



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA
MOLECULAR

**“Análisis de metilación de MLH1 y expresión de su proteína
en pacientes con y sin cáncer de ovario con inestabilidad
de microsatélites”**

TESIS

Que presenta

BIOM . MERICIA GUADALUPE SANDOVAL CHAVEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores

DR. SAÚL ARMANDO BELTRÁN ONTIVEROS
DR. ERIK RENE LIZÁRRAGA VERDUGO

Asesores

DRA. KARLA PAOLA GUTIÉRREZ CASTRO
DRA. CARLA ERNESTINA ANGULO ROJO †
DR. JAVIER ABEDNEGO MAGAÑA GÓMEZ

Culiacán, Sinaloa, México, enero de 2025



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud (CIDOCS), bajo la dirección del Dr. Saúl Armando Beltrán Ontiveros y el Dr. Erik Rene Lizárraga Verdugo y en el laboratorio de investigación del Departamento de Biología Molecular y Genómica del Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS) bajo la supervisión del Dr. José Miguel Moreno Ortiz (Profesor e investigador de CUCS). Como asesores de tesis, participaron la Dra. Karla Paola Gutiérrez Castro. Para realizar sus estudios de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular, Mericia Guadalupe Sandoval Chavez recibió una beca por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) con número (CVU) 1238571.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca que me otorgó para sostener los estudios de la maestría, a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa y al Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud (CIDOCS) por abrirme las puertas para poder llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Saúl Armando Beltrán Ontiveros, Dr. Erik Rene Lizárraga Verdugo y Dra. Karla Paola Gutiérrez Castro, por recibirme en su laboratorio, y por compartirme de sus conocimientos, además de su apoyo brindado durante toda mi estancia, y estar atentos a las necesidades académicas correspondientes.

Igualmente, agradezco a la Dra. Ana Guadalupe Ruelas Perea, por su apoyo incondicional. Es un privilegio haber coincidido, agradecida por su orientación y paciencia.

Además, agradecer al Dr. José Miguel Moreno Ortiz por el apoyo que me brindó durante mi estancia en CUCS, gracias por su orientación y conocimiento. Así mismo, me gustaría agradecer a todos los compañeros del programa del doctorado de CUCS, Anna, Miguel, Manuel, Cristal, Arturo y Daniel, que me brindaron de su paciencia y su conocimiento, haciendo que fuera más enriquecedor.

Agradezco a mis compañeras Dayane, Mariana, Yoeli, Valeria y Perla por el apoyo incondicional una a la otra a lo largo de la maestría.

Agradezco a todas las personas que formaron parte de esta etapa de mi vida, sin ustedes no hubiera podido culminar de otra manera.

DEDICATORIA

A mis padres, y hermana, por su paciencia, esfuerzo y apoyo, me permitieron cumplir esta gran meta, agradecida por estar a mi lado en todo momento, y sus palabras motivadoras me hicieron seguir adelante. A mis amistades que cuento con su apoyo incondicional, me siento muy afortunada por concluir este logro.

- Mericia Guadalupe Sandoval Chavez

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES.....	48
IV. JUSTIFICACIÓN.....	51
V. HIPÓTESIS.....	52
VI. OBJETIVOS.....	53
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
VIII. RESULTADOS	61
IX. DISCUSIÓN.....	80
X. CONCLUSIONES	90
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	91
XII. ANEXOS	105
XIII. SIGLAS Y ABREVIACIONES.....	132

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características distintivas del cáncer.	9
Figura 2. Tasa estimada de incidencia y mortalidad a nivel mundial de los tipos de cáncer, en 2022.	14
Figura 3. Estructuras anatómicas del aparato reproductor femenino.	16
Figura 4. Descripción de la anatomía del ovario.	19
Figura 5. Tasa de incidencia y mortalidad en 2022, de los distintos tipos de cáncer en mujeres en México.	21
Figura 6. Mecanismo del sistema de reparación de errores de emparejamiento.	37
Figura 7. Diagrama de la proteína MLH1.	39
Figura 8. Diagrama del gen MLH1. Posición del gen MLH1 en el cromosoma 3.	41
Figura 9. Mecanismo de metilación del ADN por ADN metiltransferasa.	43
Figura 10. Origen de las pacientes con CO incluidos en este estudio. En color rojo se destaca la ciudad de Culiacán, que ocupa el primer lugar en cuanto al origen de las pacientes, mientras que en color amarillo representa la distribución de las diferentes localidades de la república.	63
Figura 11. Corrida electroforética en 1% agarosa del ADN extraído de muestras de CO.	65
Figura 12. Corrida electroforética en 1% agarosa del ADN extraído de muestras sin CO.	65
Figura 13. Electroferograma para MSS, muestra CO029.	67
Figura 14. Electroferograma para MSI-L, muestra CO003.	68
Figura 15. Electroferograma para MSI-H, muestra CO008.	69
Figura 16. Electroferograma para MSI-H, muestra CO016.	70
Figura 17. Electroferograma para MSI-H, muestra CO017.	71

Figura 18. Porcentaje de MSI en tejido tumoral de pacientes con CO.....	73
Figura 19. Estado de los marcadores para las 5 muestras con MSI de tejido tumoral de pacientes con CO.....	73
Figura 20. Porcentaje de metilación de tejido tumoral en pacientes con CO.	75
Figura 21. Gel de agarosa al 2% que muestra el análisis de metilación del gen MLH1.	76
Figura 22. Fluorescencia relativa de MLH1 en tejido de cáncer de ovario (A) e histerectomía radical (B).....	78
Figura 23. Fluorescencia relativa de la proteína MLH1.....	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación internacional de enfermedades	6
Cuadro 2. Estadificación T	11
Cuadro 3. Estadios del cáncer.....	12
Cuadro 4. Clasificación por etapa FIGO para el cáncer de ovario, trompas uterinas y peritoneo.	25
Cuadro 5. Características clínico-patológicas de las pacientes con CO.	62
Cuadro 6. Características clínico-patológicas de pacientes sin CO.....	62

I. RESUMEN

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial y nacional, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2022, el cáncer de ovario (CO) se posicionó dentro de las primeras diez neoplasias con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial. El CO, es una enfermedad multifactorial, sus principales factores de riesgo son epigenéticos como la metilación del ADN y genéticos destacando dentro de esta, los antecedentes familiares de CO o síndrome de Lynch, pudiendo presentar variantes en genes como *MLH1*, que pueden desencadenar en un deficiente mecanismo de reparación de errores de emparejamiento (MMR) y en consecuencia la aparición de inestabilidad de microsatélites (MSI). Se ha propuesto que la MSI es una característica distintiva de numerosos tipos de cáncer ginecológicos, aunque en el CO la MSI está menos caracterizada con respecto a otros tipos de cáncer de esta estirpe. Sin embargo, este conjunto de fenómenos en CO no ha sido bien definidos. Este presente estudio proporciona el primer informe sobre MSI y metilación del gen *MLH1* en CO, ofreciendo datos valiosos para futuras investigaciones. La frecuencia de MSI se encontró en el 17% de los casos, con la mayor inestabilidad observada en los marcadores NR-21 y NR-24. La edad promedio de las pacientes fue de 48 años, el cáncer de ovario epitelial fue el tipo histológico más común. Este estudio sienta las bases para comprender la MSI en CO dentro de la población mexicana.

(Palabras clave: Cáncer de ovario, inestabilidad de microsatélites, gen *MLH1*).

ABSTRACT

Cancer is a global and national public health issue. According to data from the World Health Organization (WHO), in 2022, ovarian cancer (OC) was positioned within the first ten most incident and fatal neoplasms in the world. OC is a multifactorial disease, some of the risk factors are epigenetic such as DNA methylation, and genetic, among these factors, a family history of OC or Lynch syndrome stands out, which may present variants in genes such as MLH1, which can trigger a deficient action of the DNA mismatch repair system (MMR), resulting in the appearance of microsatellite instability (MSI). MSI has been proposed to be a hallmark of many gynecologic cancers, its characterization in OC is not as well defined compared to other gynecologic cancer, although its presence is known. This present study provides the first report on MSI and MLH1 gene methylation in OC, offering valuable data for future research. MSI frequency was found in 17% of cases, with the highest instability observed at markers NR-21 and NR-24. The mean age of the patients was 48 years, epithelial ovarian cancer was the most common histological type. This study lays the foundation for understanding MSI in OC within the Mexican population.

(Keywords: Ovarian cancer, microsatellite instability, MLH1 gene).

II. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cáncer es un importante problema de salud pública, a nivel mundial y nacional. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2022, el cáncer de ovario (CO) se posicionó dentro de las primeras diez neoplasias más incidentes y mortales en el mundo, siguiendo una tendencia muy similar en México (1).

El CO se define como una enfermedad que se origina en los ovarios, trompas uterinas y peritoneo, estructuras anatómicas y funcionalmente relacionadas. Es una afección multifactorial, influenciada por factores epigenéticos y genéticos (2).

Dentro de los factores genéticos, destacan los antecedentes familiares con CO o síndrome de Lynch. Además, pueden existir variantes en genes como MLH1 (MutL homólogo 1) que pueden desencadenar un deficiente mecanismo de reparación de errores de apareamiento del ADN o MMR (Mismatch Repair, por sus siglas en inglés) y, en consecuencia, la aparición de inestabilidad de microsatélites (MSI) (3). La MSI se ha identificado como vía de tumorigénesis que hace referencia a una capacidad hipermutable de las células y un alto nivel de MSI se asocia con un aumento de la tasa de mutación (4).

Se ha descrito que pacientes con deficiencias en el sistema MMR (dMMR) pueden desarrollar tumores con una tasa de mutabilidad aproximadamente 1,000 veces mayor que aquellos con las vías del sistema intactas, además las células con dMMR suelen ser resistentes a la muerte inducida por varios agentes quimioterápicos importantes (5).

La proteína MLH1 se compone de 756 aminoácidos y tiene un peso molecular de 84.60 kDa aproximadamente. Esta proteína es codificada por el gen del mismo nombre, ubicado en 3p22.2 y que consta de 19 exones (6).

MLH1 ha sido ampliamente estudiada en relación con la carcinogénesis colorrectal, principalmente en individuos con síndrome de Lynch. Las mutaciones de MLH1 también se relacionan con cáncer de endometrio. Sin embargo, su análisis y caracterización en CO aún es escasa (7).

En este sentido, se ha propuesto que la MSI es una característica distintiva de numerosos tipos de cáncer ginecológicos, sin embargo, hasta ahora estos tipos de cáncer con dMMR/MSI no están bien caracterizados y los marcadores para la detección de MSI en cánceres ginecológicos, incluido el CO, se encuentran pobremente definidos (8).

Lo que pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo investigaciones enfocadas en dichas variables con el objetivo de elucidar estas incógnitas y su relevancia en el cáncer de ovario.

A. CÁNCER

De acuerdo con la OMS, el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células malignas, capaz de desarrollarse en cualquier tejido del organismo y abarca a un grupo extenso y heterogéneo de enfermedades que desencadenan en una patología común, lo que conduce al deterioro de los órganos vitales formados por las células afectadas y, finalmente a la muerte del individuo (9).

El cáncer se caracteriza por alteraciones en los protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación, producidas por modificaciones epigenéticas o codificadas en línea germinal. Como resultado de estos cambios, las células afectadas adquieren la capacidad de ser autónomas, evadir la respuesta inmunológica y generar metástasis. Muchos de estos cambios genéticos son causados por la exposición ambiental, química, física y biológica, que aumentan la susceptibilidad de padecer cáncer y modifican el perfil epidemiológico de cada país o región (10).

B. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER

El cáncer se clasifica de dos maneras: según el tipo de tejido en el que se origina, lo que se conoce como clasificación histológica, y según el sitio en el cual se desarrolló por primera vez, es decir, su ubicación primaria. La clasificación internacional de enfermedades para oncología, en su tercera edición (ICD-O-3), indica que el cáncer se clasifica en seis categorías importantes, las cuales son carcinoma, sarcoma, mieloma, leucemia, linfoma y tipos mixtos (ver Cuadro 1). La clasificación es fundamental en el diagnóstico y tratamiento, para determinar el tipo, el estadio y las características moleculares del cáncer. Además, comprender el estadio y las características moleculares permite un tratamiento personalizado y efectivo, para mejorar los resultados de pacientes (11).

Cuadro 1. Clasificación internacional de enfermedades

Clasificación internacional de enfermedades para oncología (CIE-O)

<i>1. Carcinoma</i>	Neoplasia maligna de origen epitelial.
<i>1.1 Adenocarcinoma</i>	Se desarrolla en un órgano o glándula.
<i>1.2 Carcinoma de células escamosas</i>	Se origina en epitelio escamoso.
<i>2. Sarcoma</i>	Se origina en los tejidos de soporte y conectivos, como los huesos, tendones, cartílagos y músculos.
<i>3. Mieloma</i>	Se origina en las células plasmáticas de la médula ósea.
<i>4. Leucemia</i>	Se origina en la médula ósea.
<i>5. Linfoma</i>	Se originan en nódulos del sistema linfático.
<i>6. Tipos mixtos</i>	Están dentro de una categoría o de diferentes categorías.

Tomada de ICD-O (11).

C. CARCINOGENESIS

La carcinogénesis es el proceso en el que una célula sana se condiciona a cambios funcionales y morfológicos, convirtiéndose en una célula cancerosa; además, adquieren la capacidad de migrar hacia otros tejidos mediante metástasis (12).

Este proceso tiene tres etapas, las cuales son iniciación, promoción y progresión. Durante la iniciación, un agente carcinógeno interactúa con la célula para producir una alteración en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Esta célula dañada desarrolla la capacidad de crecimiento individual. En condiciones normales, las células tienen la capacidad de reparar el ADN dañado. Sin embargo, cuando una célula se divide y replica su ADN antes de ser reparado el daño, dicha alteración se hereda a las células hijas. La célula mutada puede permanecer latente durante un periodo de tiempo, que puede ser desde meses o hasta años. Se necesita de un estímulo promotor para que se desarrolle el cáncer (13).

Durante la promoción, los agentes específicos llamados promotores, que pueden ser sustancias como compuestos químicos, hormonas o radiación ultravioleta (UV), estimulan la proliferación de la célula mutada, promoviendo la proliferación y, favoreciendo el desarrollo tumoral, aunque en esta fase no son células malignas por sí mismas. Su rápida división aumenta el riesgo de acumulación de mutaciones, lo que lleva a la progresión del cáncer (12).

La progresión es la última etapa en el proceso de carcinogénesis, mediante el cual las células tumorales benignas se convierten en malignas y comienza el desarrollo del cáncer, van adquiriendo características distintivas de una célula cancerígena, como la capacidad de invadir otros tejidos y diseminarse a otras zonas del cuerpo a través de metástasis (13).

D. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DEL CÁNCER

La transformación de una célula normal a cancerosa es un proceso complejo, adquieren diversas capacidades que les permiten convertirse en tumores malignos. A estos rasgos se les denomina “características distintivas del cáncer”. En el año 2000, Robert Weinberg y Douglas Hanahan describieron estas características con el fin de comprender mejor su complejidad (Ver Figura 1) (14).

A continuación, se mencionan estas características: 1) mantenimiento de la señalización proliferativa: las células tumorales mantienen señales que promueven su proliferación, incluso en la ausencia de señales externas que regularían este proceso; 2) evasión de señales que inhiben el crecimiento: las células cancerígenas ignoran las señales anticrecimiento, lo que permite que las células tumorales crezcan sin control; 3) capacidad de división ilimitada: permite que las células tumorales eviten los mecanismos normales de regulación de crecimiento y continúen dividiéndose indefinidamente, formando tumores grandes e invasivos; 4) evasión de apoptosis: Las células son capaces de evitar el proceso normal de muerte celular programada, conocido como apoptosis. Este mecanismo ayuda a mantener la homeostasis tisular al eliminar células dañadas; 5) inducen la angiogénesis: existe estimulación en el crecimiento de vasos sanguíneos que beneficia al tumor, suministrando oxígeno y nutrientes, lo que facilita su crecimiento; 6) invasión y metástasis: son mecanismos importantes en la progresión del cáncer, donde las células malignas se propagan desde su sitio de origen a otras partes del cuerpo (14). 7) Inestabilidad genómica: es resultado de mutaciones en los genes reparadores del ADN, y se relaciona con el desarrollo del cáncer. La inestabilidad genómica incluye pequeñas variaciones estructurales como la inestabilidad de microsatélites (MSI), así como variaciones estructurales significativas como inestabilidad cromosómica (CIN) (15).

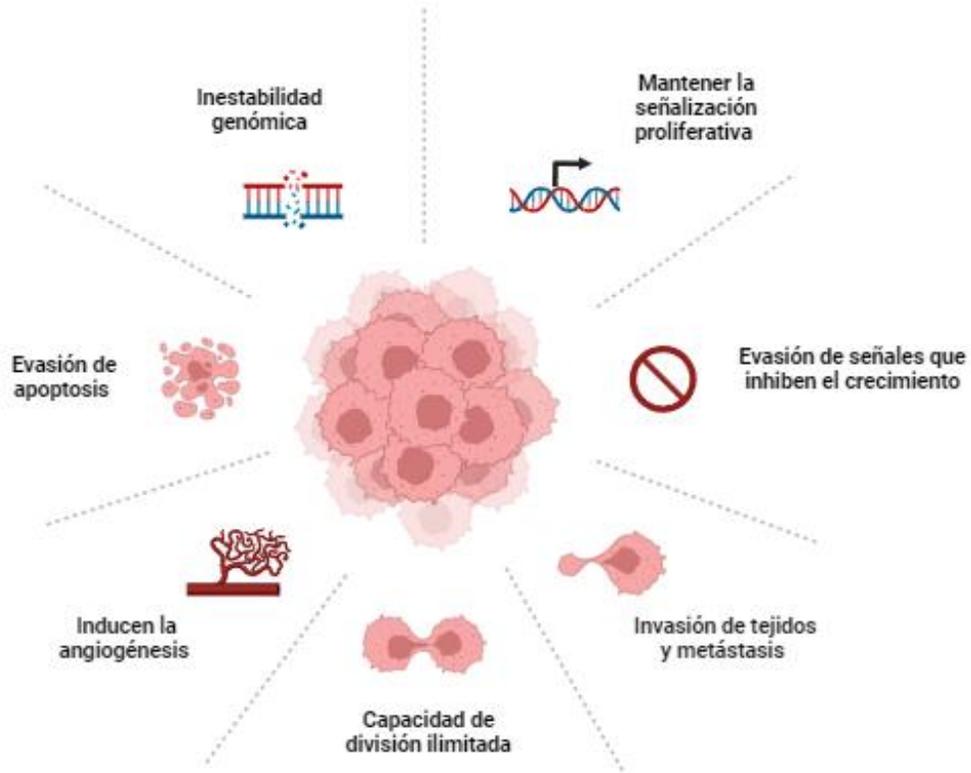


Figura 1. Características distintivas del cáncer.

En el año 2000 Robert Weinberg y Douglas Hanahan, propusieron siete características distintivas del cáncer. Modificada de Hanahan (14).

Otra alteración importante del cáncer es el metabolismo de la glucosa en las células cancerosas, llamado efecto Warburg, que le permite la adaptación metabólica de las células cancerosas para crecer, sobrevivir y proliferar. El metabolismo de la glucosa permite aprovechar la energía en forma de ATP en las células normales, la producción de energía es a través del ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa. Pero en las células cancerosas estas no son las vías de producción de energía, sino que, a través de la glucólisis aeróbica, la cual es la característica común de este efecto debido al aumento de la captación de la glucosa y fermentación de la glucosa a lactato (16).

E. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER

La estadificación del cáncer es un sistema que clasifica el alcance y severidad de la enfermedad, facilitando el pronóstico y elección de tratamiento. El sistema de estadificación que describe el tamaño del tumor (T), si el cáncer se ha propagado a ganglios linfáticos cercados (N) y si se ha propagado a otras zonas del cuerpo, es decir metástasis (M), fue desarrollado por el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés), y la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC, por sus siglas en inglés). El sistema TNM clasifica los diferentes tipos de cáncer de acuerdo con ciertos criterios, seguido de cada estadificación puede tener un número o letra (ver Cuadro 2) que ayuda a proporcionar información adicional del tumor (17).

Cuadro 2. Estadificación T

TX	No hay información sobre el tumor, o no se puede medir.
T0	Se refiere a que no hay evidencia de un tumor.
Tis	Tumor “ <i>in situ</i> ”.
T1-T4	Describe la ubicación y el tamaño del tumor, en una escala de 1 a 4.
N0	El cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo.
N1	El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.
M0	El cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo.
M1	El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

Tomada de AJCC (17).

El sistema TNM permite agrupar a los pacientes en estadios del I al IV, lo cual permite determinar el pronóstico y tratamiento del paciente (ver Cuadro 3) (18).

Cuadro 3. Estadios del cáncer

Estadio I	Tumor “ <i>in situ</i> ”.
Estadio II	El cáncer no ha crecido en los tejidos cercanos, ni se ha propagado.
Estadio III	El cáncer ha crecido en tejidos cercanos, es posible que se haya propagado a ganglios linfáticos, pero no a otras partes del cuerpo.
Estadio IV	El cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo, (metástasis).

Tomada de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (18).

F. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

Reportes en la base de datos del Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN) de la OMS a través de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) indican que los 10 tipos con mayor impacto para el año 2022 fueron el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón, el cáncer colorrectal, el cáncer cervicouterino, el cáncer de estómago, el cáncer de tiroides, el cáncer de hígado, el cáncer uterino y el CO, siendo el CO el décimo tipo más común y el octavo en lo que se refiere a la mortalidad (ver Figura 2). Se registraron a nivel mundial 324,603 casos de CO con una incidencia de 6.7%. También se notificaron 206,956 muertes por CO con una mortalidad del 4.0 % (1).

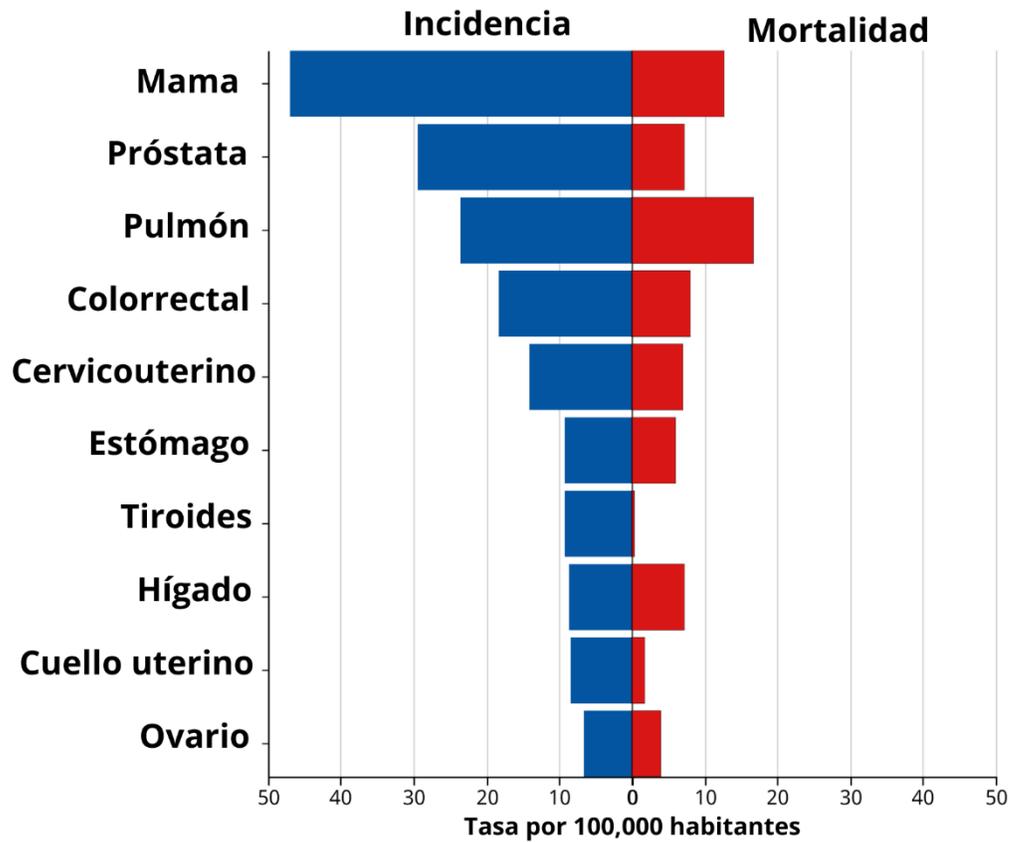


Figura 2. Tasa estimada de incidencia y mortalidad a nivel mundial de los tipos de cáncer, en 2022.

Modificada de GLOBOCAN (1).

APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

El aparato reproductor femenino, que comprende los ovarios, las trompas uterinas, el útero y la vagina (ver Figura 3) desempeña un papel importante en la regulación hormonal y en la reproducción, donde cada uno tiene funciones específicas (19). A continuación, se presentan las principales características y funciones de estos órganos.

Vagina

Es una estructura tubular fibromuscular de 7 a 10 cm de longitud, que tiene múltiples funciones: es un canal para que el fluido y tejido menstrual salgan de la cavidad uterina, además brinda protección contra patógenos dañinos a través de pH ácido y flora local, es un canal para el parto (20).

Trompas uterinas

Son conductos que tienen una longitud aproximada de 12 cm. Su función es el transporte del óvulo desde el ovario hasta el útero para su implantación. La fecundación del óvulo por el espermatozoide tiene lugar en la región de la ampolla de la trompa uterina (19).

Útero

Es un órgano hueco, con forma de pera, ubicado sobre la vejiga y anterior del recto. El útero nutre al óvulo fecundado, y se implanta en el endometrio, a medida que va creciendo el embrión, el útero se expande. Durante el parto, el útero se contrae a medida que el cuello del útero se dilata y da lugar al nacimiento del bebé (19).

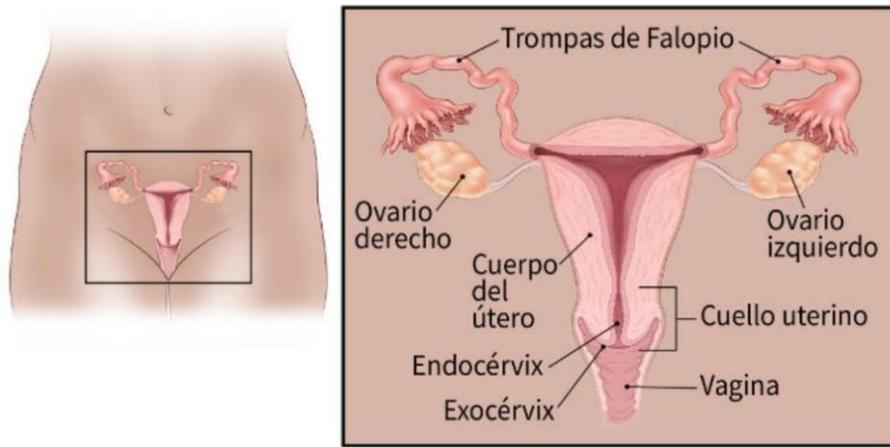


Figura 3. Estructuras anatómicas del aparato reproductor femenino.

Modificado de American Cancer Society (21).

Ovarios

Los ovarios son glándulas reproductoras femeninas encargadas de producir las hormonas y los óvulos necesarios para la reproducción. Están ubicados en el área pélvica, uno a cada lado del útero. Del mismo modo, cuentan con dos trompas uterinas, un par de conductos largos y delgados que están a cada lado del útero por los que los óvulos se desplazan hacia el útero, sitio donde el óvulo una vez fertilizado se establece y permite el desarrollo de un feto. Por otro lado, el peritoneo es el tejido que recubre los órganos en la cavidad abdominal (21).

Típicamente, un ovario mide 2.0 cm de ancho, 3.5 cm de largo y 1.0 cm de grosor. Está formado por epitelio cuboide simple, se le denomina epitelio superficial, el cual recubre al ovario. Debajo de esta capa hay un tejido conectivo compuesto de colágeno al cual se le denomina túnica albugínea. La siguiente zona contiene los folículos ováricos y se le denomina corteza. La región más interna se le denomina médula, formada por tejido conectivo laxo y que contiene vasos sanguíneos, a esta región se le denomina hilio (ver Figura 4) (22).

1. Fisiología del ovario

Los ovarios secretan hormonas esenciales, como el estrógeno y la progesterona. Estas hormonas desempeñan un papel crucial en el desarrollo de las características sexuales femeninas durante la pubertad y en la regulación del ciclo menstrual (20). Además, producen células sexuales femeninas, llamadas óvulos, mediante el proceso de ovogénesis, el cual sucede en el embrión femenino antes del nacimiento, y termina su maduración hasta la pubertad. La hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) son fundamentales en el proceso de ovogénesis, estas hormonas son producidas por la glándula pituitaria. (22).

La FSH estimula el reclutamiento de folículos y promueve su crecimiento, además, se encarga de la producción de estrógeno, mientras que la LH es encargada de la ovulación y participa en la formación del cuerpo lúteo, que es una estructura temporal que produce progesterona, preparando al óvulo para su posible implantación. El equilibrio de estas hormonas es fundamental para una reproducción exitosa (23).

En las primeras etapas del desarrollo fetal, las células germinales primitivas de los ovarios se diferencian en ovogonias, inician su división y dan origen a los ovocitos primarios. Durante el desarrollo embrionario, los ovocitos comienzan la primera división meiótica, y se detiene en profase, permaneciendo en esa etapa y termina su desarrollo hasta la pubertad (24).

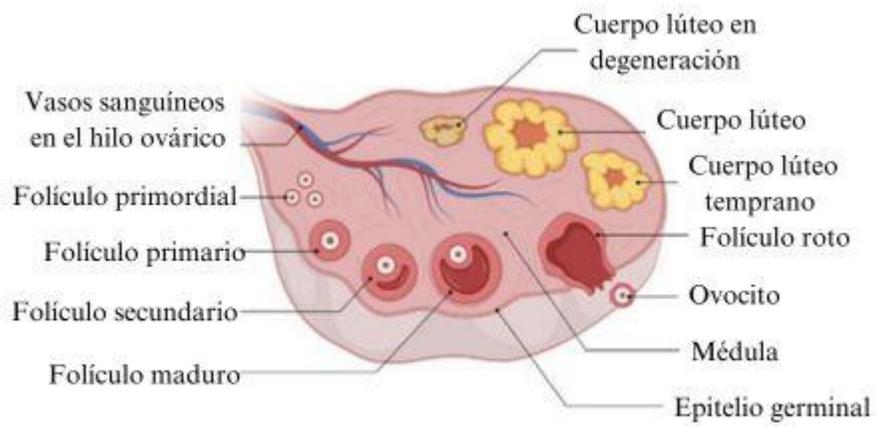


Figura 4.Descripción de la anatomía del ovario.

Modificada de ACS (21).

Las patologías que afectan a estos órganos pueden tener un impacto significativo en la salud, debido a determinadas condiciones como desequilibrios hormonales, factores ambientales o mutaciones genéticas. Una de las patologías más mortales es el cáncer de ovario, que se denomina asesino silencioso debido a que sus síntomas no son específicos y se confunden con distintas afecciones menos graves.

G. CÁNCER DE OVARIO

El cáncer de ovario es un grupo de enfermedades que se originan en los ovarios o en las áreas vinculadas de las trompas uterinas y el peritoneo (2). El CO es el más mortal de todos los tipos de cáncer ginecológicos, ya que la mayoría de los casos se diagnostican en un estadio avanzado, lo que se asocia a una baja tasa de supervivencia de la paciente (25).

2. Epidemiología del cáncer de ovario

A nivel mundial, el CO es el tercer cáncer ginecológico más frecuente, con un 3.4% de incidencia en el año 2020, seguido del cáncer de cuello uterino y cáncer de cuerpo uterino. Respecto a la situación en México, en el año 2020, el CO representó el sexto tipo de cáncer más común entre las mujeres mexicanas de todas las edades con un registro de datos de 4,963 mujeres, lo que representa el 4.7 % (ver Figura 4) y, del mismo modo, fue la sexta causa de muerte por cáncer en dicho grupo poblacional con un registro de datos de 3,083 mujeres, lo que representa el 6.6 % (ver Figura 5) (1).

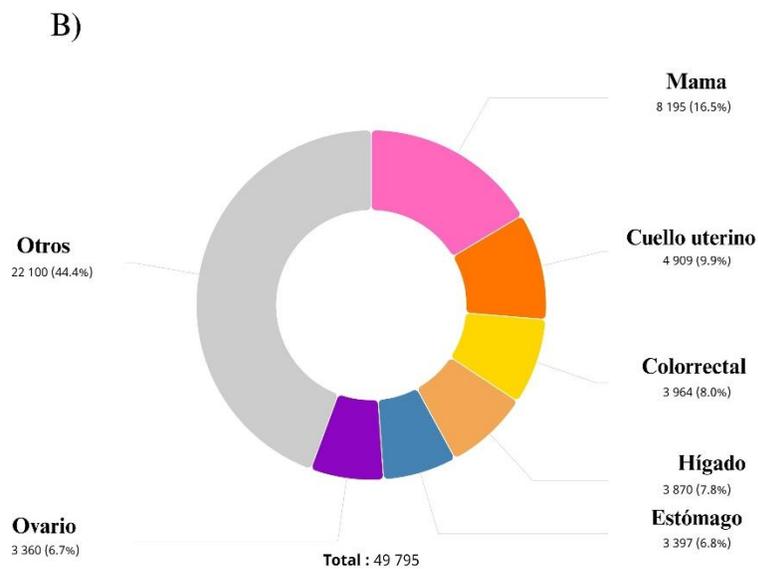
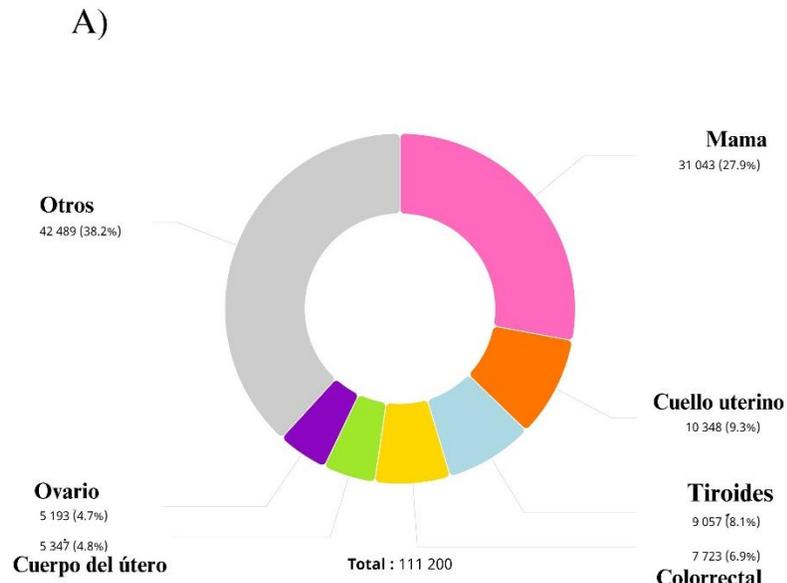


Figura 5. Tasa de incidencia y mortalidad en 2022, de los distintos tipos de cáncer en mujeres en México.

A) Muestra la incidencia en todas las edades en México. B) Mortalidad de todas las edades en México. Extraído de Global Cancer Observatory (1). 5

En la última década, se ha mostrado un aumento anual de entre el 1 al 2% en la prevalencia del CO, esta tendencia al alza se puede atribuir en gran medida al envejecimiento de la población, como otros elementos como los cambios en el estilo de vida o el aumento a la exposición ambiental (26).

Dicho aumento resalta la necesidad urgente de profundizar en el estudio del CO, con el fin de desarrollar herramientas más eficaces para el diagnóstico y tratamiento, que ayuden a mejorar la calidad de vida de las pacientes (27).

H. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL CÁNCER DE OVARIO

La Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) respalda la clasificación histológica de la OMS en CO, clasifica los tumores de ovario en dos grandes grupos, según sus características histológicas: en tumores epiteliales de ovario y no epiteliales de ovario. Los diferentes tipos de cáncer de ovario se nombran de acuerdo con las células que derivan (28).

1. Tumores no epiteliales de ovario

a. Cáncer de células germinales

Es un tumor poco frecuente, se derivan de las células germinales del ovario. Estos tumores pueden ser cancerosos o no cancerosos. Las características histopatológicas de estos tumores varían según el tipo de tumor que puedan incluir, como teratomas que tienen la presencia de elementos como hueso, cartílago o músculo (18).

b. Cáncer de células estromales

Son tumores raros, que se desarrollan en las células estructurales de tejido conectivo de los ovarios, que producen hormonas femeninas como estrógeno y progesterona.

Son heterogéneos, ya que cada subtipo de CO es único en morfología, su comportamiento biológico, incluso el pronóstico (19).

Tumor epitelial de ovario

a. Cáncer de ovario epitelial

El CO más común es el de origen epitelial (EOC por sus siglas en inglés) con un 80% de incidencia. El EOC se desarrolla en el tejido epitelial, que recubre el exterior del ovario (23).

Los subtipos histológicos del cáncer epitelial de ovario son:

b. Carcinoma seroso

El carcinoma seroso de ovario es el subtipo más común de carcinoma de ovario, se presenta como carcinoma de bajo grado (LGSC) o de alto grado (HGSC) (29).

Los siguientes son subclasificaciones de carcinoma seroso:

Carcinoma seroso de bajo grado

Se caracteriza por un estadio tardío en el momento del diagnóstico. El LGSC muestra una atipia mínima en el núcleo, raramente mitosis y defectos moleculares que también son menores (30).

Carcinoma seroso de alto grado

Es el subtipo más común, generalmente se presenta en un estadio avanzado. Presenta atipia nuclear más significativa y mitosis con mayores defectos moleculares (29).

c. Carcinoma endometriode

Este subtipo se relaciona con la endometriosis, donde las células endometriales crecen fuera del útero, suele ser de bajo grado y rara vez en estadio avanzado (20).

d. Carcinoma de células claras

Se diagnostica con mayor frecuencia en mujeres jóvenes y se suele detectar en etapas tempranas. Presentan aclaramiento celular, un patrón de crecimiento de tipo quístico y además un patrón de desarrollo típico en forma de uña. En estadio avanzado se asocia con una baja tasa de supervivencia (31).

e. Carcinoma mucinoso

Es un subtipo poco común de EOC. Forma macroscópicamente quistes multiloculares y diámetro del tumor superior a 10 cm. En este cáncer las células crecen, se llenan de líquido y tienen una apariencia espumosa, los tumores están formados por células cancerosas cubiertas de moco (22).

f. Tumores de Brenner

Son poco frecuentes y representan menos del 1% de las neoplasias malignas epiteliales (23).

Se ha supuesto que el desarrollo de cáncer en las trompas uterinas es raro, sin embargo, evidencia molecular, histológica y genética ha demostrado que hasta el 80% de los cánceres que se clasifican como carcinomas serosos de alto grado de ovario o peritoneo pueden haber tenido origen en el extremo fimbrial de las trompas uterinas (18).

El cáncer de ovario, de las trompas uterinas y peritoneales deben clasificarse quirúrgicamente, y se debe determinar su estadio, para determinar el pronóstico del paciente. Los tumores extrauterinos con su histología serosa que surgen en ovario, trompas uterinas o el peritoneo se describen como carcinomas serosos pélvicos o carcinomas mullerianos (31).

I. ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE OVARIO

La clasificación del cáncer de ovario y los diferentes subtipos se dan en función del sitio de origen y por sus características histológicas (28).

En el año 2014, el Comité de Oncología Ginecológica de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, (FIGO, por sus siglas en inglés), revisó la estadificación para incorporar el cáncer de ovario (ver Cuadro 4) de las trompas uterinas y peritoneal en el mismo sistema (18).

Cuadro 4. Clasificación por etapa FIGO para el cáncer de ovario, trompas uterinas y peritoneo.

<i>Estadio</i>	<i>Descripción de la etapa</i>
<i>Estadio I</i>	Tumor limitado a los ovarios.
<i>Estadio IA</i>	Tumor limitado a un ovario, sin ascitis, sin tumor en la superficie del ovario, y con la cápsula de ovario intacto.
<i>Estadio IB</i>	Tumor limitado a ambos ovarios, sin ascitis, sin tumor en la superficie del ovario, y con la cápsula de ovario intacta.
<i>Estadio IC</i>	Tumor limitado a uno o ambos ovarios, con alguna de las siguientes características:
<i>IC1</i>	Derrame quirúrgico.
<i>IC2</i>	Tumor en la superficie del ovario.
<i>IC3</i>	Células malignas en la ascitis.
<i>Estadio II</i>	El tumor afecta a uno o ambos ovarios con extensión pélvica.
<i>Estadio IIA</i>	Extensión al útero o a las trompas uterinas.
<i>Estadio IIB</i>	Extensión a otros tejidos pélvicos.
<i>Estadio III</i>	El tumor afecta a uno o ambos ovarios, con afectación fuera de la pelvis y/o en la metástasis o a los ganglios linfáticos.
<i>IIIA1</i>	Tumor con afectación solo en ganglios retroperitoneales.
<i>IIIA1(i)</i>	Metástasis de hasta 10 mm en su mayor distensión.
<i>IIIA1(ii)</i>	Metástasis de más de 10 mm en su mayor distensión.
<i>Estadio IIIA2</i>	Tumor con implantación de 2 cm o menos fuera de la pelvis, con o sin ganglios retroperitoneales afectados.

<i>Estadio IIIB</i>	Metástasis peritoneal más allá de la pelvis hasta 2 cm o más, fuera de la pelvis, con o sin ganglios retroperitoneales afectados.
<i>Estadio IIIC</i>	Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis de más de 2 cm, con o sin metástasis en los ganglios linfáticos retroperitoneales.
<i>Estadio IV</i>	Presencia de metástasis a distancia.
<i>Estadio IVA</i>	Derrame pleural con células neoplásicas.
<i>Estadio IVB</i>	Metástasis a órganos extra abdominales (incluidos ganglios inguinales y ganglios linfáticos fuera de la cavidad abdominal).

Tomada de FIGO (18).

J. SINTOMATOLOGÍA DEL CÁNCER DE OVARIO

El CO es conocido como una enfermedad silenciosa debido a que sus síntomas suelen ser poco específicos, lo que facilita su confusión con otros padecimientos. En la mayoría de los casos, los signos de alarma aparecen cuando la enfermedad ya ha alcanzado etapas avanzadas.

La Fundación Ginecológica de Cáncer, la Sociedad Oncológica de Ginecología y la Sociedad Americana del Cáncer publicaron una declaración de consenso sobre los síntomas del CO, la declaración recomienda que una mujer que presente la sintomatología casi a diario durante más de unas pocas semanas visite a su médico, con el objetivo de una evaluación para brindar un diagnóstico más temprano de cáncer de ovario (32).

Dentro de la sintomatología característica puede destacarse: sangrado o secreción vaginal anormal (especialmente postmenopáusica o alteraciones en el ciclo menstrual); dolor durante las relaciones sexuales; dolor y/o presión en zona pélvica; dolor abdominal; dolor de espalda; hinchazón generalizada; alteraciones en los hábitos miccionales (dificultad para comer o sensación de saciedad precipitada); cambios en los hábitos de ir al baño (necesidad de orinar con mayor frecuencia o urgencia y/o estreñimiento); pérdida de peso sin motivo aparente combinada con hinchazón abdominal, por mencionar algunos. El reconocimiento de los síntomas da como resultado la detección del CO en una etapa más temprana, aumentando la tasa de supervivencia (28).

K. DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE OVARIO

La detección en etapa temprana del CO es la única manera de lograr una alta tasa de supervivencia. Lamentablemente, hasta el momento no hay ninguna estrategia eficaz de diagnóstico temprano del CO. Su baja prevalencia, la baja especificidad y la alta tasa de falsos positivos son limitaciones para su detección. El análisis de sangre del antígeno del cáncer 125 (CA-125) tiene una baja especificidad, debido a que puede producir falsos positivos en mujeres sin CO, en muchas afecciones como endometriosis o quistes ováricos benignos, que pueden elevar los niveles de CA-125. Por lo tanto, no es una prueba definitiva para CO (33).

La evaluación diagnóstica se guía por la sintomatología presente, y por la evaluación de factores de riesgo, incluidos antecedentes oncológicos (34).

El diagnóstico del CO suele ser tardío, de hecho, solo alrededor del 20% de los casos de este cáncer se detectan en un estadio temprano. Pero es de suma importancia revertir esta situación, ya que, si el CO logra diagnosticarse en estadios iniciales, aproximadamente 94% de las pacientes viven más de 5 años después del diagnóstico (21).

Las pruebas diagnósticas para el cáncer de ovario incluyen:

Examen físico: Las pacientes con síntomas se deben someter a un examen físico, donde se examina el abdomen y se comprueba si alguno de sus ganglios linfáticos está agrandado.

Ecografía transvaginal (TVUS): Ecografía realizada con un instrumento especial que se introduce por la vagina, le ayuda al medir a examinar la anatomía de los ovarios. Si bien la TVUS detecta tumores grandes y cambios estructurales en los ovarios, no distingue masas benignas o malignas (33).

Tomografía computarizada y resonancia magnética de la pelvis: Son herramientas de diagnóstico por imágenes avanzadas que evalúan la extensión de tumores ováricos, aunque tienen especificidad limitada al momento de distinguir lesiones benignas o malignas (35).

Inicialmente, se utiliza una combinación de pruebas diagnósticas no invasivas para evaluar si se sospecha de CO. Debido a su naturaleza invasiva, la biopsia es el método definitivo para confirmar la presencia de cáncer, aunque no suele ser la primera prueba diagnóstica.

Biopsia: Procedimiento en donde se extrae una parte de tejido tumoral y se examina en el laboratorio (21).

Generalmente se realiza cuando se ha identificado una masa ovárica en un estudio por imágenes. Es muy precisa para diagnosticar el CO, sin embargo, es invasiva y normalmente se utiliza después de que otros métodos de diagnóstico lo sugieren (29).

L. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE OVARIO

Las decisiones sobre el tratamiento del cáncer de ovario se basan en la histología y el estadio de la enfermedad. El abordaje terapéutico incluye la extirpación quirúrgica del tumor, quimioterapia y terapias dirigidas. En las etapas tempranas, la enfermedad es curable hasta en el 90% de los casos; sin embargo, lamentablemente, la mayoría de los diagnósticos se realizan en etapas avanzadas (36).

La tasa de supervivencia general del CO varía significativamente según la etapa de diagnóstico. Para las mujeres diagnosticadas en estadio III, la tasa de supervivencia es de aproximadamente el 39%, mientras que para el estadio IV es de aproximadamente es del 20%. Estas cifras subrayan la importancia crítica de la detección temprana, ya que permite mejorar los resultados de las pacientes al proporcionar una intervención oportuna. Un diagnóstico temprano facilita el acceso a tratamiento más efectivo como cirugía o quimioterapia, que mejora el pronóstico. Por lo tanto, es esencial crear conciencia sobre la importancia del diagnóstico temprano (26).

Para realizar una cirugía, es importante clasificar la etapa del cáncer y realizar la cirugía cito reductora, la cual es la base importante para extirpar todos los tumores. Para conocer la ubicación del CO, se realizan estudios por imágenes para resaltar los tumores visualmente (20). La intervención quirúrgica puede ir acompañada de quimioterapia, la cual es un tratamiento que ayuda a eliminar las células cancerosas que aún pueden estar presentes después de la cirugía (37).

La terapia dirigida utiliza medicamentos para atacar a las células cancerosas, se utilizan diferentes clases de medicamentos, uno de ellos son los inhibidores de la angiogénesis, para evitar que los tumores cancerosos crezcan y se propaguen. Los inhibidores de la enzima poli

ADP ribosa polimerasa (PARP) son medicamentos que ayudan a reparar el ADN dañado. Los medicamentos dirigidos al alfa receptor de folato son otra opción para tratar el cáncer de ovario, ya que, en muchos cánceres de ovarios, las células presentan niveles elevados de la proteína receptor de folato en las superficies. Elegir el tratamiento adecuado para cada paciente es difícil, y el tratamiento dependerá de acuerdo con su tipo y estadio del cáncer (35).

M. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL CÁNCER DE OVARIO

El CO es una enfermedad multifactorial, donde los antecedentes familiares son el principal factor de riesgo. Otros factores asociados, como la edad, la genética y el historial reproductivo, también contribuyen a su incidencia. Estos elementos son clave para identificar y predecir a pacientes con mayor riesgo, facilitando su detección temprana y el diseño de estrategias preventivas (38).

Edad avanzada

La mayoría de las mujeres con CO son diagnosticadas después de la menopausia. La edad avanzada al momento del diagnóstico se asocia con un peor pronóstico y una menor tasa de supervivencia. La edad media de diagnóstico se sitúa entre 50 y 65 años (39).

Tratamiento hormonal después de la menopausia

Las mujeres que usan estrógenos solos o con progesterona después de la menopausia tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario, en comparación con las mujeres que no han tomado hormonas (27).

Nuliparidad

El riesgo de CO es un 24% mayor entre las mujeres nulíparas en comparación con las mujeres que solo tienen un hijo. La explicación sobre esta relación se ha enfatizado en el papel de los factores endocrinos y metabólicos (20).

Factores genéticos

Mutaciones en genes específicos y alteraciones en vías moleculares, incluido el sistema de reparación de errores de emparejamiento (MMR), desempeñan un proceso importante en el desarrollo y progresión de CO. Estas mutaciones pueden ser resultado de factores genéticos o factores ambientales que aumentan el riesgo de desarrollo de cáncer. El silenciamiento de genes hace referencia a que un gen se inactiva o se suprime su expresión sin un cambio

en la secuencia de ADN. Algunos mecanismos clave del silenciamiento es la metilación de la región promotora, que ocurre típicamente en las islas CpG (38).

Antecedentes familiares de CO

El antecedente familiar de CO constituye un factor de riesgo significativo en la predisposición a desarrollar este tipo de cáncer. Las personas con familiares que han sido diagnosticadas con CO presentan un mayor riesgo en comparación con la población en general. En muchos casos este riesgo se asocia en mutaciones de genes relaciona con la reparación del ADN como MLH1 (39).

N. ASPECTOS MOLECULARES DEL CÁNCER DE OVARIO

El CO es causado por alteraciones genéticas, relacionadas con la herencia o síndrome de cánceres hereditarios, que provocan cambios en la reparación del ADN; esto es debido a la acumulación de daño genético a lo largo de la vida.

El síndrome de Lynch (SL): De carácter autosómico dominante que se produce debido a mutaciones de línea germinal en genes de reparación de errores de emparejamiento (MMR) y se asocia principalmente con cáncer colorrectal, de endometrio y de ovario (40).

Estos genes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, y *PMS2*) son genes supresores de tumores implicados en la reparación de errores que suceden durante la replicación del ADN.

Las mutaciones en *MLH1* y *MSH2* representan el 90% de los casos de SL, las mutaciones en *MSH6* y *PMS2* ocurren entre el 7% y el 10% (41).

El genoma de todos los organismos está en constante contacto con agentes químicos y físicos exógenos tales como humo del cigarro, la luz ultravioleta, agentes carcinógenos ambientales, así como agentes endógenos como errores en la replicación del ADN, todos estos factores pueden dañar el ADN (42).

Las células responden al daño del ADN, poniendo en marcha a un conjunto de vías de señalización para la detección de lesiones, y realizan la reparación de daños (DDR). Las alteraciones en estas vías están asociadas con el desarrollo de cáncer, incluido el CO. De acuerdo con el tipo de lesión del ADN, se determina el mecanismo de reparación (43).

1. Sistemas de reparación del ADN

Reparación por escisión de bases (BER): Este sistema participa en la reparación del ADN causado por eventos oxidativos, derivados de la alquilación celular y despurinizaciones espontáneas (44).

Reparación por escisión de nucleótidos (NER): Este sistema participa en la reparación de lesiones que se producen por la radiación UV y agentes mutagénicos.

Recombinación homóloga (HR): Este sistema repara los daños que son generados por agentes físicos, químicos y radicales libres (45).

Reparación de errores de emparejamiento (MMR):

El sistema MMR (Mismatch Repair) corrige errores de emparejamiento espontáneos entre bases nitrogenadas generados por fallas en la replicación del ADN, es uno de los guardianes más importantes que mantienen la integridad del genoma. Los defectos en el MMR aumentan la tasa de mutación en la célula y provocan alteraciones en la longitud de los microsatélites, un fenómeno conocido como inestabilidad de los microsatélites (MSI) (42).

Los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6* y *PMS2*, a través de las proteínas que codifican (del mismo nombre), son los principales mediadores de la actividad de este sistema (46).

En síntesis, el accionar de MMR implica una interacción compleja de sus propias proteínas con la maquinaria de replicación y/o recombinación para evitar que errores de apareamiento sean heredados. El sistema MMR (ver Figura 6) se encarga de identificar, señalar y reparar bases mal apareadas, principalmente en microsatélites, los cuales son secuencias altamente repetidas en tándem, de 2 a 6 nucleótidos repetidos (10-50 veces) que se distribuyen ampliamente por todo el genoma humano, tanto en regiones codificantes como no codificantes. Su naturaleza altamente repetitiva hace que sean propensos a errores de replicación, que normalmente son reparados por el sistema MMR (47).

En células eucariotas, el sistema MMR está vinculado con los pasos de reconocimiento, eliminación y síntesis de ADN de *E.coli*. El sistema MMR se conforma de MLH1, la cual es homóloga 2 de la proteína MutS (MSH2), el homólogo 6 de MutS (MSH6) y el homólogo 2 de PMS1 (PMS2) son las proteínas que participan como heterodímeros (48).

Los nombres de las proteínas reflejan la homología con el sistema de *E.Coli*, la abreviación de MSH, deriva de MutS Homólogo, mientras que MLH se deriva de MutL, es decir MutL Homólogo de *E.Coli*. El primer heterodímero en participar está formado por la proteína MSH2, junto con MSH6, se convierten en abrazaderas deslizantes en la cadena de ADN, se deslizan hasta que reconocen bases mal apareadas. Posteriormente, se une al complejo MLH1/PMS2 que ayuda con la degradación del fragmento de la secuencia de ADN dañada. La unión y la hidrólisis de la molécula de ATP son vitales para la regulación del sistema MMR. El primer complejo MSH2-MSH6 intercambia la molécula de ADP por ATP, funcionando como un interruptor molecular. Una vez que se reconocen los errores en el ADN, y se une el primer heterodímero, se reclutan otras moléculas como la exonucleasa 1 (Exo1) (49).

Sistema MMR en el cáncer

En el cáncer, este sistema es disfuncional debido a diversas alteraciones. Cuando las proteínas MMR se dañan, los errores en el ADN no se corrigen, lo que conduce a MSI, promoviendo la tumorigénesis. La disfunción del sistema MMR se debe a diversas mutaciones genéticas, cambios epigenéticos y factores ambientales. La causa más común de deficiencia hereditaria de MMR es el síndrome de Lynch en cáncer colorrectal, que es causado por mutaciones en los genes que codifican las proteínas (50).

Sistema MMR en cáncer de ovario

Este sistema en CO no se ha estudiado ampliamente como en otros tipos de cáncer. Pero existe evidencia de que la deficiencia de MMR juega un papel importante en MSI y síndrome de Lynch. Identificar la deficiencia en este cáncer tiene importantes implicaciones diagnósticas y pronósticas, además de proporcionar información valiosa sobre las características moleculares del tumor (30).

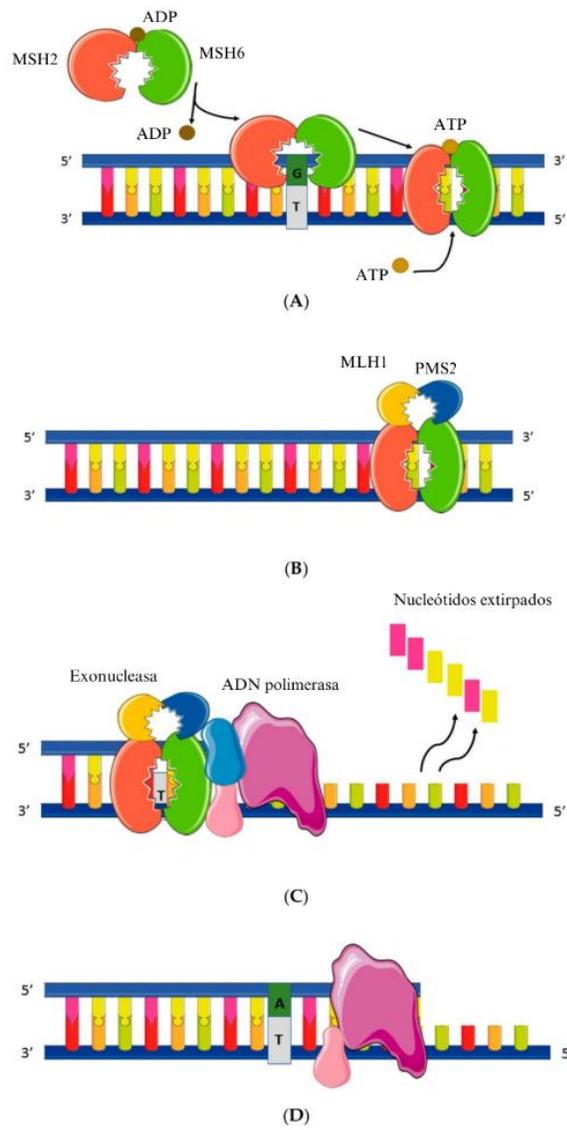


Figura 6. Mecanismo del sistema de reparación de errores de emparejamiento.

(A) Primer heterodímero en actuar está conformado por MSH2 y MSH6 como abrazadera deslizante sobre el ADN. (B) Segundo heterodímero en participar: MLH1y PMS2, se une al primer complejo. (C) Se une al complejo de exonucleasa. (D) Complejo removiendo la base nitrogenada mal apareada, y haciendo una resíntesis (51).

2. Proteína MLH1

MLH1 es una de las proteínas que conforman el sistema MMR, esta es la proteína afectada mayormente en cáncer colorrectal y otros tipos de cánceres, aunque su papel en el cáncer de ovario aún no se ha comprendido completamente (52).

La proteína MLH1, localizada en el núcleo, está constituida por 756 aminoácidos y tiene un peso molecular de 84,601 Da aproximadamente (ver Figura 7), además cuenta en su estructura con un dominio ATPasa y dos dominios para la interacción con MutS homólogo y con la proteína PMS2. Esta proteína es capaz de formar un heterodímero con actividad endonucleasa que se activa después del reconocimiento de errores de apareamiento del ADN y los bucles de inserción/delección (INDELS por sus siglas en inglés) por otros componentes del sistema MMR y es necesaria para la eliminación del ADN no coincidente (52).

Proteína MLH1 (756 aa ; 84.6 kDa)



Figura 7. Diagrama de la proteína MLH1.

C- terminal carboxilo, N- terminal amino. Se muestran los dominios de la proteína, así como sus exones. Modificado de Atlas de genética y citogenética en oncología y hematología (50).

3. Gen *MLH1*

La proteína MLH1 es codificada por el gen *MLH1*, ubicado en la región cromosómica 3p22.2, que consta de 19 exones (ver Figura 8) (7).

El control de la expresión génica de MLH1 está dado principalmente por la regulación de la región promotora de 1,787 pb, en la que se ubica la secuencia consenso CCAAT, misma que es necesaria para el reconocimiento y la unión de factores de transcripción (53). En estudios sobre este gen y su relación con la carcinogénesis se han encontrado variantes en individuos con distintos tipos de cáncer, tanto en regiones codificantes como en zonas reguladoras, sin embargo, su análisis y caracterización en CO aún es escasa (7).

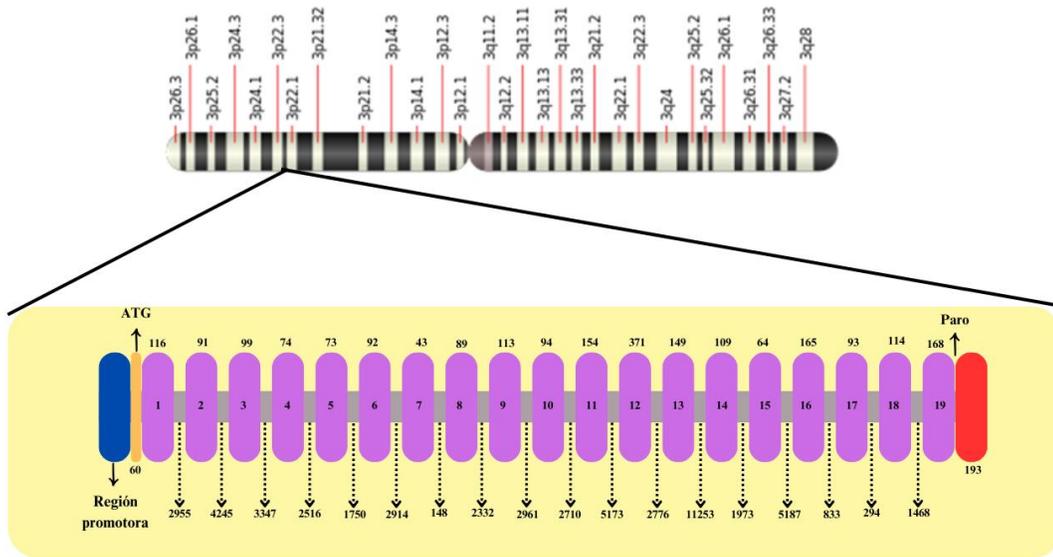


Figura 8. Diagrama del gen *MLH1*. Posición del gen *MLH1* en el cromosoma 3.

Los números de los exones están en el interior de los cuadros, y en la parte inferior el número de pares de bases. Las flechas iniciales muestran el codón ATG y la flecha final el codón de paro. Los intrones están representados por las barras negras y en las flechas de abajo se indican las pares de bases. Modificada de Atlas de genética y citogenética en oncología y hematología (54).

4. Alteraciones epigenéticas

Un mecanismo epigenético conocido que inactiva el sistema MMR es la hipermetilación del gen MLH1. La metilación del ADN se debe a la adición del grupo metilo (CH₃) en la base nitrogenada citosina (C) presente en las islas CpG, las cuales son regiones ricas en bases nitrogenadas guanina (G) y citosina. La p en CpG representa que se encuentra enlazado por fosfato. La metilación del ADN puede interferir en el ciclo y la diferenciación celular (35).

Metilación de ADN

La metilación del ADN es una marca epigenética que tiene funciones en la diferenciación, en el desarrollo y mantenimiento de la identidad celular mediante el control de la expresión genética. En los últimos años, se han observado cambios en la metilación del ADN en distintas enfermedades humanas, principalmente en el cáncer (55). Dos grupos de investigación en el año de 1975 sugirieron que la metilación de la citosina podría desempeñar un papel fundamental como marca epigenética, descubrieron que la metilación del ADN se produce predominantemente en la citosina seguida de residuos de guanina (CpG) (ver Figura 9). La citosina metilada en el quinto carbono del anillo de pirimidina se le denomina 5-metilcitosina (5mC) (56).

El proceso de metilación es mediado por las enzimas llamadas ADN metiltransferasas (DNMT), que incluyen dos familias, las ADN metil transferasas de mantenimiento, como DNMT1 que mantienen el patrón de metilación de ADN en la replicación, y las ADN metiltransferasas *de novo*, que incluyen DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L, que catalizan la metilación en la gametogénesis, diferenciación celular y en el desarrollo embrionario (57).

La metilación del gen MLH1 es una alteración bien conocida en la tumorigénesis del cáncer colorrectal y de endometrio, los dos tipos de tumores más frecuentes que se encuentran en personas con síndrome de Lynch. La carcinogénesis relacionada con MSI no es un mecanismo exclusivo del síndrome de Lynch, también se relaciona con cáncer colorrectal esporádico (58).

En otros tipos de cánceres como el colorrectal, la MSI está estrechamente asociada con la hipermetilación de la región promotora del gen MLH1. La metilación del ADN es la alteración más ampliamente estudiada. La hipermetilación del ADN es causante del silenciamiento de genes, promoviendo el inicio y desarrollo de la carcinogénesis (59).

La hipermetilación del promotor MLH1 provoca el silenciamiento del gen, causando la pérdida de la expresión de la proteína MLH1, y dando paso a la MSI (60).

Modificaciones de metilación del ADN en cáncer

Las modificaciones en la metilación del ADN desempeñan un papel importante en la tumorigénesis, ya que afectan la expresión de genes clave involucrados en el control del ciclo celular, la apoptosis y la estabilidad genómica. Estas alteraciones son resultado de factores ambientales, o procesos epigenéticos. Entre las modificaciones más estudiadas se destacan dos fenómenos principales: la hipermetilación y la hipometilación (55).

Hipermetilación del ADN

La hipermetilación de islas CpG en la región promotora, es una de las alteraciones más frecuentes en cáncer, resulta en la represión de su transcripción, llevando al silenciamiento de genes supresores de tumores, este silenciamiento contribuye a la pérdida de la función de estos genes, da paso a la desregulación de puntos de control del ciclo celular, la apoptosis y a los mecanismos de reparación del ADN (61).

Hipometilación del ADN

La hipometilación del ADN es un particularmente en regiones no promotoras, también desempeñan un papel importante en la tumorigénesis. La hipometilación da como resultado la reactivación de elementos transponibles, que contribuyen a reordenamientos cromosómicos, rotura del ADN y el aumento de mutaciones (62).

Metilación de MLH1

El silenciamiento epigenético de MLH2, generalmente es a través de la hipermetilación del promotor, lo que conduce a MSI y al aumento de la carga mutacional en células cancerígenas (58).

La metilación de MLH1, es un evento epigenético importante en el desarrollo de cánceres con MSI-H. Es una de las principales causas de MSI, en cáncer colorrectal, gástrico y endometrial. En cáncer colorrectal, la metilación de MLH1 se produce aproximadamente en el 15% al 20% de casos esporádicos, suelen ser MSI-H y se asocia a una mejor supervivencia (60).

La hipermetilación impide la unión de factores de transcripción necesarios para la expresión génica, lo que conduce a la pérdida de la expresión de la proteína MLH1. Esta pérdida altera al sistema MMR, permitiendo la acumulación de errores de replicación del ADN, y promueve la inestabilidad genómica y el desarrollo del cáncer (63).

5. Inestabilidad de microsatélites

Los defectos en el MMR aumentan la tasa de mutación en la célula y alteran las longitudes de los microsatélites, lo que se le denomina MSI (64).

La MSI es un fenómeno que resulta de la incapacidad de reparar regiones de microsatélites o de una reparación defectuosa. Esto se manifiesta por alteraciones en la longitud (número de pares de bases) de los microsatélites (3).

Así pues, la MSI ha sido definida como una vía de tumorigénesis bien establecida que hace referencia a una alta capacidad de mutación de las células y un alto nivel de MSI se asocia con un aumento de la tasa de mutación (4). En concordancia, se ha descrito que pacientes con deficiencias en el sistema MMR (dMMR) pueden desarrollar tumores con una tasa de mutabilidad aproximadamente 1000 veces mayor que aquellos con las vías del sistema intactas. Además, las células deficientes de MMR suelen ser más resistentes a la muerte inducida por diversos agentes quimioterápicos (5). Se ha demostrado que la MSI tiene un rol fundamental en la patogenia de los tumores malignos y está estrechamente relacionada con la aparición, progresión y pronóstico de diversas neoplasias malignas (65).

Respecto a la MSI, suelen emplearse paneles de 5 biomarcadores (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y NR-27) y según el número de microsatélites inestables que se presenten, se determina la clasificación de MSI en tres subtipos diferentes (66).

- Microsatélites estables (MSS): Ningún marcador inestable.
- Niveles bajos de MSI (MSI-L): 1 marcador inestable.
- Niveles altos de MSI (MSI-H): 2 o más marcadores inestables.

Múltiples investigaciones han demostrado que el cáncer de endometrio y el cáncer gástrico con MSI-H tienen un pronóstico favorable en comparación con aquellos con MSI-L o MSS, ya que exhiben mejor respuesta inmune antitumoral y mejor capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales. Por lo tanto, la MSI potencialmente podría emplearse como un predictor clave para evaluar el grado de malignidad, la eficacia y el pronóstico de los procesos oncológicos (65). Estas alteraciones en las vías de reparación de ADN, causadas por mecanismos genéticos y epigenéticos, son una característica de la carcinogénesis ovárica (35).

III. ANTECEDENTES

En los últimos años, se han observado cambios en la metilación del ADN en distintas enfermedades humanas, principalmente en el cáncer (55). Una de las consecuencias de los defectos en el sistema MMR es la MSI, la cual es una característica distintiva del cáncer colorrectal. Su utilidad como biomarcador en el cáncer de ovario es un área de investigación activa (57).

En un estudio de Sally B. *et al.* en la Universidad de Japón, en el año de 1999, evaluaron 64 muestras de cáncer de endometrio, y encontraron 53 tumores positivos para MSI. Además, encontraron metilación de la región promotora del gen MLH1 en 41 de 53 tumores. 12 de las muestras presentaban alteración en la expresión de la proteína MLH1 (67).

Watanabe Yoh *et al.* en el año 2007, en la Universidad de Oxford analizaron 36 muestras de cáncer de ovario epitelial, 18 muestras mostraron metilación del promotor MLH1, Ningún tumor mostró expresión de la proteína MLH1. 11 de los 18 casos, se determinaron como MSI-H, 4 muestras como MSI L, y 3 no presentaron MSI (68).

En CO, la MSI está menos caracterizada con respecto a otros cánceres ginecológicos, pero aun así se sabe que existe, especialmente en el carcinoma ovárico de tipo endometrioide. En general, según los reportes disponibles, el porcentaje de CO con inestabilidad de microsatélites va del 2-10% de los casos, pero puede alcanzar hasta el 20% en el subgrupo endometrioide y la mayoría de las veces, está relacionado con la metilación del promotor MLH1 (45).

Es bien sabido que la MSI puede surgir como consecuencia de las dMMR, sin embargo, este conjunto de fenómenos en CO no ha sido bien definido. En un estudio realizado a inicios de la década de 2000 se analizaron 125 tumores primarios de CO, encontrando MSI-H en 16,8 % de ellos, teniendo relación además con la expresión del ARNm de MLH1 (estuvo ausente en el 47,6% de los tumores) (55). Similarmente, Shilpa y col. (2014) estudiaron la relación de la MSI,

la metilación del promotor y la expresión de proteínas de los genes MMR en el carcinoma epitelial de ovario (COE). Como resultado, se observó MSI en más del 60% de las muestras tumorales analizadas. Además, se detectó metilación de MLH1 en 37,5% de estas muestras, pero sin pérdida total de la expresión de los genes MMR. No hubo correlación entre MSI, metilación del promotor y expresión de proteínas de los genes MMR, lo que sugiere que cada uno puede funcionar de forma independiente. En otro estudio se determinó la frecuencia de MSI en 74 carcinomas endometrioides de ovario y se examinó la expresión de proteínas MLH1 y MSH2. En total, 20 % de los tumores presentaron MSI-H y 12 % MSI-L. Además, se encontró pérdida de la expresión de MLH1 y/o MSH2 en 9 de los 15 tumores con MSI-H, fenotipo que tendió a ocurrir con mayor frecuencia en tumores de bajo grado ($p = 0,053$), pero no se correlacionó con el estadio clínico (33).

Las variantes génicas en MLH1 y su relación con el CO han sido hasta el momento, poco estudiadas. Dentro de las pocas investigaciones al respecto destaca la realizada por Niu y col. (2015) en población china. En un análisis de casos y controles, evaluaron la asociación entre la variante c.-93 G>A (rs1800734) y el riesgo de CO en 421 pacientes con cáncer de ovario y 689 controles. Encontrando que los genotipos de la variante MLH1 (C.-93AA y AG) se asocian con el riesgo de CO ([OR] ajustado = 2,02; [IC] del 95% = 1,42-2,89) en comparación con el genotipo C.-93GG. Sugiriendo que el alelo A aumenta el riesgo de CO (PA en MLH1 puede afectar la susceptibilidad al CO en la población estudiada). En el mismo sentido, en 2014, se informó que en un estudio de casos y controles en el que se incluyeron 536 pacientes con COE y 532 mujeres control, tanto los genotipos como las frecuencias alélicas de la variante c.-93 G>A (rs1800734) no fueron significativamente diferentes entre los grupos de casos y control. En comparación con el genotipo homocigoto salvaje, la presencia de alelos variantes (genotipos heterocigotos y homocigotos variantes) no afectó el riesgo de desarrollar CO prognosis (47).

Sin embargo, el análisis de supervivencia mostró que para la variante rs1800734, el alelo A puede aumentar significativamente la supervivencia libre de progresión de los pacientes en comparación con el genotipo GG G en un seguimiento de 5 años (CRI 0,66; IC del 95%: 0,44 a 0,98), lo que sugiere que la variante estudiada puede emplearse como un potencial biomarcador de prognosis (48). Y del mismo modo, Harley, (2008), genotipificó 899 mujeres con CO invasivo y 931 controles para la variante c.-93 G>A, demostrando que la presencia de la variante se asoció con un riesgo significativo de CO (OR=1,5; IC 95% 1,3-1,9; p=0,00005). La asociación estuvo presente en cánceres de todas las histologías, excepto en células claras, y en todos los grupos étnicos (49). Por otro lado, se ha reportado que en un análisis de 92 tumores fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE), que incluían muestras pareadas emparejadas de tumores diagnosticados inicialmente y recurrentes de 46 pacientes con cáncer epitelial de ovario (COE), se observaron variantes en MLH1 en un 8,2% de los casos, pero no hubo correlación entre la presencia de variantes y el pronóstico clínico. Además, las variantes somáticas no difirieron entre los CO primarios y recurrentes, ya que cada variante presente en muestras recurrentes se detectó en la muestra primaria correspondiente. Sin embargo, se propone que, para comprender la biología de la recurrencia tumoral en el COE, se necesitan más estudios, incluidas modificaciones epigenéticas o mutaciones adicionales en otros genes (39). De manera similar, se ha estimado que, en promedio, el 46,7% (IC 95%: 28,8-65,4) de los carcinomas de ovario que muestran dMMR por inmunohistoquímica tienen una variante en MMR de línea germinal identificada, siendo MLH1 el gen mayormente afectado (50).

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de ovario es un problema de salud pública a nivel mundial y nacional, ya que su incidencia y mortalidad van en aumento. En el año 2022, se registraron 324,603 nuevos casos de cáncer de ovario a nivel mundial. En México, en el mismo año se diagnosticaron 5,193 casos, su mortalidad fue de 3,360, representando que el 75% de las pacientes se diagnostican en estadios avanzados.

Su alta tasa de mortalidad es debe a que la mayoría de los casos de cáncer de ovario se diagnostican en estadios avanzados, puesto que sus síntomas suelen confundirse con otras enfermedades. Algunos de los factores de riesgo del cáncer son genéticos, ambientales, epigenéticos o la combinación de todos estos. Uno de los factores epigenéticos es la metilación del ADN, que afecta la expresión genética. En el caso del gen MLH1, cuando se produce su metilación, se inactiva y afecta el funcionamiento del sistema MMR. Esto puede dar lugar a la aparición de variantes o MSI.

Diversos estudios han determinado algunas características de este cáncer, propuesto que la MSI es una característica distintiva de numerosos tipos de cánceres ginecológicos, sin embargo, no está bien caracterizado en CO.

En México no se cuentan con estudios precisos sobre la MSI y presencia de variantes en el gen MLH1 en mujeres mexicanas con cáncer de ovario. Lo que pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo esta investigación enfocada en dichas variables con el objetivo de describir la metilación del gen MLH1, la expresión de su proteína y el grado de inestabilidad de microsatélites.

V. HIPÓTESIS

MLH1 presenta cambios en el perfil de metilación y de la expresión de su proteína en pacientes con cáncer de ovario con inestabilidad de microsatélites.

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la metilación en el gen MLH1 y la expresión de su proteína en pacientes con y sin cáncer de ovario con inestabilidad de microsatélites.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las características clínico-patológicas de pacientes con y sin cáncer de ovario.
2. Evaluar la MSI en tejido tumoral de pacientes con y sin cáncer de ovario.
3. Identificar los cambios de metilación en el gen MLH1 en pacientes con y sin cáncer de ovario positivo con MSI.
4. Analizar los niveles de expresión de la proteína MLH1 en pacientes con y sin cáncer de ovario con MSI.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Patología del Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud (CIDOCS) de la Universidad Autónoma de Sinaloa y en el Laboratorio de Genética y Cáncer del Instituto de Genética Humana “Dr. Enrique Corona Rivera” en el Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS) de la Universidad de Guadalajara.

MATERIALES

Diseño de la investigación

El diseño de la investigación es de ciencia básica, de tipo observacional, comparativo, transversal y retrospectivo.

Población de estudio

Pacientes mexicanas mayores de 18 años.

Pacientes diagnosticadas clínica e histopatológicamente con CO.

Pacientes sometidas a una histerectomía radical por una patología no oncológica.

Las muestras fueron recolectadas tras revisar el archivo clínico en el Instituto Sinaloense de Cancerología, de las cuales se recolectaron las biopsias embebidas en parafina del año 2016 hasta el año 2024.

Tamaño de muestra

Se obtuvieron 29 muestras con cáncer y 28 muestras sin cáncer procedentes de histerectomía radical (HR) embebidas en parafina (FFPE) del Instituto Sinaloense de Cancerología, del periodo 2016 a 2024, que cumplieron los criterios de selección.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

Se seleccionaron dos grupos de estudio, el primero conformado por pacientes con diagnóstico positivo para cáncer de ovario, el segundo grupo conformado por pacientes sin cáncer procedentes de histerectomía radical.

Criterio de exclusión

Pacientes con diagnóstico de CO que hayan estado con tratamiento de quimioterapia.

Criterios de eliminación

Muestras cuyo material genético se presente con concentración insuficiente o con degradación.

MÉTODOS

Recolección de los datos

Las pacientes fueron examinadas por médicos ginecólogos expertos. La historia clínica de cada paciente se obtuvo mediante la revisión de archivo en el Instituto Sinaloense de Cancerología que incluye los siguientes parámetros: edad, índice de masa corporal, estadio patológico y antecedentes clínicos.

Clasificación morfológica de los tumores

Las muestras fueron clasificadas por un médico patólogo, quien evaluó las características histopatológicas del tumor a través de la observación de las muestras teñidas con hematoxilina y eosina (H&E). La predominancia de muestras con carcinoma epitelial permitió mantener un grupo homogéneo de pacientes, por lo cual, para garantizar la homogeneidad en los resultados del estudio, se decidió concentrar la investigación en este tipo de cáncer. Siendo el más frecuente dentro de la población estudiada, lo que refuerza su selección como el más predominante.

Extracción de ADN

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo según lo descrito por el manual del kit “QIAamp DNA FFPE (Qiagen Cat No. /ID: 56404)”, que consiste en purificar ADN de las secciones de tejido en parafina. El procedimiento se describe con detalle en el ANEXO 1.

Cuantificación del ADN e integridad del ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante el Multiskan SkyHigh de ThermoFisher Scientific, un lector de microplacas, que cuenta con 96 pocillos dispuestos en filas y columnas en la placa, lo que permite la cuantificación de múltiples muestras en una sola lectura. Mide principalmente la absorbancia en longitudes de onda específicas para cuantificar material genético. Al medir la absorbancia a 260 nm, el sistema cuantifica la concentración de ADN en la muestra. La absorbancia a 280 nm se utiliza para estimar la concentración de proteínas.

El espectrofotómetro calcula la relación A260/A280 para evaluar la pureza del ADN, debido a que proteínas pueden contaminar las muestras de ácido nucleico. El cálculo de la concentración y pureza se muestra en el ANEXO 2.

La integridad se observó en un gel de agarosa, que se describe con detalle en ANEXO 3.

Evaluación de las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de ovario

La evaluación de las características clínico-patológicas de las pacientes con y sin CO se realizó mediante una revisión retrospectiva de historias clínicas. Esta revisión incluyó datos de pacientes con diagnóstico de cáncer de ovario, así como de aquellas que se sometieron a histerectomía. Se recopilaron sistemáticamente las características relevantes como edad, tipo histológico, grado del tumor, antecedentes familiares, IMC y procedencia para su análisis.

Se creó una base de datos para organizar esta información en Microsoft Excel versión 2410 (compilación 18129.20158), donde se generaron tablas y gráficas para representar visualmente los hallazgos y facilitar el análisis.

La evaluación e interpretación histopatológica fueron realizadas por un patólogo experimentado que, desconocida los detalles clínicos, incluido el diagnóstico de la paciente, con el fin de eliminar cualquier sesgo en el análisis. El patólogo examinó cuidadosamente las muestras de tejido en las laminillas e identificó regiones con una alta concentración de células cancerosas. Una vez que se delinearón estas áreas, se procedió con la extracción de ADN.

Evaluación de MSI en tejido tumoral con y sin cáncer de ovario

PCR múltiple

El análisis de MSI se realizó mediante PCR múltiplex utilizando un panel de cinco marcadores (NR-21, NR-24, NR-27, BAT-25 y BAT-26). Estos marcadores se utilizan comúnmente debido a su alta tasa de sensibilidad y especificidad para detectar la inestabilidad. La amplificación de estas secuencias se llevó a cabo mediante PCR múltiplex, que amplifica estas regiones de microsatélites. Cada conjunto de cebador está diseñado para amplificar una región de microsatélites específica y se utilizan marcados con fluorescencia para su detección. Se describe a detalle en el ANEXO 4.

Secuenciación para MSI

Los productos de PCR se sometieron a una reacción de secuenciación de Sanger, y se analizaron mediante electroforesis capilar. Donde los fragmentos de ADN se separaron en función de tamaño y un láser excita los marcadores fluorescentes. La fluorescencia que se emite es detectada y se traduce en un electroferograma que representa la secuencia del fragmento.

Los productos de la reacción de secuenciador de Sanger se analizaron utilizando la plataforma de Thermo Fisher Connect™ Microsatellite Analysis CE Fragment Sizing que permite la interpretación precisa de los fragmentos de PCR. Esta plataforma emplea cebadores marcados con fluorescencia para distinguir y medir la longitud de los productos de PCR, que permite la detección de cambios alélicos que indican MSI.

Análisis de metilación del gen MLH1

Conversión de ADN con bisulfito de sodio

La conversión de ADN con bisulfito de sodio se llevó a cabo según lo descrito por el manual del kit “EZ DNA Methylation-Gold de marca ZYMO Research”. Se utilizó 18 µL de ADN a una concentración de 100 ng/ml que se encontraron disueltos en buffer TE. Se describen a detalles las concentraciones en el ANEXO 5.

PCR específica de metilación

Se realizó MS-PCR con las muestras que fueron tratadas con bisulfito de sodio, se utilizaron iniciadores específicos para poder reconocer el ADN metilado y ADN no metilado. En ANEXO 6 se incluyen concentraciones.

Electroforesis

Los productos de la MS-PCR se observaron en geles de 6% de poliacrilamida. Se llevó a cabo mediante la tinción con nitrato de plata, que ayudó a visualizar los fragmentos. En el ANEXO 7, se describe a detalle el procedimiento.

Detección de la proteína MLH1 mediante inmunofluorescencia

Para el análisis de la expresión de la proteína MLH1, se realizaron cortes de las muestras embebidas en parafina, de 4 µm de espesor, posteriormente se incubaron a 58°C durante al menos 1 hora para la eliminación de los residuos de parafina.

Inicialmente, se rehidrató la muestra en 100% de etanol y posteriormente en 95% y 80% de etanol durante 1 minuto para cada concentración. Finalmente, se lavó con agua destilada. Se procedió a sumergir las muestras en tinción de buffer de citrato a 95-100° C, se incubaron a temperatura constante en baño maría durante 20 minutos, se retiraron de la fuente de calor y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se realizaron lavados con buffer de lavado (PBS1X-Tween20).

La incubación se realizó durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario IgG de conejo recombinante anti-MLH1 (Abcam, ab92312) en una dilución 1:200. La dilución se preparó en un tampón de bloqueo para garantizar la concentración del anticuerpo primario.

Después de lavar el anticuerpo primario con PBS-Tween, se aplicó un anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 647 a una dilución 1:800 (Abcam, ab150075), durante 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz. Las muestras fueron montadas con Fluoroshield con DAPI (4,6 diamidino-2-fenilindol [Sigma-Aldrich F6057]) como un medio de contraste para teñir los núcleos celulares.

El análisis visual cualitativo, se realizó una vez que se adquirieron las imágenes de inmunofluorescencia en el microscopio Leica TCS SP8. Su configuración permite ajustar la intensidad del láser y tiempo de exposición para optimizar la calidad de la señal. Una vez que se adquirieron, se realizó el proceso de análisis con el software Leica LAS X. Fueron seleccionadas cinco regiones de interés (ROIs) para calcular la media de fluorescencia en cada muestra. Se observaron los núcleos teñidos con DAPI de color azul. Se describe a detalle en ANEXO 8.

Análisis estadístico

La recolección de datos se organizó mediante una base de datos en software Microsoft Excel versión 2410, se definieron las variables cuantitativas, y se expresaron en términos de medias y desviaciones estándar. Las variables cualitativas, se reportaron en porcentajes y frecuencias. Se calcularon intervalos de confianza para cada medida, se determinaron las variables como nominales dicotómicas: la metilación en el gen MLH1, y la expresión proteica de MLH1. El análisis comparativo de los dos grupos se realizó con la prueba U de Mann-Whitney. El análisis de la expresión de la proteína se realizó con GraphPad Prism 8.

VIII. RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron un total de 57 bloques de tejido FFPE, de las cuales 29 (50.87%) muestras de tejido tumoral de pacientes mexicanas con CO y 28 (49.13%) muestras de pacientes sin CO, procedentes de histerectomía radical. A partir de los datos obtenidos de las historias clínicas de las pacientes, se realizó una base de datos que integra la información clínica patológica: edad, IMC, estadio y procedencia de las pacientes.

Características clínico-patológicas de pacientes con CO y sin CO

El promedio de la edad de pacientes con CO fue de 48 años \pm 9.68. En cuanto al IMC, el promedio fue de 26 kg \pm 5.83. Referente a la estadificación, el 59% de las pacientes presentaron un diagnóstico en estadio III (ver Cuadro 5). Respecto al grupo de pacientes sin cáncer, solo se recopiló la edad de las pacientes. El promedio de edad de las pacientes sin CO fue de 48 años \pm 11.82 (ver Cuadro 6).

De acuerdo con las características demográficas de las 29 pacientes con CO, el 52% son originarias de la ciudad de Culiacán, mientras que el 48% restante de pacientes se distribuyen de diversas localidades de Sinaloa (Sinaloa de Leyva, Elota, El Dorado, Los Mochis, Badiraguato, Choix, Mazatlán y Guasave), con excepción de las provenientes de las ciudades de Hermosillo y Oaxaca. La distribución geográfica de las pacientes se muestra en la figura 9. (ver Figura 9).

Características clínico-patológicas de las pacientes con CO									
Edad (años)			IMC (kg/m ²)			Estadificación			CA 125
Grupo	n	%	Categoría	n	%	Clasificación	n	%	Valores
20-30	1	3%	Peso bajo	2	7%	I	6	20%	>35 U/mL
31-40	9	32%	Normal	11	38%	II	2	7%	15 (52%)
41-50	11	38%	Sobrepeso	9	31%	III	17	59%	
51-60	7	24%	Obesidad	7	24%	IV	4	14%	<35 U/mL
61-70	1	3%							14 (48%)
48 años ± 9.68			26 ± 5.83						

Cuadro 5. Características clínico-patológicas de las pacientes con CO.

Características clínica-patológicas de pacientes sin CO.		
Edad(años)		
Grupo	n	%
20-30 años	1	4%
31-40 años	5	17%
41-50 años	10	36%
51-60 años	9	32%
61-70 años	2	7%
71-80 años	0	0%
81-90 años	1	4%
48 años		
± 11.82		

Cuadro 6. Características clínico-patológicas de pacientes sin CO.

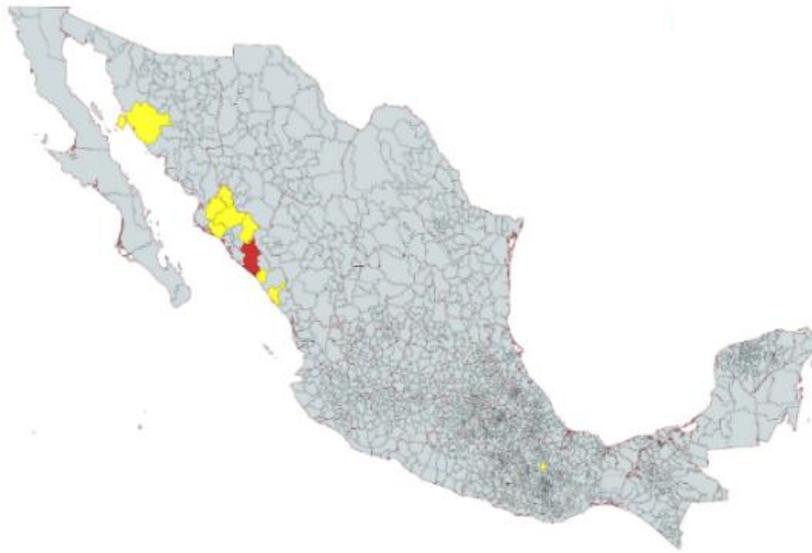


Figura 10. Origen de las pacientes con CO incluidos en este estudio. En color rojo se destaca la ciudad de Culiacán, que ocupa el primer lugar en cuanto al origen de las pacientes, mientras que en color amarillo representa la distribución de las diferentes localidades de la república.

Concentración y calidad de la extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de 57 muestras, 29 de ellas correspondían a casos de CO y las 28 muestras restantes pertenecen a muestras sin cáncer, obtenidas por histerectomía. La figura 10 muestra las concentraciones de ADN en las muestras con CO y sin CO. El valor promedio de concentración fue de 32.36 ng/ μ L de las muestras con CO. La concentración promedio fue de 50.94 ng/ μ L para las muestras sin CO.

Integridad del ADN

Las muestras de ADN fueron cargadas en un gel de agarosa (ver Figuras 10, y 11) para realizar una electroforesis durante 30 minutos a 120 V.

Como resultado, las muestras mostraron una calidad inferior a la esperada, se observó un patrón degradado en ambos grupos. Esta situación surge debido a que, cuando se trabaja con muestras de tejido archivadas, como las embebidas en parafina, suelen estar sujetas a degradación con el tiempo, lo que afecta negativamente la calidad. A pesar de esto, se continuó trabajando con las muestras, debido a que la prueba de MSI ha demostrado en distintas investigaciones su confiabilidad, incluso con ADN de baja calidad. Se considera una prueba noble en la investigación del cáncer colorrectal y de endometrio, ya que se enfoca en fragmentos de ADN relativamente cortos.

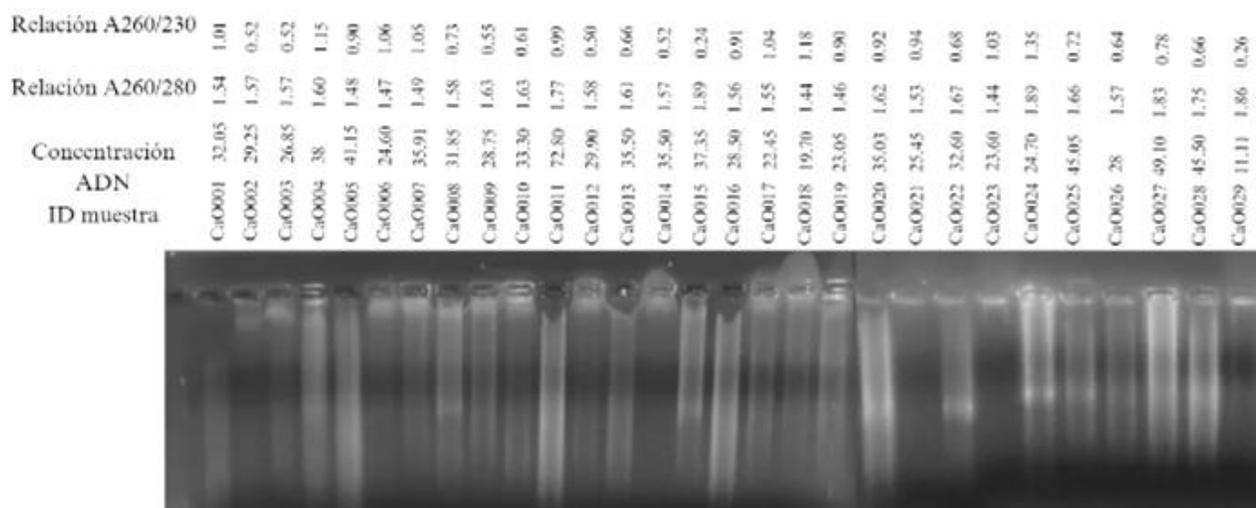


Figura 11. Corrida electroforética en 1% agarosa del ADN extraído de muestras de CO.

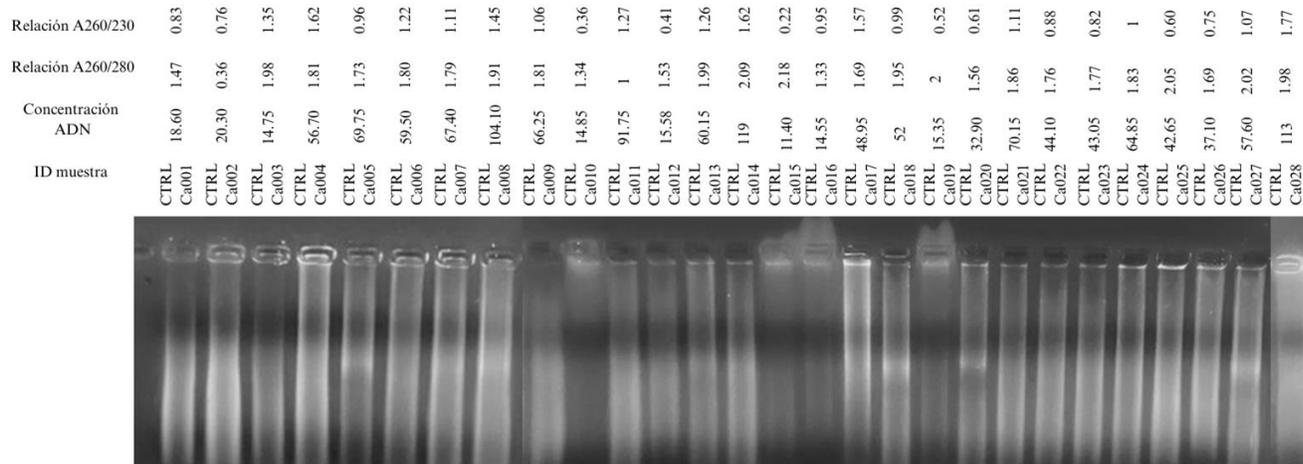


Figura 12. Corrida electroforética en 1% agarosa del ADN extraído de muestras sin CO.

Análisis de inestabilidad de microsatélites en muestras tumorales

Se analizó la MSI para los marcadores (NR-27, NR-21, NR-24, BAT- 25 y BAT-26) en 29 tejidos tumorales de pacientes con CO, solo 5 mostraron evidencia de MSI. Los electroferogramas exhibieron características distintas con las muestras normales. Como se esperaba, las 28 muestras de tejido sin cáncer, no mostraron ningún signo de MSI.

La Figura 14 representa un electroferograma para MSS de la muestra CO029, no se muestran cambios en las posiciones de cada marcador, que se representan en patrones de picos. Observamos que en el eje de las X, se representa el tamaño del fragmento, y en el eje de las Y nos indica la intensidad de fluorescencia del fragmento que se detectó.

El tamaño de cada pico se mide en pares de bases (pb), los marcadores estables mostrarán un pico en el tamaño esperado (ver Figura 12). Los marcadores inestables mostrarán dos picos, que se desplazaron a un mayor o menor tamaño, lo que indica MSI. Para el primer marcador NR-27, un resultado estable, tiene un pico uno a 83 pb. En el marcador NR-21, un resultado estable es a 111 pb. En el marcador NR-24, tiene un pico a 127 pb. En el marcador BAT-25, se presenta 152 pb, y para el marcador BAT-26, un pico estable es a 180 pb.

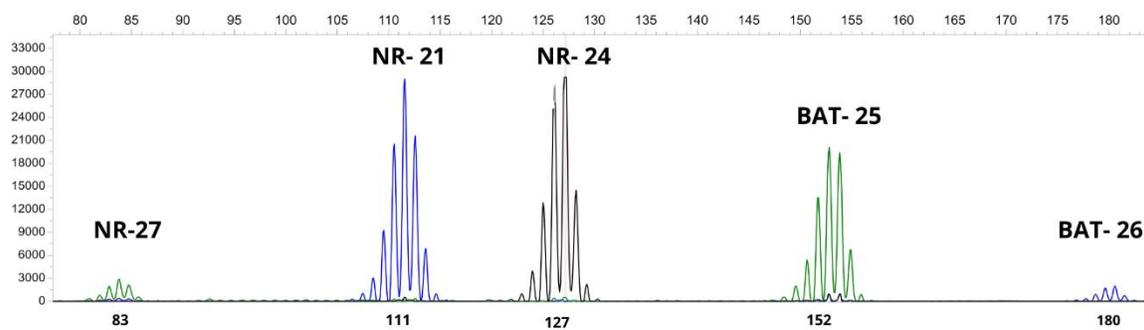


Figura 13. Electroferograma para MSS, muestra CO029.

Los fragmentos se encontraron dentro del rango esperado.

El electroferograma de la muestra CO003 (ver Figura 13) presentó inestabilidad para el marcador BAT-25. En la imagen se muestra que el pico de BAT-25 aparece en una posición diferente a la de la muestra normal, hay un desplazamiento hacia la izquierda, lo que provoca un cambio en el tamaño del fragmento. Este hallazgo sugiere que esta muestra presentó MSI-L.

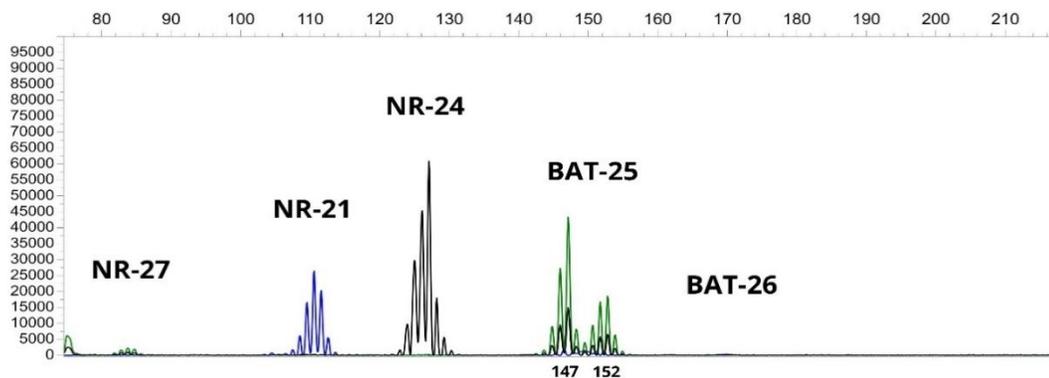


Figura 14. Electroferograma para MSI-L, muestra CO003.

El electroferograma de la muestra CO008, presentó inestabilidad para los marcadores NR-21 y NR-24 (ver Figura 14). El pico de NR-21 en tejido normal se observa a 111 pb, pero observamos que el segundo pico se encuentra a 102 pb, lo que indica específicamente la deleción de la longitud de esa región de microsatélite. El pico del marcador NR-24 se encuentra en 127 pb y el segundo pico en 119 pb, también indica una pérdida en la longitud de este marcador. Este hallazgo sugiere que esta muestra presentó MSI-H.

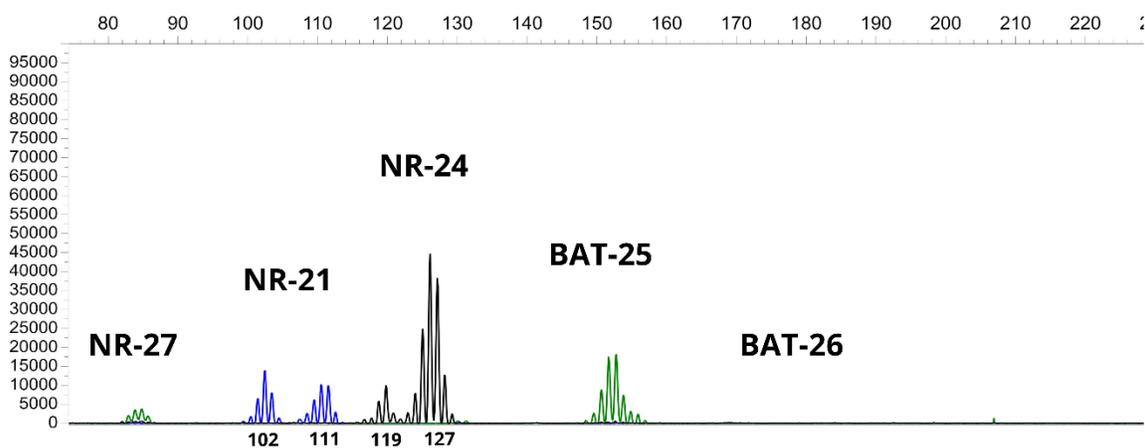


Figura 15. Electroferograma para MSI-H, muestra CO008.

El electroferograma 3, de la muestra CO016 presentó inestabilidad para los marcadores NR-21, NR-24 y BAT-25. (ver Figura 15). El NR-21 presento un tamaño de 100 pb. El NR-24 presentó un tamaño de 118 pb. El marcador BAT-25 presentó un tamaño de 142 pb, todos presentaron un desplazamiento hacia la izquierda, indicando una pérdida de longitud en cada marcador. Este hallazgo indica que esta muestra presentó MSI-H.

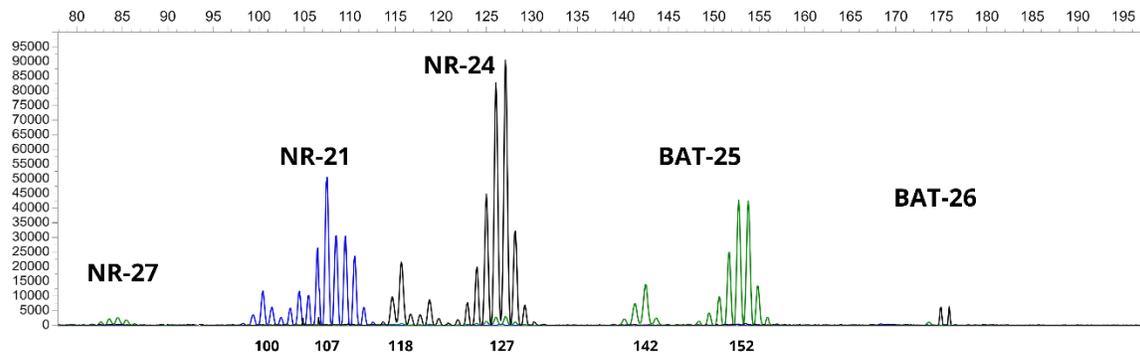


Figura 16. Electroferograma para MSI-H, muestra CO016.

El electroferograma para la muestra CO017, la cual presentó inestabilidad para los cinco marcadores (ver Figura 16). NR-27 presentó un tamaño de 79 pb. NR-21, su tamaño fue de 106 pb. El marcador NR-24 presentó un tamaño de 120 pb. BAT-25 presentó un tamaño de 142 pb y el marcador BAT-27 un tamaño de 175 pb. Todos presentaron un desplazamiento hacia la izquierda, lo que describe una delección en la longitud de cada marcador. Esta prueba presentó MSI-H.

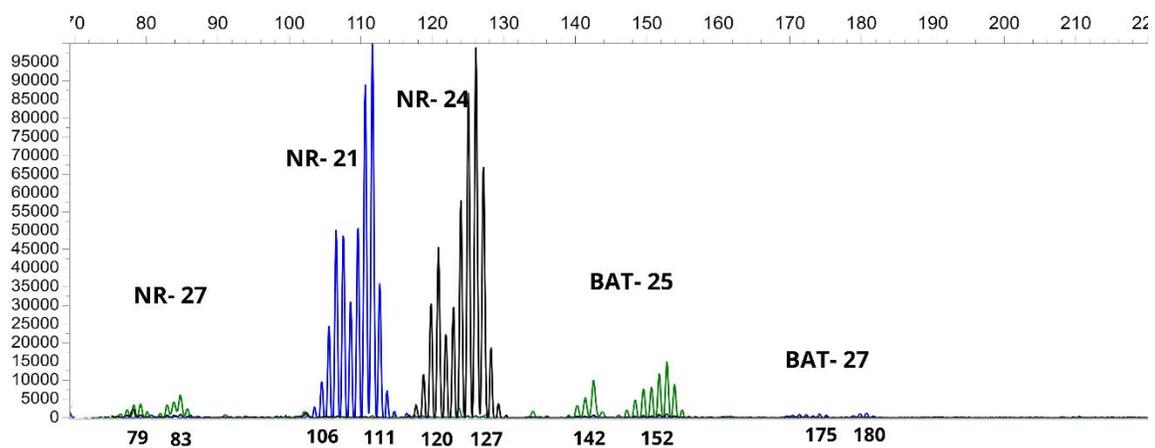


Figura 17. Electroferograma para MSI-H, muestra CO017.

De los 29 tejidos tumorales, el 10% (3 muestras) presentaron MSI-H y el 7% MSI-L (2 muestras). La frecuencia general de MSI en nuestro análisis fue del 17% (ver Figura 17). En la actualidad se han descrito distintas neoplasias malignas y está presente entre el 10 y 15% de los casos de cáncer colorrectal, de endometrio y gástricos.

De las pacientes MSI-H, las tres pacientes eran menores de 50 años, las otras dos pacientes con MSI-L eran mayores de 50 años. El 7% (2 muestras) de MSI-L no tenía antecedentes oncológicos familiares, solo el 3% de MSI-H (1 muestra) presentó antecedentes oncológicos familiares.

MSI-H (inestabilidad de microsatélites alta); MSI-L (inestabilidad de microsatélites baja) y MSS (estabilidad de microsatélites).

Las cinco muestras que presentaron MSI fueron identificadas con sus respectivos marcadores (ver Figura 18). Se observó con mayor frecuencia la inestabilidad en los marcadores NR-21 y NR-24, en los que se detectó inestabilidad en el 14% para cada uno de estos marcadores.

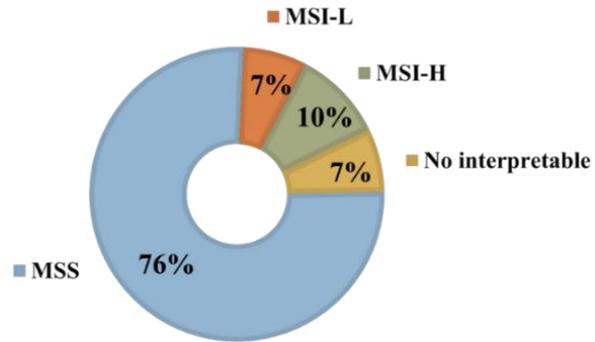


Figura 18. Porcentaje de MSI en tejido tumoral de pacientes con CO.

Marcadores					
Muestra	NR27	NR21	NR24	BAT25	BAT26
CO003			X		
CO008		X	X		
CO016		X	X	X	
CO017	X	X	X	X	X
CO022		X			

Figura 19. Estado de los marcadores para las 5 muestras con MSI de tejido tumoral de pacientes con CO.

Con X representa el marcador que se encuentra inestable.

Análisis de metilación del gen MLH1 mediante MS-PCR

La frecuencia de metilación del presente estudio se categorizó en tres grupos: metilada, no metilada, no amplificado (ver Figura 19). El 3% de las muestras tumorales se clasificaron como metiladas. El 7% se clasificó como no metilada. Y el 7% de las muestras se consideraron no amplificadas.

Los resultados se presentan en el gel del 2% de agarosa (ver Figura 20) Se muestran los productos de amplificación. En los primeros cinco carriles se muestran los resultados de las muestras tumorales que presentaron MSI. Se observó la amplificación de una banda en la región metilada del gen MLH1 en la muestra CO016, según los patrones electroforéticos en el gel, mientras que no se observa amplificación en ninguna región en las muestras CO008 y CO017. La amplificación en la región no metilada se presentó en las muestras CO003 y CO022. Además, se amplificaron cinco muestras de pacientes sin CO, de las cuales presentaron no metilación (CTRL1-5).

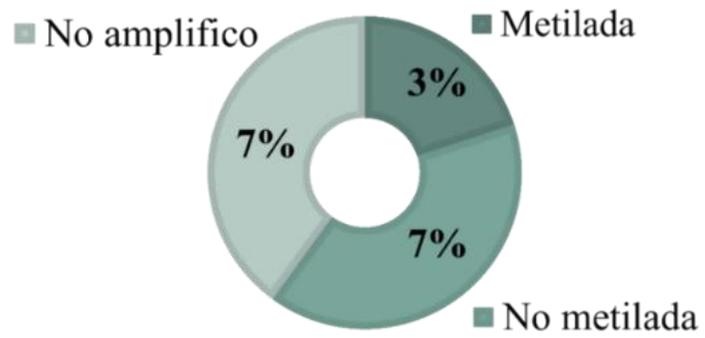


Figura 20. Porcentaje de metilación de tejido tumoral en pacientes con CO.

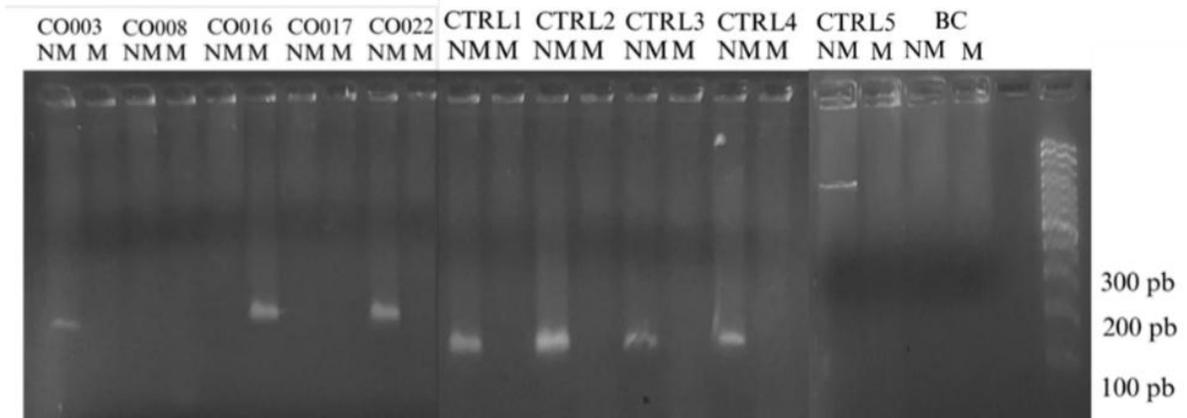


Figura 21. Gel de agarosa al 2% que muestra el análisis de metilación del gen MLH1. El blanco y el control metilado y no metilado.

La muestra CO016 que presentó metilación en MLH1, es MSI-H para tres marcadores NR-21, NR-24 y BAT-25, no tenía antecedentes oncológicos familiares, y su reporte de estadificación fue IA.

Expresión de la proteína MLH1 *in situ*

Se cuantificó la expresión de la proteína MLH1 en un total de diez muestras, distribuidas en dos grupos: cinco muestras con MSI, y cinco muestras sin CO. La cuantificación de la expresión se llevó a cabo mediante la medición de la intensidad de fluorescencia (IMF) en ambas series de muestras y se compararon los resultados entre el grupo de pacientes con y sin CO (ver Figura 21).

En el grupo A, correspondiente a pacientes con CO, se obtuvieron dos imágenes: una con la tinción de DAPI, que resalta los núcleos celulares en un vibrante color azul. La intensidad permite observar claramente la morfología y distribución de las células dentro de la muestra con CO. En la otra imagen, se resalta la expresión de la proteína MLH1, donde se visualiza con una fuerte señal roja, permitiendo observar la localización y distribución de la proteína en las células de la muestra. El grupo B, corresponde a pacientes sin CO.

Estas imágenes fueron fusionadas para realizar un análisis conjunto. Los núcleos celulares teñidos de azul se superponen con la señal de la proteína MLH1, lo que permite visualizar como se distribuye la proteína en relación con los núcleos celulares. Esta visualización combinada es crucial para identificar si existe alguna alteración en la localización nuclear o en la intensidad de la expresión de MLH1.

Al comparar la intensidad de fluorescencia entre ambos grupos, no se encontró una diferencia significativa ($p > 0.05$) en los niveles de expresión de la proteína MLH1 entre las muestras de pacientes con MSI y las muestras sin cáncer (ver Figura 22). Esto sugiere que la expresión de MLH1, no presenta alteraciones detectables asociadas a la presencia o ausencia de CO.

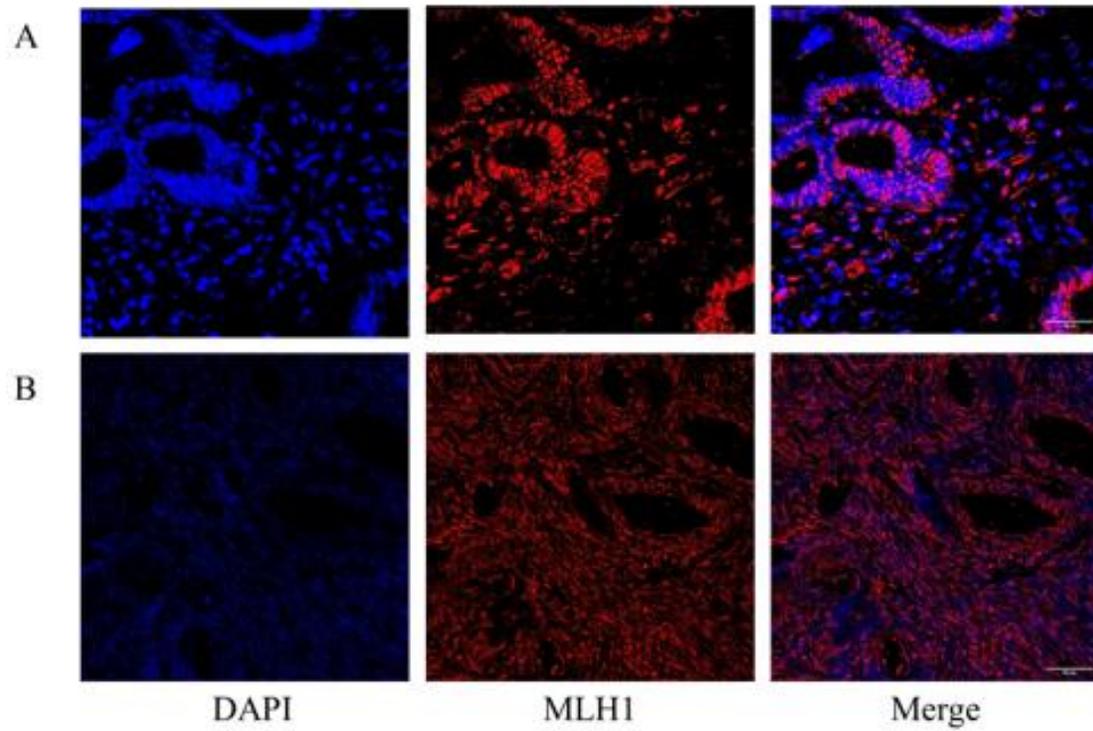


Figura 22. Fluorescencia relativa de MLH1 en tejido de cáncer de ovario (A) e histerectomía radical (B).

La barra de escala representa longitud de 50 μm .

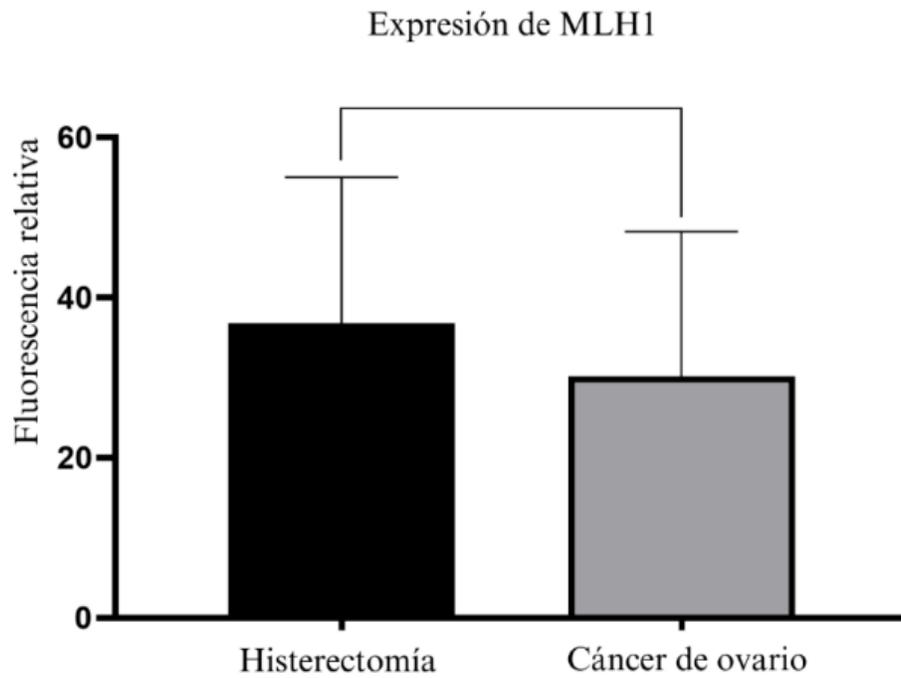


Figura 23. Fluorescencia relativa de la proteína MLH1.

Se comparó la intensidad de fluorescencia de los grupos con y sin CO utilizando la prueba de U Man Whitney sin presentarse diferencias significativas entre los grupos ($p=0.690$). Las barras representan el valor medio \pm desviación.

IX. DISCUSIÓN

El CO es una enfermedad difícil de diagnosticar debido a la falta de síntomas específicos, muchos de los signos se logran identificar en etapas avanzadas, debido a que no existen pruebas de detección de rutina efectiva para su detección en estadio temprano. La etiología de CO se desconoce, pero se describe como un factor de riesgo la edad, datos publicados por Momenimovahed en 2019 describieron que la edad media de diagnóstico es de 50 a 79 años (69).

Datos del Instituto Nacional del Cáncer afirman que alrededor del 88% de los casos se diagnostican después de los 45 años, lo que concuerdan con nuestros resultados, donde la mayoría de los casos con CO se diagnosticaron entre 41 y 50 años, representando el 38%. El promedio de edad fue de 48 años (19).

La mayor incidencia de CO en mujeres mayores de 45 años es el resultado de diversos factores hormonales, genéticos, antecedentes reproductivos e influencias en estilo de vida. Alrededor de los 50 años. Las mujeres se acercan a la menopausia, una etapa importante que se experimentan cambios hormonales, en particular en niveles de estrógeno y progesterona. Además de estos cambios, el envejecimiento contribuye a la acumulación mutaciones genéticas como consecuencia natural del envejecimiento, además los mecanismos de reparación del cuerpo se vuelven menos eficientes. La exposición a contaminantes ambientales a lo largo del tiempo, como productos químicos industriales, también pueden contribuir al CO. La interacción de estos elementos aumenta la susceptibilidad de las mujeres de este grupo de edad (70).

Es preocupante que el segundo grupo de edad más representativo en nuestro estudio esté conformado por mujeres más jóvenes, con un rango de edad de 31 a 40 años, lo que representa el 32% de los casos. Este hallazgo sugiere un cambio en la epidemiología de la enfermedad, tradicionalmente se asocia con mujeres de mayor edad. Esto indica que el CO está mostrando una tendencia hacia mayor agresividad y sugiere que los factores que afectan a mujeres jóvenes están incrementando el riesgo de padecer esta enfermedad a edades más tempranas (71).

Curiosamente, se encontró que las pacientes sin CO tenían una distribución de edad similar a las que sí lo tenían. La edad promedio fue de 48 años en concreto, el 36% de las pacientes sin CO se encontró dentro del mismo rango de edad que va de 41 a 50 años. Esto resulta relevante, ya que la edad no es el único factor determinante en el desarrollo de esta enfermedad, es posible que otros factores como los hábitos de vida, factores genéticos, condiciones hormonales o factores ambientales, estén contribuyendo igualmente al riesgo de CO, independientemente de la edad. Además, esto sugiere la necesidad de estudiar con mayor profundidad los factores no relacionados con la edad que podrían influir en el desarrollo de CO (72).

Según la OMS, la clasificación de CO se subdivide en sus características histológicas: epitelial, de células germinales y estroma. El cáncer epitelial es el más común y agresivo, representa el 90% de las neoplasias malignas de ovario, que se caracteriza por una variedad de subtipos histológicos como carcinoma seroso, endometrioide y de células claras. Los tumores de células germinales representan el 5%, y los tumores del estroma representan el 5%; todos se subdividen (70). En nuestro estudio, los tumores epiteliales se observaron en mayor incidencia, representando el 100%, la subclasificación que predominó fue el subtipo seroso con un 83%, de células transicionales el 8%, de células claras el 3%, mucinosos el 3% y de tipo endometrioide el 3%.

En el estudio de Latham *et al*, en 2019 describieron que el subtipo seroso es la forma más común y agresiva de cáncer de ovario epitelial, y se asocian al síndrome de Lynch; representan MSI. Además, es de gran interés clínico, ya que sugiere que pueden responder mejor a cierto tratamiento, que pueden ser eficaces con alta MSI (73).

MSI

Umar *et al*, en 1994, informaron por primera vez la frecuencia de MSI en cáncer colorrectal, identificándola en el 90% de los casos. Inicialmente, la MSI estaba estrechamente asociada solo a cáncer colorrectal (74). Sin embargo, la investigación ha revelado que MSI está presente en una variedad de otras neoplasias, como en cáncer de endometrio. En 1997 Lynch *et al*. identificaron que la MSI se asociaba alrededor del 25 al 30% de los casos de endometrio (74). Al Mulla *et al*, en 2002, informaron que la MSI en cáncer de ovario oscilaba entre el 10 y el 20% de los casos en población británica (46). Los datos de nuestro estudio coinciden con los hallazgos previos, ya que se observó que el 17% de los casos presentaron MSI, identificándose en 5 de los casos analizados. Este hallazgo sugiere que la presencia de MSI podría ser un factor relevante en la tumorigénesis de CO, lo cual abre la puerta a futuras investigaciones que exploren el papel de MSI en este tipo de cáncer, a pesar de que se ha asociado con mayor frecuencia en otros tipos de cáncer como colorrectal y de endometrio. La presencia de MSI en el 17% de los casos sugiere que podría haber alteraciones en el sistema MMR, lo que explicaría la acumulación de mutaciones en estas células tumorales. No obstante, no todos los casos de CO presentan MSI, indicando que existen otros mecanismos biológicos involucrados en su desarrollo que no están necesariamente relacionados con la deficiencia del sistema MMR, resaltando la complejidad molecular del CO (72).

En 2014 Kloor *et al.* describió en la población americana la frecuencia de MSI-H con CO de alrededor del 2 al 5% de los casos; asociado a síndrome de Lynch, el subtipo endometroide exhibió la prevalencia más alta (75). Esta frecuencia de MSI-H coincide con nuestro reporte, ya que el 10% tenía MSI-H y el 7% tenía MSI-L. El resto de las 24 muestras presentaron MSS, representando el 93%.

En las 28 muestras sin CO se observó estabilidad de microsatélites (MSS) lo que indica el funcionamiento eficiente del sistema MMR, que actúa previniendo activamente los errores de replicación en las regiones de los microsatélites, asegurando la integridad genómica. La presencia de MSS en estas muestras sirve como marcador de estabilidad genómica, que es importante para la prevención del cáncer. Por el contrario, las células malignas, desarrollan defectos en estos sistemas, lo que conduce a la MSI (76).

Datos de Kobayashi *et al.* en el 2007 informaron una frecuencia de 15% de cáncer de ovario con una deficiencia de MMR, y el 68% para cáncer endometrial, hay pocos estudios que analizan y describen datos de MSI en cáncer de ovario. En general, se informaron tasas más altas de MSI para endometrio en comparación con cáncer de ovario (72). Además, reporta que la mayoría de los cánceres con MSI se dan esporádicamente, alrededor del 16% son el resultado de una mutación en uno de los genes MMR (72).

La MSI en cáncer colorrectal se estableció como marcador pronóstico en el 2008, en el estudio de Boland *et al.* en el contexto del síndrome de Lynch, la MSI-H en CCR se asocia con un buen pronóstico, que brinda mejores resultados después de cirugía de los pacientes. Brindando una mejor tasa de supervivencia. En CO se necesitan estudios más exhaustivos para comprender su papel, describir la evaluación de cómo afecta la MSI al pronóstico (77).

Tras analizar la inestabilidad de los marcadores por separado, observamos que la inestabilidad mayor observada se encuentra en los marcadores NR-21 y NR-24 con una frecuencia del 14%,

el 7% para el marcador BAT-25 y el 3% para los marcadores NR-27 y BAT-26.

El estudio de Kohmann *et al.* en 2011 coincide con los dos marcadores predominantes, ya que describió que NR-21 y NR-24 se encontraban más inestables en comparación con BAT-25 y BAT-26. Además, estos dos marcadores podrían ser marcadores confiables para detectar MSI en cáncer de ovario, pero se necesitan más investigaciones para comprender el papel de NR21 y NR-24 en CO, y su posible uso en paneles de muestras para MSI (78).

En el año 2002, en el estudio de Kim *et al.* encontró inestabilidad para BAT-25 en el 15 al 20% de los casos de cáncer gástrico. Describieron que el cáncer gástrico con MSI.H se asociaba a mejor pronóstico y la inestabilidad de BAT.25 se podría usar como evaluación pronóstica, sin embargo, describen que son cruciales más estudios para mejorar los resultados de pacientes (79). Otro hallazgo que describe la inestabilidad para los marcadores NR-21 y NR-24, es el estudio de Esmailnia *et al.* en Irán, 2017 revelaron que estos marcadores obtuvieron mayor inestabilidad en un 45% de pacientes con cáncer colorrectal. Destacaron que son marcadores más sensibles para detectar MSI en cáncer colorrectal y podrían ofrecer un valor pronóstico; además destacaron la necesidad de continuar con la investigación en estos marcadores (80).

La MSI ha surgido como un marcador en cáncer colorrectal, de endometrio y gástrico, donde se asocia con deficiencia de MMR. En el contexto de CO, la MSI sigue siendo un biomarcador poco caracterizado, se resalta la importancia de estudios más amplios para establecer un panorama más claro de MSI en CO en diversos grupos de pacientes. Además, el comprender qué marcadores son más sensibles y específicos para MSI en CO es esencial para la evaluación de su pronóstico.

Metilación del gen MLH1

La metilación juega un papel importante en la tumorigénesis, promoviendo la iniciación y el desarrollo de cáncer. De acuerdo con Yunxia *et al.* en 2017, la frecuencia de metilación del gen MLH1 es del 20% en cáncer colorrectal (CCR) con MSI. Sin embargo, distintos estudios han reportado un rango de metilación para CCR del 5.2% al 50% (81).

En otra investigación, Evrard *et al.* en el 2023, describieron que el fenotipo tumoral deficiente del sistema MMR se relaciona con la pérdida de una o más proteínas implicadas en este sistema, principalmente en la mayoría de los casos, la hipermetilación del promotor del gen MLH1 en cáncer colorrectal (82).

En el presente estudio se mostró una frecuencia de metilación de MLH1 del 3%, el 7% no presentó metilación. Otro 7% no presentó amplificación, y constituye el primer reporte en pacientes mexicanas con CO. Ravindran *et al.* describen que las mutaciones en los genes de MMR especialmente MLH1, MSH2 y MSH6, son relativamente raras en CO, y representan el 1 al 2% de los casos (31).

Correa *et al.* describe que inactivación del gen MLH1 se asocia predominantemente en CCR y de endometrio (83).

Expresión de MLH1

La expresión de la proteína MLH1 fue analizada mediante inmunofluorescencia. La proteína MLH1 es crucial para el mantenimiento de estabilidad genómica.

En un estudio realizado en Alemania, Yunxia *et al.* en 2017, reportaron que las células cancerosas presentaron una mayor expresión de la proteína MLH1, en comparación con las células epiteliales bronquiales normales.

En el contexto de cáncer colorrectal primario, se observó que el 54% de casos presentaron sobreexpresión de MLH1, lo que sugiere una alteración en la regulación de este marcador en tumores que muestran MSI alta (81).

En contraste, los resultados de nuestro estudio revelaron que la expresión de la proteína MLH1 en muestras de CO no mostró una sobreexpresión significativa en comparación con el grupo control. Las muestras con CO mostraron una expresión normal de MLH1, lo que podría indicar que, a diferencia de lo reportado de otros tipos de cáncer como cáncer colorrectal y el pulmonar, la regulación de la proteína MLH1 en CO no se alteró de forma evidente en las muestras analizadas.

Es importante destacar que la falta de una diferencia significativa en nuestra investigación no descarta el rol de MLH1 en CO, si no que podría indicar la necesidad de realizar más estudios con un tamaño de muestra mayor que puedan proporcionar más información precisa sobre la regulación de esta proteína en el contexto de CO.

Fortalezas

1. Contribución del primer reporte de la frecuencia de MSI de CO en México.
2. La investigación enfocada en MLH1 y la expresión de su proteína contribuye a una mejor comprensión de las alteraciones moleculares de tumorigénesis en CO.
3. Proporciona datos para futuras investigaciones, ya que sirve como punto de partida sobre la expresión de MLH1 y MSI en CO, particularmente en población mexicana.

Limitaciones

1. Una limitación importante del estudio es el número limitado de muestras de CO, que se debe principalmente al bajo número de diagnósticos en la región o a la ausencia de un registro establecido.
2. La información incompleta en el historial clínico, como antecedentes médicos del paciente, edad, medidas antropométricas o información relevante, o solo la evolución de la enfermedad.
3. La baja cantidad o degradación de material genético que se extrajo del tejido embebido en parafina.

Perspectivas del estudio

1. Amplificación del tamaño de la muestra reclutando más pacientes de múltiples centros o regiones.
2. Analizar la metilación de genes faltantes en el sistema MMR (MSH2, MSH6 y PMS2).
3. Evaluar la expresión proteica de los genes MMR.

X. CONCLUSIONES

El presente estudio representa el primer reporte sobre la frecuencia de inestabilidad de microsatélites y la metilación del gen *MLH1* en pacientes mexicanas con CO, ofreciendo datos de referencia importantes que pueden guiar investigaciones futuras en la población mexicana. Nuestros hallazgos son importantes porque representan un paso fundamental en la comprensión de las bases moleculares de CO en México.

Los resultados del análisis de MSI revelaron la prevalencia de MSI del 17%, con marcadores NR-21 y NR-24 mostrando la frecuencia más alta de inestabilidad, afectando el 14% de los casos, lo que sugiere un papel significativo en la vía de MMR en tumorigénesis.

El tipo histológico más frecuente fue el cáncer ovárico epitelial, lo que se alinea con la epidemiología de CO. Curiosamente, nuestro estudio encontró que las pacientes con MSI, eran en promedio mayor a 45 años. Por el contrario, las pacientes sin CO no mostraron ningún signo de MSI, lo que refuerza la especificidad del panel de MSI como biomarcador de CO.

Si bien este estudio es una base importante, también se destaca la necesidad de que futuras investigaciones amplíen estos hallazgos, para comprender cómo la MSI afecta la progresión del CO y su potencial como marcador pronóstico.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* mayo de 2021;71(3):209–49.
2. Evrard C, Alexandre J. Predictive and Prognostic Value of Microsatellite Instability in Gynecologic Cancer (Endometrial and Ovarian). *Cancers (Basel)* [Internet]. el 2 de mayo de 2021 [citado el 2 de julio de 2023];13(10). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34069845/>
3. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. Vol. 89, *Archives of Toxicology*. Springer Verlag; 2015. p. 899–921.
4. Kim DG, An JY, Kim H, Shin SJ, Choi S, Seo WJ, et al. Clinical Implications of Microsatellite Instability in Early Gastric Cancer. *J Gastric Cancer* [Internet]. el 1 de diciembre de 2019 [citado el 2 de julio de 2023];19(4):427–37. Disponible en: <https://doi.org/10.5230/jgc.2019.19.e38>
5. Sedhom R, Antonarakis ES. Clinical implications of mismatch repair deficiency in prostate cancer. *Future Oncology* [Internet]. el 1 de julio de 2019 [citado el 3 de julio de 2023];15(20):2395. Disponible en: </pmc/articles/PMC6714067/>
6. NCBI. MLH1 mutL homolog 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. 2023 [citado el 6 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=4292>
7. Nassiri M, Kooshyar MM, Roudbar Z, Mahdavi M, Doosti M. Genes and SNPs associated with non-hereditary and hereditary colorectal cancer. Vol. 14, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention; 2013. p. 5609–14.

8. Deshpande M, Romanski PA, Rosenwaks Z, Gerhardt J. cancers Gynecological Cancers Caused by Deficient Mismatch Repair and Microsatellite Instability. [citado el 2 de julio de 2023]; Disponible en: www.mdpi.com/journal/cancers
9. Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman C, Schottenfeld D. Cancer Epidemiology and Prevention. Schottenfeld and Fraumeni Cancer Epidemiology and Prevention, Fourth Edition [Internet]. el 14 de noviembre de 2017 [citado el 2 de julio de 2023];1–1308. Disponible en: <https://academic.oup.com/book/25326>
10. Efraín Sosa-Durán E, Mario García-Rodríguez F. Revista Mexicana de Anestesiología Panorama epidemiológico del cáncer en México. Supl 1 Abril-Junio [Internet]. 2013 [citado el 2 de julio de 2023];36:130–2. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/rmawww.medigraphic.org.mx>
11. ICD-O-3. Cancer Classification | SEER Training [Internet]. [citado el 3 de julio de 2023]. Disponible en: <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
12. Patterson AD, Gonzalez FJ, Perdew GH, Peters JM. Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. Toxicol Sci [Internet]. el 1 de octubre de 2018 [citado el 2 de julio de 2023];165(2):277–83. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30053205/>
13. Botelho MC, Teixeira JP, Oliveira PA. Carcinogenesis. Encyclopedia of Toxicology: Third Edition. el 1 de enero de 2014;713–29.
14. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell [Internet]. el 7 de enero de 2000 [citado el 2 de julio de 2023];100(1):57–70. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10647931/>
15. Yao Y, Dai W. Genomic Instability and Cancer. J Carcinog Mutagen [Internet]. 2014 [citado el 27 de noviembre de 2023];5(02). Disponible en: [/pmc/articles/PMC4274643/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26444443/)

16. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Trends Biochem Sci [Internet]. el 1 de marzo de 2016 [citado el 4 de julio de 2023];41(3):211. Disponible en: [/pmc/articles/PMC4783224/](#)
17. Escrig Sos J, Gómez Quiles L, Maiocchi K. The 8th edition of the AJCC-TNM classification: New contributions to the staging of esophagogastric junction cancer. Cir Esp. el 1 de octubre de 2019;97(8):432–7.
18. Berek JS, Renz M, Kehoe S, Kumar L, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. Int J Gynaecol Obstet [Internet]. el 1 de octubre de 2021 [citado el 2 de julio de 2023];155 Suppl 1(Suppl 1):61–85. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34669199/>
19. Ovarian, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer—Patient Version - NCI [Internet]. [citado el 6 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/types/ovarian>
20. Gibson E, Mahdy H. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary. StatPearls [Internet]. el 25 de julio de 2022 [citado el 4 de julio de 2023]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545187/>
21. American Cancer Society. What is Ovarian Cancer | Ovarian Tumors and Cysts [Internet]. 2018 [citado el 2 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/types/ovarian-cancer/about/what-is-ovarian-cancer.html>
22. Williams CJ, Erickson GF. Morphology and Physiology of the Ovary. Endotext [Internet]. el 30 de enero de 2012 [citado el 4 de julio de 2023]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>
23. Hollis RL. Molecular characteristics and clinical behaviour of epithelial ovarian cancers. Cancer Lett. el 28 de febrero de 2023;555:216057.

24. Gorodnova T V., Sokolenko AP, Kuligina E, Berlev I V., Imyanitov EN. Principles of clinical management of ovarian cancer. Chin Clin Oncol [Internet]. el 1 de diciembre de 2018 [citado el 4 de julio de 2023];7(6). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30509078/>
25. Menon U, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Singh N, Ryan A, Karpinskyj C, et al. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. Lancet [Internet]. el 6 de junio de 2021 [citado el 3 de julio de 2023];397(10290):2182. Disponible en: [/pmc/articles/PMC8192829/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/358192829/)
26. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin [Internet]. el 1 de mayo de 2024 [citado el 14 de diciembre de 2024];74(3):229–63. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21834>
27. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. J Epidemiol Glob Health [Internet]. el 1 de diciembre de 2019 [citado el 2 de julio de 2023];9(4):217–22. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31854162/>
28. Centers for Disease Control and Prevention. Ovarian Cancer | CDC [Internet]. 2022 [citado el 2 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/cancer/ovarian/index.htm>
29. Hayashi T, Hayashi T, Konishi I. Histopatología molecular para establecer un método de diagnóstico y terapia clínica para el carcinoma de ovario. Revista de investigación de medicina clínica [Internet]. el 28 de febrero de 2023 [citado el 4 de diciembre de 2023];15(2):68–75. Disponible en:

<https://www.jocmr.org/index.php/JOCMR/article/view/4853>

30. Harley I, Rosen B, Risch HA, Siminovitch K, Beiner ME, McLaughlin J, et al. Ovarian cancer risk is associated with a common variant in the promoter sequence of the mismatch repair gene MLH1. *Gynecol Oncol* [Internet]. junio de 2008 [citado el 2 de noviembre de 2024];109(3):384. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3060029/>
31. Ravindran F, Choudhary B, Ravindran F, Choudhary B. Ovarian Cancer: Molecular Classification and Targeted Therapy. *Ovarian Cancer - Updates in Tumour Biology and Therapeutics* [Working Title] [Internet]. el 5 de febrero de 2021 [citado el 4 de diciembre de 2023]; Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/75017>
32. Rossing MA, Wicklund KG, Cushing-Haugen KL, Weiss NS. Predictive Value of Symptoms for Early Detection of Ovarian Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. el 24 de febrero de 2010 [citado el 4 de diciembre de 2023];102(4):222–9. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1093/jnci/djp500>
33. González-Martín A, Harter P, Leary A, Lorusso D, Miller RE, Pothuri B, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up ☆. *Annals of Oncology* [Internet]. el 1 de octubre de 2023 [citado el 4 de diciembre de 2023];34(10):833–48. Disponible en: <http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753423007974/fulltext>
34. Forstner R. Early detection of ovarian cancer. *Eur Radiol* [Internet]. el 1 de octubre de 2020 [citado el 4 de diciembre de 2023];30(10):5370. Disponible en: </pmc/articles/PMC7476911/>
35. Lecuona Rodríguez MAlejandro, Guerrero Álvarez Alejandra. *Medicina general : diagnóstico en oncología*. Elsevier; 2015.

36. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006 7:5 [Internet]. el 12 de abril de 2006 [citado el 5 de julio de 2023];7(5):335–46. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrm1907>
37. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* [Internet]. el 10 de julio de 2012 [citado el 2 de julio de 2023];22(1):9–20. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22789535/>
38. Ali AT, Al-Ani O, Al-Ani F. Epidemiology and risk factors for ovarian cancer. *Prz Menopauzalny* [Internet]. 2023 [citado el 4 de diciembre de 2023];22(2):93. Disponible en: </pmc/articles/PMC10477765/>
39. Ovarian Cancer Risk Factors | Risk Factors for Ovarian Cancer [Internet]. [citado el 4 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/types/ovarian-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
40. Crispens M. Endometrial and Ovarian Cancer in Lynch Syndrome. *Clin Colon Rectal Surg* [Internet]. 2012 [citado el 4 de diciembre de 2023];25(2):97. Disponible en: </pmc/articles/PMC3423887/>
41. NAKAMURA K, BANNO K, YANOKURA M, IIDA M, ADACHI M, MASUDA K, et al. Features of ovarian cancer in Lynch syndrome (Review). *Mol Clin Oncol* [Internet]. noviembre de 2014 [citado el 4 de diciembre de 2023];2(6):909. Disponible en: </pmc/articles/PMC4179837/>
42. Ovejero-Sánchez M, González-Sarmiento R, Herrero AB. DNA Damage Response Alterations in Ovarian Cancer: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)* [Internet]. el 1 de enero de 2023 [citado el 4 de julio de 2023];15(2). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36672401/>
43. Catherine Sánchez N. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología

- del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. el 1 de julio de 2013;24(4):553–62.
44. Baudrin LG, Deleuze JF, How-Kit A. Molecular and computational methods for the detection of microsatellite instability in cancer. *Front Oncol* [Internet]. el 12 de diciembre de 2018 [citado el 28 de enero de 2024];8(DEC):426670. Disponible en: www.frontiersin.org
 45. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* [Internet]. el 1 de junio de 2017 [citado el 4 de diciembre de 2023];58(5):235. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5474181/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35474181/)
 46. Liu J, Albarracin CT, Chang KH, Thompson-Lanza JA, Zheng W, Gershenson DM, et al. Microsatellite instability and expression of hMLH1 and hMSH2 proteins in ovarian endometrioid cancer. *Mod Pathol* [Internet]. enero de 2004 [citado el 3 de julio de 2023];17(1):75–80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14631366/>
 47. Martha Alejandra FG, José Miguel MO, José Alfredo CG, Jesús Israel MF, Guerrero-Valdez M, Saúl Armando BO, et al. Inestabilidad de Microsatélites como marcador biológico para la administración de Pembrolizumab. *Rev Med UAS* [Internet]. el 1 de abril de 2022 [citado el 4 de diciembre de 2023];12(2):135–42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v12.n2.008>
 48. Evrard C, Tachon G, Randrian V, Karayan-Tapon L, Tougeron D. Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. el 1 de octubre de 2019 [citado el 5 de diciembre de 2023];11(10). Disponible en: [/pmc/articles/PMC6826728/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35474181/)
 49. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Front Mol Biosci*. el 26 de junio de 2020;7:535672.
 50. Fraune C, Rosebrock J, Simon R, Hube-Magg C, Makrypidi-Fraune G, Kluth M, et al.

- High homogeneity of MMR deficiency in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* el 1 de marzo de 2020;156(3):669–75.
51. Evrard C, Tachon G, Randrian V, Karayan-Tapon L, Tougeron D. Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. el 1 de octubre de 2019 [citado el 4 de diciembre de 2023];11(10). Disponible en: </pmc/articles/PMC6826728/>
 52. Gupta D, Heinen CD. The mismatch repair-dependent DNA damage response: Mechanisms and implications. Vol. 78, *DNA Repair*. Elsevier B.V.; 2019. p. 60–9.
 53. Ito E, Yanagisawa Y, Iwahashi Y, Suzuki Y, Nagasaki H, Akiyama Y, et al. A Core Promoter and a Frequent Single-Nucleotide Polymorphism of the Mismatch Repair Gene hMLH1 [Internet]. 1999. Disponible en: <http://www.idealibrary.com>
 54. Domingo Enrico SSJr. *ATLAS of GENETICS and CYTOGENETICS in ONCOLOGY and HAEMATOLOGY*. 2005 [citado el 10 de julio de 2023]. MLH1 (human mutL homolog 1). Disponible en: <https://atlasgeneticsoncology.org/gene/149/mlh1-%28human-mutl-homolog-1%29>
 55. Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Experimental & Molecular Medicine* 2017 49:4 [Internet]. el 28 de abril de 2017 [citado el 15 de enero de 2024];49(4):e322–e322. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/emm201710>
 56. Jang HS, Shin WJ, Lee JE, Do JT. CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes* 2017, Vol 8, Page 148 [Internet]. el 23 de mayo de 2017 [citado el 15 de enero de 2024];8(6):148. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4425/8/6/148/htm>
 57. Pal T, Permuth-Wey J, Sellers TA. A Review of the Clinical Relevance of Mismatch-

- Repair Deficiency in Ovarian Cancer. *Cancer* [Internet]. el 8 de agosto de 2008 [citado el 5 de julio de 2023];113(4):733. Disponible en: /pmc/articles/PMC2644411/
58. Carnevali IW, Cini G, Libera L, Sahnane N, Facchi S, Viel A, et al. MLH1 Promoter Methylation Could Be the Second Hit in Lynch Syndrome Carcinogenesis. *Genes (Basel)* [Internet]. el 1 de noviembre de 2023 [citado el 17 de enero de 2024];14(11):2060. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/11/2060/htm>
59. Ma Y, Chen Y, Petersen I. Expression and promoter DNA methylation of MLH1 in colorectal cancer and lung cancer. *Pathol Res Pract.* el 1 de abril de 2017;213(4):333–8.
60. Carnevali IW, Cini G, Libera L, Sahnane N, Facchi S, Viel A, et al. MLH1 Promoter Methylation Could Be the Second Hit in Lynch Syndrome Carcinogenesis. *Genes (Basel)* [Internet]. el 1 de noviembre de 2023 [citado el 11 de enero de 2024];14(11):2060. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/11/2060/htm>
61. Ozdemir F, Altinisik J, Karateke A, Coksuer H, Buyru N. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Exp Ther Med* [Internet]. diciembre de 2012 [citado el 22 de enero de 2024];4(6):1092–6. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/233889400_Methylation_of_tumor_suppressor_genes_in_ovarian_cancer
62. Pineda M, Mur P, Iniesta MD, Borràs E, Campos O, Vargas G, et al. MLH1 methylation screening is effective in identifying epimutation carriers. *European Journal of Human Genetics* [Internet]. diciembre de 2012 [citado el 3 de julio de 2023];20(12):1256. Disponible en: /pmc/articles/PMC3499751/
63. Geissler F, Nesic K, Kondrashova O, Dobrovic A, Swisher EM, Scott CL, et al. The role of aberrant DNA methylation in cancer initiation and clinical impacts. *Ther Adv Med Oncol* [Internet]. el 1 de enero de 2024 [citado el 2 de noviembre de 2024];16. Disponible

en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/17588359231220511>

64. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* 2008 18:1 [Internet]. el 24 de diciembre de 2007 [citado el 5 de julio de 2023];18(1):85–98. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/cr2007115>
65. Yang G, Zheng R yi, Jin Z shun. Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. el 1 de diciembre de 2019 [citado el 3 de julio de 2023];145(12):2891–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31617076/>
66. Kim YM, Lee SW, Chun SM, Kim DY, Kim JH, Kim KR, et al. Analysis and Comparison of Somatic Mutations in Paired Primary and Recurrent Epithelial Ovarian Cancer Samples. *PLoS One* [Internet]. el 17 de junio de 2014 [citado el 3 de julio de 2023];9(6). Disponible en: </pmc/articles/PMC4060993/>
67. Simpkins SB, Bocker T, Swisher EM, Mutch DG, Gersell DJ, Kovatich AJ, et al. MLH1 Promoter Methylation and Gene Silencing is the Primary Cause of Microsatellite Instability in Sporadic Endometrial Cancers. *Hum Mol Genet* [Internet]. el 1 de abril de 1999 [citado el 22 de enero de 2024];8(4):661–6. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1093/hmg/8.4.661>
68. Watanabe Y, Ueda H, Etoh T, Koike E, Fujinami N, Mitsuhashi A, et al. A Change in Promoter Methylation of hMLH1 is a Cause of Acquired Resistance to Platinum-based Chemotherapy in Epithelial Ovarian Cancer. *Anticancer Res* [Internet]. el 1 de mayo de 2007 [citado el 22 de enero de 2024];27(3B):1449–52. Disponible en: <https://ar.iiarjournals.org/content/27/3B/1449>
69. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health* [Internet]. 2019 [citado el 30 de

septiembre de 2024];11:287–99. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31118829/>

70. Mehra P, Aditi S, Prasad KM, Bariar N k. Histomorphological Analysis of Ovarian Neoplasms According to the 2020 WHO Classification of Ovarian Tumors: A Distribution Pattern in a Tertiary Care Center. *Cureus* [Internet]. el 29 de abril de 2023 [citado el 30 de septiembre de 2024];15(4). Disponible en: [/pmc/articles/PMC10225821/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31118829/)
71. Radu CA, Matos de Melo Fernandes N, Khalfe S, Stordal B. Awareness of ovarian cancer symptoms and risk factors in a young ethnically diverse British population. *Cancer Med.* el 1 de abril de 2023;
72. Kobayashi H, Sumimoto K, Moniwa N, Imai M, Takakura K, Kuromaki T, et al. Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. enero de 2007 [citado el 1 de octubre de 2024];17(1):37–43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17291229/>
73. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, et al. Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. el 1 de febrero de 2019 [citado el 21 de noviembre de 2024];37(4):286–95. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30376427/>
74. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. el 18 de febrero de 2004 [citado el 1 de octubre de 2024];96(4):261–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14970275/>
75. Kloor M. Pathogenese mikro-satelliteninstabiler kolorektaler Karzinome. Evaluierung neuer diagnostischer und therapeutischer Optionen. *Pathologe.* noviembre de

2013;34(SUPPL 2):277–81.

76. Liu J, Albarracin CT, Chang KH, Thompson-Lanza JA, Zheng W, Gershenson DM, et al. Microsatellite instability and expression of hMLH1 and hMSH2 proteins in ovarian endometrioid cancer. *Modern Pathology* [Internet]. el 1 de enero de 2004 [citado el 21 de noviembre de 2024];17(1):75–80. Disponible en: <http://www.modernpathology.org/article/S0893395222044428/fulltext>
77. Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* [Internet]. 2008 [citado el 21 de noviembre de 2024];7(1):41–52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17636426/>
78. Chung Y, Nam SK, Chang HE, Lee C, Kang GH, Lee HS, et al. Evaluation of an eight marker-panel including long mononucleotide repeat markers to detect microsatellite instability in colorectal, gastric, and endometrial cancers. *BMC Cancer* [Internet]. el 1 de diciembre de 2023 [citado el 28 de enero de 2024];23(1):1–11. Disponible en: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-023-11607-6>
79. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. el 1 de diciembre de 2002;123(6):1804–11.
80. Esmailnia G, Montazer-Haghighi M, Javadi G, Parivar K, Zali M. Microsatellite Instability Markers Status in Colorectal Cancer. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* Journal homepage: www.zjrms.ir Available [Internet]. 2013 [citado el 1 de noviembre de 2024];16(12):25–8. Disponible en: www.zjrms.ir
81. Ma Y, Chen Y, Petersen I. Expression and promoter DNA methylation of MLH1 in

- colorectal cancer and lung cancer. *Pathol Res Pract.* el 1 de abril de 2017;213(4):333–8.
82. Evrard C, Cortes U, Ndiaye B, Bonnemort J, Martel M, Aguillon R, et al. An Innovative and Accurate Next-Generation Sequencing–Based Microsatellite Instability Detection Method for Colorectal and Endometrial Tumors. *Laboratory Investigation.* el 1 de febrero de 2024;104(2):100297.
83. Correa PA, Pujol-Borrell R, Colobran R. Bisulfite genomic sequencing to uncover variability in DNA methylation: Optimized protocol applied to human T cell differentiation genes. *Inmunología [Internet].* el 1 de octubre de 2012 [citado el 29 de enero de 2024];31(4):97–105. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-inmunologia-322-articulo-bisulfite-genomic-sequencing-uncover-variability-S0213962612000911>
84. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol [Internet].* el 1 de abril de 2019 [citado el 28 de enero de 2024];36(2):116. Disponible en: </pmc/articles/PMC6425773/>
85. García-Alegría AM, Anduro-Corona I, Pérez-Martínez CJ, Corella-Madueño MAG, Rascón-Durán ML, Astiazaran-García H. Quantification of DNA through the nanodrop spectrophotometer: Methodological validation using standard reference material and sprague dawley rat and human DNA. *Int J Anal Chem.* 2020;2020.
86. Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv Biobank [Internet].* el 8 de agosto de 2016 [citado el 23 de enero de 2024];14(4):264. Disponible en: </pmc/articles/PMC4991598/>
87. Martha Alejandra FG, José Miguel MO, José Alfredo CG, Jesús Israel MF, Guerrero-

Valdez M, Saúl Armando BO, et al. Inestabilidad de Microsatélites como marcador biológico para la administración de Pembrolizumab. *Rev Med UAS* [Internet]. el 1 de abril de 2022 [citado el 28 de enero de 2024];12(2):135–42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.28960/revmeduas.2007-8013.v12.n2.008>

88. Nasr SH, Fidler ME, Said SM. Paraffin Immunofluorescence: A Valuable Ancillary Technique in Renal Pathology. *Kidney Int Rep.* el 1 de noviembre de 2018;3(6):1260–6.

XII. ANEXOS

ANEXO 1. Extracción de ADN de tejido por medio del kit “QIAamp DNA FFPE”

Fundamento:

La extracción de ADN es un procedimiento que consiste en purificar el ADN mediante métodos químicos y físicos a partir de una muestra de ADN, debe ser puro, libre de proteínas y de otros componentes celulares. Para la extracción se utilizan kits disponibles comercialmente y también métodos manuales (84).

Reactivos	Materiales	Equipo
Soluciones del kit “QIAamp DNA FFPE”. Etanol Xilol	Micropipetas Tubos eppendorf de 2 mL Bisturí Pipetas	Centrifuga Vortex Incubadora Baño maría con termostato digital

Procedimiento:

1. Se realizaron los cortes del bloque de la muestra, con un microtomo de 8 secciones de 10 µm de grosor de tejido FFPE utilizando el kit de tejido QIAamp DNA FFPE (Qiagen Cat No/ID: 56404).
2. Posicionar inmediatamente las secciones en un tubo de microcentrífuga de 2 mL posteriormente se debe agregar 1 mL de xileno a la muestra. Se debe cerrar la tapa y agitar vigorosamente durante 10 segundos.
3. Se procede a centrifugar a 14,000 rpm durante aproximadamente 3 minutos a temperatura ambiente (15°C - 25°C). Retirar el sobrenadante y se conserva el pellet.

4. Agregar 1 mL de etanol (96-100%) al sedimento y se debe mezclar utilizando vórtex durante 5 segundos aproximadamente. Se deben realizar dos lavados.
5. Centrifugar a 14,000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente (15°C - 25°C). Se procede a retirar el sobrenadante y se conserva el pellet.
6. Posteriormente resuspender el sedimento en 180 µL de buffer ATL. Agregar 20 µL de proteinasa K y agitar en el vortex. Se procede a incubar a 56°C por 1 hora, después se incuba 1 hora más a 90°C. Agitar en vortex eventualmente durante la incubación para dispersar la muestra. Cuando culmine el tiempo de incubación, se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos.
7. Agregar 200 µL de buffer AL a la muestra, posteriormente mezclar por vortex durante 15 segundos e incubar a 70°C durante 10 min.
8. Después se agrega 200 µL de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar por vortex durante 15 segundos.
9. Con cuidado se debe aplicar la mezcla del paso anterior (incluido el precipitado) a la columna de centrifugación n QIAamp Mini (tubo de recolección de 2 mL) sin humedecer el borde. Se procede a cerrar la tapa y se centrifuga a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto. Se coloca la columna de centrifugación QIAampMini en un tubo de recolección limpio, desechar el tubo que contiene el filtrado. Se debe agregar todo el precipitado a la columna de centrifugación. Si la solución no paso totalmente a través de la membrana, se debe centrifugar nuevamente a una mayor velocidad hasta que toda la solución pase.

10. Destapar con cuidado la columna de centrifugación QIAamp Mini y agregar 500 μ L de buffer AW1 sin humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto. Situar la columna de centrifugación QIAampMini en un tubo de recolección limpio y desechar el tubo que tiene el filtrado.
11. Destapar con cuidado la columna de centrifugación QIAamp Mini y agregar 500 μ L de buffer AW2 sin humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad (20,000 x g; 14,000 rpm) durante aproximadamente 3 minutos. Desechar el filtrado y volver a centrifugar durante 1 minutos a 14,000 rpm.
12. Situar la columna de centrifugación QIAampMini en un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 o 2 mL y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado. Abrir con cuidado la columna de centrifugación QIAamp Mini y agregar 45 μ L de buffer AE, sin humedecer el borde. Incubar a temperatura ambiente aproximadamente durante 1 minuto y centrifugar a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto.
13. Agregar nuevamente 45 μ L de buffer AE sin humedecer el borde. Incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos, después centrifugar a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto.

ANEXO 2. Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Fundamento:

Uno de los métodos más utilizados para determinar la pureza del ADN es mediante absorbancia a 260 nm. La relación de absorbancia determina la calidad del ADN y la presencia de contaminantes en las muestras, durante el proceso de extracción de ADN (85). La lectura se realiza a 260 nm y 280 nm, el ADN absorbe la luz con mayor fuerza y el número que se produce estima la concentración de la solución. Se acepta una proporción de 1.8 como “pura” para el ADN. Si la proporción es más baja indica la presencia de contaminantes (86).

Reactivos	Materiales	Equipo
Muestra de ADN Agua inyectable	Pipetas Puntillas Vortex	Espectrofotómetro lector de microplacas Multiskan SkyHigh con pantalla táctil y placa MDop Duo

Procedimiento

1. Se procede a incubar a 65°C durante una hora previo a la cuantificación.
2. Homogeneizar la muestra y dar pulso de centrifugado sin pasar de 3,000 rpm.
3. Encender el espectrofotómetro y elegir el programa de ácidos nucleicos de doble cadena.
4. En la microplaca se coloca 1 µL de ADN en cada pocillo de manera duplicada, la placa cuenta con 8 filas, para la lectura del blanco se coloca 1 µL de agua estéril.
5. Se registran los datos obtenidos en los rangos de la densidad óptica a 260 nm.
6. Posteriormente las alícuotas se almacenan a una temperatura de - 20°C hasta su uso.

Anexo 3. Integridad de ADN mediante electroforesis de agarosa.

La electroforesis describe el desplazamiento de moléculas cargadas mediante campo eléctrico, siendo el movimiento de una molécula de ADN inversamente proporcional a su peso molecular.

En gel de agarosa se utiliza de manera usual para el análisis del ADN (85).

Reactivos	Materiales	Equipo
Muestra de ADN	Pipetas	Thermo Scientific™
Agarosa 1%	Puntillas	electroforesis en mini gel
Buffer Tris-Borate-Edta 1X	Microtubos	Ow1™ EasyCast™ B2
SYBR® Gold	Balanza analítica	Transiluminador en gel
Marcador de peso molecular	Papel Parafilm	Fuente de poder
	Peine de plastico	Microondas
	Liga	
	Gradilla	

Procedimiento:

1. Colocar el molde para hacer los geles en la cámara, y cerrar los extremos con ayuda de la liga para que no derrame la agarosa.
2. En un vaso precipitado de 200 ml para preparar la solución, añadir 100 ml de TBE 1x más 1 gr de agarosa, revolver la mezcla para diluir los grumos de agarosa.
3. Calentar la mezcla en microondas durante 45 segundos hasta disolver la agarosa.
4. Verter la mezcla en la cámara del gel, y se coloca el peine y se deja secar unos 15 minutos aproximadamente.

5. Una vez que el gel este solidificado se retira el peine con cuidado, y se aloja el gel en la cámara. Se llena la cámara de electroforesis con tampón de electroforesis, asegurándose que el gel quede completamente cubierto.
6. En papel Parafilm se coloca 2 μL de agente intercalante, se le añade 5 μL de ADN y 1 μL de SYBR Gold, con ayuda de la pipeta se mezcla durante unos segundos.
7. Cargar las muestras dentro de los pocillos del gel y se procede a colocar la cubierta de la electroforesis en cada terminal de los electrodos (Es importante insertar correctamente los electrodos, el cable negro en la entrada de la fuente de corriente (entrada negra), la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo de la fuente).
8. Configurar la fuente de corriente a 120 voltios durante 45 minutos.
9. Una vez que la electroforesis finalice, apagar la fuente de corriente, se desconectan los electrodos y sacar la cubierta.
10. Situar el gel en el transiluminador.

Anexo 4. Determinación de inestabilidad de microsatélites

Fundamento:

Se han desarrollado diversas perspectivas para la detección de MSI en cáncer, ya que se ha detectado en diversos tipos de cáncer como el colorrectal, de endometrio y el gástrico. La MSI proporciona información sobre el grado de sensibilidad y especificidad (78).

Se han planteado diversos marcadores de microsatélites para su detección, este método es el estándar de oro que se basa en la amplificación de marcadores de microsatélites con métodos basados en PCR (44). Se desarrolló un panel pentaplex con cinco marcadores de repetición de mononucleótidos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 y NR-27) es más específico (87).

Reactivos	Materiales	Equipo
Type-it® Microsatellite PCR Marca Qiagen Master Mix Q-Solution Formamida Marcador de fragmentos GeneScan 500 LIZ Dye Size Standard	Muestras de ADN Puntillas para micropipetas Tubos eppendorf de 0.2 ml y 1.5 ml Gradillas Micropipetas	Microcentrífuga de microplacas Sistema de analizador genético SeqStudio™ con SmartStart Vortex Termociclador VeritiPro™ 96-well

Procedimiento:

1. Se rotulan los tubos eppendorf 0.2 ml de acuerdo con el número de muestras que se procesaran.

2. Se realiza el mix de iniciadores para PCR multiplex de acuerdo con la siguiente tabla:

Componente	Cantidad
Type-it MSI PCR Master Mix	6.25 μ L
Mix de iniciadores	1.25 μ L
H2O	1.50 μ L
Q-solution	2.5 μ L
ADN	2.0 μ L
Total	11.50l μ L

3. Se coloca 11.5 μ l del mix anterior a cada tubo de 1.5 mL y se coloca en el termociclador (40 ciclos) a las siguientes condiciones:

Proceso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min
Desnaturalización	95 °C	30 seg
Alineación	58 °C	90 seg
Extensión	72 °C	30 seg
Extensión final	60 °C	30 min
Conservación	4 °C	Indefinido

4. Sacar los tubos del termociclador.

5. Preparar un mix de la reacción con 8.43 μ L de formamida, y 0.07 μ L GeneScan 500 Liz.

6. Colocar 8.5 μ L del mix anterior, en cada pocillo de la placa de 96 pocillos.

7. Se procede a sacar los tubos del termociclador y se le añade 2 μL del producto amplificado al pocillo proporcionado.
8. Dar un spin en la centrifuga de microplacas durante unos segundos, y colocar la placa por 5 minutos a una temperatura de 96°C.
9. Se realiza el choque térmico colocando la placa en hielo por 5 minutos.
10. Finalmente se realiza la corrida de muestras en el secuenciador.

ANEXO 5. Conversión de bisulfito al ADN

Fundamento:

La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en el control de la expresión de genes, participa en distintos procesos biológicos como en el desarrollo embrionario, diferenciación celular y la proliferación. Para determinar el estado de metilación del ADN se necesita de un método preciso y eficiente. La secuenciación con bisulfito proporciona un enfoque cuantitativo y cualitativo para la detección de metilación del ADN (83).

Esta técnica consta de tres principales pasos:

1. Sulfonación: Se añade el grupo bisulfito en el doble enlace 5-6 de la citocina no metilada.
2. Desanimación: Se elimina el grupo amino de las citocina-bisulfito, dando como resultado uracilo-bisulfito.
3. Desulfonación: Se elimina el grupo sulfonato para dar procedencia a un uracilo.

Posteriormente se amplificará el ADN por PCR, los uracilos se convierten en timina, en tanto las citosinas metiladas continúan siendo citosinas (57).

Reactivos	Materiales	Equipo
Kit EZ DNA Methylation-Gold de marca ZYMO Research Agua inyectable	Gradillas Tubos eppendorf 0.2 ul Pipetas Puntillas	Vortex

Procedimiento:

1. Se procede a sacar las muestras de ADN, que se convertirán a una concentración de 1,500 ng/ μ L en un volumen de 20 μ L añadiendo 15 uL de muestra y 5 uL de agua inyectable en un tubo de PCR de 0.2 mL.
2. Llevar los controles de metilación a una concentración de 250 ng/ μ L en un volumen de 20 μ L añadiendo 2 μ L de control metilado en un tubo de PCR estéril, y 2 μ L de control no metilado a otro tubo de PCR de 0.2 mL y agregar 18 μ L de agua inyectable a cada tubo.
3. Preparar el reactivo de conversión (CT) agregando directamente 900 μ L de agua inyectable al tubo, posteriormente se agrega 300 μ L de buffer de dilución y 50 μ L de buffer disolvente. Se procede agitar en vórtex durante 10 minutos.
4. Agregar 130 μ L de conversión (CT) directamente a cada tubo de ADN y a los controles previamente preparados, resuspender la solución.
5. Se colocan los tubos en la placa del termociclador con las siguientes condiciones:

98°C	10 minutos
64°C	02:30 horas
4°C	∞

6. Sacar del kit las columnas y colocarlas en los tubos de recolección con el número de muestras a procesar, agregar 600 μL de buffer de unión. Agregar los productos de PCR en las columnas correspondientes, mezclar los tubos por inversión.
7. Centrifugar los tubos a 12,000 rpm durante 30 segundos. Desechar el líquido del tubo colector y volver a colocar la columna del tubo.
8. Agregar 100 μL de buffer de lavado a la columna y centrifugar por 30 segundos a 12,000 rpm, desechar el líquido del tubo colector.
9. Adicionar 200 μL de buffer de desulfonación a la columna e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Centrifugar a 12,000 rpm durante 30 segundos y desechar el líquido del tubo colector.
10. Adicionar 200 μL de buffer de lavado. Centrifugar a 12,000 rpm durante 30 segundos.
11. Repetir el paso anterior.
12. Desechar los tubos de colección colocar las columnas en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL.
13. Agregar de 10 a 15 μL de buffer de elución directo sobre el filtro de la columna sin tener contacto con él. Se procede a centrifugar a 12,000 rpm durante 30 segundos.
14. Rotular tubos de 2 mL con el número de muestras que están en la columna, se transfiere el ADN eluido de los tubos 1.5 μL a 0.2 mL.
15. Almacenar el ADN convertido a -20°C .

ANEXO 6. Reacción en cadena de polimerasa específica para metilación (MS-PCR)

Fundamento:

La técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se basa en la amplificación de un segmento específico de ADN, a partir de una pequeña cantidad, produce millones de copias. Se implica el uso de fragmentos llamados cebadores que seleccionan el segmento del genoma que amplificará y varias rondas de síntesis (83). MS-PCR es un procedimiento, que requiere dos conjuntos de cebadores, uno para ADN metilado y el otro para ADN no metilado.

Reactivos	Materiales	Equipos
Iniciador forward metilado	Micropipetas	Centrífuga
Iniciador forward no metilado	Puntillas estériles	Vortex
Iniciador reverse metilado	Tubos estériles de PCR de 0.2 µL.	Termociclador
Iniciador reverse no metilado	Tubos eppendorf estériles de 1.5 mL.	
Taq polimerasa platinum	Agua inyectable.	
ADN	Gradillas.	
Controles metilados y no metilados		
Buffer 10X		
MgCl ₂		
dDTPs		

Procedimiento:

1. Preparar el mix de la reacción dependiendo el número de muestras que se procesan con los siguientes reactivos en dos tubos eppendorf de 1.5 mL estériles.

ADN metilado		ADN no metilado	
Reactivos	1x	Reactivos	1x
H ₂ O	16.75 uL	H ₂ O	16.75 μL
Buffer	2.50 μL	Buffer	2.50 μL
MgCl ₂	0.750 μL	MgCl ₂	0.750 μL
dNTP's	0.50 μL	dNTP's	0.50 μL
Primer F	1 μL	Primer F	1 μL
Primer R	1 μL	Primer R	1 μL
Taq pol	0.05 μL	Taq pol	0.05 μL
ADN	2.45 μL	ADN	2.45 μL
Total	23 μL	Total	23 μL

2. En un tubo (1) estarán los iniciadores para el ADN metilado y en otro tubo (2) para el ADN no metilado.
3. Para preparar la mezcla de la reacción (1) se agregará, 16.75 μL de agua inyectable.
4. Mezclar los tubos con el vortex y centrifugar a 3,000 rpm durante 10 segundos.
5. Distribuir las dos mezclas de reacción en los tubos de PCR rotulados con el código de las muestras a procesar, los controles metilados y no metilado, y el blanco.
6. Adicionar en los tubos correspondientes el ADN de cada muestra, el control metilado y no metilado, y el agua inyectable para el blanco.
7. Mezclar los tubos en el vortex y centrifugar a 3,000 rpm durante 10 segundos.
8. Situar los tubos en la placa de termociclador (40 ciclos) y programar las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo
95°C	5 minutos
94°C	45 segundos
57°C	45 segundos
72°C	1 minuto
4°C	∞

9. Poner las columnas en los tubos de colección, ponerlas en una gradilla y rotular los tubos.
10. Agregar 600 μL de M.binding buffer en la columna. Agregar 150 μL de producto de PCR en la columna con el M.binding buffer y mezclar por inversión. Centrifugar a 12,000 rpm durante 30 segundos.
11. Agregar 100 μL de M-wash buffer a la columna, posteriormente centrifugar por 30 segundos a máxima velocidad (12,000 rpm) y vaciar el líquido del tubo colector.
12. Agregar 200 μL de M-desulphonation buffer a las columnas y se procede a incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Centrifugar por 30 segundos a máxima velocidad y vaciar el líquido del tubo colector.
13. Agregar 200 μL de W.wash buffer a la columna, centrifugar 30 segundos a máxima velocidad y vaciar el líquido del tubo colector. (Repetir este paso).
14. Tomar tubos estériles de 1.5 μL y en estos colocar las columnas y se desechan los tubos.
15. Agregar de 10 a 15 μL de M.elution buffer directo sobre el filtro de la columna. Centrifugar 30 segundos a máxima velocidad para eludir el ADN que estará convertido.
16. Rotular tubos de 0.2 μL con el código de las muestras que están en la columna. Transferir el ADN eluido de los tubos de 1.5 μL a los tubos de 0.2 μL . Almacenar a -20°C .

ANEXO 7. Electroforesis en gel de agarosa

Fundamento:

La electroforesis consiste en la separación de moléculas en función de su velocidad de movimiento a través del gel, bajo un campo eléctrico. La electroforesis en gel de agarosa se utiliza para preparación y análisis de ADN. Se cargan en el gel marcadores de peso conocida para estimar el tamaño del fragmento de ADN (86).

Reactivos	Materiales	Equipo
TBE 1x	Pipetas	Thermo Scientific™
Agarosa 2%	Puntillas	electroforesis en mini gel
Syber Gold	Microtubos	Owl™ EasyCast™ B2
Agente intercalante	Balanza analítica	Transiluminador en gel
Marcador de peso molecular	Papel Parafilm	Fuente de poder
	Peine de plástico	Microondas
	Liga	
	Gradilla	

Procedimiento:

1. Colocar el molde para hacer geles en la cámara de electroforesis, y cerrar los extremos con una liga para que no se derrame la agarosa.
2. Agregar 100 ml de TBE 1x en un vaso de precipitado, agregar 2 gr de agarosa, revolver la mezcla hasta diluir.
3. Calentar en microondas durante 45 segundos hasta disolver la agarosa.

4. Verter la mezcla en la cámara del gel, se coloca el peine y se deja secar durante 15 minutos.
5. Una vez solidificado el gel retirar el peine, y alojar el gel en la cámara, agregar tampón de electroforesis, hasta cubrir el gel.
6. Colocar en un papel Parafilm 2 μL de agente intercalante, 5 μL de ADN y 1 μL de SYBR Gold, con ayuda de la pipeta se mezcla durante unos segundos.
7. Cargar la mezcla dentro de los pocillos del gel, y se procede a colocar la cubierta de la electroforesis en cada terminal de los electrodos (Insertar correctamente los electrodos, el cable negro en la entrada negra de la fuente, la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo de la fuente).
8. Configurar la fuente de corriente a 120 voltios durante 45 minutos.
9. Apagar la fuente de la corriente, desconectar los electrodos, retirar la cubierta y se procede a sacar el gel con mucho cuidado.
10. Situar el gel en el transiluminador, para observar los resultados.

ANEXO 8. Inmunofluorescencia

Fundamento:

La inmunofluorescencia en parafina es una técnica que permite investigar la localización y expresión de proteínas en una sección de tejido, utilizando colorantes fluorescentes, un fluoróforo que absorbe energía luminosa a una longitud de onda, se conoce como inmunofluorescencia. Se basa en el reconocimiento de los anticuerpos que identifican antígenos (88).

Reactivos	Materiales	Equipo
Buffer de citrato	Fluoroshield	Microscopio confocal
Buffer de lavado	Pañuelos	Horno de secado
Buffer de dilución	Tubo colin	
Buffer de bloqueo	Micropipetas	
	Puntillas	

Procedimiento:

1. Colocar las muestras en la estufa a 60°C durante 1 hora.
2. Desparafinar laminillas en 2 cambios de xileno por 5 minutos cada uno.
3. Hidratar en 2 cambios de etanol al 100% durante 3 minutos cada uno.
4. Etanol al 95% y 80% durante 1 minuto cada uno. Enjuagar en agua destilada.
5. Precalear el tubo colin que contiene buffer de citratos en baño maría a 95-100°C.
6. Incubar las muestras en el buffer de citratos durante 20 minutos.

7. Retirar del baño maría el tubo con las muestras y dejar enfriar durante 20 minutos aproximadamente o hasta que llegue a temperatura ambiente.
8. Enjuagar las muestras con buffer de lavado (PBS1X-Tween20) 2 por 5 minutos.
9. Retirar el exceso de buffer de lavado con un pañuelo y seccionar la muestra con la pluma hidrofóbica.
10. Inmediatamente agregar buffer de bloqueo y dejar durante 30 minutos.
11. Incubar con anticuerpo primario a una dilución adecuada durante toda la noche a 4°C.
12. Enjuagar las muestras con buffer de lavado, 3 veces durante 5 minutos.
13. Incubar con anticuerpo secundario a una dilución apropiada por 1 hora a 4°C.
14. Enjuagar las muestras con buffer de lavado, 3 veces durante 5 minutos.
15. Retirar el exceso de buffer y agregar una gota de fluoroshield a cada muestra y colocar el cubreobjetos cuidando no formar ninguna burbuja.
16. Dejar secar y almacenar a 4°C.

LA JEFATURA NACIONAL DE MÉDICOS RESIDENTES DEL ISSSTE

A través de su Coordinación Académica Nacional
Otorga la presente

CONSTANCIA

DE ASISTENCIA

PARA:

Mericia Guadalupe Sandoval Chavez

Por su destacada participación como **ASISTENTE**, en la ponencia en línea titulada **Cáncer de ovario** realizada el 9/20/2023, con una duración de **2 horas**.

FOLIO: JNMIR-2023-2661



DR. JAVIER ALEJANDRO RAMÍREZ ACOSTA
JEFE NACIONAL
JNMR DEL ISSSTE



JEFATURA NACIONAL
DE MÉDICOS RESIDENTES



Mesa directiva
2022-2024

Presidente
MSP Carlos Robles Talavera

Vicepresidente
Dr. Juan Carlos Navarro Guerrero

Secretaría
Dra. Claudia Karina Millán Otero

Tesorero
Dr. Enrique Lizárraga Arámburo

SOCIEDAD SINALOENSE DE SALUD PÚBLICA

otorga la presente

CONSTANCIA

Sandoval Chavez Mericia Guadalupe, Beltrán Ontiveros Saúl
Armando, Gutiérrez Castro Karla Paola, Ángulo Rojo Carla
A: Ernestina, Magaña Gómez Javier Abednego, Lizárraga Verdugo
Erik Rene.

Por su destacada participación en la presentación de trabajos libres con
el trabajo titulado:

**“Análisis de metilación de MLH1 y expresión de su proteína en
pacientes con y sin cáncer de ovario con inestabilidad de
microsatélites”**

Durante el 1er CONGRESO DE LA SOCIEDAD SINALOENSE DE SALUD PUBLICA:
“Una Sola Salud”, realizado los días 20 y 21 de octubre del año en curso.

“Por la Salud del Pueblo”
Culiacán Rosales, Sinaloa, a octubre de 2023.

MSP Carlos Robles Talavera
Presidente
Sociedad Sinaloense de Salud
Pública

Dr. Juan Carlos Navarro Guerrero
Vicepresidente y Coordinador del
Comité Organizador

Dr. Carlos Víctor Hernández Ramírez
Comisión de investigación
Coordinador del Área: Salud Animal

M.C. Dulce Carolina Sánchez García
Comisión de investigación
Coordinador del Área: Medio Ambiente

M.C. Adriana Alicia Barrios Rodríguez
Comisión de investigación
Coordinador del Área: Salud Humana



Mesa directiva
2022-2024

Presidente
MSP Carlos Robles Talavera

Vicepresidente
Dr. Juan Carlos Navarro Guerrero

Secretaría
Dra. Claudia Karina Millán Otero

Tesorero
Dr. Enrique Lizárraga Arámburo

Aval Curricular
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Sinaloa



SOCIEDAD SINALOENSE DE SALUD PÚBLICA

otorga la presente

CONSTANCIA

A: MERICIA GUADALUPE SANDOVAL CHAVEZ

Por su destacada participación como ASISTENTE en el 1er CONGRESO DE LA SOCIEDAD SINALOENSE DE SALUD PÚBLICA: "Una Sola Salud", realizado los días 20 y 21 de octubre del año en curso.

"Por la Salud del Pueblo"

Culliacán Rosales, Sinaloa, a octubre de 2023.

MSP Carlos Robles Talavera
Presidente
Sociedad Sinaloense de Salud
Pública

Dr. Juan Carlos Navarro Guerrero
Vicepresidente y Coordinador del
Comité Organizador

Dr. Carlos Víctor Hernández Ramírez
Comisión de investigación
Coordinador del Área: Salud Animal

M.C. Dulce Carolina Sánchez García
Comisión de investigación
Coordinador del Área: Medio Ambiente

M.C. Adriana Alicia Barrios Rodríguez
Comisión de investigación
Coordinador del Área: Salud Humana

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

a través de la Unidad Académica

FACULTAD DE MEDICINA

otorga la presente:

Constancia

a: BIOM. MERICIA GUADALUPE SANDOVAL CHÁVEZ

Por su valiosa participación con el cartel que lleva por título "Análisis de metilación de MLH1 y expresión de su proteína en pacientes con y sin cáncer de ovario con inestabilidad de microsatélites" durante la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2023 - Retribución Social con Sentido Humanista llevado a cabo en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

"SURSUM VERSUS"

Culiacán, Sinaloa a 27 de octubre del 2023


Dr. Josué Camberos Barraza
Secretario Académico


Dr. Luis Alberto González García
Director



JORNADA UNIVERSITARIA DEL
CONOCIMIENTO
UAS - 2023

RETRIBUCIÓN SOCIAL CON
SENTIDO HUMANISTA



UAS
CON VISIÓN DE
FUTURO
2025



JORNADA UNIVERSITARIA DEL
CONOCIMIENTO
UAS - 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

Mericia Guadalupe Sandoval Chávez, Erik René
Lizárraga Verdugo y Saúl Armando Beltrán Ontiveros

A: _____

Por su destacada participación como expositor del cartel de investigación titulado "Análisis de metilación de MLH1 y expresión de su proteína en pacientes con y sin cáncer de ovario con inestabilidad de microsatélites" en el marco de la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2023, llevada a cabo del 16 de Octubre al 19 de Noviembre de 2023.

"Sursum Versus"

DR. MARIO NIEVES SOTO
DIRECTOR GENERAL INVESTIGACIÓN Y POSGRADO





UNIVERSIDAD DE
GUADALAJARA
Real Universitaria e Instituto Benemérito de Jalisco

**CENTRO UNIVERSITARIO DE
CIENCIAS DE LA SALUD**

Departamento de Morfología
Maestría en Genética Forense
e Identificación Humana

A QUIEN CORREPONDA

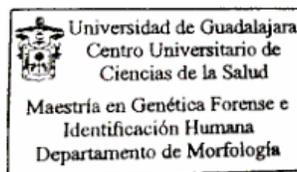
Hago de su conocimiento que la estudiante abajo mencionada, estará asistiendo al Laboratorio de Investigación ubicado en la planta baja del Edificio P, del Departamento de Biología Molecular y Genómica del Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Esto como parte de sus actividades experimentales de su trabajo de tesis que lleva cabo como estudiante de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

- **Estudiante:** MERICIA GUADALUPE SANDOVAL CHÁVEZ
- **Fecha de estadía:** Del 6 al 23 de mayo de 2024
- **Horario:** 7:00am a 5:00pm
- **Profesor responsable:** José Miguel Moreno Ortiz

Sin otro particular, quedo al pendiente de cualquier comentario que pueda surgir al respecto

Atentamente

Dr. José Miguel Moreno Ortiz
Profesor-Docente Titular A.
Coordinador de la Maestría en Genética
Forense e Identificación Humana





Las poblaciones y los recursos genéticos latinoamericanos, a 100 años de la genética de poblaciones

XIX Congreso Latinoamericano de Genética
Congreso Nacional de Genética 2024 de la Sociedad Mexicana de Genética
LII Congreso Argentino de Genética
LVII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile
II Congreso Paraguayo de Genética
IX Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética
VIII Congreso Latinoamericano de Genética Humana



ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE GENÉTICA



SAG

Sociedad Argentina de Genética



S. P. G

Sociedad Paraguaya de Genética



SUG

Sociedad Uruguaya de Genética



CERTIFICAMOS QUE

Mericia Guadalupe Sandoval Chavez

HA ASISTIDO AL

XIX Congreso Latinoamericano de Genética, Congreso Nacional de Genética 2024 de la Sociedad Mexicana de Genética, LII Congreso Argentino de Genética, LVII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, II Congreso Paraguayo de Genética, IX Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética, VIII Congreso Latinoamericano de Genética Humana

Dr. José Francisco Muñoz Valles
Rector. Centro Universitario de Ciencias de la Salud
Universidad de Guadalajara

Dr. José Elías García Ortiz
Presidente
Red Latinoamericana de Genética Humana

Dra. Ana María Soler
Presidenta
Sociedad Uruguaya de Genética

Dra. Elodía Torres
Presidenta
Sociedad Paraguaya de Genética

Dra. Paola Krall
Presidenta
Sociedad de Genética de Chile

Dra. Elsa Camadro
Presidenta
Sociedad Argentina de Genética

Dra. Juana Sánchez Alarcón
Presidenta
Sociedad Mexicana de Genética

Dra. María Inés Oyarzabal
Presidenta
Asociación Latinoamericana de Genética



Las poblaciones y los recursos genéticos latinoamericanos, a 100 años de la genética de poblaciones

XIX Congreso Latinoamericano de Genética
Congreso Nacional de Genética 2024 de la Sociedad Mexicana de Genética
LVII Congreso Argentino de Genética
LVII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile
II Congreso Paraguayo de Genética
IX Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética
VIII Congreso Latinoamericano de Genética Humana



ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE GENÉTICA



SAG

Sociedad Argentina de Genética



CERTIFICAMOS QUE EL TRABAJO

ANÁLISIS DE METILACIÓN DE MLH1 EN PACIENTES CON CÁNCER DE OVARIO CON INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

Sandoval Chavez M.G., S.A. Beltrán Ontiveros, K.P. Gutiérrez Castro, A.G. Ruelas Perea, J.M. Moreno Ortiz, M.A. Rico Méndez, M.?. Trujillo Rojas, A.G. López Ceballos, E.R. Lizárraga Verdugo

FUE PRESENTADO EN LA SECCIÓN DE COMUNICACIONES LIBRES DE:

Genética Humana / Human Genetics

del **XIX Congreso Latinoamericano de Genética, Congreso Nacional de Genética 2024 de la Sociedad Mexicana de Genética, LVII Congreso Argentino de Genética, LVII Reunión Anual de la Sociedad de Genética de Chile, II Congreso Paraguayo de Genética, IX Congreso de la Sociedad Uruguaya de Genética, VIII Congreso Latinoamericano de Genética Humana**

Dr. José Francisco Muñoz Valles
Rector. Centro Universitario de Ciencias de la Salud
Universidad de Guadalajara

Dr. José Elías García Ortiz
Presidente
Red Latinoamericana de Genética Humana

Dra. Ana María Soler
Presidenta
Sociedad Uruguaya de Genética

Dra. Elodia Torres
Presidenta
Sociedad Paraguaya de Genética

Dra. Paola Krall
Presidenta
Sociedad de Genética de Chile

Dra. Elsa Camadro
Presidenta
Sociedad Argentina de Genética

Dra. Juana Sánchez Alarcón
Presidenta
Sociedad Mexicana de Genética

Dra. María Inés Oyarzabal
Presidenta
Asociación Latinoamericana de Genética

XIII. SIGLAS Y ABREVIACIONES

CO: Cáncer de ovario.

MSI: Inestabilidad micro satelital.

MMR: Inestabilidad de microsátélites.

dMMR: Deficiencia del sistema MMR.

FIGO: Federación internacional de ginecología y obstetricia.

ICD-O-3: Internacional de enfermedades para oncología en su tercera edición.

AJCC: Comité Conjunto estadounidense sobre el cáncer.

IARC: Agencia Internacional para la investigación del cáncer.

UICC: Control internacional del cáncer.

GLOBOCAN: Observatorio Global del Cáncer.

TVUS: Ecografía transvaginal.

PARP: Inhibidores de la enzima poli ADP ribosa polimerasa.

DDR: Respuesta al daño del ADN.

CH3: Grupo metilo.

CpG: Islas CpG.

DNMT: ADN metiltransferasas.

MLH1: Proteína de reparación de errores de emparejamiento de ADN MLH1.

MLH2: Proteína de reparación de errores de emparejamiento de ADN MLH2.

MLH3: Proteína de reparación de errores de emparejamiento de ADN MLH3.

MLH6: Proteína de reparación de errores de emparejamiento de ADN MLH6.

PMS2: Endonucleasa de reparación de errores de emparejamiento PMS2.

FFPE: Tejidos fijados en formalina, embebidos en parafina.