Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *HER2* Y *HER3* EN CÁNCER DE MAMA, MEDIADO POR LA OBESIDAD, CONSUMO DE ALCOHOL Y POLIFENOLES

Por:

Isabel Clark Montoya

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Septiembre, 2019

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Isabel Clark Montoya, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Dr. Iván Anduro Corona
Director de Tesis

Dr. Jorge Alejandro Alegría Torres
Co-director

Dr. Humberto Astazarán García
Integrante del comité de tesis

Dra. Osiris Álvarez Bajo
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Regulación de la Expresión de los Genes HER2 y HER3 en Cáncer de Mama, Mediado por la Obesidad, Consumo de Alcohol y Polifenoles" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Isabel Clark Montoya, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo brindado en otorgarme una beca económica de manutención.

A CIAD, por abrirme las puertas de esta institución para realizar un posgrado y de la cual he aprendido como profesionista y persona.

Al Dr. Iván Anduro Corona, muchas gracias por ser un gran director de tesis, por escucharme, alentarme y creer en mí, le agradezco todo lo que ha hecho, no tengo palabras como agradecerle por todo lo que me ha apoyado.

Al Dr. Jorge Alejandro Alegría Torres, por ser un excelente guía y siempre tener las palabras acertadas a alguna duda que tengo, le agradezco todo su apoyo.

A la Dra. Osiris Álvarez Bajo, por siempre brindarme su apoyo y accesibilidad cada vez que tenía duda en el análisis de los datos, infinitas gracias.

Al Dr. Humberto Astiazarán García, por abrirme las puertas de su laboratorio y prestarme sus instalaciones para poder realizar mi proyecto, se lo agradezco.

Al personal del Laboratorio de Patología del Hospital General del Estado de Sonora por permitirme aprender mucho de ustedes y siempre ser muy amables conmigo. Al Dr. De León, al Dr. Minor por permitirme utilizar las instalaciones del laboratorio. Al QB. Omar, por enseñarme a cortar los tejidos en parafina, gracias por su paciencia cuando no me salían y me decía que practicara muchas veces hasta lograrlo.

A los residentes Manuel, David, Karla, Fernando y Alberto por ayudarme en todo lo que necesitaba para realizar mi proyecto, por las largas charlas y volverse mis amigos, se los agradezco.

Al personal del Laboratorio de Patología Experimental de CIAD, a la QB. Bertha Pacheco y a mis compañeros de laboratorio, Luis, Diana, Cristina, Jessica, Anita y Herminia por apoyarme en todo y hacer las mejores fiestas del laboratorio.

A la Facultad de Enfermería y Nutrición, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. En especial al laboratorio de Microbiológica y Toxicología de los Alimentos y a la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y Tecnología (CIACYT) por abrirme las puertas de sus laboratorios para realizar una estancia de investigación.

Al cDr. Obed Lemus por enseñarme la técnica de extracción de RNA de tejido sano y tumoral embebido en parafina, gracias por toda tu paciencia.
A la Dra. Yolanda Terán Figueroa, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por permitirme estar en una estancia de investigación en su laboratorio.
A la Mtra. Alejandra López, por ayudarme en la explicación de su proyecto y reclutamiento de las pacientes, muchísimas gracias.
Al Dr. Marcel Martínez Pocha y la Dra. Verónica Mata, por prestarme las instalaciones de sus laboratorios para realizar la qPCR.
A mis amigos de la maestría, Ezequiel, por acompañarme cuando tenía problemas, vaya que fueron muchos, pero también por esos viernes de lavar tan divertidos y por las idas a la playa, te quiero mucho amigo.
A Karen, por darnos asilo en su casa cuando lo necesitamos y por ayudarme los últimos días de la maestría cuando tenía problemas, infinitas gracias.
A Cristina por ser una gran amiga y compañera, tienes un corazón enorme y un gran a angelito junto a ti que es Gael.
A María e Isaac por ser unas excelentes personas y amigos, gracias por apoyarme y estar al pendiente de mí los últimos días de la maestría y darme asilo, los quiero mucho a los dos, saben que pueden contar conmigo.

DEDICATORIA

A ti Mama, que siempre tenías una llamada de consuelo cuando me sentía lejos de casa, gracias por decirme que puedo más y que todos mis sueños se pueden cumplir, sin ti no sería nada. Te amo a ti y a mi pedacito Brandito.

A ti Miguel, que si no me hubieras acompañado a esta aventura de estar en Hermosillo, no hubiera vivido los mejores 2 años de mi vida. Gracias por acompañarme en cada sueño que tengo. Te amo hasta el final del universo y del camino.

A mi abuelo Lorenzo, mi abuela Chenda, mi Tío Raúl, Tía Gaby, Tía Aracely, Tío Federico, mis primos, José, Jesús, Raúl, Ángel, Sofía, Damián. Por apoyarme estos dos años en mi estancia en Hermosillo, cada uno, me ayudó muchísimo a que este proyecto se llevara a cabo.

Y a todas las personas que luchan contra el cáncer, mi total admiración, espero tener la fuerza que ustedes tienen para afrontar la vida y haberles aportado un poco de lo que sé, de esperanza y apoyo. Tengan por seguro que trataré de seguir por este camino y aportar un granito a la inmensa montaña de esta enfermedad.

CONTENIDO

APROBACIÓN 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
DEDICATORIA 6
CONTENIDO 7
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE CUADROS 10
RESUMEN 11
ABSTRACT 11
1. INTRODUCCIÓN 13
2. ANTECEDENTES 15
2.1 Cáncer de mama 15
2.1.1 Tipos 15
2.1.2 Grados 16
2.1.3 Etapas 16
2.1.4 Etiología 17
2.1.5 Diagnóstico 17
2.1.6 Tratamiento 18
2.2 Factores de Riesgo en Cáncer de Mama 18
2.3 Características Moleculares en Cáncer de Mama 19
2.3.1 Gen *Her/2 neu* 20
2.3.2 Obesidad y Her2/neu 22
2.3.3 Alcohol y Her2/neu 23
2.3.4 Gen *Her3* en Cáncer de Mama 24
2.3.5 Epigenética en Cáncer de Mama 24
2.3.5.1 Los miRNA y el cáncer de mama 25
2.3.5.1.1 miRNA-205 25
2.3.5.1.2 miRNA-205, genes *Her2/neu* y *Her3* 26
2.3.5.1.3 Polifenoles en la regulación de miRNA-205 26
2.4 Justificación 27
3. HIPÓTESIS 28
4. OBJETIVOS 29
4.1 General 29
4.2Específicos 29
5. MATERIALES Y MÉTODOS 30
5.1 Participantes del Estudio 30
5.2 Diseño del Estudio 30

CONTENIDO (Continuación)

5.3 Tamaño de Muestra y Reclutamiento de pacientes 31
5.4 Consideraciones Éticas 31
5.5 Recolección y Procesamiento de Muestras....32
5.5.1 Extracción de RNA 33
5.5.2 Síntesis de cDNA, y Evaluación de Expresión Genética....34
5.5.3 Evaluación de Expresión Genética 34
5.6 Inmunohistoquímica 35
5.7 Expediente Clínico....37
5.8 Cuestionario de Factores de Riesgo para Desarrollar Cáncer de Mama 37
5.9 Percepción Corporal 37
5.10 Cuantificación dePolifenoles....38
5.11 Análisis Estadístico 39

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN....40
6.1 Índice de Masa Corporal (IMC) y Subtipos moleculares 42
6.2 IMC y Percepción Corporal de las Pacientes con Cáncer de Mama 44
6.3 Estimación del Consumo de Alcohol 45
6.4 Estimación del Consumo de Polifenoles 46
6.5 Expresión Genética de miR-205, *Her2/neu* y *Her3*....47

7. CONCLUSIÓNES....51

8. RECOMENDACIONES....52

9. REFERENCIAS 53

10. ANEXOS 59

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

1. (A) Tejido tumoral y sano adyacente de mama en FFPE. (B) Cortes de 5µm de espesor y montadas en portaobjetos. (C) Tejido tumoral teñido con IHQ, vista en microscopio y delimitado con plumón en portaobjetos. (D) Cortes adicionales de tejido en FFP……..... 33
2. Modelos para la clasificación de percepción corporal…….…… 38
3. Receptores de estrógenos (PR), progesterona (PR), Her2/neu, KI67……..... 40
4. Grado tumoral de las pacientes con cáncer de mama…….. 41
5. Estadio de cáncer de mama en las pacientes ……..….. 41
6. Subtipos moleculares de cáncer de mama de las pacientes……. 42
7. IMC al diagnóstico de cáncer de mama y actual……..... 44
8. Percepción corporal e IMC actual……..…….…. 45
9. Estimación del consumo de alcohol en las pacientes con cáncer de mama……. 46
10. Expresión relativa ΔΔCT de los genes miR.205, *Her3* y *Her2/neu*…….…… 48
11. Expresión genética de miR-205, *Her3* y *Her2/neu* en Δ1 tejido tumoral y Δ1 sano adyacente……..……...……..... 49

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Etapas del cáncer de maMA…….……...…….	16
2.	Subtipo molecular en cáncer de mama de acuerdo a la inmunohistoquímica…….……..	20
3.	Resultados de la prueba Her2/neu…….…….……...	21
4.	Asociación de los subtipos moleculares y sobrepeso-obesidad en las pacientes con cáncer de mama…….	43
5.	Estimación de la ingesta de polifenoles y gramos de frutas y verduras……...	47
6.	Asociación de la expresión genética entre *Her2/neu*, *Her3* en tejido tumoral y sano adyacente con sobrepeso-obesidad, consumo de alcohol y polifenoles…...……	50

RESUMEN

En el cáncer de mama (CaMa) hasta el 30% de los casos sobrexpresan *Her2/neu*. El receptor Her3, se heterodimeriza con Her2 para activar la vía PI3K/AKT encargada de la proliferación celular, relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad. Se ha comprobado que la obesidad y el consumo de alcohol activan esta vía de señalización. De igual manera, se ha identificado que Her3 es regulado negativamente por miRNA-205, mismo que se encuentra poco expresado en CaMa. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar la asociación entre la obesidad y el consumo de alcohol en la expresión de los genes *Her2* y *Her3* en tejido tumoral mediado por miRNA-205.

Para esto se realiza un estudio transversal en el que participaron personas diagnosticadas con cáncer de mama entre los años 2015 y 2018. En este estudio 54 voluntarias firmaron el consentimiento informado, respondieron el cuestionario de factores de riesgo y reportaron peso y talla actual.

La edad de las participantes fue de 53.5± 8.8 años. De las pacientes con CaMa el 18.51% presentó Her2+ y de ellas el 95% tenían un índice de masa corporal (IMC) ≥25. No se presentó una diferencia entre el IMC al momento de la entrevista y al diagnóstico de CaMa ($p>0.05$). El 55.56% de las voluntarias reportaron no haber consumido alcohol y el 44.45% reportó haber consumido al menos una bebida al año. El promedio del consumo de los polifenoles estudiados, un año previo al diagnóstico de cáncer de mama de delfinidina 3-o-glucósido fue de 1.1 mg/día, ácido elágico de 1.06 mg/día y de cianidina 3-o-glucósido de 3.96 mg/día, esto representa el 1% del consumo recomendado como benéfico para la salud en las mujeres que padecen cáncer de mama.

El sobrepeso-obesidad y el consumo de alcohol se asociaron ($p<0.05$) a la sobreexpresión de *Her3*. Sin embargo, esta asociación parece ser independiente de la expresión de miR-205. La asociación de *Her2/neu* con sobrepeso-obesidad, pudiera estar involucrada en la vía de proliferación celular de PI3K/AKT. El ácido elágico en tejido tumoral parece ser insuficiente para aumentar la expresión de miR-205 y cianidina 3-o-glucósido en tejido sano, pudiendo tener un metabolismo diferente en los tejidos.

Palabras clave: *Her2/neu*, *Her3*, miRNA-205, Obesidad, Alcohol, Polifenoles.

ABSTRACT

In breast cancer (BC) up to 30% of cases overexpress Her2/neu. The Her3 receptor is heterodimerized with Her2 to activate the PI3K / AKT pathway responsible for cell proliferation, related to a poor prognosis of the disease. It has been proven that obesity and alcohol consumption activate this signaling pathway. Similarly, it has been identified that Her3 is negatively regulated by miRNA-205, which is poorly expressed in BC. Therefore, the objective of this work is to evaluate the association between obesity and alcohol consumption in the expression of the *Her2* and *Her3* genes in the tumor tissue mediated by miRNA-205.

For this, a cross-sectional study is carried out in which people diagnosed with breast cancer between 2015 and 2018 participated. In this study 54 volunteers signed the informed consent, answered the risk factors questionnaire and reported current weight and height.

The age of the participants was 53.5 ± 8.8 years. Of the patients with BC, 18.51% presented Her2 + and 95% of them considered a body mass index (BMI) ≥25. No difference was found between BMI at the time of the interview and the diagnosis of BC ($p > 0.05$). The 55.56% of the volunteers reported not having consumed alcohol and 44.45% reported having consumed at least one drink a year. The average consumption of the polyphenols studied, one year prior to the diagnosis of breast cancer of delphinidin 3-o-glycoside was 1.1 mg/day, ellagic acid 1.06 mg/day and cyanidine 3-o-glycoside 3.96 mg/day, this represents 1% of the recommended consumption as beneficial for health in women suffering from breast cancer.

Overweight-obesity and alcohol consumption were associated ($p<0.05$) with the overexpression of *Her3*. However, this association seems to be independent of the expression of miR-205. The association of *Her2/neu* with overweight-obesity could be involved in the cell proliferation pathway of PI3K/AKT. Ellagic acid in tumor tissue appears to be insufficient to increase the expression of miR-205 and cyanidine 3-o-glycoside in healthy tissue, and may have a different metabolism in tissues.

Keywords: *Her2/neu*, *Her3*, miRNA-205, Obesity, Alcohol, Polyphenols.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial, afecta a más de 1.5 millones de mujeres cada año. La Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud (2019), indicaron que en América Latina y el Caribe el cáncer mamario es el tipo de cáncer más frecuente. En 2012 causó 1.3 millones de muertes y se estima que la mortalidad casi se duplicará para el año 2030 (PAHO; OMS, 2019). En México, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (INEGI, 2017). Los estados con mayor índice de mortalidad son Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, San Luis Potosí, Jalisco y Nuevo León (Castrezana, 2017). En particular en el estado de Sonora, la tasa de mortalidad de cáncer de mama en el año 2015 fue de 28.6% (SSA, 2015).

Dentro de los factores de riesgo para desarrollar cáncer en el mundo, están la mala alimentación, el sedentarismo, el sobrepeso y la obesidad (PAHO, 2019). Se estima que alrededor de un tercio de los casos de cáncer, entre los que se encuentra el cáncer de mama, podrían prevenirse evitando estos factores de riesgo (PAHO, 2019). Por lo que es importante conocer los mecanismos, por los cuales estos factores de riesgo promueven el desarrollo o agravan la enfermedad.

En la etiología del cáncer de mama están involucrados diferentes factores, entre ellos el génetico. Un ejemplo de esto es Her2/neu, ya que, de los casos diagnosticados de cáncer de mama, de un 20-30% sobrexpresa esta proteína, haciendo un tipo de cáncer más agresivo y un peor pronóstico de la enfermedad (Colomer et al., 2001). Her2/neu está involucrado en la división y proliferación celular, por lo que su expresión anormal se ha vinculado con procesos cancerosos (Tan, 2013). La vía de señalización para la proliferación celular maligna se lleva a cabo cuando el receptor Her2 se heterodimeriza con Her3 para activar la vía PI3K/AKT (Mujo et al., 2014). Se ha comprobado que miRNA-205 regula negativamente el gen *Her3* y que hasta el 70% de los tumores que sobrexpresan *Her2/neu*, también sobrexpresan *Her3*; sin embargo, en cáncer de mama se encuentra disminuido y se desconoce el motivo de esto (Wang et al., 2013; Adachi et al., 2011; Hailong et al., 2009; Savad et al., 2012). Por lo que la regulación epigenética a través de mecanismos dependientes de miRNA, puede representar un enfoque novedoso para tratar pacientes con cáncer de mama que sobrexpresan Her2/neu.

Algunos estudios indican que la baja expresión de miRNA-205 en cáncer de mama, puede ser atribuible a los factores de riesgo ambientales como la obesidad y el consumo de alcohol (Mazarrella et al., 2013; Staniz et al., 2015; Staniz, 2013). De igual manera, los polifenoles como pteroestibeno, ácido elágico y dolphin, han comprobado que regula positivamente a miRNA-205 *invitro e invivo* (Chih- Ming et al., 2015; Abbasi et al., 2018; Chen et al., 2018).

Por lo anterior, el objetivo del trabajo es evaluar la asociación entre la obesidad, el consumo de alcohol y polifenoles en la expresión de los genes *Her2/neu y Her3* en tejido tumoral mediado por miRNA-205.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer de Mama

La Sociedad Americana de Cáncer (ACS, 2018), define al cáncer de mama como un crecimiento anormal de las células de la mama, que a menudo invaden los tejidos circundantes. La mayoría comienza en los conductos que conducen la leche al pezón (cáncer ductal) y algunos en las glándulas que producen leche materna (cáncer lobular).

La diseminación del cáncer se lleva a cabo por el tejido linfático que se encuentra en todo el cuerpo y conecta los ganglios linfáticos. Si las células cancerígenas se han extendido a los ganglios linfáticos, hay una mayor posibilidad de que se disemine a todo el cuerpo, llevando a cabo la metástasis, lo que a menudo afecta el tratamiento. Por lo tanto, una detección temprana de esta enfermedad disminuye la mortalidad en gran medida (ACS, 2018).

2.1.1 Tipos

Los tipos de cáncer de mama son dos, *in situ* e invasivos. El primero se refiere al cáncer no invasivo o preinvasivo, como el carcinoma ductal *in situ* que crece dentro de los conductos mamarios y el carcinoma lobulillar *in situ,* es menos frecuente, se considera un marcador de riesgo y nose relaciona con una masa palpable o cambios de la mama específicos. Por su parte, el cáncer de mama invasivo o infiltrante, es el que se ha propagado al tejido circundante de la mama; como son el carcinoma ductal infiltrante, del 10 al 15% de las pacientes presentará este tipo de cáncer invasor y el carcinoma lobulillar invasivo (ACS, 2018; DTCM, 2017).

2.1.2 Grados

El grado de cáncer de mama, se determina con base a que tanto se parecen las células cancerosas a las normales. Es importante conocerlos, para entender qué tan probable es que se propague a otros tejidos (ACS, 2018).

El grado histológico del cáncer se determina analizando tres características y se asigna una puntuación de acuerdo a la escala de Scarff-Bloom-Richardson (ACS, 2018). El grado 1 (puntuación de 3, 4 o 5), se considera cuando las células son de crecimiento lento y se parecen a las células del tejido mamario normal. En el grado 2 (puntuación 6 o 7) la velocidad de crecimiento y el aspecto de las células no se parecen a las células de tejido mamario normal, pero tampoco son muy diferentes. El grado 3 (puntuación de 8, 9), es cuando las células cancerosas no se parecen a las células normales y crecerán o propagarán más rápido.

2.1.3 Etapas

La etapa (estadio) del cáncer de mama determina qué tan grave es el cáncer y así determinar la mejor manera de tratarlo (Cuadro 1) (ACS, 2018).

Cuadro 1. Etapas del cáncer de mama

Etapas	Definición
0	El tumor está limitado al interior del conducto de leche y es cáncer no invasivo.
I	El tumor mide <2 cm y no se ha propagado a los ganglios linfáticos o se encuentran en grupos pequeños.
IIA	El tumor mide <2 cm y se ha propagado a los ganglios linfáticos de la axila o mide entre 2-5 cm, pero no se ha propagado a los ganglios cercanos de la axila.
IIB	El tumor mide entre 2-5 cm y se ha propagado en 1-3 ganglios linfáticos o el tumor mide >5 cm, pero no se ha propagado a los ganglios linfáticos
IIIA	El tumor mide >5 cm y se ha propagado en 1-3 ganglios linfáticos.
IIIB	El tumor tiene un tamaño no definido, provocando inflamación, enrojecimiento y pudo haberse propagado a 9 ganglios linfáticos.
IIIC	El tumor tiene un tamaño indefinido y pudo haberse propagado en 10 o más ganglios linfáticos.
IV	El cáncer de mama, se ha extendido a órganos del cuerpo.

Realizado a partir de ACS, 2018, NOM-041-SSA2-2011.

2.1.4 Etiología

El cáncer de mama, probablemente es causado por una combinación multifactorial, entre factores hormonales, genéticos, la edad, ambiente y el estilo de vida. Se estima, que el 50% de los casos recién diagnosticados de cáncer de mama, se relacionan con factores hormonales y de un 5-10% con factores genéticos. Sin embargo, aunque este porcentaje es muy bajo, en personas con la predisposición genética, la proporción es muy alta. Las investigaciones realizadas en las últimas décadas han permitido determinar los factores fisiológicos, ambientales y de estilo de vida que se relacionan con el desarrollo de cáncer de mama. Algunos de éstos son modificables, con intervenciones preventivas para disminuir la incidencia (PAHO, 2019).

En los países desarrollados la diferencia en la incidencia de cáncer de mama, se puede explicar por el tipo de alimentación que consumen en conjunto con la exposición hormonal. La tendencia a tener hábitos poco saludables en países de bajos y medios ingresos, es un determinante en el aumento de la incidencia de cáncer de mama (OMS, 2019).

2.1.5 Diagnóstico

La mamografía es el instrumento más utilizado para detección de cáncer mama. Consiste en una dosis baja de rayos x que permite buscar cambios en el tejido mamario. Existen dos tipos de mamografía, la de detección y la de diagnóstico. La primera, se utiliza para buscar signos en mujeres que no tienen ningún síntoma o problema en el tejido mamario. Las imágenes de rayos x se toman desde dos ángulos diferentes. La mamografía de diagnóstico, se realiza si se observa una anomalía en la mamografía de detección e incluye vistas de imágenes adicionales (ACS, 2018; GPCA, 2013).

La mamografía detecta áreas anormales en el tejido mamario, pero no pueden demostrar que esa área anormal sea cáncer. Por lo tanto, se necesita una biopsia para confirmar o descartar el

diagnóstico de cáncer de mama. Hay diferentes tipos de biopsias. Las más comunes utilizan agujas o una incisión de piel (ACS, 2018; DTCM, 2017; GPCA, 2013; SSA, 2009).

2.1.6 Tratamiento

La Asociación Americana del Cáncer (2018) indica que los tratamientos para cáncer de mama se dividen en locales y sistémicos, los cuales varían según su tipo y etapa. Los tratamientos locales inciden solo en el tumor, sin afectar el resto del cuerpo. Estos son cirugía y terapia de radiación. Los tratamientos sistémicos para el cáncer de mama, se suministran vía oral o en el torrente sanguíneo, para combatir células cancerígenas que están por el cuerpo. Estos son quimioterapia adyuvante o neoadyuvante, terapia hormonal y terapia dirigida.

2.2 Factores de Riesgo en Cáncer de Mama

Los factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama, son múltiples. Los factores no modificables, estos pueden ser la predisposición genética, la posmenopausia, el sexo y la edad. Por otro lado, están los modificables, que son no haber amamantado, la obesidad, la inactividad física, exposición a la radiación, el consumo de hormonas terapéuticas exógenas de estrógenos, el consumo de alcohol y de tabaco (PAHO, 2017). Aunque esos factores de riesgos son bien conocidos, en la mayoría de las mujeres que presentan la enfermedad, no es posible identificar factores de riesgos como “causa”.

El tener antecedentes familiares de cáncer de mama, aumentan el riesgo entre 2 y 3 veces de presentar la enfermedad (OMS, 2019). Las mutaciones de los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *p53*, se asocian con un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama. Sin embargo, eso sucede rara vez y solo explica una pequeña parte de la carga genética como determinante para presentar esta enfermedad (OMS, 2019).

Los factores de riesgo no modificables reproductivos como la exposición prolongada a estrógenos endógenos, en las que abarca la primera menstruación antes de los 12 años, menopausia después de los 52 años y tener el primer hijo después de los 30 años, son de los factores de riesgo más importantes para desarrollar cáncer de mama. Por otro lado, consumir hormonas exógenas como anticonceptivos orales y tratamiento de sustitución hormonal presentan más riesgo que aquellas mujeres que no utilizan estos productos (OMS, 2019; IMSS, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (2019), reporta que el 21% de las muertes de cáncer de mama a nivel mundial, son relacionadas a la obesidad, el consumo de alcohol y el sedentarismo. Y en los países de ingresos medios y bajos representó el 18%. Por lo tanto, conocer como la obesidad, el consumo de alcohol y la inactividad física afecta al desarrollo de cáncer de mama es de suma importancia para disminuir el riesgo desarrollar esta enfermedad.

El consumo de alimentos saludables, realizar actividad física y el control del consumo de alcohol, sobrepeso y obesidad, podría reducir la incidencia de cáncer de mama a largo plazo, (OMS, 2019). Los beneficios de esta estrategia, se podrían reflejar si la población toma las medidas necesarias. Para esto, se necesitan un conjunto de políticas públicas que puedan ser aplicadas a la población en general. Por lo tanto, hasta el momento la detección temprana del cáncer de mama, sigue siendo la medida viable para el control de la enfermedad.

2.3 Características Moleculares en Cáncer de Mama

En el año (2000) Perou y colaboradores, publicaron la subclasificación molecular del cáncer de mama, el cual consiste en determinar qué pacientes recibirá terapia neoadyuvante (quimioterapia y hormonoterapia) para disminuir la recurrencia y prolongar la vida de las pacientes. La importancia de determinar quien recibirá estos tratamientos, se debe a la posibilidad de aplicarlos solo a quien realmente le serán de provecho (Imigo et al., 2011).

Esta subclasificación molecular consiste en evaluar la expresión genética de acuerdo con microarreglos de cDNA y lo clasificaron en cinco subtipos: Luminal A, Luminal B, cáncer de

mama triple negativo, similar a normal y Her2/neu (Imigo et al., 2011). Sin embargo, el uso de esta tecnología en hospitales o instituciones de salud es costosa, por lo que algunos autores han propuesto clasificaciones aproximadas menos costosas y confiables basadas en la inmnohistoquímica (Mártinez & Castro, 2018), los cuales se clasifican según el cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación subtipo molecular del cáncer de mama de acuerdo con la inmunohistoquímica

Subtipo molecular	**Inmunohistoquímica**	**Pronóstico**
Luminal A	ER+ PR+ HER2- KI67-	Bueno
Luminal B	ER+ PR+ HER2- KI67+	Intermedio
	ER+ PR+ HER2+ KI67+	Malo
Her2 positivo	ER- PR- HER2+	Malo
Triple negativo (similar basal)	ER- PR- HER2-, marcador basal +	Malo
Similar Normal	ER+ PR+ HER2- KI67-	Intermedio

Modificado a partir de Dai et al., 2015 e Imigo et al., 2011. Dónde: ER (Receptor de estrógenos) PR (Receptor de progesterona), Her2 (Proto-oncogén asociado a mal pronóstico) Ki67 (Molécula de proliferación celular).

2.3.1 Gen *Her/2 neu*

El gen *Her2/neu* codifica una proteína de 185 kDa, un miembro de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) del receptor tirosina quinasa, los cuales son her1, her3, her4. Esta proteína hasta el momento no se le conoce un dominio de unión al ligando y no puede unirse a los factores de crecimiento. Sin embargo, se une a los miembros de la familia del receptor EGF para formar un heterodímero, estabilizar la unión y potenciar la señalización por cinasa (Gene Cards, 2018; GHR, 2018). Por lo tanto, desempeña un papel importante en la división y crecimiento celular, en la cual coordina la red de señalización (English et al., 2013).

Del total de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama Her2/neu está sobrexpresado aproximadamente hasta el 30%. La amplificación de *Her2/neu* produce la sobreexpresión de una glicoproteína que pasa de los niveles normales de 30,000 receptores por célula, a 1'000,000, aumentando la señalización de división celular (Colomer et al., 2001; Tan & Yu, 2000-2013; Colonia et al., 2015). Por lo tanto, su expresión anormal se ha vinculado con procesos cancerosos (GHR, 2018).

La señalización de la glicoproteína que amplifica *Her2/neu* se produce por dimerización de Her2 y otros factores de crecimiento epidérmicos, como Her3, Her4 y en menor grado Her1. Los factores de crecimiento heregulina y factor de diferenciación neu2, tras unirse con Her3, inician la cascada de transmisión de señales al núcleo, por el dominio de tirosina cinasa y se activan los genes para iniciar la división celular, como la proteínas quinasa Ras / Raf / mitógeno activada (Ras / Raf / MAPK) y la proteína fosfatidilinositol 3 quinasa/ objetivo de la quinasa-B / mamífero de las vías de rapamicina (PI3K / AKT / mTOR) (Colomer et al., 2001; Tan & Yu, 2000-2013; English et al., 2013).

Las personas recién diagnosticadas con cáncer de mama invasivos, deben someterse a la prueba de inmunohistoquímica para detectar la sobrexpresión de *Her2/neu*, para determinar qué tipo de tratamiento se administrará, véase cuadro 3. Cuando tienen un resultado de Her2 positivo, responden mejor al tratamiento al administrar un anticuerpo monoclonal, lla ado trastuzumab que se dirige a los receptores de la glicoproteína sobreexpresada de Her2 para inhibirlos (ACS 2018; Dawood et al., 2010; Shahi & Manga, 2006; DTCM, 2013).

Cuadro 3. Resultados de la prueba Her2/neu por innmunohistoquímica

Resultado	**Estado de Her2/neu**	**Tratamiento**
0 o 1+	Negativo	No responde al medicamento que se dirige al receptor de *Her2/neu*
2 +	Equívoco	Realizar prueba de FISH para detectar positivo o negativo
3 +	Positivo	Tratado con medicamentos que se dirigen al receptor de *Her2/neu*

Realizado a partir de ACS 2018

2.3.2 Obesidad y Her2/neu

La obesidad es un problema de salud pública en México y es un factor de riesgo de diversas enfermedades crónicas, entre ellas el cáncer de mama (ENSANUT MC 2016). Existe evidencia que la obesidad promueve la proliferación celular en el cáncer de mama, por ejemplo, en la menopausia.

En la menopausia, se detiene la producción de estrógenos ováricos, dejando al tejido adiposo como principal proveedor, lo que favorece la proliferación de células cancerosas. Cuando las reservas de energía exceden la capacidad de almacenamiento en el tejido adiposo, experimentan hiperplasia e hipertrofia produciendo niveles elevados de la hormona leptina. Esta hormona viaja al torrente sanguíneo hasta el hipotálamo para inducir saciedad (Pérez-Solis et al., 2016). En algunos tejidos se expresan receptores de leptina, incluyendo el mamario induciendo señales de proliferación celular en tejidos mamarios (Brown et al., 2009; Wu et al., 2009; Vona-Davis et al., 2007). La asociación de los niveles aumentados de leptina en la obesidad, se ha encontrado que regula positivamente la transcripción de genes asociados con el crecimiento y la proliferación tumoral tales como Cadh-1 y CP450Arom (Pérez-Solís et al., 2016).

Aunque no se ha encontrado asociación hasta el momento entre la obesidad y el aumento de la expresión de Her2/neu, si se ha visto que el aumento en el IMC se ha relacionado con mayor riesgo del subtipomolecular Her2+, es decir ER- PR- y Her2+ (English et al, 2013). En un estudio de Mazarella et al., (2013) se encontró una relación entre la obesidad y Her2/neu al promover la metástasis, en la que la supervivencia de las pacientes disminuía, sobre todo en tumores ER- y Her2+. En otro estudio de Bowers et al., (2015), se descubrió que este padecimiento suprimió la expresión del receptor de estrógenos beta por una vía mediada por Her2, en la cual indica que la obesidad podría suprimir la expresión del receptor de estrógenos beta activando Her2; sin embargo, esto se desconoce y se necesitarían más estudios para comprender el mecanismo. Asimismo, en un estudio de Ray (2017) la leptina que secreta el tejido adiposo activa moléculas que conecta vías de señalización de Her2/neu, también mTOR una quinasa parecida a PI3K que participa en el metabolismo de los lípidos y la adipogénesis. Por lo tanto, entender cómo la obesidad regula la

expresión de este gen a través de todos sus posibles mecanismos, sería importante para proponer intervenciones nutricionales en el cáncer de mama Her2 positivo.

2.3.3 Alcohol y Her2/neu

El consumo de alcohol promueve la metástasis y es un promotor tumoral en células que sobrexpresan Her2/neu (Xu et al., 2016). En un estudio de Wong et al., (2012), observaron que el alcohol en células de cáncer de mama que sobrexpresan her2/neu, aumentaba la metástasis por medio de la vía de señalización de estrógenos. De igual manera, el alcohol, inhibe el gen *BCRA1*, que es un supresor tumoral, por lo tanto, este gen no puede realizar su función (Pérez-Solís et al., 2016).

En otro estudio de Fiegl et al., (2006) realizado en mujeres con cáncer de mama encontraron que el gen *HSD17B4* que codifica una enzima encargada del metabolismo del alcohol, se encontraba metilado. Esto daba lugar a la inhibición de la síntesis de la enzima y a una posible deficiencia en el metabolismo del alcohol, ocasionando que el alcohol se encuentre más tiempo en plasma y pueda ocasionar daños a nivel epigenético.

Asimismo, en otros estudios se ha comprobado que el alcohol aumentan las enzimas metaloproteinasas encargadas de crear un ambiente carcinogénico y degradar la matriz extracelular, promoviendo la migración hacia ganglios linfáticos y fomentando la metástasis (Xu, 2016; Pérez-Solis, 2016; MA, 2003; Xu, 2013; Xu, 2010; Mill, 2009; Luo, 2006; Ke, 2006; Luo, 2006). En un estudio de Fan et al., (2000), se demostró que la exposición al alcohol en células de mama aumentó de 10 a 15 veces más la expresión genética del receptor de estrógenos alfa. De igual manera inactivó el gen *BRCA1* un importante inhibidor de este receptor. Sin embargo, el mecanismo es desconocido.

2.3.4 Gen *Her3* en Cáncer de Mama

El gen *Her3* codifica una proteína que es miembro de la familia de receptores quinasa y para activar su señalización requiere unirse a otros miembros de la familia de ErbB como Her2 o EGFR (Her1). Esto ocurre por la unión de neuregulina a Her3 y se heterodimeriza particularmente con her2, lo que da lugar a la fosforilación de residuos de tirosina de la región C-terminal de her3. Posteriormente fosfotirosinas de Her3 dan lugar a sitios de unión para activar las vías de proliferación y división célular PI3K/AKT y Ras/Raf/MAPK. Por lo tanto, cuando *Her2/neu* esta sobreexpresado la división y proliferación de células malignas se ve aumentada y por lo tanto se vincula con resistencia al tratamiento médico (Radioterapia). Se ha visto que en células que expresan Her2, se ven niveles aproximadamente del 50-70% de Her3 (Mujo et al., 2014).

2.3.5 Epigenética en Cáncer de Mama

En las primeras etapas del inicio del cáncer se ven alteraciones en la estructura de la cromatina por modificaciones del ADN (Regiones metiladas CpG, La 5-hidroximetil citosina, 5hmC) y modificaciones postraduccionales de las proteínas unidas al ADN, como las histonas que pueden tener lesiones genéticas, afectarse por el medio ambiente, entre otros factores. Esto afecta a la célula y favorece la reprogramación oncogénetica de las células primarias tumorales y adquieren propiedades proliferativas. Después en etapas posteriores, junto con las mutaciones subclonales y las señales del microentorno que se encuentran en la célula, encaminan a la metástasis del tumor (Pasculli et al., 2018).

Recientemente se ha reconocido como reguladores epigenéticos a los ARN no codificantes (ARNnc), especialmente a los micro ARN (miRNA) (Pasculli et al., 2018). Se ha comprobado que son sensibles a la regulación epigenética, al igual que los genes que codifican proteínas, pero éstos pueden actuar por sí mismos y regular postranscripcionalmente a los genes. Sin embargo, se ha visto una desregulación en cáncer de mama por lo que en las últimas décadas ha habido un interés

por estudiar el epigenoma para identificar rasgos nuevos y mejorar el pronóstico del cáncer (Pasculli et al., 2018).

2.3.5.1 Los miRNA y el cáncer de mama. Los microRNA (miRNA) son RNA de cadena corta de 19-25 nucleótidos no codificantes, que regulan la función de los genes diana en la fase postranscripcional, en las regiones 3' especificas del ARNm, causando degradación o supresión de la traducción. Se considera que los miRNA tienen un papel importante en el desarrollo, progresión y metástasis del cáncer (Kurozumi et al., 2017; Zhang et al., 2015).

Los miRNA se han propuesto como nuevos biomarcadores para la detección del cáncer de mama, debido a que su extracción es fácil y estable, ya que existen en tejidos y fluidos corporales como orina y plasma. Además, son resistentes al almacenamiento prolongado, a las RNasa, la ebullición, pH y múltiples ciclos de congelación-descongelación (Zhang et al., 2015; Kurozumi et al., 2015).

2.3.5.1.1 miRNA-205. Entre los miRNA, miRNA-205 podría ser un nuevo biomarcador en la detección temprana del cáncer de mama, de acuerdo con múltiples estudios (Zhang et al., 2015; Yue et al., 2016; Luo et al., 2013; Sempere et al., 2007; Savad et al., 2012; Wang, 2013). Este microRNA, se descubrió por métodos computacionales y posteriormente se determinó el mecanismo de expresión in vivo, indicando que es un supresor tumoral.

El miRNA-205 ha sido identificado como miRNA de baja expresión en pacientes con cáncer de mama comparado con grupo control en muestra de tejido (Savad y et al., 2012; Fiannac et al., 2015) y suero (Liu et al., 2013; Zhang et al., 2015). Los niveles de expresión en suero de miR-205 de pacientes con cáncer de mama y pacientes saludables mediante qRT-PCR, se encontró una sobrexpresión de miRNA-205 en los pacientes saludables. En cambio, en los pacientes con cáncer de mama se encontró una baja expresión de miRNA-205 para el diagnóstico de la enfermedad. La evaluación de sensibilidad y especificidad para diagnóstico de la enfermedad por miR-205, fue de 86.2%, por lo que posee precisión en el diagnóstico de pacientes con cáncer de mama entre pacientes saludables.

2.3.5.1.2 miRNA-205, genes *Her2/neu* y *Her3*. En cáncer de mama, cuando el gen Her2/neu está sobrexpresado, el miRNA-205, se encuentra con una baja expresión, por lo tanto, la represión de la sobrexpresión de dicho gen, se encuentra deficiente (Wang et al., 2013; Adachi et al., 2011; Hailong et al., 2009; Savad et al., 2012). La asociación de la baja expresión de miRNA-205 ha sido relacionada con cáncer de mama de subtipo triple negativo (ER- PR- HER2-) en muestras de tejido de pacientes con cáncer de mama (Savad et al., 2012; Fiannac et al., 2015).

En un estudio de Adachi et al., (2011) encontraron que las células epiteliales mamarias que sobrexpresaban el gen *Her2/neu*, disminuyó la expresión de miRNA-205, lo que sugiere que miRNA-205 es esencial para la tumorogénesis y puede ser una potencial diana terapéutica para el cáncer de mama con Her2+.

Algunos estudios indican que la sobrexpresión de *Her2/neu* es un tipo de tumores agresivos de cáncer de mama y depende de la interacción con otros miembros de la familia Her, en particular la ruta PI3K/akt, importante en la tumorogénesis, y se realiza tras la fosforilación de quinasa Her3. El miRNA-205 modula negativamente a Her3 en los tumores mamarios, y se dirige directamente al receptor Her3 e inhibe la activación corriente abajo de Akt. De esta manera, miRNA-205 puede mejorar la capacidad de respuesta de terapias especificas contra el cáncer (Lorio et al., 2009).

2.3.5.1.3 Polifenoles en la regulación de miRNA-205. Los compuestos activos de los alimentos, como los polifenoles, se han reportado que modulan epigeneticamente la metilación o acetilación del ADN y participan en la modificación de las histonas (Vo & Millis, 2012). Uno de estos polifenoles es la cianidin 3-o-glucósido, que se sintetiza para protegerse de las infecciones en las uvas, arándanos entre otros alimentos y se reportó que regula la expresión de Her2/neu, induciendo la apoptosis (Liu et al., 2014). De igual manera, en un estudio de revisión reportaron que el ácido elágico, que se encuentra en fresas, uvas, moras, frambuesas, arándanos, guayabas, nueces, entre otros alimentos encontraron que aumenta la expresión invitro e in vivo de miRNA-205 (Abbasi et al., 2018). Por otro lado, la antiocianina Dolphin inhibe una vía llamada AMPK en células con Her2+. Se encuentra principalmente en uvas, cerezas y moras (Chen et al., 2018). Sin embargo, el mecanismo de acción que tienen estos polifenoles en la modulación epigenética del miRNA-205 es desconocida.

2.4 Justificación

La obesidad y el consumo de alcohol son factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama. Existe una gran prevalencia de obesidad en México, según la ENSANUT, la prevalencia de obesidad en adultos es de 72.5%, constituyendo un problema de salud pública en el país. La prevalencia de consumo de alcohol en las mujeres un año previo a la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (2016-2017) es de 39% y es una cifra que va en aumento.

En cáncer de mama se ha encontrado una sobrexpresión de Her2/neu del 20-30%, ocasionando un peor pronóstico de la enfermedad. Asi mismo, la obesidad y el consumo de alcohol se han relacionado con el aumento de la metástasis en células de cáncer de mama que sobrexpresan dicha proteína.

Por otro lado, los factores ambientales a los que estamos expuestos, influyen en la expresión genética (Xacur-García et al., 2008). Lo que ocasiona constantemente, cambios epigenéticos en el genoma humano.

En cáncer de mama el miRNA-205 se ha encontrado que regula negativa e indirectamente a *Her3*. Sin embargo, en las pacientes con cáncer de mama, el miRNA-205 disminuye su expresión. Por lo tanto, sería importante vincular los factores de riesgo modificables como la obesidad y el consumo de alcohol, así como el consumo de polifenoles. Los cuales podrían influir en la regulación del gen *Her3* a través de miRNA-205 y en un futuro proponer intervenciones que mejoren la supervivencia en las mujeres con cáncer de mama.

3. HIPÓTESIS

El consumo de alcohol, polifenoles y la obesidad promueven el aumento en la expresión de los genes *Her2/neu y Her3*, modulado por el miRNA-205 en tejido tumoral en mujeres que padecen cáncer de mama.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar la asociación entre el consumo de alcohol, polifenoles y obesidad en la expresión de los genes *Her2/neu* y *Her3* en tejido tumoral mediado por miRNA-205 en mujeres que padecen cáncer de mama.

4.2 Específicos

- Medir la frecuencia de consumo de alcohol y polifenoles en mujeres que padecen cáncer de mama, tomando en cuenta el contexto de salud nutricional.
- Evaluar la expresión de los genes *Her2/neu, Her3* y miRNA-205 en tejido tumoral y sano adyacente en mujeres que padecen cáncer de mama.
- Determinar la correlación entre el consumo de alcohol, polifenoles y la obesidad con la expresión de los genes *Her2/neu, Her3* y miRNA-205 en mujeres que padecen cáncer de mama.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Participantes del Estudio

Se realizó una revisión retrospectiva de los casos de cáncer de mama diagnosticadas en el Hospital General del Estado de Sonora (HGE) de los años 2015 al 2018. Las mujeres con cáncer de mama fueron seleccionadas de la base de datos del Laboratorio de Anatomía Patológica del HGE. Los criterios de inclusión fueron mujeres con cáncer de mama, sin tratamiento previo a la cirugía y mayores de 18 años. De igual manera, se tuvo en cuenta la disponibilidad del tejido tumoral y sano adyacente. Los criterios de exclusión fueron: padecer algún otro tipo de cáncer, metástasis, tratamiento previo a la resección del tumor e incapacidad para firmar el consentimiento informado.

Los criterios de eliminación fueron que las participantes que no estuvieran dispuestas a donar la muestra de tejido tumoral y sano adyacente, o bien, que la participante decidiera abandonar el estudio.

5.2 Diseño del Estudio

El estudio fue observacional, retrospectivo. Las variables independientes fueron el consumo de alcohol, polifenoles y la obesidad. Las variables dependientes fueron la expresión del gen *Her2/neu, Her3* y miRNA-205.

Se evaluó la expresión de los genes *Her2/neu, Her3* y miRNA-205 en tejido tumoral y tejido sano adyacente. Asimismo, se busca la relación entre la expresión del gen *Her2/neu* y miRNA-205 con obesidad, consumo de alcohol y polifenoles.

5.3 Tamaño de Muestra y Reclutamiento de Pacientes

El tamaño de muestra fue por conveniencia, se seleccionaron de la base de datos del Laboratorio de Anatomía Patológica del HGE. Se identificaron 232 posibles candidatas, de las cuales 168 cumplieron con los criterios de inclusión. Se visitaron a las 168 en diferentes municipios del Estado de Sonora y se encontró que 7 mujeres han fallecido, 9 pacientes no contaron con registro del domicilio en la base de datos del HGE, 36 candidatas no se han localizado, 18 pacientes tuvieron tratamiento previo a la cirugía, 44 pacientes se encuentran en otros municipios que no fuimos a reclutar y 54 voluntarias aceptaron participar en el proyecto, firmando consentimiento informado.

5.4 Consideraciones Éticas

El protocolo del proyecto se ajustó al principio de la Declaración de Helsinki, el informe Belmont de 1978, así como al Reglamento de la Ley General de Salud en investigación. De igual manera, se basó en la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 que establece los criterios para la realización de proyectos de investigación para la salud en humanos.
El nivel de riesgo del estudio, según el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud, se clasifica con riesgo 1.

El comité de ética en investigación del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., aprobó el proyecto en junio 2018 con la clave de autorización CE/007/2018. De igual manera el Hospital General del Estado de Sonora aprobó el proyecto con autorización SSS-HGE-CI-Oficio-2019-006. El consentimiento informado se otorgó a las participantes antes de comenzar el proyecto, de igual manera podían retirar el consentimiento informado, en cualquier momento del estudio sin ninguna repercusión, véase anexo 1.

5.5 Recolección y Procesamiento de Muestras

Se tomaron muestras de tejido tumoral y tejido sano adyacente en las mujeres que padecen cáncer de mama por medio de la resección quirúrgica del tumor, en bloque de parafina. Se realizó dentro del Laboratorio de Anatomía Patológica del HGE y en colaboración con el personal asignado al área. La obtención de tejido tumoral y sano adyacente se realizó tomando una muestra de tejido embebido en parafina, sumergido en una solución de formalina neutra al 10% durante un promedio de 18-24 horas (FFPE). Posteriormente, se realizaron cortes de 5µm de espesor del tejido con un micrótomo marca Leica RM2125 RTS, se llevó a cabo la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) mediante el protocolo de Soler & Acosta, (2018) y se montaron en un portaobjetos. El tejido tumoral ya teñido se delimitó con un plumón, posteriormente se realizaron entre 5 y 10 cortes de 5µm adicionales, véase figura 1. Las preparaciones adicionales se superpusieron con la muestra de inmunohistoquímica y se separó el tejido tumoral del sano adyacente usando la técnica de raspado con bisturí con ayuda de un patólogo experto, el tejido sano adyacente se depositó en un tubo independiente del tejido tumoral de la muestra de cada participante. Posteriormente se aisló RNA del tejido separado.

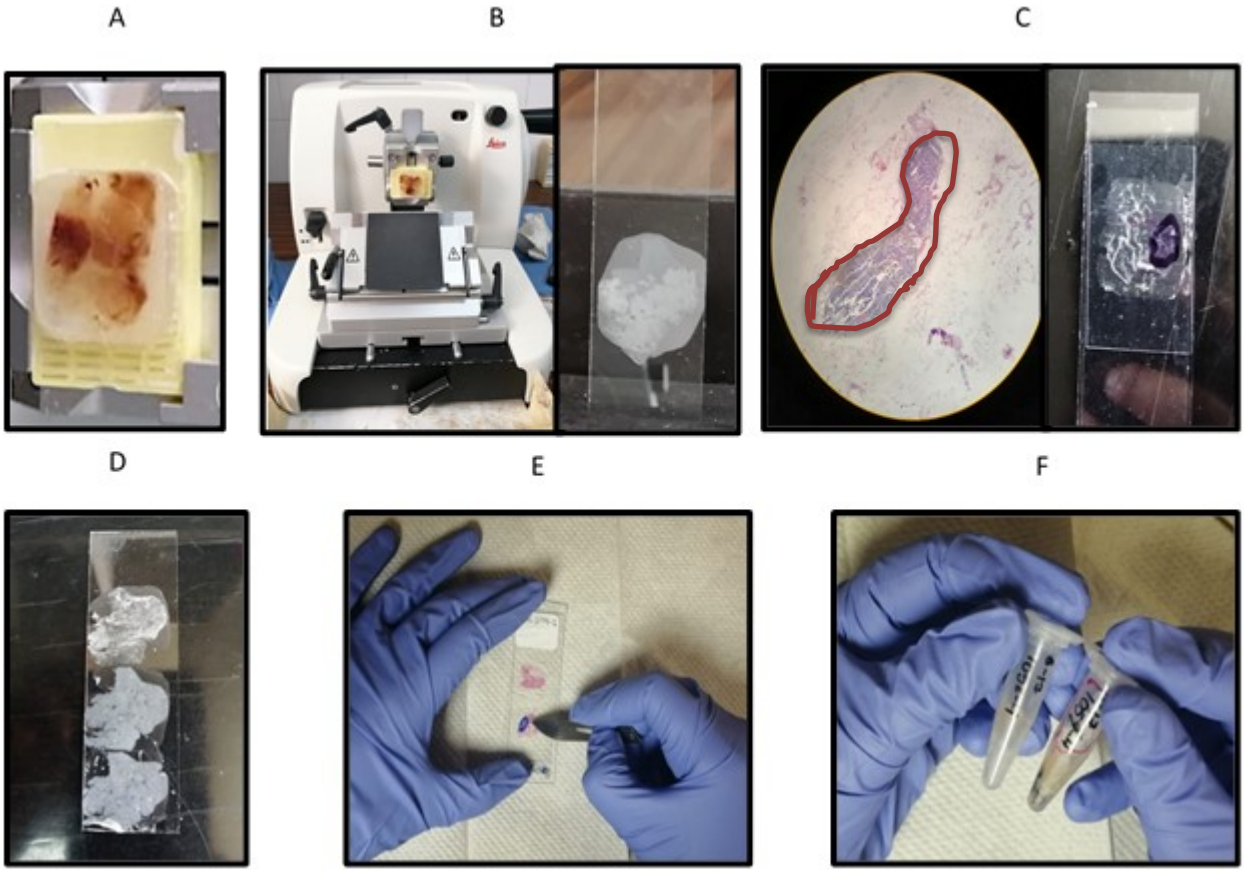


Figura 1. (A) Tejido tumoral y sano adyacente de mama en FFPE. (B) Cortes de 5µm de espesor y montadas en portaobjetos. (C) Tejido tumoral teñido con IHQ, vista en microscopio y delimitado con plumón en portaobjetos. (D) Cortes adicionales de tejido en FFPE. (E) Raspado con bisturí del tejido tumoral y sano adyacente. (F) Tubos independientes de tejido tumoral y sano adyacente de la paciente con cáncer de mama.

5.5.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó mediante el kit NORGEN BIOTEK Corp para aislar el RNA total del tejido embebido en parafina, siguiendo las instrucciones del fabricante. Excepto que, se desparafinó el tejido a 80°C por 1 hora y quitamos parafina en exceso antes de poner el xilol. De igual manera las centrifugaciones del desparafinado fueron a 4°C y el proceso de obtención de RNA a 6°C.

Para estimar la concentración y pureza del RNA de todas las muestras se realizó un análisis espectrofotométrico mediante NanoDrop1000 (Thermo Scientific), la concentración se calculó por absorbancia a 260nm y el índice de pureza por la relación A260/280. Las muestras de RNA obtenidas se almacenaron a -80C.

5.5.2 Síntesis de cDNA, y Evaluación de Expresión Genética

La síntesis de cDNA, se realizó por TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), usando *Her2/neu* (ID: HS1001580_m1)*, Her3* (ID: HS00176538_m1) y miRNA-205 (ID: 241040_mat) en estudio, así como *18s* (ID: HS99999901_s1) y miRNA-39 (ID: 000200) como referencia (TaqMan MicroRNA Assay- Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La expresión de los genes *Her2/neu, Her3* y miRNA-205 se calculó con el método de doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$). El Ct es el ciclo de PCR donde la señal de fluorescencia del fluorocromo supera el umbral de amplificación.

5.5.3 Evaluación de Expresión Genética

El valor de Ct de cada gen *Her2/neu, Her3* y miRNA-205 se calculó con la siguiente fórmula:
ΔCt = (Ct del gen de interés - Ct gen de referencia)

Para la normalización de los datos se utilizó la media de los Ct de (miR39 y *18S*) los genes de referencia para cada muestra.

El cálculo de ΔCt de las muestras de las mujeres que padecen cáncer de mama se realizaró con la siguiente fórmula.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = [(Ct del gen de interés - Ct gen de referencia) Tejido tumoral Participante con cáncer de mama – (Ct del gen de interés – gen de referencia) Tejido sano adyacente Participante con cáncer de mama

Δ=Delta, Ct= Cycle threshold

Los resultados obtenidos se interpretaron como la expresión relativa de los genes *Her2/neu, Her3* y miRNA-205.

El índice de cambio en la expresión de los genes *Her2/neu, Her3* y miRNA-205 del tejido tumoral con el sano adyacente, se calculó con la media de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los valores mayores a 1 indicaron una sobrexpresión de los genes *Her2/neu, Her3* y miRNA-205, mientras que los menores a 1 representaron una baja expresión.

Para el cálculo de las diferencias en la expresión de los genes entre el tejido tumoral y sano adyacente se utilizaron los Δ (Ct gen de interés – Ct gen de referencia) para tejido tumoral y sano adyacente, respectivamente.

5.6 Inmunohistoquímica

Los estudios de inmunohistoquímica para la evaluación de los receptores (ER, PR, Her2/neu y Ki67) se realizaron por las clonas recomendadas de la FDA, Her2/neu: A085.25, CB11, 4D5; receptor estrógenos: 1D5, 6G11, SP1, 1D5+ER.2.123; receptor progesterona: 1A6, 1294, 312; Ki67: MIB-1.

Los receptores de ER y PR, se detectaron por medio de una tinción nuclear y es válido reportar el porcentaje de células neoplásicas positivas con 1%. Se sugieren los sistemas Allred y H-Score que describe el Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario (2017), para especificar el porcentaje de células positivas.

Sistema H-score, intensidad de tinción (0-3):
Porcentaje de células positivas x 3 (tinción nuclear intensa), más
Porcentaje de células positivas x 2 (tinción nuclear moderada), más
Porcentaje de células positivas x 1 (tinción nuclear débil)
El resultado es el índice de H-score que va de 0 a 300.

Sistema Allred, células positivas (0-5):
Área positiva:
0: Sin células positivas
1: <1% de células positivas
2: 1 a 10% de células positivas
3: 11 a 33% células positivas
4: 34 a 66% de células positivas
5: 67% o más de células positivas
El resultado es el índice de Allred que va de 0 a 8.
Intensidad de tinción 1= débil, 2= moderada, 3= intensa

La valoración de la expresión de Her2/neu se realizó por medio del kit HerceptTest DAKO, se elaboró e interpretó por la guía de la ASCO-CAP. La cual indica los puntos de corte de la siguiente manera: los resultados 0 y 1 son negativos (10% de las células neoplásicas, tinción incompleta y débil), el resultado 2 es dudoso y necesita confirmación por el estudio de FISH/CISH (>10%, tinción completa, pero débil) y el resultado 3 es positivo (>10% tinción, completa, intensa y uniforme en las membranas de las células neoplásicas) .

El marcador de proliferación celular Ki67 se interpretó como bajo: <14% y alto >14% (Imigo et al., 2011). De acuerdo a los resultados de los receptores y de ki67 se clasificó por subtipo molecular (Luminal A, Luminal B, Her2/neu+ y triple negativo de acuerdo a Dai et al., (2015) e Imigo et al., (2011), véase cuadro 2.

5.7 Expediente Clínico

Del expediente clínico se tomaron el peso y talla al momento del diagnóstico de cáncer de mama y se calculó el índice de masa corporal (IMC) con la fórmula IMC=Kg/m^2. De acuerdo con los resultados obtenidos se clasificó por estado nutricional de normopeso (18.5-24.9), sobrepeso (25-29.9) y obesidad (≥30) (OMS, 2018). De igual manera se tomó el grado tumoral de cáncer de mama previamente clasificado por la escala Scarff-Bloom-Richardson y el estadio de la enfermedad por el sistema TNM de American Join Committe on Cancer (NOM-041-SSA2-2011).

5.8 Cuestionario de Factores de Riesgo para Desarrollar Cáncer de Mama

Se aplicó un cuestionario de factores de riesgo diseñado previamente para el estudio (López-Vázquez et al., 2017), en el cual se preguntó el consumo de alcohol, entre otros. De igual manera se tomó el peso utilizando una báscula marca AND FG-150 kg y la talla por medio del estadiómetro marca Seca en plano de Frankfurt, y se calculó el IMC con la fórmula IMC=Kg/m^2 (OMS, 2018), véase anexo 2.

5.9 Percepción Corporal

La percepción corporal se midió, basándose en un modelo de figuras de un estudió de Pérez-Gil (2010), en mujeres mexicanas de bajos recursos. En el cual, se les preguntaba a las participantes con cuál modelo de silueta se identificaban y se clasificaban en desnutrición, normopeso, sobrepeso u obesidad, de acuerdo al número de cada silueta, véase figura 2.

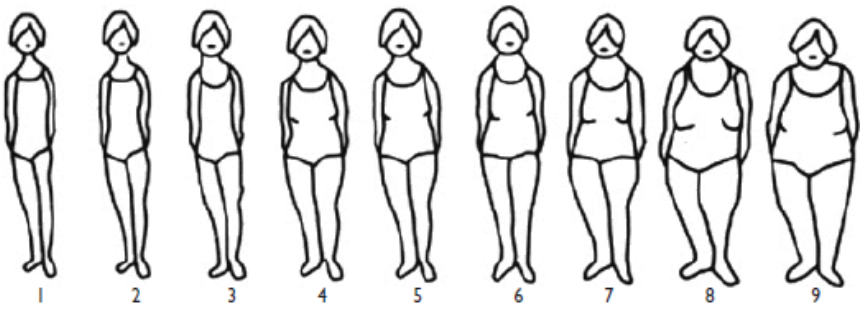


Figura 2. Modelos para la clasificación de percepción corporal. Tomado de Pérez Gil (2010)

5.10 Cuantificación de Polifenoles

Se cuantificó el consumo de polifenoles cianidina 3-o-glucósido, ácido elágico y delfinidina 3-o-glucósido, por medio de una frecuencia de consumo de alimentos un año previo al diagnóstico de cáncer de mama. Se basó en una herramienta validada para mujeres mexicanas de Quizán & Ortega, (2000) y por el registro de alimentos con los polifenoles descritos del software Phenol Explorer 3.6. De igual manera, se cuantificarán los polifenoles de los alimentos anteriomente mencionados del software Phenol Explorer 3.6, el cual indica cuanto polifenol se absorbe dependiendo del alimento, véase anexo 3.

5.11 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con una prueba de chi-cuadrada para la asociación del sobrepeso-obesidad y los subtipos moleculares. De igual manera, para el análisis del IMC antes y después del diagnóstico de cáncer de mama se realizó con una *t pareada*, esto para conocer el estado de salud de las participantes.

Las diferencias en la expresión relativa de los genes *Her2/neu, Her3* y miRNA-205 se realizaron con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, ya que los datos no fueron normales. Así como la prueba de *t pareada* para observar diferencias en tejido tumoral y tejido sano adyacente. Asimismo, la expresión de *Her2/neu, Her3* y miRNA-205 relacionado con la obesidad, el consumo de alcohol y polifenoles, se analizó con una chi-cuadrada. El paquete estadístico Minitab versión 2017 se utilizó para el análisis de los datos y fue considerado un nivel de significancia (α) de 0.05.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se incluyeron 54 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama analizados en el periodo 2015-2018, que aceptaron participar en el estudio, de las cuales la edad promedio al momento del diagnóstico fue de 53.5 años (±8.8).

La mayoría de las pacientes presentaron los receptores positivos para ER, PR y el biomarcador de proliferación celular Ki67, véase figura 3. En un estudio de Maffuz-Aziz (2017) los receptores de ER fueron de 72.22% y PR 64.81%, de igual manera el 43% tuvieron <14% y 56% >15%, siendo muy similar a nuestro trabajo, a excepción de Ki67 que fue de 70.37%, por lo tanto el pronóstico de la enfermedad se vuelve desfavorable.

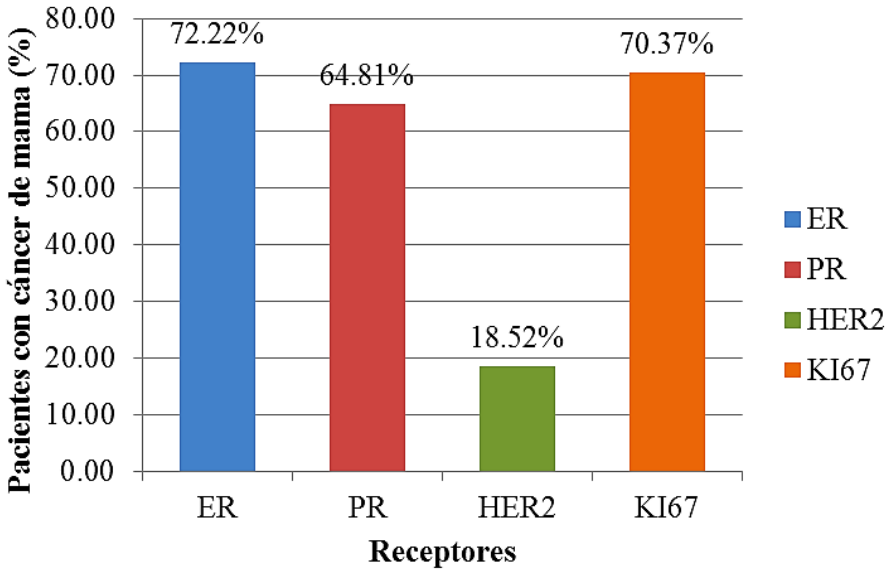


Figura 3. Receptores de estrógenos (PR), progesterona (PR), Her2/neu, KI67

En un estudio en población sonorense de López-Vázquez (2017) se reportó un 46.6% de grado tumoral 2, mayor porcentaje que nuestro estudio. Estas cifras nos indican que las células tumorales crecen y se propagan más rápido, por lo que el pronóstico se vuelve desfavorable, véase figura 4.

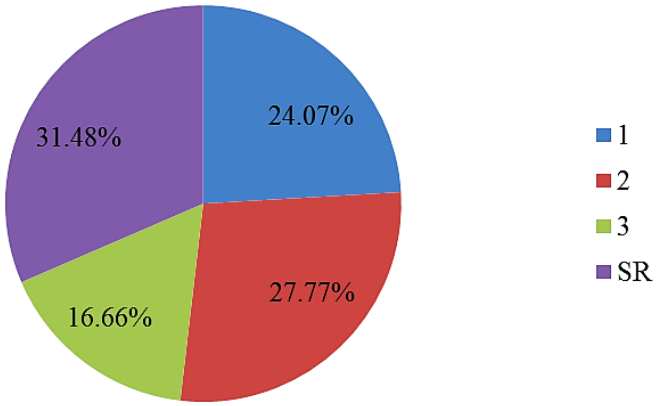


Figura 4. Grado tumoral de las pacientes con cáncer de mama

La mayoría pacientes con cáncer de mama presentaron las etapas I y II (74.05%), véase figura 5. En un estudio de López-Vázquez (2017), las etapas clínicas I y II fueron de mayor prevalencia con un 36% y la etapa III y IV con un 45%. En un estudio de Maffuz-Aziz (2017) se presentó muy similar en etapas tempranas de I a IIA con un 82.7% pesquisa y diagnóstica 35.6%. Por lo tanto, en este estudio se observa la detección del cáncer de mama en etapas tempranas, mejorando la supervivencia de estas pacientes.

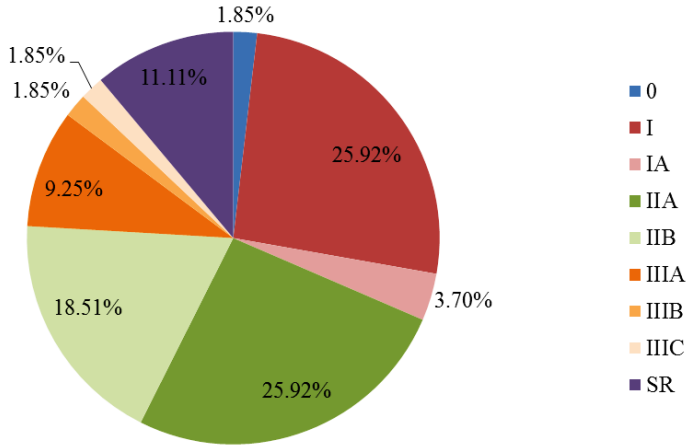


Figura 5. Estadio de cáncer de mama en las pacientes

La incidencia de los subtipos moleculares fue de: Luminal A (33.33%), B (35.18%), Her2/neu+ (18.51%) y triple negativo (12.96%), véase figura 6. Nuestros hallazgos, coinciden con la prevalencia encontrada en un estudio de Dai et al., (2015), (Luminal A (23.7%), Luminal B (38.8%), Her2/neu+ (25.2%) y Triple Negativo (12.3%), cuyo objetivo era explorar y resumir los subtipos intrínsecos existentes, las características clínicas-patológicas de los pacientes y la clasificación de tumores para comprender la aplicación clínica y futuras tendencias del cáncer de mama. En un estudio de López-Vázquez (2017), reportaron una prevalencia del subtipomolecular Luminal A y B del 40%, respectivamente, y Her2/neu con un 13.33% y sin casos de triple negativo, estos datos concuerdan con nuestro estudio, ya que las pacientes de este estudio son originarias del noroeste de México.

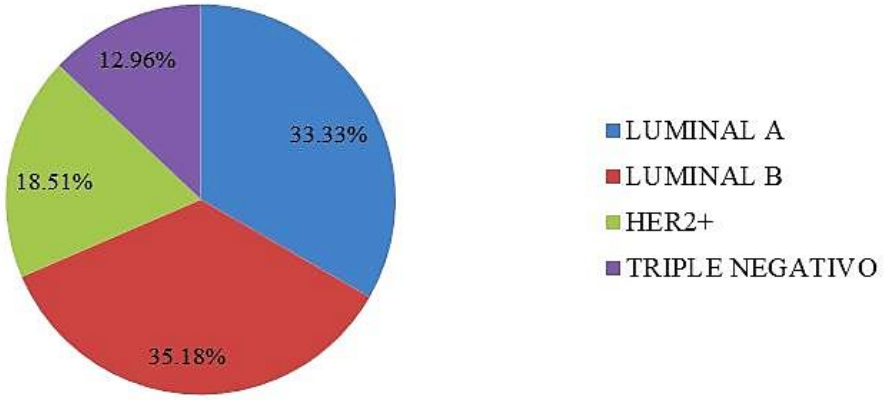


Figura 6. Subtipos moleculares de cáncer de mama de las pacientes

6.1 Índice de Masa Corporal (IMC) y Subtipos Moleculares

Las pacientes con cáncer de mama al momento del diagnóstico presentaron sobrepeso-obesidad con un 76.92%. Al relacionarlo con el subtipo molecular Her2+ no fue significativo ($p>0.05$). Sin embargo, el subtipo molecular Luminal A, que presenta un pronóstico favorable en cáncer de mama se asoció ($p<0.05$) con las pacientes que presentaban sobrepeso y obesidad, no encontrándose asociación con los subtipos moleculares más agresivos, véase cuadro 4. Sin embargo, no se descarta

que exista una relación entre los diferentes grados de obesidad con los subtipos moleculares de mayor agresividad. Debido a nuestra base de datos, el número de muestra de obesidad mórbida fue de una persona y no fue posible realizar esta asociación, ya que en este estudio se evaluó de manera general, la asociación del sobrepeso y la obesidad con los diferentes subtipos moleculares.

Cuadro 4. Asociación de los subtipos moleculares y sobrepeso-obesidad en las pacientes con cáncer de mama

Subtipomolecular	Asociación con IMC	Valor de p
Luminal A	Sobrepeso-obesidad	$p<0.05$
Luminal B, Her2+ y triple negativo	Ninguna	$p>0.05$

Los estudios que evalúan el estado nutricional por IMC con la presencia de diferentes subtipos moleculares se concentran en países orientales y pocos en occidente. Por ejemplo, Sato et al. (2018), realizaron un estudio en población japonesa donde la obesidad (IMC≥ 25 kg/m2) se asoció con un factor pronóstico para presentar ER+ y Her2-. De igual manera, en un estudio de Abubakar et al. (2018), en población asiática indígena, en las pacientes que presentaron el subtipo molecular Luminal A, se evaluó que un IMC≥ 25 kg/m2 o ≤ 18.5 kg/m2 con una menarquia de inicio mayor a 15 años, se asociaron con un pronóstico adverso. En un estudio de un país occidental, en Alemania, realizado por Nattenmüller et al. (2018), analizaron los receptores hormonales en tejido embebido en parafina de pacientes con cáncer de mama con terapia hormonal posmenopáusicas. Concuerda que un IMC≥ 25 kg/m2, se asoció con mayor riesgo de tumores menos agresivos, es decir, ER+, PR+, Her2- y Ki67-.

6.2 IMC y Percepción Corporal de las Pacientes con Cáncer de Mama

Las pacientes con cáncer de mama presentaron sobrepeso-obesidad un 76.92%, esto concuerda con un estudio de Reyes-Barretero et al., (2016) que indicó un 76.89% de incidencia y Bartehellii-Cardona et al., (2018) con un 84.4%, ambos realizados en población mexicana.

El índice de masa corporal no fue diferente ($p>0.05$) antes y después del diagnóstico de cáncer de mama, solo cuatro participantes pasaron de sobrepeso a normopeso, dos de obesidad a sobrepeso, dos de sobrepeso a obesidad y una de normopeso a sobrepeso, las demás se mantuvieron con un IMC similar. Aunque, las participantes refirieron haber cambiado sus hábitos de alimentación, parece ser que no siguen una orientación adecuada para realizar dichos cambios, véase figura 7. En un estudio de Vargas-Meza et al., (2016) se vio un aumento de peso del 72.6% de las mujeres con cáncer de mama postmenopausicas y no hubo una diferencia después del tratamiento con un 69.5%, datos similares a este trabajo.

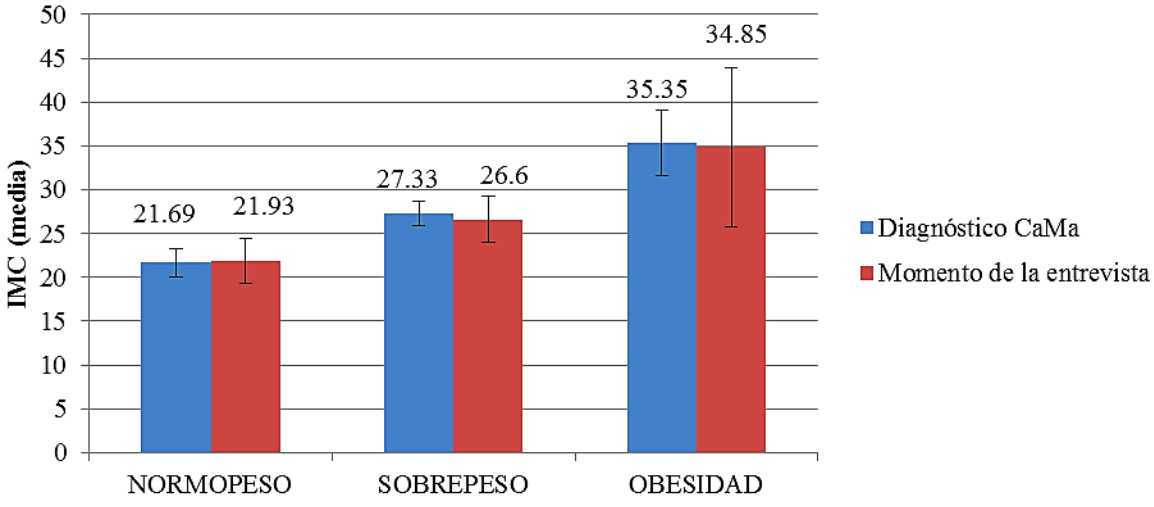


Figura 7. IMC al diagnóstico de cáncer de mama y actual

La percepción corporal de las pacientes que padecen cáncer de mama, no concuerda con el IMC al momento de la entrevista. De acuerdo a los modelos de percepción corporal de Pérez-Gil (2010), el 26.62% refiere percibirse con desnutrición y la realidad es que la categoría es nula. De igual manera, el 7.40% se percibe con sobrepeso, sin embargo el número de personas que presentan un IMC >25, es mayor (67.29%), véase figura 8. Es importante señalar que una correcta percepción corporal, ayuda a apegarse adecuadamente al tratamiento médico, psicológico y nutricio, y así mejorar la calidad de vida de las pacientes (Pérez-Gil et al., 2010).

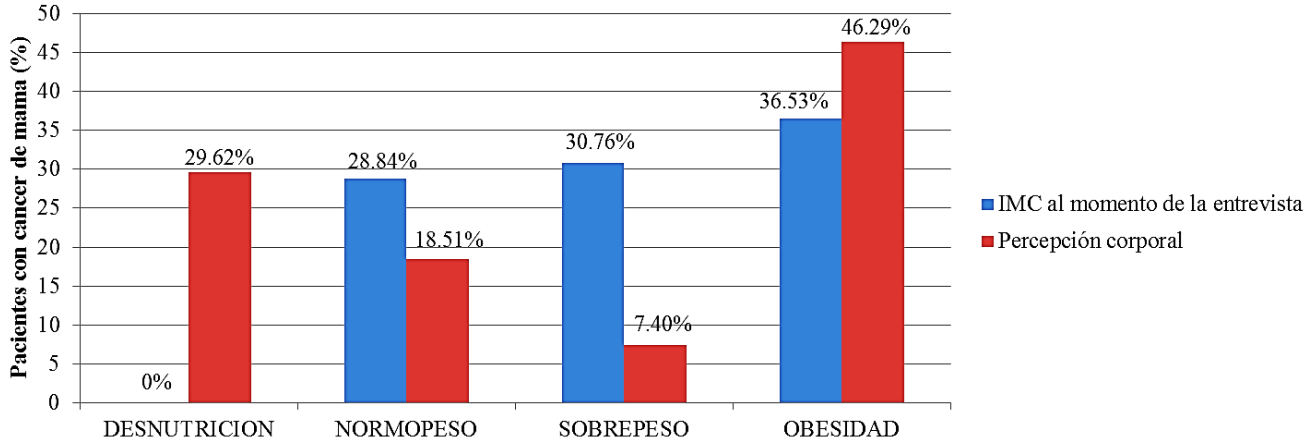


Figura 8. Percepción corporal e IMC al momento de la entrevista

6.3 Estimación del Consumo de Alcohol

La mayoría de las pacientes que padecen cáncer de mama refirieron no haber consumido alcohol (55.56%), antes del diagnóstico de cáncer de mama y un 44.45% refirió haber consumido por lo menos una bebida alcohólica en un año, véase figura 9. Esta cifra es similar a la reportada en la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (2016-2017) con un 39%, lo que refiere ser una cifra elevada para el riesgo de desarrollo de cáncer de mama.

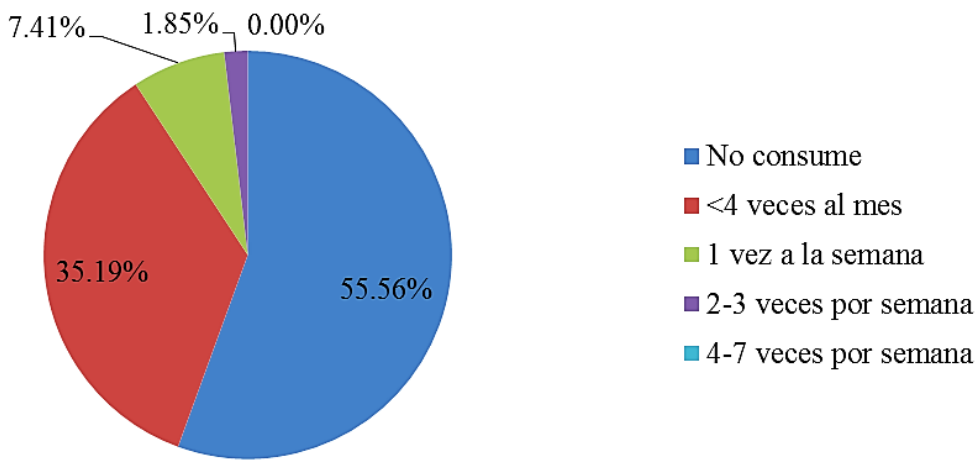


Figura 9. Estimación del consumo de alcohol en las pacientes con cáncer de mama

6.4 Estimación del Consumo de Polifenoles

Los polifenoles han sido muy estudiados y refieren tener efectos benéficos a la salud, sin embargo no existe información suficiente sobre el consumo proveniente de la dieta. En este trabajo, se utilizó la base de datos Phenol Explorer 3.6 (INRA et al., 2015). Existen múltiples alimentos mexicanos de los que se desconoce el contenido de estos compuestos. Hasta el momento no hay una recomendación diaria de estos polifenoles, pero un estudio de Zamora et al., (2013) ha asociado un consumo elevado de polifenoles >600mg/día, con un efecto protector a distintas enfermedades crónicas, incluidas el cáncer.

El promedio del consumo diario en este estudio, un año previo al diagnóstico de cáncer de mama de delfinidina 3-o-glucósido fue de 1.1±0.81 mg/día, ácido elágico de 1.06 ± 1.53 mg/día y de cianidina 3-o-glucósido de 3.96 ± 6.02mg/día, principalmente de fuentes como uvas, fresas, duraznos y aceitunas, véase tabla 5. Si comparamos con el consumo de estos polifenoles con el consumo de >600mg/día, solo representa el 1% del consumo en la dieta de las mujeres que padecen cáncer de mama. La OMS (2019) indica que un consumo mayor de 400 gramos al día, asegura el consumo de polifenoles y otros nutrientes. En nuestro trabajo, se reportó que la media de consumo

de frutas y verduras fue de 53.5±99.78 gramos al día, representando el 13.37% de la ingesta de los tres polifenoles, véase cuadro 5.

En un estudio de Navarro et al., (2017) se reportó que la población española consume 1365.1mg/día, en población francesa de 1193mg/día, filandeses de 863mg/día y sicilianos de 663.7mg/día, esto por encima de la ingesta de >600mg/día de polifenoles reportado como benéfico para la salud.

Cuadro 5. Estimación de la ingesta de polifenoles y gramos de frutas y verduras

Polifenol	**Ingesta de polifenol mg/día**	**Ingesta de frutas y verduras g/día**
Delfinidina 3-o-glucósido	1.1±(0.81)	53.5±(99.78)
Ácido elágico	1.06±(1.53)	
Cianidina 3-o-glucósido	3.96±(6.02)	

6.5 Expresión Genética de miR-205, *Her2/neu* y *Her3*

En cuanto a la expresión relativa de los genes *Her2/neu*, *Her3* y miR-205 basado en los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se encontraron diferencias entre miR-205 y *Her2/neu* ($p<0.001$), así como entre *Her3 y Her2/neu* ($p<0.001$), esto fue contrario a lo que se esperaba, ya que al haber una baja expresión de miR-205, se esperaba un aumento en la expresión relativa de *Her3*, pero no fueron diferentes ($p=0.496$), véase figura 10. En un estudio de Xi et al., (2018) en células de cáncer de mama humanas, demostraron que existe una correlación entre la expresión de *Her2/neu* y *Her3* porque Her2 alberga un elemento de respuesta de miR-125 a/b compartido e indujo un secuestro del mismo, que resultó en una baja expresión de *Her3*.

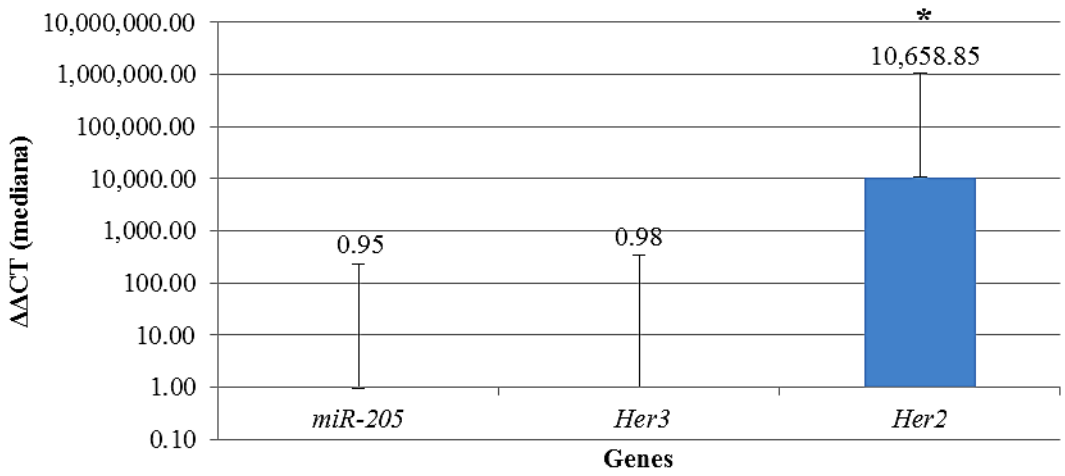


Figura 10. Expresión relativa ΔΔCT de los genes miR-205(n=34), *Her3* (n=34) y *Her2/neu* (n=22). El símbolo (*) indica diferencias significativas ($p<0.05$).

En cuanto a la expresión de *Her2*/neu, en nuestro estudio encontramos que el 95% (n=22) de los casos sobrexpresaron *Her2/neu* a nivel mRNA, mientras que del total de las pacientes (n=54) que padecen cáncer de mama, hasta el 18.5% sobrexpresan Her2/neu a nivel IHC y de las 21 pacientes que expresaron *Her2/neu* a nivel mRNA fue de 18.8% expresó Her2/neu a nivel IHC, siendo diferente la expresión a nivel genético y proteína. Estos resultados se explican por los diferentes niveles de regulación que existen, en ese sentido, es posible que muchos de los mensajes que son transcritos no lleguen a ser traducidos (Cavagnari B, 2012). De igual manera, el 50% de los casos que sobrexpresaron Her2/neu, coexpresan Her3, estas cifras concuerdan con el autor Mujo (2014), lo que explica la dimerización entre Her2/neu y Her3, que activa la vía de señalización de la proliferación celular PI3K/AKT pudiera explicarse por la presencia de sobrepeso y obesidad, cuyas asociaciones se describen a continuación. Lo anterior sugiere que, para nuestro caso, aunque los valores entre la expresión de *Her2/neu* a nivel mRNA y proteína difieran, las proporciones se mantienen.

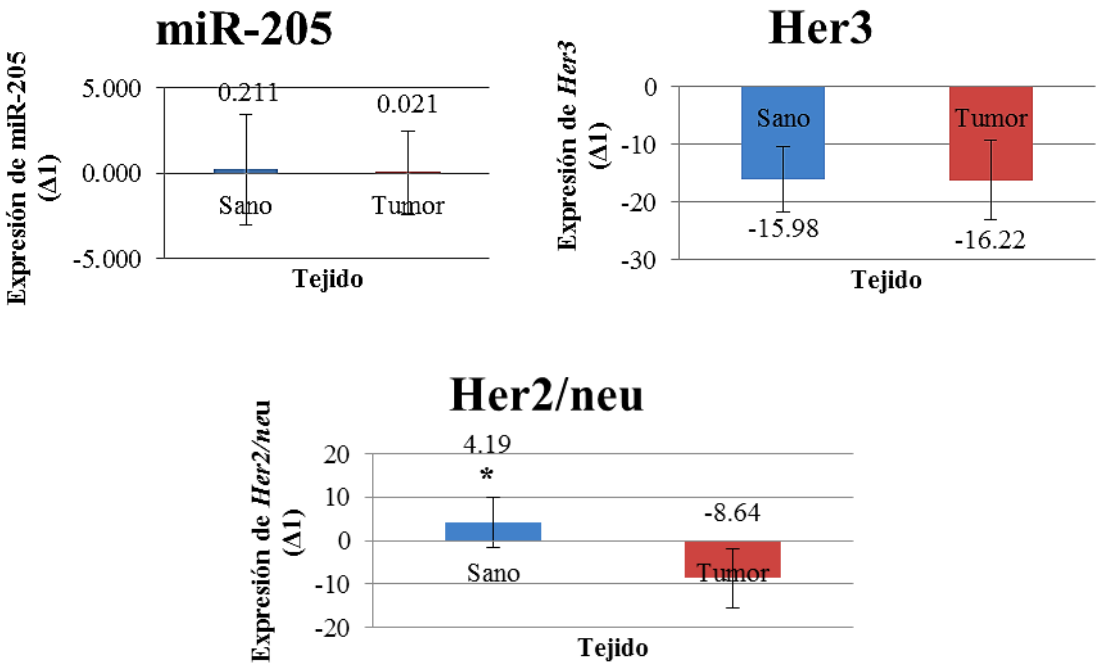


Figura 11. Expresión genética de miR-205, *Her3* y *Her2/neu* en Δ1 tejido tumoral y Δ1 sano adyacente. El símbolo (*) indica diferencias significativas (p<0.05). A. Expresión de *Her2/neu* (n=22) p=0.000001. B. Expresión de *Her3*(n=34) p=0.57. C Expresión de miR-205(n=34) p=0.75.

Los valores de Δ1 sano y Δ1 tumor se tomaron en cuenta para valorar la asociación de tejido tumoral y sano adyacente en las pacientes con cáncer de mama. Al evaluar la expresión genética de miR-205 y *Her3* no se encontraron diferencias (p>0.05) entre tejido tumoral y sano adyacente embebido en parafina en las pacientes que padecen cáncer de mama, pero si hay mayor expresión (p=.000001) de *Her2/neu* en tejido tumoral, véase figura 11. En un estudio de López-Vázquez (2017) se identificó que miR-205 en sangre periférica se encontraba disminuido en pacientes con cáncer de mama. Nuestros análisis de la expresión genética relativa de miR-205 en tejido tumoral embebido en parafina parecen concordar, pero no fueron significativos (p>0.05). El sobrepeso y la obesidad combinada se asociaron tanto con la expresión de *Her2/neu* (p=0.039) como con la expresión de *Her3* en tejido tumoral de cáncer de mama, véase cuadro6.

Además los análisis manifiestan una asociación entre la expresión de *Her3* y el consumo de alcohol en tejido tumoral (p=0.07). Asimismo, se determinó una asociación entre el consumo de cianidina

3-o-glucósido y la expresión del gen *Her2/neu* en tejido sano (p=0.054). El autor Liu (2014) reportó que esta antocianina regula la expresión de este gen induciendo la apoptosis en células de cáncer de mama, este resultado sugiere un metabolismo diferencial en tejido tumoral con respecto al tejido sano. Por su parte, el consumo de ácido elágico se asoció con la expresión de *Her2*/neu en tejido tumoral (p=0.052), posiblemente la ingesta de este polifenol sea insuficiente para aumentar miR-205 en tejido tumoral (Abbasi et al., 2018), véase Cuadro 6. La mayoría de los estudios analizan la asociación entre Her2/neu y la exposición ambiental u otros genes en cáncer, lo hacen a nivel IHQ o bien, a nivel mRNA en líneas celulares, más en nuestra búsqueda, no encontramos evidencia previa de la asociación de la expresión de *Her2/neu* con el sobrepeso y la obesidad y el consumo de ácido elágico a nivel mRNA en tejido tumoral. Estos hallazgos permiten hacer nuevas inferencias sobre el comportamiento tumoral en condiciones reales.

Cuadro 6. Asociación de la expresión genética entre *Her2/neu* , *Her3* en tejido tumoral y sano adyacente con sobrepeso-obesidad, consumo de alcohol y polifenoles.

Gen	Asociación	Tejido	Valor de p
Her2/neu (n=22)	Sobrepeso y obesidad	Tumor	p=0.039*
	Cianidina 3-o-glucósido	Sano	p=0.054
	Ácido elágico	Tumor	p= 0.052
Her3 (n=34)	Sobrepeso y obesidad	Tumor	p=0.02*
	Alcohol	Tumor	p= 0.07

El símbolo (*) indica diferencias significativas (p<0.05).

7. CONCLUSIÓNES

- Refutamos nuestra hipótesis de trabajo, pues si bien la expresión de los genes *Her2/neu* y *Her3* está asociada al consumo de alcohol y polifenoles, así como al estado nutricional, en nuestro contexto de estudio, tales fenómenos no son mediados por la expresión de miR205.

- Inferimos que hay un comportamiento diferencial entre el metabolismo del tejido tumoral y sano adyacente, lo que permite explicar las asociaciones tejido específico que identificamos.

- Para nuestro conocimiento, este trabajo representa el primer reporte que demuestra una asociación de la expresión de *Her2/neu* y *Her3* a nivel mRNA con el sobrepeso y la obesidad y el consumo de ácido elágico, cianidina 3-o-glucósido y el consumo de alcohol en tejido mamario tumoral y/o sano adyacente.

8. RECOMENDACIONES

- Aumentar el número de muestra en otras estancias de salud.
- Explorar otras vías de señalización, relacionadas con obesidad y genes de proliferación célular.
- Explorar otros miRNAs que estén involucrados en la regulación epigénetica de genes relacionados a la división y proliferación célular.

9. REFERENCIAS

Abbasi B, Iqbal J, Mahmood T, Khalil A, Ali B, Kanwal S, Shah S, Ahmad R. 2018. Role of dietary phytochemicals in the modulation of miRNA expression: Natural swords combating breast cancer. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 11(4).

Abubakar M, Sung H, BCR D, Guida J, Tang S, Pfeiffer R, Yang X. 2018. Breast cancer risk factors, survival and recurrence, and tumor molecular subtype: analysis of 3012 women from an indigenous Asian population Breast Cancer Research 20:114.

Adachi R, Horiuchi S, Sakurazawa Y, Hasegawa T, Sato K , Sakamaki T. 2011. ErbB2 down-regulates microRNA-205 in breast cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications. 11(4):804-808.

Bertehelli-Cardona I, Ángeles-Casas M, MejíaMiranda N, Martínez-Ángeles J. Obesidad en mujeres con cáncer de mama en un hospital general de zona de Hidalgo, México. Aten Fam. 2018;25(1):3-6.

Reyes Barretero DY, Cruz Castillo AB, Jaimes Alpízar E, Carmona Vilchis J, Cabrera Galeana PA, Sánchez Flores DP, Barrera Franco jl. 2016. Prevalencia de sobrepeso y obesidad de acuerdo al Índice de Masa Corporal y el porcentaje de grasa en pacientes con cáncer de mama. Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria 36(3): 10-13

Bowers, Wiese, Brenner, Rossi, Tekmal, Hursting, Linda A. de Graffenried. 2015. Obesity Suppresses Estrogen Receptor Beta Expression in Breast Cancer Cells via a HER2-Mediated Pathway. PLoS ONE. 10(12): e0145452.

Brown KA, McInnes KJ, Hunger NI, Oakhill JS, Steinberg GR, Simpson ER. 2009. Subcellular localization of cyclic AMP-responsive element binding protein-regulated transcription coactivator 2 provides a link between obesity and breast cancer in postmenopausal women. Cancer Res. 69(13):5392–5399.

Castrezana M. 2017. Geografía del cáncer de mama en México. Invest. Geog no.93 México.

Cavagnaria B. 2012. Regulation of gene expression: how do epigenetic mechanisms work. Arch Argent Pediatr 110(2):132-136

Chen J, Zhu Y, Zhang W, Peng X, Zhou J, Li F, Han B, Liu X, Ou Y, Yu X. 2018. Delphinidin induced protective autophagy via mTOR pathway suppression and AMPK pathway activation in HER-2 positive breast cancer cells. BMC Cancer 18:342.

(DTCM) Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Séptima revisión. Elsevir. Colima 2017.

Colomer R, Monteroa S, Roperoa S, Menéndeza JA, Cortés H, Solanasb M, Escrich E. 2001. El oncogén HER2 como ejemplo del progreso diagnóstico y terapéutico en cáncer de mama. Rev Senol Patol Mamar. 14:8-19.

Colonia A, Rivera J, Orozco J Marín D. 2015. HER-2: Un marcador molecular usado en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de mama. Revista médica Risaralda. 21 no.1.

Dai X, Li T, Bai z, Yang Y, Liu X, Zhan J, and Shi, B. 2015. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. Am J Cancer Res. 5(10): 2929–2943.

Dawood S, Broglio K, Buzdar A, Hortobagyi G, and Giordano S. 2010. Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by HER2 Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review. J Clin Oncol. 28(1): 92–98.

Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco. 2016-2017. Consumo de alcohol: Reporte de Alcohol. INSP.

English D,Roque D and Santin A. 2013. HER2 Expression Beyond Breast Cancer: Therapeutic Implications for Gynecologic Malignancies. Mol Diagn Ther.17(2): 85–99.

(ENSANUT MC). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Medio Camino. 2016 Informe de Resultados.

Fan S, Meng Q, Gao B, Grossman J, Yadegari M, Goldberg ID, Rosen EM. 2000. Alcohol stimulates estrogen receptor signaling in human breast cancer cell lines. Cancer Res. 60:5635–5639.

Fiannac A, La Rosa M, La Paglia L, Rizzo R, Urso A. 2015. Analysis of miRNA expression profiles in breast cancer using biclustering. BioMed Central. 16(4).

Fiegl H , Millinger S, Goebel G, Müller-Holzner E , Marth C, Laird P y Widschwendter M. 2006. Breast Cancer DNA Methylation Profiles in Cancer Cells and Tumor Stroma: Asso.ciation with HER-2/neu Status in Primary Breast Cancer. Cancer Res 66: (1).

Gene Cards. 2018. Her2/neu. Recuperado 22/04/18 7:56pm http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERBB2

(GHR) Genetics Home Reference. 2018. Gen erbB2. Recuperado: 22/04/18 http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ERBB2.

(GPCA) Guía de práctica clínica. 2013. Diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama en segundo y tercer nivel de atención, México, Secretaria de salud.

Hailong Wu, Shoumin Zhu & Yin-Yuan Mo. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. Cell Research. 2009: (19)439–448.

(INRA). Instituto Nacional de Ciencias Agronomicas de Francia. 2015. Software Phenol Explorer 3.6. http://phenol-explorer.eu/

Imigo F , Mansilla E , Delama I , Poblete M, Fonfach C. 2011. Clasificación molecular del cáncer de mama. Cuad. Cir. 25: 67-74.

(IMSS) Instituto Mexicano del Seguro Social. 2015. Cáncer de mama: Desarrollo y factores de riesgo. Recuperado el 01/03/19 http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-mama.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). “Estadísticas a propósito del Día mundial de la lucha contra el cáncer de mama 19 de octubre”. 2017. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México.

Kurozumi S, Yamaguchi Y, Kurosumi M, Ohira M, Matsumoto H & Horiguchi J. 2017. Recent trends in microRNA research into breast cancer with particular focus on the associations between microRNAs and intrinsic subtypes. Journal of Human Genetics. 62:15–24.

Ke Z, Lin H, Fan Z, Cai TQ, Kaplan RA, Ma C, Bower KA, Shi X, Luo J. 2006. MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial cells over-expressing ErbB2. Int J Cancer. 119(1):8-16.

Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud. Artículo 17.

Liu W, Xu J, Liu Y, Yu X, Tang X, Wang Z, Li X. 2014. Anthocyanins potentiate the activity of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells in vitro and in vivo. Mol Med Rep. 2014 Oct;10(4):1921-6

Liu J, Mao Q, Liu Y, Hao X, Zhang S, Zhang J. 2013. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. Chin J Cancer Res. 25(1):46-54.

Lorio MV, Casalini P, Piovan C, Di Leva G, Merlo A, Triulzi T, Ménard S, Croce CM, Tagliabue E. 2009. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. Cancer Res. 69(6):2195-200.

López-Vázquez. 2017. Cuantificación de miRNAs en mujeres con cáncer de mama y su relación con características clínico-patológicas. [Tesis maestría ciencias de la salud]. Universidad de Sonora.

Luo D, Wilson JM, Harvel N, Liu J, Pei L, Huang S, Hawthorn L, Shi H. 2013. A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells. J Transl Med.11:57.

Luo J. 2006. Role of matrix metalloproteinase-2 in ethanol-induced invasion by breast cancer cells. Gastroenterology and hepatology. 21(3)S65-S68.

Ma C, Lin H, Leonard SS, Shi X, Ye J, Luo J. 2003. Overexpression of ErbB2 enhances ethanol-stimulated intracellular signaling and invasion of human mammary epithelial and breast cancer cells in vitro. Oncogene. 14;22(34):5281-90.

Maffuz-Aziz A, Labastida-Almendaro S, Sherwell-Cabello S, RuvalcabaLimón E, Domínguez-Reyes CA, Tenorio-Torres JA, Rodríguez-Cuevas S. Supervivencia de pacientes con cáncer de mama. Análisis por factores pronóstico, clínicos y patológicos. Ginecol Obstet Mex. 2016 ago;84(8):498-506.

Martínez & Castro . 2018. Inmunohistoquímica en el cáncer de mama. Herramienta necesaria en la actualidad. Medisur vol.16 no.1.

Mazzarella L, Disalvatore D, Bagnardi V, Rotmensz N, Galbiati D, Caputo S, Curigliano G, Pelicci PG. 2013. Obesity increases the incidence of distant metastases in estrogeno receptor-negative human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer patients. Eur J Cancer. 49(17):3588-97.

Mill C, Chester J, and Riese D. 2009. EGFR may couple moderate alcohol consumption to increased breast cancer risk. Breast Cancer (Dove Med Press). 1: 31–38.

Mujo K, Choi B, Huang Z, Zhang N, An Z. 2014. Regulation of ERBB3/HHER3 signaling in cáncer. Oncotarget. 5(21): 10222–10236.

Nattenmüller C, Kriegsmann M, Sookthai D, Turkanzi R, Steffen A, Walter B, Johnson T, Kneisel J, Katzke V, Bergmann M, Peter H, Schirmacher P, Herpel E, Boeing J

and Kühn T.2018.Obesity as risk factor for subtypes of breast cancer: results from a prospective cohort study BMC Cancer. 2018; 18: 616.

Navarro I, Periagoa M, García F, Alonsoa. 2017. Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. Rev Esp Nutr Hum Diet. 21(4).

NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.

NORMA Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012. Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.

(OMS)Organinzación mundial de la salud. 2019. Índice de masa corporal (IMC). Recuperado 19/09/18 http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight .

(OMS)Organización Mundial de la Salud. 2019. Cáncer de mama. http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/ Recuperado 10/03/19.

(OMS)Organización Mundial de la Salud. 2019. Fomento del consumo mundial de frutas y verduras. https://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/

(PAHO) Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud (2019). Cáncer de mama. Recuperado 14/03/2019 http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292%3Acancer-program&catid=1872%3Acancer&Itemid=3904&lang=es

Pasculli B, Barbano R, Parrella P. 2018. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. Seminars in Cancer Biology. (51) 22-35.

Perou C, Sørlie T, Eisen M, van de Rijn M, Jeffrey S, Rees C et al. 2000. Molecular portraits of human breast tumors. Nature. 406: 747-752.

Pérez-Gil R SE, Romero JG. 2010. Imagen corporal en mujeres de tres zonas rurales de México: percepción y deseo. Salud publica mex 2010; 52 (2)

Pérez-Solis M, Maya-Nuñez G, Casas-González P, Olivares A, and Aguilar-Rojas A. 2016. Effects of the lifestyle habits in breast cancer transcriptional regulation. Cancer Cell Int.6:7.

Quizán & Ortega. 2000. Diseño y validación de una herramienta para identificar riesgo dietario en mujeres adultas de bajo ingreso. Nutrición Clinica. 3(4):128-135.

Ray, A. 2017. Tumor-linked HER2 expression: association with obesity and lipid-related microenvironment. Horm Mol Biol Clin Investig. 32(3).

Sato M, Terai S, Tachikawa H, Maeda H, Yamamoto M, Tomioka N, Watanabe K, Takahashi M. 2018. Obesity is associated with poor prognosis of Japanese breast cancer, especially in ER positive/HER2 negative subtype, which tendency is prominent [abstract]. In: Proceedings of the 2017 San Antonio Breast Cancer Symposium; 2017 Dec 5-9; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res; 78(4 Suppl):Abstract nr P1-07-13.

Savad S, Mehdipour P, Miryounesi M, Shirkoohi R, Fereidooni F, Mansouri F, Modarressi MH. 2012. Expression analysis of MiR-21, MiR-205, and MiR-342 in breast cancer in Iran. Asian Pac J Cancer Prev.13:873–877.

Sempere LF, Christensen M, Silahtaroglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, Wells W, Kauppinen S, Cole CN. 2007. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. Cancer Res. 67:11612–11620.

(SINAIS) Sistema Nacional de Información de Salud. 2010, Estadísticas del cáncer de mama, SINAIS, México. [http://www.cnegsr.salud.gob.mx/contenidos/Programas_de_Accion/cancermama/estadisticas_CM.html

Shahi & Manga . 2006. La relevancia clínica de la sobreexpresión de HER-2 en el cáncer de mama. An. Med. Interna (Madrid) 23 no.3.

(ACS) Sociedad Americana de Cáncer. 2018. Estado del cáncer de mama HER2. Recuperado 22/04/2018 https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-her2-status.html

Soler & Acosta. 2018. Guía de inmunohistoquímica para técnicos. 1ª ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer, 2018.

Software Phenol Explorer 3.6. Database on polyphenol content in foods. Recuperado 29/03/19 21:00hrs http://phenol-explorer.eu/

Tan M and Yu D. 2000-2013. Molecular Mechanisms of ErbB2-Mediated Breast Cancer Chemoresistance. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience.

Vargas-Meza RD, Chávez-Tostado RD, Cortes-Flores MD, Urias-Valdez MD, Delgado -Gómez, Morgan-Villela, Zuloaga-Fernández Del Valle, Jiménez-Tornero, Zuloaga-Fernández Del Valle, Fuentes-Orozco MD, García-Rentería J, Rendón-Félix L. Cuesta-Márquez, González-Ojeda MD, PhD. Body weight changes after adjuvant chemotherapy of patients with breast cancer: results of a Mexican cohort study Eur J Cancer Care. 2017;26:e12550.

Vo A and . Millis R. 2012. Epigenetics and Breast Cancers. Obstetrics and Gynecology International. 10.

Vona-Davis L, Rose DP. 2007. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. Endocr Relat Cancer 14(2):189–206.

Wang Z, Liao H, Deng Z, Yang P, Du N, Zhanng Y, Ren H. 2013. miRNA-205 affects infiltration and metastasis of breast cancer. Biochem Biophys Res Commun. 441:139–143.

Wang S, Huang J, Lyu H, Lee C-K, Tan J, Wang J & Liu B. 2013. Functional cooperation of miR-125a, miR-125b, and miR-205 in entinostat-induced downregulation of erbB2/erbB3 and apoptosis in breast cancer cells. Cell Death & Disease. (4)e556.

Wong AW , Dunlap SM , Holcomb VB , Nunez NP . 2012. Alcohol promotes mammary tumor development via the estrogen pathway in estrogen receptor alpha-negative HER2/neu mice. Alcohol Clin Exp Res. 36(4):577-87.

Wu MH, Chou YC, Chou WY, Hsu GC, Chu CH, Yu CP, Yu JC, Sun CA. 2009. Circulating levels of leptin, adiposity and breast cancer risk. Br J Cancer. 100(4):578–582.

Xacur-García, Castillo-Quan J, Hernández-Escalante V, Laviada-Molina H. Genómica nutricional: una aproximación de la interacción genoma-ambiente. Nutritional genomics: an approach to the genome-environment interaction.

Xin Li, Yu xiu Xu, Yun Ding, Changfei Li, Hong Zhao, Jiandong Wang, and Songdong Meng. Posttranscriptional upregulation of HER3 by HER2 mRNA induces trastuzumab resistance in breast cancer. *Mol Cancer*. 2018; 17: 113.

Xu M, Bower K, Chen G, Shi X, Dong Z, Ke Z, Luo J. 2010. Ethanol Enhances the Interaction of Breast Cancer Cells Over-Expressing ErbB2 With Fibronectin ALCOHOLISM. (34):5 751-760.

Xu Mb, Ren Z, Wang X, Comer A, Frank J, Ke Z, Huang Y, Zhang Z, Shi X, Wang S and Luo J. 2016. ErbB2 and p38γ MAPK mediate alcohol-induced increase in breast cancer stem cells and etastasis. Molecular Cancer. 15:52.

Yue X, Lan F, Hu M, Pan Q, Wang Q, Wang J. 2016. Downregulation of serum microRNA-205 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma. J Neurosurg. 124(1):122-8.

Zamora-Ros R, Rabassa M, Cherubini A, Urpí-Sardà M, Bandinelli S, Ferrucci L, et al. 2013. High concentrations of a urinary biomarker of polyphenol intake are associated with decreased mortality in older adults. J Nutr. 143(9):1445-50.

Zhang H, Li B, Zhao H, and Chang J. 2015. The expression and clinical significance of serum miR-205 for breast cancer and its role in detection of human cancers. Int J Clin Exp Med. 8(2): 3034–3043.

10. ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA CASOS RETROSPECTIVOS

Regulación de la expresión de los genes *Her2, Her3* en cáncer de mama, mediado por la obesidad y el consumo de alcohol.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El presente documento está dirigido a mujeres con diagnóstico de cáncer de mama como invitación a participar en el proyecto de investigación titulado "Regulación de la expresión de los genes *Her2* y *Her3* en cáncer de mama, mediado por la obesidad y el consumo de alcohol", realizado por investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

Le pedimos tomarse su tiempo para leer cuidadosamente este documento, expresar cualquier duda que usted tenga, puede comentarlo con su médico, familiar o con quien se sienta más cómoda. Solamente deberá acceder a participar en este estudio cuando haya comprendido la información de manera que pueda tomar una decisión informada respecto a su participación.

¿Por qué y para qué se realiza este estudio?
El objetivo de este estudio es evaluar la asociación entre la obesidad y el consumo de alcohol en la expresión de los genes *Her2 y Her3* en tejido tumoral y sano adyacente, ya que la sobrexpresión de estos genes se ha relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad, porque la molécula que bloquea su expresión llamada miRNA-205 se encuentra disminuida y esto ocasiona un aumento de la división de las células cáncerigenas más rápido que otros tipos de cáncer de mama.

Es importante observar que este estudio no implica el uso de medicamentos en fase de investigación. El tratamiento que recomiende su médico para usted no estará basado en nuestra investigación, usted recibirá el tratamiento estándar para cáncer de mama indicado por su institución de salud.

¿Quiénes pueden participar en el estudio?
Mujeres con diagnóstico de cáncer de mama que tenga disponible tejido tumoral y sano adyacente embebido en parafina y no haya estado en tratamiento previo a la remoción del tumor.

¿Qué pasará si participo en este estudio de investigación?
En caso de que usted decida participar, se le solicitarán las siguientes muestras:

- Del tejido obtenido en su cirugía, se solicitará muestra de su tumor y tejido normal adyacente en bloque de parafina (alrededor de 500 a 1000 mg), dentro del laboratorio de patología del hospital en el cual se atiende, dicha muestra no afectará el diagnóstico de su cáncer.

Se le solicitará responder a un cuestionario de factores de riesgo de cáncer de mama que incluye preguntas acerca de su historial reproductivo, antecedentes de cáncer en su familia y factores de riesgo relacionados a padecer cáncer de mama. De igual manera se le solicitará que recuerde sus hábitos alimenticios al momento del diágnostico para conocer patrones de alimentación que nos ayuden a comprender la alimentación de las mujeres con cáncer de mama y se le tomará peso y talla actual. Adicionalmente, se obtendrá información de su expediente clínico dentro de su Hospital para conocer más acerca de las características de su enfermedad. Esta información mejorará nuestra comprensión de las características clínicas y epidemiológicas del cáncer de mama en las mujeres mexicanas.

¿Cuál será el uso de mis muestras para investigación?
El material genético obtenido de sus muestras, será codificado, almacenado y estudiado en el Laboratorio de Patología Experimental del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC. Como parte del proyecto, una cantidad específica del material genético serán utilizadas para realizar la investigación. Si usted está de acuerdo, las muestras sobrantes de tejido y material genético podrían ser almacenadas y utilizadas en futuras investigaciones relacionadas con cáncer de mama. Ninguna persona ajena al proyecto recibirá información relacionada con usted ni con sus muestras. Si es su deseo, usted podrá retirar sus muestras en cualquier momento del estudio, haciendo la solicitud por escrito a los investigadores responsables.

¿Puedo dejar de participar en el estudio?
Sí. Usted puede decidir retirar su consentimiento en cualquier momento. Su participación en este estudio es completamente voluntaria, lo que usted decida no afectará de manera alguna la atención médica que usted recibe en su institución de salud.

¿Cuáles son los efectos secundarios o riesgos que puedo esperar de participar en el estudio?
En este estudio no se esperan efectos secundarios o riesgos para usted debido a que solamente le solicitaremos su aprobación para el manejo de la muestra quirurgica de tejido tumoral y sano adyacente que previamente ya se realizó en su hospital. Así como la información de su padecimiento previamente explicada en este documento.

¿Existen beneficios por participar en el estudio?
La investigación que se llevará a cabo con sus muestras no ofrece beneficios inmediatos para usted. Sin embargo, al conocer el comportamiento de la expresión de estos genes podría ayudar a personas que padezcan de cáncer y otras enfermedades en el futuro. Los beneficios de la investigación que emplea tejido, incluyen aprender más acerca del cáncer, cómo diagnosticarlo y cómo tratarlo. Los informes acerca de la investigación llevada a cabo con sus muestras no se agregarán a su historial médico, no se entregarán a usted o a su médico. Usted puede tener acceso a los resultados si lo solicita a los investigadores del estudio, sin embargo, la información obtenida no tendrá efecto alguno en los cuidados y atención que usted reciba. Es muy importante mencionar que los resultados obtenidos serán publicados en revistas científicas.

¿Se mantendrá la privacidad de mi información médica?
Nos aseguraremos que su información personal se mantenga confidencial. En este estudio, la información obtenida de sus muestras, cuestionario y expediente clínico será registrada en una base de datos electrónica donde se eliminará su información personal y sólo se le identificará mediante un número de estudio. Solo los investigadores responsables del estudio podrán tener acceso a la información obtenida. Si la información de este estudio se publica o se presenta en una reunión científica, congreso o publicación, no se utilizará su nombre u otros datos personales que permitan conocer su identidad. La información genética que obtengamos de su participación en este estudio, no se compartirá con compañías de seguros médicos, ni empleadores, en conformidad con el artículo 16 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

¿Cuáles son los costos de participar en el estudio?
No habrá cargo alguno para usted o su institución de salud por los estudios de investigación que se realizarán con sus muestras.

¿Me pagarán por participar en este estudio?
Usted no recibirá pago alguno por participar en el estudio. Sus muestras se utilizarán sólo para fines de investigación y no se venderán.

¿Quién puede responder mis preguntas respecto al estudio?
Si usted tiene alguna otra pregunta acerca del estudio, puede llamar a la Mtra. Alejandra López Vázquez al cel. 044-66-21-95-37-60 (Universidad de Sonora). En otro caso, puede llamar al investigador responsables del estudio, Dr. Iván Anduro Corona, al 044-66-21-94-44-82 de lunes a viernes en horario de 9:00 am a 5:00 pm (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., CIAD A.C.). Si desea hacer preguntas acerca del estudio o sus derechos como participante en una investigación a alguien que no sea el médico o el coordinador del estudio, o si desea expresar cualquier problema o inquietud que pudiera tener acerca del estudio, le pedimos que llame al Dr. Luis Quihui Cota al teléfono 2-89-24-00, ext. 301 (presidente de la Comité de Ética e Investigación del CIAD A.C.), en horario de 8:00 am a 3:00 pm, de lunes a viernes.

Al firmar el siguiente formato de consentimiento, usted está de acuerdo en que sus muestras de tejido obtenidas en este estudio serán utilizadas para fines de investigación y está de acuerdo en contestar el cuestionario de factores de riesgo de cáncer de mama, frecuencia de alimentos y tomar las medidas antropométricas correspondientes.

Consentimiento
Además, se le pedirá que firme el siguiente formato para autorizar el acceso a su información de salud. Usted recibirá copias de este formato de consentimiento.

LA PARTICIPACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN ES VOLUNTARIA. Usted tiene derecho a negarse a participar o a retirarse en cualquier momento en este estudio sin poner en peligro su atención y cuidados médicos. Su médico puede decidir retirarla de este estudio con o sin su consentimiento si es lo más conveniente para usted en términos médicos.

Firma
He leído todo lo anterior, he hecho preguntas y recibido respuestas sobre lo que no comprendía. Tuve la oportunidad de llevarme este formato a casa para su revisión o comentarios. Si usted desea participar en este estudio, sírvase firmar al calce.

Nombre de la participante: _____
Firma de la participante: _____ Fecha: _____
Nombre del testigo _____
Firma del testigo: _____ Fecha: _____
Relación con la participante: _____
Dirección: _____
Nombre del testigo _____
Firma del testigo: _____ Fecha: _____
Relación con la participante: _____
Dirección: _____
Nombre de la persona que obtiene el consentimiento:
_____
Firma de la persona que obtiene el consentimiento:
_____ Fecha: _____

ANEXO 2.CUESTIONARIO DE FACTORES DE RIESGO

ID: |___|___|___|___| **Fecha:** |___|___| / |___|___| / |___|___|___|___|
Día Mes Año

Hospital: _____

Fecha de diagnóstico de cáncer de mama: |___|___| / |___|___| / |___|___|___|___|
Día Mes Año

SECCIÓN A. INFORMACIÓN GENERAL

1. ¿Cuál es su fecha de nacimiento? |___|___| / |___|___| / |___|___|___|___|
Día Mes Año
2. ¿Cuál es su edad actual? |___|___|___| edad

3. ¿En dónde nació? _____
Ciudad Estado País

4. ¿Cuál es su origen nacional o ascendencia? _____
Ciudad Estado País

SECCIÓN B. ESTATUS SOCIOECONÓMICO

1. ¿Cuál es el grado más alto (o año) de la escuela que ha completado? (marque uno)
Primaria: ☐01 ☐02 ☐03 ☐04 ☐05 ☐06
Secundaria: ☐07 ☐08 ☐09
Preparatoria: ☐10 ☐11 ☐12
Universidad: ☐13 ☐14 ☐15 ☐16 ☐17+

2. ¿Cuál ha sido la ocupación que ha realizado (o realiza) por más tiempo? ¿Por cuantos años?
Ocupación:_____ |__|__| años de ocupación

3. ¿Cuantas personas viven en su casa, incluida usted? |__|__|
a) De estas personas, ¿Cuantos son niños de ≤18 años de edad? |__|__|

4. ¿Cuál de las siguientes categorías describe mejor su ingreso familiar total de su hogar durante los últimos 12 meses? esto debe incluir los ingresos de todas las fuentes, salarios, rentas, seguridad social, pensiones, ayuda de familiares (incluyendo pagos de pensión alimenticia).
☐ < $2000
☐ $2000 - < $4000
☐ $4000 - < $6000
☐ $6000 - < $8000
☐ $10,000 - < $12,000
☐ ≥ $12,000
☐ No sabe/No está segura
☐ Rechazo responder

5. ¿Cuántas personas en su casa dependen de dicho ingreso total?
|__|__| Número de personas

SECCION C. HISTORIAL PERSONAL Y FAMILIAR DE CÁNCER

a) Historial personal de cáncer

1. Hasta hace un año antes de su diagnóstico ¿Alguna vez le han realizado una cirugía de mama, biopsia por aspiración o con aguja, remoción de un bulto, alargamiento o reducción mamaria?
   ☐ Si ☐ No (Pase a la siguiente sección)

2. Antes de su diagnóstico de cáncer, ¿Alguna vez un médico le diagnosticó cáncer?
   ☐ Si ☐ No (Pase a la pregunta 5)

3. ¿Qué tipo de cáncer diagnosticó su médico? ¿En qué parte de su cuerpo inició?
   _____
   Tipo Lugar donde inició

4. ¿En qué año le fue diagnosticado?
   |__|__|__|__| Año

5. ¿Ha recibido alguna vez quimioterapia, radioterapia u otro tipo de terapia para cáncer de mama?
   ☐ Si ☐ No

6. ¿Cuál?
   ☐ Quimioterapia
   ☐ Radioterapia
   ☐ Otro, indique cuál _____

b) Historial familiar de cáncer

Las siguientes preguntas son acerca de su historial familiar de cáncer, le pedimos que por favor realice un esfuerzo en recordar si alguno de sus familiares presentó cualquier tipo de cáncer o tumor, respondiendo a las siguientes preguntas.

1. ¿Algún familiar ha sido diagnosticado con cáncer o tumor?
   ☐ Si ☐ No ☐ No sabe

2. ¿Qué familiar? ¿Qué tipo de cáncer?
   _____ _____

3. ¿Cuántos hermanos tiene/tuvo? De sus hermanos ¿Qué posición ocupa usted?
   |__|__| número de hermanos _____

SECCIÓN D. FACTORES HORMONALES Y REPRODUCTIVOS

a) Menstruación

1. ¿A qué edad inició su menstruación?
   |__|__| Edad ☐No sabe

2. ¿Cuándo fue su última menstruación?
   |__|__|/|__|__||__|__| o |__|__|
   Mes Año edad ☐No sabe

3. ¿Cuál de los siguientes describe mejor porque su ciclo menstrual se detuvo?

☐Embarazo reciente
☐Lactancia materna
☐Anticonceptivos o medicamentos
☐La menopausia natural
☐Cirugía para extirpar el útero o los ovarios
☐Otra (especificar) _____
☐No sabe

---

b) Embarazos y lactancia

4. ¿Alguna vez ha estado embarazada?
☐ Si ☐No (Pase a la pregunta 15)

5. ¿Qué edad tenía la primera vez que quedó embarazada?
|__|__| Años ☐No sabe

6. ¿Cuántas veces ha estado embarazada? Por favor incluya mortinatos, abortos involuntarios, abortos, embarazos ectópicos y nacidos vivos.
|__|__|Número de embarazos en total

7. ¿Cuantos de sus embarazos resultaron en nacidos vivos?
|__|__|Número de embarazos nacidos vivos

8. ¿Cuál era su edad en el nacimiento de su primer hijo nacido vivo?
|__|__| Edad ☐ No sabe

9. ¿Cuál era su edad en el nacimiento de su último hijo nacido vivo?
|__|__| Edad ☐ No sabe

10. ¿Alguna vez tomo medicamento u hormona como ayuda para quedar embarazada o mantener un embarazo?
☐ Si ☐ No (Pase a la pregunta 12)

11. ¿Recuerda el nombre del medicamento que tomó, o si este estaba compuesto de hormonas?
Especificar:_____

12. ¿Amamantó a alguno de sus hijos?
☐ Si
☐ No (Pase a la pregunta 15)

13. ¿Cuál era su edad cuando amamanto por primera vez?
|__|__| Edad

14. Pensando en todos sus hijos(as) ¿Por cuánto tiempo, semanas o meses, en total los amamanto?
|__|__| Semanas O |__|__| Meses

---

c) Historial de cirugía ginecológica

15. ¿Alguna vez ha tenido histerectomía, es decir, han sido removidos su útero o matriz?
☐Si

☐No (Pase a la pregunta 16)
☐No sabe (Pase a la pregunta 16)

16. ¿Cuál era su edad cuando le removieron su útero o matriz?
|__|__| Edad

17. ¿Cuantos de sus ovarios han sido removidos?
☐ Ninguno (Pase a la pregunta 15)
☐ Eliminación parcial de uno o ambos ovarios
☐ Un ovario
☐ Ambos ovarios
☐ Otro (Por favor especifique _____)
☐ No sabe

18. ¿A qué edad fue su más reciente remoción de uno o ambos ovarios?
|__|__| Edad

19. ¿Ha tenido ligadura de trompas, es decir, han atado sus trompas de Falopio?
☐ Si ☐ No ☐ No sabe

---

d) Uso de anticonceptivos
e)

20. ¿Alguna vez ha tomado pastillas anticonceptivas por cualquier motivo (método anticonceptivo, regular los periodos menstruales, acné, etc.)?
☐ Si
☐ No (Pase a la pregunta 26)
☐ No sabe (Pase a la pregunta 26)

21. ¿Qué edad tenía cuando empezó a tomar pastillas anticonceptivas?
|__|__| Edad

22. ¿Por cuantos meses o años en total ha usado pastillas anticonceptivos?
|__|__| Meses O |__|__| Años

23. ¿Qué edad tenía cuando dejo de usar pastillas anticonceptivas?
|__|__| Edad O ☐ Todavía tomo pastillas anticonceptivas

24. ¿Usa o usó alguno de los siguientes anticonceptivos?

Tipo de anticonceptivo	Si	No	No sabe	Edad en la que inicio su uso	Edad en la que dejo de usarlo	¿Por cuantos años?	
Inyecciones	[ ]	[ ]	[ ]	|__|__|	|__|__|	|__|__|	No sabe
Parche hormonal	[ ]	[ ]	[ ]	|__|__|	|__|__|	|__|__|	No sabe
Anillo vaginal	[ ]	[ ]	[ ]	|__|__|	|__|__|	|__|__|	No sabe
Dispositivo intrauterino (DIU)	[ ]	[ ]	[ ]	|__|__|	|__|__|	|__|__|	No sabe
Otro (especifique)_____	[ ]	[ ]	[ ]	|__|__|	|__|__|	|__|__|	No sabe

f) Hormonas post-menopausia

A veces las mujeres toman hormonas femeninas, como el estrógeno o progesterona durante o después de la menopausia para controlar sus síntomas como los bochornos. Las siguientes preguntas son acerca del uso de dichas hormonas, a menudo llamadas terapia de remplazo hormonal o terapia hormonal para la menopausia.

25. ¿Alguna vez ha usado terapia de reemplazo hormonal?
☐ Si
☐ No (Fin de preguntas hormonales)
☐ No sabe (Fin de preguntas hormonales)

26. ¿Aproximadamente a qué edad comenzó a tomar la terapia de reemplazo hormonal?
|__|__| Edad

27. ¿Aproximadamente a qué edad dejó de tomar la terapia de reemplazo hormonal?
|__|__| Edad ☐ Aun tomo terapia de reemplazo hormonal

28. ¿Por cuantos meses o años en total ha usado la terapia de reemplazo hormonal?
|__|__| Meses O |__|__| Años

29. ¿Qué tipo de terapia de reemplazo hormonal ha tomado durante el mayor período de tiempo?
☐ Pastillas de estrógeno
☐ Pastillas de progesterona/ progestina
☐ Pastillas de estrógeno y progesterona/progestina en la misma píldora o en diferentes píldoras
☐ Cremas de estrógeno, inyecciones o parches
☐ Cremas de progesterona/progestina, inyecciones o parches
☐ Cremas de estrógeno y progesterona/progestina, inyecciones o parches
☐ No sabe

SECCIÓN E. CONSUMO DE ALCOHOL

Para responder a las preguntas de esta sección, una bebida alcohólica es igual a lo siguiente:
Cerveza = una botella de 355 ml o lata
Vino = un vaso de 118 ml
Licores = 30 ml (1 shot) o bebida preparada con 30 ml de licor
Si usted bebe más de un tipo de bebida alcohólica, añadir el número de bebidas para cada tipo para obtener el número total de bebidas

1. En toda su vida, ¿ha bebido al menos 1 bebida de cualquier tipo de alcohol, sin contar los pequeños sorbos?
   Si ..... ☐1
   No ..... ☐2 (Pase a la siguiente sección)
   No sabe/Rechazo responder ..... ☐99 (Pase a la siguiente sección)

2. ¿Cuantos años tenías cuando empezaste a beber, sin contar los pequeños sorbos?
   |__|__| Edad
   No sabe/Rechazo responder ..... ☐99

a) Evaluación de la exposición reciente

3. En los últimos 12 meses, ¿con qué frecuencia usted bebió por lo menos una bebida alcohólica?
   Nunca ..... ☐1 (PASE A LA PREGUNTA 5)
   < 4 veces en un mes..... ☐2

Una vez a la semana ..... ☐3
2-3 veces por semana ..... ☐4
4-7 veces por semana ..... ☐5

4. En los últimos 12 meses, en los días que bebió alcohol, ¿cuántas bebidas por día bebió en promedio?

|__|__| Número
No recuerda..... ☐9

b) Evaluación de la exposición de por vida acumulada

5. ¿Ha consumido alguna vez bebidas alcohólicas, como cerveza, vino o licor al menos una vez a la semana durante 6 meses o más?
Si ..... ☐1
No ..... ☐2 (Pase a la siguiente sección)
No sabe/Rechazo responder ..... ☐99 (Pase a la siguiente sección)

6. ¿A qué edad empezó a consumir bebidas alcohólicas, como cerveza, vino o licor al menos una vez a la semana durante 6 meses o más?

Cuando tenía:	**En promedio, ¿Con que frecuencia bebía por lo menos una bebida alcohólica?**					**En los días que bebió alcohol a esa edad, ¿cuántas bebidas en promedio bebió?**	
	Nunca	<4 veces al mes	Una vez por semana	2-3 días por semana	4-7 días por semana		
7a. menor de 20 años de edad	☐1	☐2	☐3	☐4	☐5	|___|___| 7b. Número	No sabe/Rechazo responder ☐99
8a. 20-29 años de edad	☐1	☐2	☐3	☐4	☐5	|___|___| 8b. Número	No sabe/Rechazo responder ☐99
9a. 30-39 años de edad	☐1	☐2	☐3	☐4	☐5	|___|___| 9b. Número	No sabe/Rechazo responder ☐99
10a. 40-49 años de edad	☐1	☐2	☐3	☐4	☐5	|___|___| 10b. Número	No sabe/Rechazo responder ☐99
11a. 50-59 años de edad	☐1	☐2	☐3	☐4	☐5	|___|___| 11b. Número	No sabe/Rechazo responder ☐99
12a. 60 años de edad	☐1	☐2	☐3	☐4	☐5	|___|___| 12b. Número	No sabe/Rechazo responder ☐99

7. Al momento del diagnóstico de cáncer de mama, ¿con qué frecuencia usted bebió por lo menos una bebida alcohólica?

Nunca..... ☐1 (PASE A LA SIGUIENTE SECCION)

< 4 veces en un mes ..... ☐2
Una vez a la semana..... ☐3
2-3 veces por semana..... ☐4
4-7 veces por semana

¿Alguna vez un médico le indico que tuvo o tiene la siguiente condición?	Marque la respuesta	¿Qué edad tenía?	¿Qué tipo de tratamiento se le indico?
Presión alta, no durante el embarazo	☐ Si ☐ No	|__|__|__| Edad ☐ No sabe	☐ Hospitalización ☐ Cirugía ☐ Medicamento ☐ Ninguno de los anteriores
Colesterol alto	☐ Si ☐ No	|__|__|__| Edad ☐ No sabe	☐ Hospitalización ☐ Cirugía ☐ Medicamento ☐ Ninguno de los anteriores
Enfermedad de tiroides	☐ Si, especificar tipo:_____ ☐ No	|__|__|__| Edad ☐ No sabe	☐ Hospitalización ☐ Cirugía ☐ Medicamento ☐ Ninguno de los anteriores
Diabetes, no durante el embarazo	☐ Si ☐ No	|__|__|__| Edad ☐ No sabe	☐ Hospitalización ☐ Cirugía ☐ Medicamento ☐ Ninguno de los anteriores
Pólipos en el colon o recto	☐ Si ☐ No	|__|__|__| Edad ☐ No sabe	☐ Hospitalización ☐ Cirugía ☐ Medicamento ☐ Ninguno de los anteriores
Cálculos en la vesícula	☐ Si ☐ No ☐ No sabe	|__|__|__| Edad ☐ No sabe	☐ Hospitalización ☐ Cirugía ☐ Medicamento ☐ Ninguno de los anteriores

SECCIÓN F. OTRAS CONDICIONES DE SALUD

Ahora le haré preguntas sobre algunas condiciones de salud (enfermedades).

SECCIÓN G. ANTROPOMETRÍA Y ACTIVIDAD FÍSICA

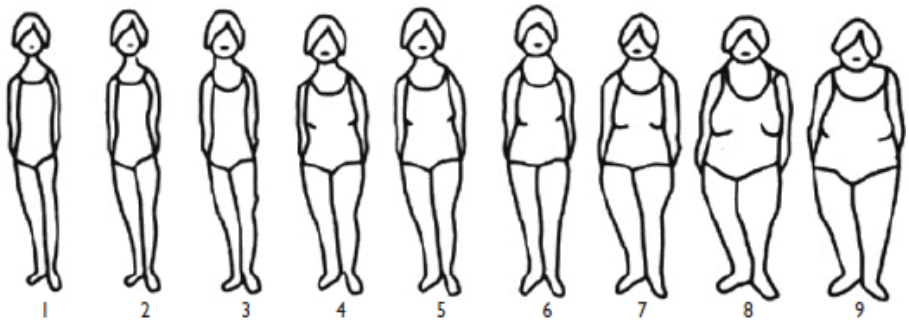
1. Peso actual

|__|__|__|.|__|__| kg

2. Talla actual

|__|__|__| cm

3. De acuerdo a las imágenes de siluetas, con ¿Cuál se identifica?



Los modelos se clasificaron de acuerdo con los criterios de IMC, categorizándolos de la siguiente manera:

Modelo 1: desnutrición 3
Modelo 2: desnutrición 2
Modelo 3: desnutrición 1
Modelo 4: normal
Modelo 5: sobrepeso
Modelo 6: obesidad 1
Modelo 7: obesidad 2
Modelo 8 y 9: obesidad 3

Tomado de Pérez-Gil (2010)

4. ¿Cuál ha sido el peso máximo que ha llegado a tener y qué edad tenía? (excluya el peso de embarazos)

|__|__|__|.|__|__| kg |__|__|__| Edad

Ahora le haré unas preguntas sobre su actividad física.

Actividades que realizaba cuando tenía	5. ¿Qué tan seguido participaba en actividades físicas vigorosas tales como nadar en piscina olímpica, bailar, correr, gimnasia, baloncesto, montar en bicicleta rápido, aerobics?	6. ¿Qué tan seguido participó en actividades físicas moderadas tales como caminar a paso ligero, voleibol, tenis recreativo, softbol, ciclismo pausado?
Alrededor de su diagnóstico	☐ Diariamente ☐ 4-6 veces por semana ☐ 2-3 veces por semana ☐ 1 vez por semana ☐ 1-3 veces por mes ☐ Menos de una vez al mes o nunca	☐ Diariamente ☐ 4-6 veces por semana ☐ 2-3 veces por semana ☐ 1 vez por semana ☐ 1-3 veces por mes ☐ Menos de una vez al mes o nunca

ANOTACIONES DEL ENTREVISTADOR

1. La cooperación del entrevistado fue:

MUY BUENA.....1
BUENA……..2
JUSTA…….....3
POBRE….....4

2. La calidad de la entrevista fue (complete para cada sección)

	No satisfactoria	Cuestionable	Generalmente confiable	De alta calidad
Sección A. Información general				
Sección B. Estatus socioeconómico				
Sección C. Historial familiar de cáncer				
Sección D. Factores hormonales y reproductivos				
Sección E. Consumo de alcohol				
Sección F. Otras condiciones de salud				
Sección G. Antropometría y actividad física				

3. La calidad global de la entrevista fue:

No satisfactoria..... 1
Cuestionable..... 2
Generalmente confiable ..... 3 (Comentarios)
De alta calidad..... 4 (Comentarios)

4. La(s) razón(es) por la cual la información fue no satisfactoria o la calidad de la información cuestionable fue debido a que el entrevistado: (encierre en un círculo las opciones que aplican)

No sabía información suficiente acerca del tema.....1
No quiso ser más específica.....2
Estaba aburrida o desinteresada.....3
Estaba molesta, deprimida o enojada.....4
Tenía problemas para hablar o escuchar.....5
Estaba confundida o distraída por interrupciones frecuentes.....6
Era inhibida por otros a su alrededor.....7
Estaba avergonzada por el tema abordado.....8
Estaba emocionalmente inestable.....9
Estaba físicamente débil/enferma..... 10
Otro
(Especificar)_____
_____

Comentarios:_____
_____
_____

ANEXO 3

FRECUENCIA DE CONSUMO DE POLIFENOLES EN ALIMENTOS

Fecha:_____ Folio:_____ No. Expediente:_____ Fecha de diagnóstico cáncer de mama:_____ No. Inmunohistoquimica:_____

Nombre:_____

Trate de recordar la fecha de su diagnóstico de cáncer de mama o un acontecimiento importante a ese momento, ahora ¿Con qué frecuencia consumía los siguientes alimentos?

Alimentos	**Porción Promedio**	**Tamaño**			**Frecuencia de consumo**					**Gramos**	**Clave**
		CH	M	G	D	S	M	A	R		
Frutas y jugos											
1- Arándano	1/2 taza										
2- Jugo de naranja	1 vaso mediano										
3- Ciruela	1 mediana										
4- Frambuesa	1 taza										
5- Manzana	1 mediana										
6- Granada	1 pieza mediana										
7- Naranja	1 mediana										
8- Mora	3/4 taza										
9- Fresa	9 piezas medianas										
10- Cereza en almibar	1/4 taza										
11- Cereza fresca	20 piezas										
12-Durazno almibar	1/2 taza										
13- Durazno	2 piezas medianas										
14- Nectarina	1 pieza mediana										
15- Uvas	1 racimo mediano (20 pz)										
Vegetales		CH	M	G	D	S	M	A	R		
16- Lechuga	2 hojas										
17- Tomate (crudo, cocido)	1 chico										
18- Zanahoria (cocida, guisada)	1/2 zanahoria mediana										
19- Zanahorias crudas	1 mediana										
20- Cilantro	1 taza										
Platillos Preparados		CH	M	G	D	S	M	A	R		
21- Frijoles enteros	2 cdas de cocinar										
22 - Frijoles guisados (secos, aguados)	1 cda de cocinar										

Salsas, aderezos y sazonadores		CH	M	G	D	S	M	A	R		
23- Salsa/tomate/picada/enlatada	3 cucharaditas										
24- Salsa/tomate/hecha en casa	3 cucharaditas										
25- Salsa de tomate picante enlatada	3 cucharadas soperas										
Tortillas, panes y botanas		CH	M	G	D	S	M	A	R		
26- Pan integral	2 rebanadas										
27- Pan integral tostado	2 rebanadas										
Aceites		CH	M	G	D	S	M	A	R		
28- Aceituna verde con hueso	6 piezas										
29- Pistacho	18 piezas										
30- Nuez	3 pzas										
Azúcares											
31- Mermelada (fresa, zarzamora, mora, durazno)	1 cucharada										
Bebidas		CH	M	G	D	S	M	A	R		
32- Vino tinto	2 copas										
33- Cerveza	1 lata (355ml)										
34- Coñac	1 caballito (60mL)										
35- Café	1 taza										
36- Ron	1 caballito (60mL)										
37- Whisky	1 caballito (60 mL)										