

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE PEDIATRIA  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

**BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL EXON 11 DEL GEN BRCA1 EN  
MUJERES MEXICANAS CON ANTECEDENTE DE CANCER DE MAMA  
HEREDITARIO.**

**TESIS**

Como uno de los requisitos para obtener el grado de  
Especialista en Genética Médica

PRESENTA

\*Dr. Saúl Neri Gámez

Tutores de la tesis:

\*Dr. Diego Julio Arenas Aranda

\*Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez

Colaboradores:

\*\*Dr. Sinuhé Barroso Bravo

M. C. Elizabeth Ruiz Sánchez

Asesor:

\*Dra. Eunice López Muñoz

Dirección del tesista: Laboratorio de Genética Molecular, UIM Genética Humana,  
CMN SXXI, IMSS. Teléfono 56 27 69 41, 56 27 69 00. Ext. 22409.

Correo electrónico: [neriga13@yahoo.com.mx](mailto:neriga13@yahoo.com.mx)

\*Laboratorio de Genética Molecular, UIMGH, Hospital de Pediatría.

\*\*Hospital de Oncología CMN SXXI IMSS.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## **DEDICATORIA:**

A mis padres María Lina y José Pablo por todo su apoyo, por su entrega y dedicación hacia mí, por ser un estímulo cada día de mi vida, por ser parte de cada una de mis aspiraciones y de mis logros.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Dios por darme la oportunidad de vivir.

A mis hermanas Paola y Maricela por brindarme su cariño y apoyo en todo momento.

Al Dr. Fabio Salamanca Gómez por darme sus consejos y por compartir su experiencia.

Al Dr. Diego Arenas Aranda por su amistad, dirección y consejos en este proyecto.

Al Dr. Sinuhé Barroso Bravo por su valiosa colaboración.

Al Dr. Ramón Coral por todas las recomendaciones en este proyecto.

A la M. en C. Elizabeth Ruiz por todo el apoyo brindado a este trabajo.

A mis compañeras y amigas Carmen y Eunice, por escucharme, por su paciencia, por todos sus consejos y por compartir sus experiencias y emociones.

A todos los pacientes, médicos y compañeros investigadores que han colaborado en mi formación como profesional.

A Patty por ser parte importante de este proyecto.

A mi sobrino Éver por contagiarme de su risa.

**Lugar de realización del proyecto:**

Laboratorio de Genética molecular, unidad de investigación Médica en Genética humana,  
Hospital de Pediatría, CMN-SXXI, IMSS.

**El presente trabajo fue apoyado por:**

CONACYT a través del proyecto titulado “Estudio de genes, regiones cromosómicas y análisis de variación de proteínas en Cáncer de mama de mujeres mexicanas” con la tutoría del Dr. Diego Julio Arenas Aranda. Con clave del proyecto número 01-74 del fondo sectorial de salud CONACYT- IMSS.

<b>INDICE:</b>	<b>Página.</b>
Resumen	8
Marco Teórico	11
Epidemiología	11
Factores predisponentes	12
Cuadro clínico	13
Clasificación del cáncer de mama	13
Detección del cáncer de mama	13
Genética de BRCA1 y 2	16
Manejo del cáncer de mama familiar	19
Mastectomía profiláctica	19
Oforectomía	19
Tamoxifeno	19
Antecedentes	21
Experiencia del grupo de investigación	21
Planteamiento del problema	22
Preguntas de investigación	22
Justificación del proyecto	22
Objetivo	23
Hipótesis	23
Material y métodos	23
Aspectos éticos	24
Definición de variables	25
Análisis de datos	27
Financiamiento y factibilidad	27
Recursos humanos	27
Metodología	27
Origen de la muestra	27
Extracción de DNA total	28
Cuantificación de DNA	28
Diseño de iniciadores	29
PCR	32
Purificación del DNA	33
Secuenciación del DNA	33
Resultados	34
Discusión	48
Conclusiones	49
 Anexos:	
Anexo 1: Carta de consentimiento informado	50
Anexo 2. Manejo de las pacientes que resulten con alguna mutación	53
Anexo 3: Clasificación TNM del cáncer de mama	55
Anexo 4: Métodos de laboratorio	58
 Bibliografía	 60

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS:

	Página
Figura 1	26
Figura 2	31
Figura 3	35
Figura 4	36
Figura 5	37
Figura 6	38
Figura 7	39
Figura 8	39
Figura 9	40
Figura 10	41
Figura 11	41
Figura 12	41
Figura 13	42
Figura 14	42
Figura 15	43
Figura 15.1	44
Figura 16	44
Figura 16.1	45
Figura 17	46
Figura 18	47
Tabla 1	29
Tabla 2	34
Tabla 3	40
Tabla 4	43



## **RESUMEN**

**Título: BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL EXON 11 DEL GEN BRCA1 EN MUJERES MEXICANAS CON ANTECEDENTE DE CANCER DE MAMA HEREDITARIO.**

### **Antecedentes:**

El cáncer de mama en los últimos años ha tenido una tendencia hacia el aumento en la mortalidad, en nuestro país ocupa el segundo lugar con un 16.4% como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años de edad. Aún no se conocen todos los factores de riesgo asociados al cáncer de mama, y de todos ellos el más importante es el antecedente familiar de esta entidad.

Existen dos genes que al mutar confieren susceptibilidad para cáncer de mama hereditario BRCA1 y BRCA2, en 30% de las pacientes con cáncer de mama hereditario se encuentra algún tipo de alteración en el gen BRCA1 y alrededor de 20% para el gen BRCA2. Los productos proteicos de BRCA1 y 2 desempeñan múltiples funciones en la respuesta celular de daño al DNA, en el punto de revisión del ciclo celular, en el control de la recombinación homóloga y en la reparación por ruptura de doble cadena. Las células que pierden dichas funciones acumulan anomalías cromosómicas que incluyen rupturas cromosómicas, aneuploidias, formación de estructuras tri o tetrarradiadas, amplificación del centrosoma, lo cual forma parte de la patogénesis del cáncer de mama. El mecanismo que lleva a presentar cáncer de mama familiar es la pérdida de heterocigosidad en una persona que es portadora de una mutación germinal en alguno de los genes BRCA1 ó 2, fenómeno que se explica por la hipótesis de Knudson.

El exón analizado en este estudio es el numero 11 del gen BRCA1, del cual se origina la secuencia de aminoácidos que corresponde a parte del dominio de unión a DNA y al dominio de interacción con las proteínas ATM, CHK2 Y CDK2, las cuales son indispensables para una adecuada función de reparación. Por tamaño corresponde al 60% de la secuencia codificante del gen, aproximadamente un

50% de las mutaciones reportadas para el gen *BRCA1*, se han reportado en este exón, el otro 50% se distribuyen a lo largo del gen.

### **Pregunta de investigación, objetivo e hipótesis.**

¿Hay mutaciones en el exón 11 del gen *BRCA1* en las mujeres mexicanas estudiadas con cáncer de mama hereditario, y cuáles son?

Objetivo:

Identificar mutaciones en el exón 11 del gen *BRCA1*, en las mujeres mexicanas con antecedente de cáncer de mama hereditario.

Hipótesis:

Si están presentes las mutaciones en el exón 11 del gen *BRCA1*.

### **Material y métodos:**

Se trató de un estudio observacional, transversal que incluyó 4 mujeres mexicanas con historia de cáncer de mama hereditario, que cumplían los criterios de inclusión, en quienes se realizó búsqueda de mutaciones en el exón 11 del gen *BRCA1* en leucocitos de sangre periférica.

Se aisló DNA por el método de extracción con sales a partir de 5 mililitros de sangre periférica, se verificó la integridad de DNA, posteriormente se amplificaron 15 segmentos de la secuencia del exón 11 del gen *BRCA1* mediante reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Se purificaron los productos de PCR correspondientes a cada una de las participantes y sometieron a secuenciación por el método de Sanger.

### **Experiencia en México sobre los genes *BRCA1* Y 2:**

En un estudio realizado en 22 mujeres con diagnóstico de cáncer de mama de presentación temprana y sin antecedente de cáncer de mama hereditario, realizado por Calderon- Garcidueñas *et al.*, se encontraron 4 cambios en la secuencia del gen *BRCA1* de significancia desconocida y 2 mutaciones que originaban proteínas truncadas.

**Resultados:**

Dos de las muestras analizadas presentan alteraciones en la secuencia de nucleótidos, se encontró un polimorfismo de nucleótido sencillo (de sus siglas en inglés SNP) conocido como rs799917 en la base de datos del Gene Bank. Las otras dos muestras presentaron la secuencia idéntica a la original.

**Conclusiones:**

Se encontró el polimorfismo rs799917 en dos de las mujeres estudiadas, llama la atención que representa el 50% de las muestras analizadas y sería importante conocer la frecuencia del mismo tanto en mujeres sanas como en afectadas con cáncer de mama. Así mismo conocer los polimorfismos presentes en el gen BRCA1 de la población mexicana para posteriormente investigar si estos pueden conferir un riesgo mayor para cáncer de mama o por el contrario un factor de protección.

## MARCO TEÓRICO

### Epidemiología

El Cáncer de mama en nuestro país como en el mundo es uno de los problemas prioritarios de salud. Se identifican en la población formas esporádica y familiar, a esta última forma de presentación se le engloba dentro de los síndromes de cáncer familiar, específicamente denominado cáncer de mama hereditario. De manera general se ha demostrado que el 20 al 25% de las pacientes con cáncer de mama se presentan de forma familiar, variando en ciertas regiones del mundo del 5 al 10% de todas ellas, con un carácter autosómico dominante, con penetrancia incompleta. Muchos de los cánceres de mama, se encuentran asociados con mutaciones en los genes de susceptibilidad *BRCA1* y *2*. De manera interesante la etnicidad juega un papel importante en el cáncer de mama hereditario y su asociación con mutaciones fundadoras particulares Vgr. grupos étnicos de Islandia, judíos, rusos, israelitas. En Islandia la mutación *BRCA2* 999del5 se encuentra en el 24% de las mujeres diagnosticadas menores de 40 años (1, 2, 3).

En los últimos años, esta neoplasia ha presentado una tendencia al aumento en la mortalidad, en el año de 1991 se reportó una tasa de mortalidad de 10.6 por 100,000 habitantes en derechohabientes del IMSS y de 11.2 por 100,000 habitantes en no derechohabientes del IMSS, mientras que en el año 2001 la tasa de mortalidad por cáncer de mama para derechohabientes del IMSS fue de 11 por 100,000 habitantes y en no derechohabientes del IMSS fue de 16.8 por cada 100,000 habitantes. Actualmente ocupa el segundo lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años de edad (4,5).

### ¿Qué es el cáncer de mama hereditario?

El cáncer de mama es una enfermedad caracterizada por degeneración celular maligna de la glándula mamaria, tiene como característica principal un número de casos, dentro de una familia, muy superior al esperado para la población general;

es decir que a menudo se presentan más de dos casos por familia, observándose un modelo de herencia autosómico dominante. Es frecuente que la enfermedad se presente en mujeres jóvenes, de forma bilateral e inclusive pueden observarse casos de varones afectados (1,6).

### **Factores predisponentes:**

Todavía no se conocen con exactitud la mayoría de factores que predisponen o que se asocian a cáncer de mama; se han descrito la paridad nula o baja, primer parto a edades tardías, menarca antes de los 12 años de edad, menopausia después de los 50 años de edad, radiaciones ionizantes, dietas altas en grasa y obesidad, como factores predisponentes en población mexicana para cáncer mama en general. Pero el antecedente familiar de un caso de cáncer de mama es uno de los más importantes, esto es que existe un componente hereditario. 15 a 20% de las pacientes con cáncer de mama tienen historia familiar de la enfermedad (6).

BRCA1 y BRCA2 son dos genes de susceptibilidad para cáncer de mama hereditario, cuando se encuentran con alguna mutación o con alteraciones en sus patrones de metilación. El gen BRCA1 (Breast Cancer type 1) es un gen con actividad de tumor supresor, localizado en el brazo largo del cromosoma 17 en la región 2 banda 1, y se encuentra con algún tipo de alteración en el 20 a 30 % de los casos de cánceres de mama hereditario. El gen BRCA2 (Breast Cancer type 2), localizado en el brazo largo del cromosoma 13 en su región 1 banda 2 sub-banda 3, se encuentra alterado en el 10 a 20% de los cánceres de mama y ovario hereditarios. Ambos genes se relacionan con presentación temprana de la enfermedad y con un modelo de herencia autosómico dominante para la susceptibilidad a cáncer de mama (7,8).

Judy E. *et al* (1) reportan una frecuencia mayor de mutaciones en el gen BCRA1 en alrededor del 70% de las familias con cánceres de mama y ovario, y alrededor del 20% de familias con únicamente cáncer de mama.

## **CUADRO CLINICO**

Mediante la autoexploración la mayoría de las pacientes detectan un nódulo en alguna de sus glándulas mamarias, la enfermedad no se presenta con un cuadro de signos o síntomas característicos. En estadios avanzados pueden presentarse alteraciones de la forma, posición, volumen, estado de la superficie de la mama y sintomatología general de acuerdo al estadio de la enfermedad.

Una vez que una paciente es detectada en la consulta médica se solicitan pruebas diagnósticas (7,8).

## **CLASIFICACION DEL CANCER DE MAMA**

El cáncer de mama se clasifica de acuerdo al tumor primario (T), la afección a ganglios linfáticos regionales (N), estudio histopatológico (pN), metástasis distancia (M), para definir el estadio en el que se encuentra los cuales van de estadio cero (0), I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC y IV, en orden creciente de gravedad (9). Para más información ver anexo número 2.

## **DETECCION DEL CANCER DE MAMA**

En nuestro país existe un programa de detección oportuna de cáncer de mama al cual la mayor parte de la población mexicana tiene acceso. Dicho programa se inicia en los centros de atención de primer nivel mediante examen físico en mujeres, cuando se detecta alguna alteración en la glándula mamaria es referida a segundo nivel en donde se realizan pruebas diagnósticas tales como ultrasonido, mastografía e imagen por resonancia magnética. Los estudios de imagen mencionados orientan al clínico acerca del manejo médico que deberá continuar en cada paciente, algunos casos solo requerirán de vigilancia en caso de que la sospecha sea una patología benigna. Cuando la sospecha sea cáncer esta indicado realizar biopsia, ya sea por aspiración con aguja fina, dirigida por USG o bien a cielo abierto, esto dependerá del criterio del clínico tratante (10).

La sensibilidad del examen físico para detectar cáncer de mama invasivo es del 17.9%, en la mayoría de los casos se detecta un nódulo cuando suele ser mayor a 2cm.

La sensibilidad del ultrasonido para detección de cáncer de mama no ha sido claramente establecida dado que en estadios iniciales solo aporta datos sobre la localización del tumor, así como su morfología en general, es un estudio que se solicita para corroborar los hallazgos por examen físico y su sensibilidad se ha establecido alrededor del 20% cuando se trata de estadio II o más.

La sensibilidad de la mamografía varía aproximadamente entre el 54 a 58% en mujeres de 40 años y de 81 a 94% en mujeres mayores de 65 años de edad. Esta sensibilidad varía dependiendo de varios factores incluyendo la edad de la paciente, densidad y volumen de la mama, tamaño de la lesión, localización del mismo, aspecto mamográfico y la experiencia del personal que interpreta dicho estudio. Actualmente los estándares de calidad para este estudio consideran un mínimo de 7 años de experiencia en trabajo exclusivamente con mamografía.

Aproximadamente un 30% de los pacientes a quienes se encuentra alguna anomalía por mamografía, se detectan tumores malignos cuando se efectúa biopsia de los mismos.

La imagen por resonancia magnética tiene una sensibilidad del 79.5%, este es uno de los estudios con mejor porcentaje de sensibilidad sin embargo es de costo elevado (11).

El examen físico, la mamografía al igual que el resto de los métodos diagnósticos son indispensables en la detección oportuna de cáncer de mama. Sin embargo esto es aplicable a población general, que en su mayoría corresponden a formas esporádicas de la enfermedad, no así en una familia que se presenta con el modelo dominante de la enfermedad en la cual la posibilidad de presentar la enfermedad supera por mucho la observada en población sin antecedentes de cáncer de mama en su familia, tal como se ha descrito en familias a quienes se ha identificado alguna alteración en los genes de susceptibilidad para cáncer de mama hereditario.

Para el caso particular del cáncer de mama hereditario en el cual podemos realizar medidas preventivas, es importante conocer el estado de portador de alguna

mutación en los genes BRCA1 y BRCA2 de los individuos con historia familiar de cáncer de mama, ya que la vigilancia y manejo de los portadores de dichas mutaciones se vera beneficiado. Como se menciona previamente la detección de la enfermedad con métodos habituales no es posible en las etapas tempranas de la misma.

Dicho manejo en estas familias es diferente al de la población general, se puede realizar diagnóstico predictivo y por ende profilaxis, la cual va desde cambios en el estilo de vida, vigilancia estrecha a partir de los 30 años de edad mediante estudios de imagen tales como mamografías, resonancia magnética, estudios de medicina nuclear con el fin de detectar estadios tempranos de la enfermedad, además de quimioterapia o medidas como la mastectomía y ooforectomía profilácticas. Los objetivos de estas últimas medidas permiten retirar el órgano blanco en este síndrome de cáncer familiar (12,13).

Un estudio realizado en nuestro país en el que se evaluó a mujeres con diagnóstico de cáncer de mama de presentación temprana, se encontraron en 22 mujeres estudiadas 2 mutaciones que originaban proteína truncada una en BRCA1 y otra en BRCA2. En vista de que no se estudiaron familias con el modelo autosómico dominante la proporción de mutaciones fue baja (14).



## GENETICA DE BRCA1 Y BRCA2:

Los genes *BRCA1* y *BRCA2* fueron clonados en 1994 y 1995 respectivamente, se han descrito múltiples mutaciones a lo largo de su secuencia, *BRCA1* tiene 24 exones, codifica una proteína de 1863 aminoácidos. A lo largo de su secuencia nucleotídica presenta diferentes dominios que interaccionan con otras proteínas y con el DNA. El gen *BRCA2* tiene 27 exones y codifica una proteína de 3418 aminoácidos (1).

Dichas proteínas presentan diferentes dominios funcionales a lo largo de su cadena peptídica. El primer dominio de *BRCA1* situado proximalmente al segmento aminoterminal denominado “dedo en anillo”, sirve para lograr la función de ubiquitin-ligasa cuando se une a otra proteína denominada *BARD1*. Otro dominio denominado NLS (señales de localización nuclear) tiene la propiedad de unirse a proteínas como p53, MYC, RB y ZBRK, de las cuales conocemos su importancia como reguladores en el ciclo celular y la respuesta de daño a DNA, además también puede interaccionar con el complejo SWI/SNF que es un regulador de cromatina. El dominio de unión a DNA se da entre los aminoácidos 452 y 1079, es uno de los grandes en este gen y contribuye a las funciones relacionadas con la reparación, que son parcialmente mediadas por un complejo denominado BASC (complejo de sobrevivencia asociado a *BRCA1*). El dominio denominado SCDs (dominio de secuencias cluster), el cual contiene secuencias ricas en aminoácidos como serina y treonina, representan los sitios preferidos para la fosforilación por ATM (15,16).

Por último el dominio BRCT situado en la porción carboxiterminal puede unirse a muchas proteínas incluyendo la RNA pol II, p300, BACH1, HDACs, P53 y RB. Además *BRCA2* y *RAD51* también pueden unirse a *BRCA1* en este dominio. El tamaño completo de esta proteína es de 1863 aminoácidos.

El exón analizado en este estudio es el número 11 del cual se origina la secuencia de aminoácidos que corresponde a parte del dominio de unión a DNA y el dominio de interacción con las proteínas ATM, CHK2 Y CDK2, las cuales son indispensables para una adecuada función de reparación. Por tamaño corresponde al 60% de la secuencia codificante del gen y es el exón con más mutaciones hasta ahora reportado (17).

La gran mayoría de las mutaciones originan proteínas truncadas. Un número de mutaciones “fundadoras” de la población judía provenientes del Este de Europa han sido identificadas en varias poblaciones, incluyendo Estados Unidos. Dos en *BRCA1* (185delAG y 5382insC) y la mutación 6174delT en *BRCA2* (1).

Los productos proteicos de *BRCA1* Y *BRCA2* desempeñan múltiples papeles en la respuesta celular de daño al DNA, dichas proteínas participan en el proceso que implementa la célula en el punto de revisión del ciclo celular.

Las proteínas BRCA1 y BRCA2 están involucradas en el control de la recombinación homóloga y en la reparación por ruptura de doble cadena en respuesta al daño al DNA. En pocos minutos posteriores al daño al DNA la histona H2A se fosforila, BRCA1 es reclutado en ese sitio varias horas antes que otros factores tales como RAD50 o RAD51. Esto indica que las histonas y BRCA1 inician la reparación por modificaciones locales de la estructura cromatínica, de esta manera se permite que otras proteínas actúen sobre el sitio dañado.

BRCA1 y BRCA2 también funcionan como co-reguladores transcripcionales a través de interacción directa con factores de transcripción de secuencias específicas y con componentes de la maquinaria transcripcional. Además las funciones de remodelación de cromatina se han atribuido a ambos BRCA1 y BRCA2 (18,19,20).

Las células que pierden las funciones de BRCA1 y BRCA2 acumulan anomalías cromosómicas que incluyen rupturas cromosómicas, formación de estructuras trirradiadas o tetrarradiadas, aneuploidias, amplificación del centrosoma. La inestabilidad cromosómica como resultado de la deficiencia de BRCA1 y BRCA2, forma parte de la patogénesis del cáncer de mama. También se reportan evidencias de que la pérdida de función de BRCA en las células de la mujer puede llevar a perturbaciones en el cromosoma X inactivo y desestabilización de su estado silenciado. (21,22).

La correcta función de estos genes en el mantenimiento de la homeostasis del ser humano es importante, ya que la pérdida o alteración en sus funciones se ha relacionado no sólo con cáncer de mama familiar y esporádico sino también con algunas entidades tales como son el síndrome de Li-Fraumeni L, cáncer de páncreas, próstata y la anemia de Fanconi, dado que las vías de reparación de daño a DNA son un proceso común (23,24).

El mecanismo que lleva a presentar cáncer de mama familiar es la pérdida de heterocigosidad, esto es que deberá ocurrir un segundo evento mutacional en el tejido mamario para que se presente la enfermedad, fenómeno que se explica por la hipótesis de Knudson (17,25).

El riesgo de desarrollar cáncer de mama en portadoras de mutaciones en *BRCA1* para desarrollar cáncer de mama es del 82% y para cáncer de ovario es del 54%. Para las mutaciones en *BRCA2* es del 23%, el riesgo para mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA2* parece estar incrementado en aquellas quienes abarcan los nucleótidos 3035-6629 (7,26).

## **MANEJO DEL CANCER DE MAMA FAMILIAR**

Las medidas de prevención incluyen aquellas tales como cambios en el estilo de vida, quimioprevención, hasta la cirugía profiláctica.

### **Cambios en el estilo de vida:**

Algunos factores modificables como la dieta alta en grasas saturadas, sobrepeso, tabaquismo deben ser controlados a fin de disminuir estos factores que incrementan el riesgo de cáncer de mama (7,8).

### **Mastectomía profiláctica:**

Esta medida es una vía efectiva para la prevención de cáncer entre aquellas pacientes portadoras de mutaciones en los genes *BRCA1/2*. En un estudio realizado por Meijers *et al* (26), no se observaron casos de cáncer de mama después de tres años en 76 mujeres quienes se sometieron a mastectomía profiláctica. Rebbeck y colaboradores observaron cáncer de mama en 2 de 191 mujeres después de mastectomía radical, comparado con 184 de 378 mujeres quienes retuvieron sus glándulas mamarias. Dichos estudios sugieren que el riesgo de cáncer postmastectomía es muy bajo (26,27,28).

### **Oforectomía:**

La oforectomía previene el cáncer de mama en portadoras de mutaciones en *BRCA1/2* en base a que se conoce el efecto hormonal sobre la neoplasia que son positivas para receptores de estrógenos. Los estudios reportados en la literatura estiman una reducción en el riesgo de cáncer de mama asociado con oforectomía hasta en un 50% (29).

### **Tamoxifeno:**

Es un medicamento se une a un receptor de estrógenos y ha disminuido la incidencia de cáncer de mama en mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA2* y con receptores de estrógeno positivos. Se ha observado que en mujeres con

cáncer de mama unilateral y portadoras de alguna mutación en los genes ya comentados, el uso de tamoxifeno reduce hasta en un 50% la incidencia de cáncer de mama contralateral. (30)

## **ANTECEDENTES**

El estudio realizado por Calderón (14), se diseñó en pacientes mexicanas con cáncer de mama de presentación temprana; es esperado que dado que no se emplearon criterios de inclusión específicos para cáncer de mama hereditario la frecuencia de mutaciones encontradas fuera baja. Se encontraron en 22 mujeres estudiadas 2 mutaciones que originaban proteína truncada una en BRCA1 y otra en BRCA2. No existen otras referencias de estudio en población mexicana, sobre estos dos genes de susceptibilidad hasta el momento.

### **Experiencia del grupo de investigación sobre cáncer de mama**

En nuestra Unidad de Investigación se encontró que las células tumorales mamarias obtenidas por biopsia de mujeres con cáncer de mama en diferentes estadios presentaban sobreexpresión del gen BIK en un análisis de microarreglos, principalmente en estadios III y IV, en 14 de 15 tumores, dicho gen se ha asociado con reversión tumoral en diferentes líneas celulares neoplásicas por su función en la apoptosis (31). También se realizó la determinación mediante RT-PCR de la expresión del gen BIK en linfocitos de 28 mujeres sanas no encontrándose expresión en ninguna de ellas (32).

Otro estudio empleando la técnica hibridación genómica comparativa (CGH) en el que se analizaron muestras de pacientes con cáncer de mama esporádico en estadios II y III, se obtuvieron 4.1 alteraciones cromosómicas por muestra; se identificó una pequeña región en Xq27 con un alto nivel de amplificación en 3 de 16 muestras. Las alteraciones más frecuentes fueron amplificaciones en 4q, 5q, 8q, 12p y pérdidas en 1p, 16p, 19q y Xp (33).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El cáncer de mama es un problema de salud pública y su diagnóstico no es fácil. Aproximadamente un 20% de los casos corresponden a casos familiares en donde la neoplasia se manifiesta en forma autosómica dominante. La identificación de las mutaciones en los genes de susceptibilidad *BRCA1* y *BRCA2* asociadas al cáncer de mama familiar constituye un apoyo diagnóstico importante para el manejo de estos individuos. Por el momento consideramos que es importante iniciar el estudio molecular de mujeres con antecedente de cáncer de mama familiar, ya que de acuerdo a la bibliografía reportada se ha visto que el gen más frecuentemente alterado es *BRCA1*, y que las mutaciones que afectan el exón 11 repercuten en la funcionalidad del gen para efectuar reparación.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACION**

¿Existen mutaciones en el exón 11 del gen *BRCA1* en las mujeres mexicanas estudiadas con cáncer de mama hereditario?

## **JUSTIFICACION**

El diagnóstico molecular actualmente es una herramienta importante en el manejo médico de los individuos que pertenecen a familias con antecedente de cáncer de mama hereditario, ya que el riesgo de heredar la predisposición es del 50%; por tratarse de genes altamente penetrantes, es importante contar con el diagnóstico molecular en las familias con historia de cáncer de mama hereditario. La prevención y el manejo en estas pacientes dependerán de la presencia o no de las mutaciones encontradas en el gen, y así iniciar asesoramiento genético o bien ampliar el estudio molecular a otras regiones del gen u otros genes.

Hasta la fecha se han realizado estudios en nuestro país pero los criterios utilizados han limitado de forma importante el trabajo y los resultados son poco contundentes, es importante conocer el tipo de mutaciones en el exón 11 del gen *BRCA1*, a fin de determinar si este se encuentra afectado o no en nuestra población, y en caso de ser así implementar una prueba de apoyo diagnóstico en caso de que la frecuencia de mutaciones en dicho exón sea elevada en la población estudiada.

## **OBJETIVO**

Identificar la presencia de mutaciones en el exón 11 del gen *BRCA1* en mujeres mexicanas con historia de cáncer de mama hereditario.

## **HIPOTESIS**

Si están presentes las mutaciones en el exón 11 del gen *BRCA1*.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Diseño:**

Se trata de un estudio transversal, descriptivo y observacional.

### **Población de estudio:**

Se realizaron 26 entrevistas a mujeres con algún antecedente familiar de cáncer de mama, procedentes del servicio de mama del Hospital de Oncología de CMN SXXI, se realizó análisis de la genealogía de cada propositus y solo se incluyeron para el estudio a 4 mujeres mexicanas que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos. Para dicho procedimiento se contó con la colaboración del Dr. Sinuhé Barroso Bravo quien es jefe de dicho departamento, durante el periodo comprendido entre julio-diciembre del 2005.



**Criterios de inclusión:**

Mujeres mexicanas en por lo menos tres generaciones previas.

Mujeres con cáncer de mama con al menos un familiar de primer grado afectado.

Mujeres con cáncer de mama y de ovario concomitantes.

Mujeres sin cáncer de mama con al menos 2 familiares en primer grado con diagnóstico de cáncer de mama o de ovario.

**Criterios de no inclusión:**

Mujeres en quienes no se realizó el diagnóstico de certeza de cáncer de mama.

Mujeres que se negaron a ingresar al estudio o que no firmen la hoja de consentimiento informado.

Mujeres menores de 18 años de edad.

**Criterio de eliminación:**

Mujeres que abandonen voluntariamente el estudio.

**ASPECTOS ETICOS**

Se trató de un estudio con riesgo mínimo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana en materia de Investigación en Salud.

Se solicitó consentimiento informado a cada una de las donadoras de muestra sanguínea. Se anexa al presente la forma de consentimiento (anexo 1 y 2).

El presente estudio fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica (CNIC) con el número 2561-2005-126.

## **DEFINICION DE VARIABLES:**

Variable independiente:

Mutación en región codificante de los genes BRCA1 y BRCA2 (cualitativa).

- Presente
- No presente

Variable dependiente:

Cáncer de mama hereditario o cáncer de mama y de ovario concomitantes (cualitativa).

## DESARROLLO DEL ESTUDIO:



**Figura 1.- Diagrama de flujo.** Esquematiza el orden de los procedimientos para el desarrollo del trabajo.

## **ANÁLISIS DE DATOS**

Se realizó tabla con distribución de la frecuencia de los cambios encontrados en la población estudiada.

## **FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD**

El estudio fue factible dado que se cuenta con material físico y de laboratorio necesario para la realización del mismo. Se utilizaron las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría del CMN SXXI, IMSS.

## **RECURSOS HUMANOS**

Los investigadores que realizaron el estudio son: Dr. Saúl Neri Gámez, Dr. Diego J. Arenas Aranda y Dr. Fabio Salamanca, con la colaboración del personal del Hospital de Oncología y de Investigación Médica en Genética Humana del CMN Siglo XXI, IMSS.

## **METODOLOGIA**

### **ORIGEN DE LA MUESTRA:**

La extracción y colección de sangre periférica se realizó mediante punción en vena periférica obteniéndose aproximadamente 5 mililitros (ml). Se colocaron inmediatamente en tubos BD Vacutainer™ K<sub>3</sub> EDTA con capacidad de 5 ml.

Se homogeneizó la sangre con el EDTA y se mantuvieron en hielo hasta el momento de efectuar el aislamiento del DNA total.

### **EXTRACCION DE DNA TOTAL:**

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de 5ml de sangre periférica utilizando la metodología descrita por Sambrook *et al* (28). La concentración del DNA obtenido se determinó por espectrofotometría y la integridad del mismo en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio al 0.5µg/µl. Ver anexo 3.

### **ELABORACION DE GELES DE AGAROSA PARA CONFIRMAR INTEGRIDAD DE DNA TOTAL**

Se colocaron 30mL de amortiguador TBE 1X y 0.3gr de agarosa grado molecular, la agarosa se fundió a 50°C. Se agregó 4µL de bromuro de etidio (concentración 1µg/mL) y se homogeneizó. Se procedió a vaciar en la cámara de electroforesis y se dejó polimerizar. Se agregó amortiguador TBE 1X hasta cubrir los pozos del gel. Se cargaron 2µL de la muestra de DNA mezclada con 1µL de amortiguador de carga (constituido por azul de bromofenol y cianol xileno), se somete a electroforesis a 70 Volts durante 60 minutos.

Se visualizó el gel a través del transiluminador de luz ultravioleta (Mighty bright, Hoefer Scientific Ins<sup>TM</sup>).

### **CUANTIFICACION DE DNA CON ESPECTROFOTOMETRO**

Se prepararon 4 alícuotas de cada una de las pacientes a estudiar. De una alícuota de DNA se tomaron 2µL para mezclarlo con 98µL de agua y se colocó en una celdilla para análisis en espectrofotómetro a 260nm y 280nm (Ultrospect 2000, Pharmacia Biotech®), considerando que una densidad óptica equivale a 40µg/µL.

## DISEÑO DE LOS INCIADORES:

Secuencia del exón 11 del gen BRCA1 (Breast Region Cancer 1).

Se diseñaron 15 pares de iniciadores para abarcar la secuencia del exón 11 ya que éste tiene un tamaño de 3426pb. Se consideraron 103pb corriente arriba y 363pb corriente abajo del exón a fin de poder incluir las uniones intron-exón. El diseño se llevó cabo con el programa Oligo 4.1 (Wojciech Rysclik) y fueron sintetizados por Invitrogen™ Life Technologies, a partir de la secuencia reportada en el Gene Bank Ensembl Genome Browser número ENSG00000012048 (35).

En la Tabla 1 se muestran las características de cada uno de los iniciadores, en la figura 2 se muestra la localización de cada uno de los iniciadores dentro del exón analizado.

**Tabla 1:** Iniciadores superiores para el exón 11 del gen BRCA1:

Nombre	Long Pb.	Tm	%gc	Tamaño del fragmento. Pb	Iniciador superior
PROTO 1	21	50	33	401	ATA TAg CCA gTT ggT TgA TTT
PROTO 2	21	51	38	401	gAA TTT TCT gAg ACg gAT gTA
PROTO 3	20	56	45	401	TTC AAA CTT gCA TgT ggA gC
PROTO 4	18	48	35	417	AgA AAA gAA Tgg AAT AAg
PROTO 5	19	49	33	358	CCA TgT AAC TgA AAA TCT A
PROTO 6	20	49	40	401	ATT TgT TAC TgA gCC ACA gA
PROTO 7	26	53	27	401	TAA TAg Tgg TCA TgA gAA TAA AAC AA
PROTO 8	20	55	45	401	Tgg AAg gTA AAg AAC CTg CA
PROTO 9	23	51	39	401	AgT ATT TCA TTg gTA CCT ggT AC
PROTO 10	19	51	34	440	gTC ggg AAA CAA gCA TAg A
PROTO 11	21	51	38	401	TTA AgT ATC CAT Tgg gAC ATg
PROTO 12	19	47	35	589	gCC AAA TgT AgT ATC AAA g
PROTO 13	19	51	40	412	TTT CTC TCC ATA TCT gAT T
PROTO 14	27	50	22	401	TgT TAT TTg gTA AAg TAA ACA ATA TAC
PROTO 15	19	49	37	401	ACC Agg TAA TAT Tgg CAA A

**Tabla 1.1:** Iniciadores inferiores para el exón 11 del gen BRCA1:

Nombre	Long Pb.	Tm	%gc	Iniciador inferior
PROTO 1 A	18	50	50	CCA gCC CAT CTg TTA TgT
PROTO 2 A	19	50	42	CAT ggC AgT TTC TgC TTA T
PROTO 3 A	24	56	42	CAT gTg AgT CAT CAg AAC CTA ACA
PROTO 4 A	18	48	33	AgT AAC AAA TgC TCC TAT
PROTO 5 A	19	50	40	CAT ATT gCT TAT ACT gCT g
PROTO 6 A	19	50	53	gCC Tgg TAg AAg ACT TCC T
PROTO 7 A	21	54	48	TgT TAC TCT TCT Tgg CTC CAg
PROTO 8 A	25	55	28	CAC ACA TTT ATT TGG TTC TGT TTT T
PROTO 9 A	21	50	33	AAA gTg ACT TTT ggA CTT TgT
PROTO 10 A	19	52	45	gAT ggg AAA AAg Tgg Tgg T
PROTO 11 A	18	52	50	TTC gTT gCC TCT gAA CTg
PROTO 12 A	19	47	40	CCA TAG gCT gTT CTA AgT T
PROTO 13 A	19	50	46	TAA ATT CTC CTC CTC TgT gTT C
PROTO 14 A	18	50	44	ATC CAT gCT TTg CTC TTC
PROTO 15 A	25	50	32	TAA gAA gCA gTT CCT TTA ACT ATA C

La tabla se ha dividido en dos partes a fin de mostrar por separado los iniciadores superiores de los inferiores, a cada uno se asignó un nombre. Long pb: longitud el iniciador en pares de bases. Tm: temperatura de alineamiento. Tamaño del fragmento pb: Tamaño en pares de bases del segmento esperado una vez utilizado con su par correspondiente.

AGGGAAAAATCTGAAATAAAAATTTAATGGATCCTAAGTGAAAAATAATCTAGGTAATA  
GGAAATTAATGAAAGAGTATGAGCTACATCTTCAGTATACTTGGTAGTTTATGAGGTTAG  
TTTCTCTAATAAGCCAGTTCGTTGATTTCCACCTCCAAGGTGATGAGTATGTATTTT  
TTAATGACAAATTCAGTTTTTGGTACCTTGTATTTTTTGTATATTTTCAGCTGCTTTGG  
AATTTTCTGAGACGGATGTACAAAATCTGAACATCATCAACCCAGTAATAATGATTTGA  
ACACCCTGAGAAGCGTGCAGCTGAGAGGCAATCCAGAAAAGTATCAGGGTAGTTCGTGTT  
CAAACCTGCATGTGGAGCCATGTGGCACAATACTCATGCCAGCTCATTACAGCATGAGA  
ACAGCAGTTTATTACTACTAAAAGACAGAATGAATGTAGAAAAGGCTGAATTTCTGTAATA  
AAAGCAAACAGCCTGGCTTAGCAAGGAGCCAACATAACAGATGGGCTGAAGTAAGGAAA  
CATGTAATGATAGGCGGACTCCAGCAGCAGAAAAAAGGTAGATCTGAATGCTGATCCCC  
TGTGTGAGAGAAAAGAATGGAAATAAGCAGAACTGCCATGCTCAGAGAATCCTAGAGATA  
CTGAAGATGTTCTTGGATAACACTAAATAGCAGCATTAGAAAAGTAAATGAGTGGTTTT  
CCAGAAGTGATGAACTGTTAGGTTCTGATGACTCAGATGATGGGAGCTGGAATCAAATG  
CCAAAGTAGCTGATGATTGGACGTTCTAAATGAGGTAGATGAATATTCTGGTTCTTCAG  
AGAAAATAGACTTACTGGCCAGTGTCTCATAGGGCTTAAATATGTAAGGTAAGGAGAG  
TTCACTCCAAATCAGTAGAGATAATATTGAAGCAAAAATATTGGGAAAACCTATCGGA  
AGAAGGCAAGCCTCCCAACTTAAGCCATGTAACCTGAAAATCTAATTATAGGAGCATTG  
TTACTGAGCCACAGTAAATACAAGAGCGTCCCTCACAAAATAAATAAGCGTAAAAGGA  
GACCTACATCAGGCCCTCATCTGAGGATTTTATCAAGAAAGCAGATTTGGCAGTTCAA  
AGACTCCTGAAATGATAAATCAGGGAACCTAACAAAACGGAGCAGAATGGTCAAGTATGA  
ATATTACTAATAGTCTCATAGCAATAAATAAAAAGGTTATCTTATTCAGAATGAGAAAA  
ATCCTAACCCAATAGAATCACTCGAAAAGAATCTGCTTTCAAAACGAAAGCTGAACCTA  
TAAGCAGCAGTATAAGCAATATGAACTCGAATTAATATCCACAATCAAAGCACCTA  
AAAAAATAGGCTGAGGCTGAAATTTCTGAGGTTAATATTATTCATGCGCTTGAACTAGTAG  
TCAGTAGAAATCTAAGCCACCTAATTTGACTGAATGCAAAATGATAGTTTGTCTAGCA  
GTGAAGAGATAAGAAAAAAGTACAACCAATGCCAGTCCAGGCACAGCAGAAAACCTAC  
AACTCATGGAAGGTAAAGAACCTGCAATGAGGCTCAGAGGTTAAGAGCTAAGCAGCAAAATGAAC  
AGACAAGTAAAAGACATGACAGCGATACTTTCCAGAGCTGAAGTTAACAATGACACCTG  
GTTCTTTACTAAGTGTCAAATACCAGTGAACCTAAAGAATTTGTCAATCTAGCCTTC  
CAAGAGAAGAAAAGAGAAAACCTAGAAAACAGTTAAAGTGTCTAATAATGCTGAAGACC  
CCAAAGATCTCATGTTAAGTGGAGAAAGGTTTGCAAACTGAAAGATCTGTAGAGAGTA  
GCNGTATTTCAATGGTACCTGGTACTGATTATGGCACTCAGGAAAGTATCTCGTTACTGG  
AAGTTAGCACTTAGGGAAGGCAAAACAGAACCAATAAATGTTGTTAGTCAGTGTGCAG  
CATTTGAAAACCCCAAGGACTAAATTCATGGTGTGTTCCAAAGATAATAGAAAATGACACAG  
AAGGCTTTAAGTATCCATGGGACATGAAGTTAACCAAGTCCGGGAAAACAGCATAGAAA  
TGGAAGAAAGTGAACCTGATGCTCAGTATTTGAGAAATACATTCAAGGTTTCAAAGCGCC  
AGTCATTTGCTCCGTTTTCAAATCCAGGAAAAGCAGAAAGAGGAAATGCAAACTTCTTG  
CCCCTCTGGTCCTTAAAGAAACAAGTCCAAAAGTCACTTTGAATGTGAACAAAAGG  
AAGAAAATCAAGGAAAGAAATGAGTCTAATATCAAGCCTGTACAGACAGTTAATATCAGT  
CAGGCTTCTCTGTTGGTGCAGAAAGATAAGCCAGTTGATAATGCCAAATGATGATATCA  
AAGGAGGCTCTAGGTTTGTCTATCATCTCAGTTGAGAGGCAACCAACTGGACTCATT  
CTCAAATAAACATGGACTTTTCAAACCCATATCGTATACCACCCTTTTTCCCATGA  
AGTCATTTGTTAAAATAAATGAAGAAAACTGCTAGAGGAAAACCTTGAGGAACATT  
CAATGTCACCTGAAAGAGAAAATGGGAAATGAGAACATTCGAAGTACAGTGAAGCAATTA  
GCCGTAATAACATTAGAGAAAATGTTTTAAAGAAGCCAGCTCAAGCAATTAATGAAG  
TAGGTTCCAGTACTAATGAAGTGGGCTCCAGTATTAATGAAAATAGGTTCCAGTGAAGAA  
ACATTCAGCAGAACTAGGTAGAAACAGAGGCCAAAATGAAATGCTATGCTTAGATTAG  
GGGTTTGCACCTGAGGCTATAAAACAAAGTCTTCTGGAAGTAAATGTAAGCATCTCG  
AAATAAAAAGCAAGAAATGAAGAAAGTATTCAGACTGTTAATACAGATTTTCTCTCCAT  
ATCTGATTCAGATAACTTAGAACAGCCTATGGGAAGTGTGATGATCTCAGGTTTGT  
CTGAGACACCTGATGACCTGTAGATGATGGTGAATAAAGGAAGATACTAGTTTTGCTG  
AAAAAGCATTAAAGAAAGTTCTGCTGTTTTAGCAAAAGCGTCCAGAAAAGGAGAGCTTA  
GCAGGAGTCTAGCCCTTCCACCATACATTTGGCTCAGGTTACCGAAGAGGGGCCA  
AGAAAATTAGAGTCCCTCAGAAAGAACTTATCTAGTGAGGATGAAGAGCTCCCTGCTCC  
AACACTGAAATCTGGGAAAGTAAACAATAACTTCTCAGTCTACTAGGCATAGCACCG  
TTGCTACCGAGTGTCTGTCTAAGAACACAGAGGAGAAATTAATCATTTGAAGAATAGCT  
TAAATGACTGCAGTAAGCAAAACAGGAAAGGCAATCCAGTCTCAGGAACATCACCTTAGTG  
AGGAAACAAAATGTTCTGCTAGCTTGTCTTCTCACAGTGCAGTGAATGGAAGACTTGA  
CTGCAAAATACAAACCCAGGATCTTTCTGATTGGTTCTTCCAAAACAAATGAGGCATC  
AGTCTGAAAGCCAGGAGTTGGCTGAGTGACAAGGAATGGTTTCAGATGATGAAGAAA  
GAGGAACGGGCTTGGAAGAAAATAATCAAAGAGCCAAAGCATGCAATCAAACCTTAGGTA  
TTGGAACAGGTTTTTGTGTTTGGCCAGTCTATTATAGAAGTGAAGTAAATGTTTATG  
CTTTGGGAGCACATTTTACAAATTTCCAAAGGAGTAACTGAAAACATGTTCTCCTCCTAAGGTGCTTTTCATAGAAAAAGTCTTCACACAGCTAGGACC

Figura 2: Se muestra en letras resaltadas en colores los pares de las secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación del exón 11 del gen *BRCA1*. Son 3648pb que incluyen las uniones intron-exón.



## REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):

Se realizaron las reacciones de amplificación con los siguientes reactivos y cantidades estándar.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN ( $\mu$ l)
Iniciador (S e I)	20 pmol	2
Amortiguador 10X	1X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	0.75
DNTPs	2Mm	2
Agua		15.5
Taq polimerasa	0.5 UI	0.25
DNA	150ng/ $\mu$ L	2
Volumen final		25

La amplificación se realizó en termociclador Gene Amp® PCR System 9700, bajo los siguientes pasos: la primera fase de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, la segunda fase de 30 ciclos dividida en tres pasos, el primero de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, el segundo de amplificación (de acuerdo a la T<sub>m</sub> de cada iniciador) durante 30 segundos y el tercero de extensión a 72°C por un tiempo de 30 segundos, y la tercera fase de alargamiento final a 72°C por 7 minutos.

Se procedió a preparar 30mL de amortiguador TBE 1X y 0.3mg de agarosa grado molecular, se fundió a 50°C, posteriormente se agregaron 4 $\mu$ L de bromuro de etidio (concentración 1 $\mu$ g/mL) y se homogeneizó. Dicho preparado se vació en la cámara de electroforesis y cada uno de los geles se dejó polimerizar a temperatura ambiente, el paso siguiente fue agregar amortiguador TBE hasta cubrir los pozos y se cargaron los productos de PCR (volumen aproximado de 24 $\mu$ L) con 3 $\mu$ L de amortiguador de carga (constituido por azul de bromofenol y cianol xileno), se colocó marcador de peso molecular de 100pb para realizar la

medición del producto el cual por lo general se depositaba en el primer pozo del gel. Los productos una vez depositados en cada uno de los pozos se sometieron a electroforesis a 70 Volts durante 60 minutos. Una vez concluido este tiempo se visualizó cada uno de los geles con luz ultravioleta y se procedió a realizar corte de cada una de las bandas que correspondía al segmento de interés y este fue depositado en un tubo de trabajo eppendorf® de 1.5mL y conservado a 4°C aproximadamente, ya de forma inmediata se procedería purificar el amplificado.

#### **PURIFICACION DEL PRODUCTO DE PCR A PARTIR DE GEL DE AGAROSA:**

Este se realizó por medio del kit denominado “protocolo de extracción rápida de DNA a partir de gel”, de la marca Marligen-Bioscience Inc. número 11456-027. Una vez que se obtenían los purificados se tomaban 2µL para ser visualizados en un gel de agarosa al 1%, a fin de conocer la integridad del DNA y se colocaba en uno de los pozos 2µL de marcador de masa de 100pb. De acuerdo a la intensidad de la banda se realizaron comparativos en cada una de las muestras para establecer la cantidad de DNA que se tenía en cada caso. Las muestras fueron almacenadas a -30°C y posteriormente se realizó la reacción de secuenciación.

#### **SECUENCIACION DEL DNA:**

El exón 11 del gen BRCA1 fue secuenciado utilizando el kit BigDye (Perkin Elmer) en un secuenciador automático de capilar en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## RESULTADOS:

A continuación se muestra la Tabla 2. La edad reportada es de la paciente al momento del estudio.

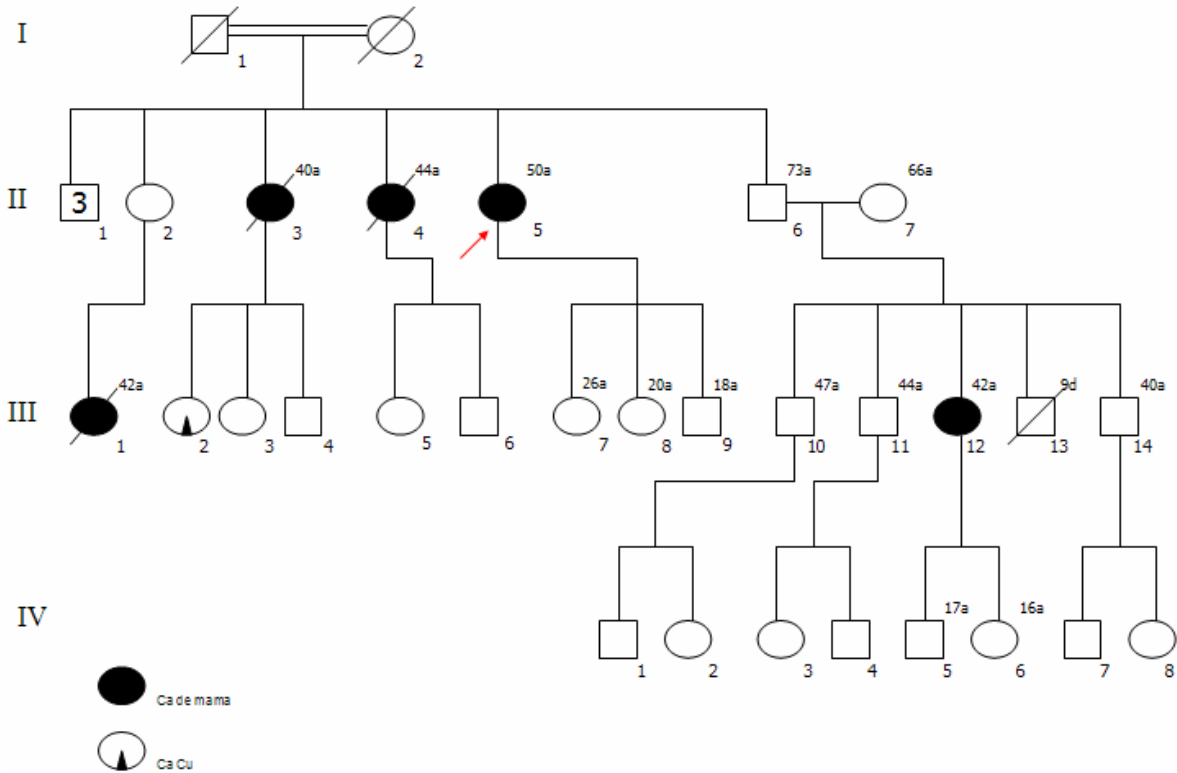
Tabla 2: Características generales de las propositus.

PAC	EDAD años.	TALLA (m)	PESO (kg)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	HISTOPATOLOGIA	FAMILIARES AFECTADOS	LACTANCIA
<b>A</b>	50	1.60	68	26.56	Adenocarcinoma (II)	5	Si
<b>B</b>	23	1.72	62	21.01	Carcinoma ductal (III)	2	Si
<b>C</b>	35	1.68	60	21.27	Adenocarcinoma (II)	2	Si
<b>D</b>	41	1.62	71	27.09	Adenocarcinoma (III)	2	Si

Como se puede apreciar las pacientes A y D presentan como factor de riesgo agregado el sobrepeso, aun cuando para el caso de la variante hereditaria de cáncer de mama no es fundamental para que se presente la enfermedad, es un dato que se debe considerar por ser un factor de riesgo más. Los tipos histológicos están acorde con lo reportado para cáncer de mama hereditario y se muestra en la tabla el estadio. Todas las propositus de estudio tienen descendencia y se documenta lactancia positiva.

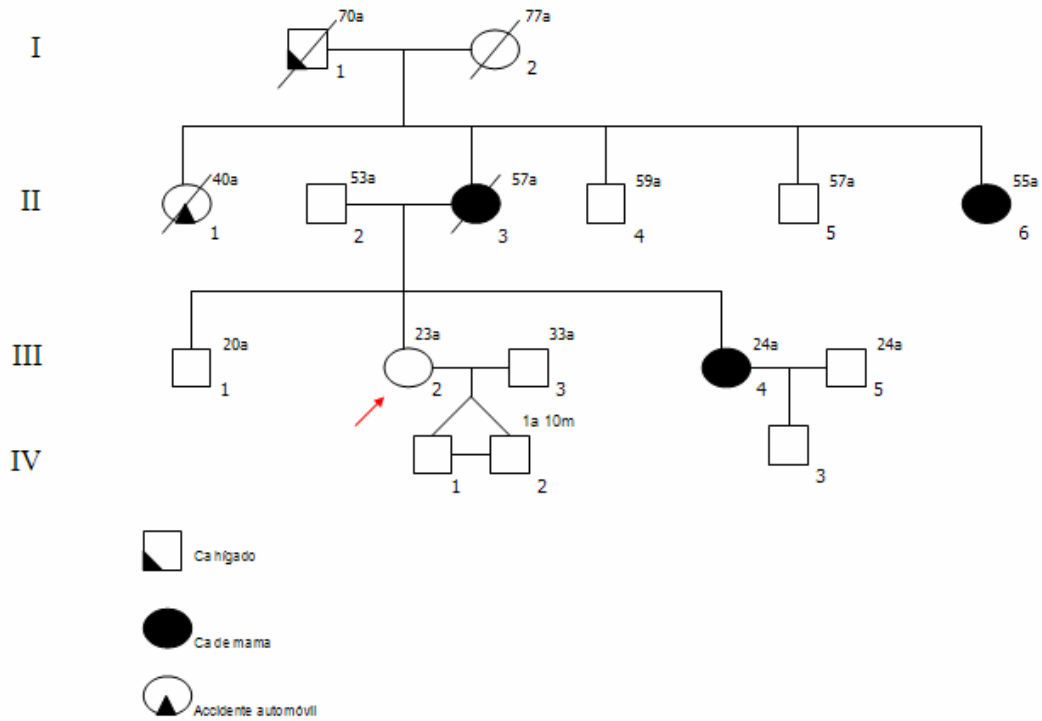
A continuación se muestran las genealogías de las pacientes incluidas en el estudio y se aprecia que reúnen los criterios de inclusión establecidos para este estudio.

## ARBOL GENEALOGICO PROPOSITUS A



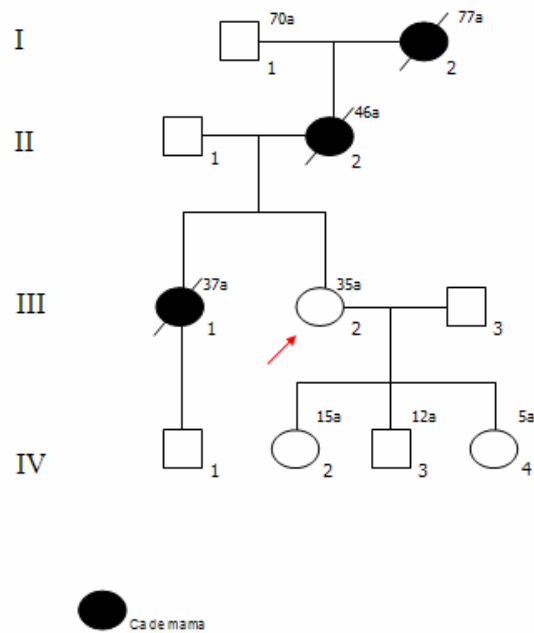
**Figura 3:** Familia A en la que se aprecia modelo de herencia dominante para cáncer de mama. La propositus se encuentra localizada en II-5, se reportó por el Servicio de Patología un resultado de biopsia positivo para adenocarcinoma, a la edad de 49 años. Las pacientes de la segunda generación fueron diagnosticadas con la entidad a la edad de 37 y 38 años respectivamente (II-3 y II-4). Las pacientes de la generación III fueron diagnosticadas a la edad de 36 y 37 años respectivamente (III-1 y III-12).

## ARBOL GENEALOGICO PROPOSITUS B



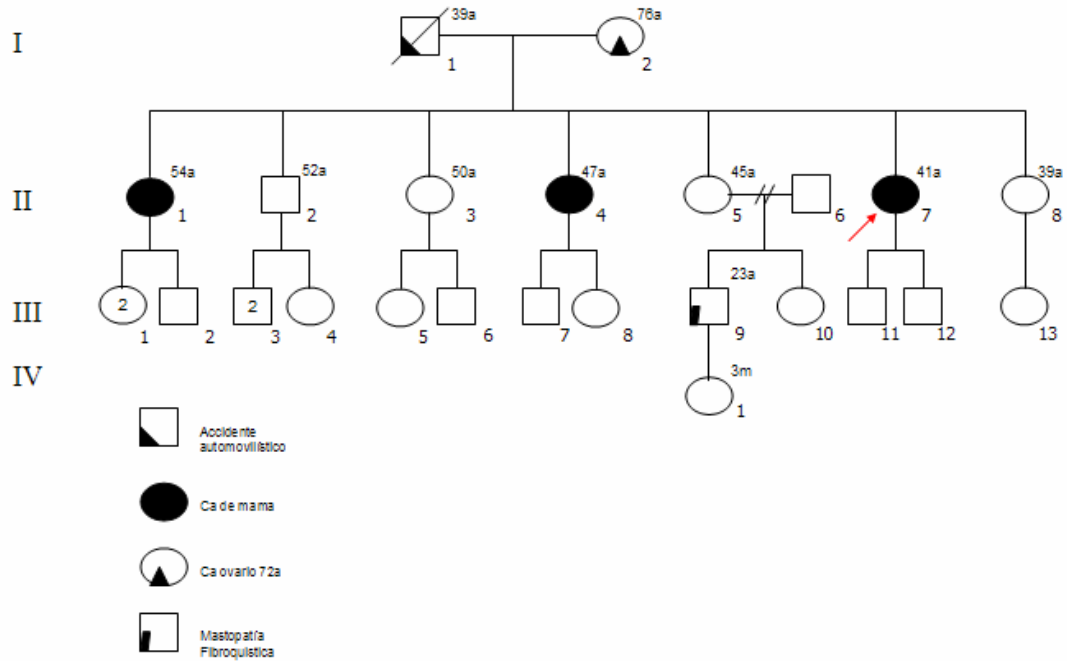
**Figura 4:** Familia B en la que se aprecia modelo de herencia dominante para cáncer de mama. La propositus se encuentra localizada en III-2, actualmente sana. Las pacientes de la segunda generación fueron diagnosticadas con la entidad a la edad de 55 y 51 años respectivamente (II-3 y II-6). La paciente de la generación III fue diagnosticada a la edad de 22 años (III-1 y III-12).

### ARBOL GENEALOGICO PROPOSITUS C



**Figura 5:** Familia C en la que se aprecia modelo de herencia dominante para cáncer de mama. La propositus se encuentra localizada en III-2. La paciente no padece la enfermedad pero cuenta con dos familiares en primer grado con la entidad. La paciente de la primera generación falleció a la edad de 77 años, no se sabe la edad del diagnóstico, la paciente II-2 fue diagnosticada a la edad de 43 años, la paciente III-1 fue diagnosticada a la edad de 35 años.

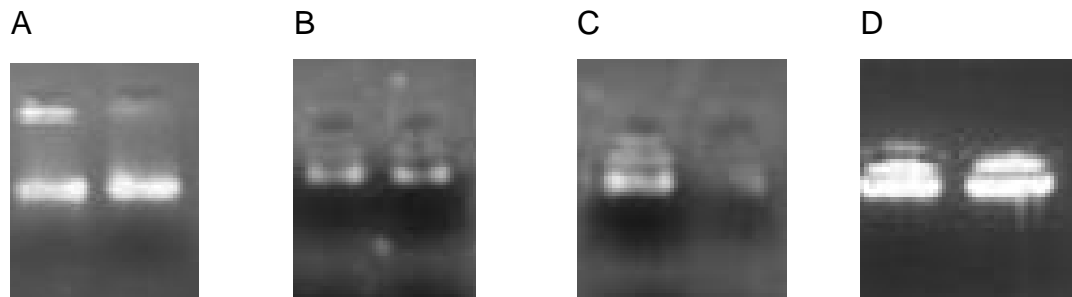
## ARBOL GENEALOGICO PROPOSITUS D



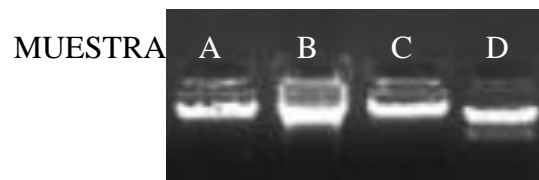
**Figura 6:** Familia D en la que se aprecia modelo de herencia dominante para cáncer de mama. La propositus se encuentra localizada en II-7. La paciente I-2 presento cáncer de ovario a la edad de 72 años. Las pacientes de la segunda generación fueron diagnosticadas con la entidad a la edad de 50, 44 y 38 años respectivamente (II-1, II-4 y II-7).

## AISLAMIENTO DE DNA

De cada una de las participantes se obtuvieron leucocitos a partir de sangre periférica, y mediante el método de Sambrook *et al*, se realizó extracción de DNA total, a continuación se muestran las imágenes de gel para corroborar la integridad del DNA, de cada paciente se obtuvieron 2 alícuotas.



**Figura 7:** Se indican las bandas correspondientes a DNA genómico de las pacientes A, B, C y D. En lo sucesivo nos referiremos a cada paciente con las letras ya indicadas según corresponda.



**Figura 8:** Se presentan las alícuotas utilizadas para la amplificación del exón 11 de *BRCA1*.



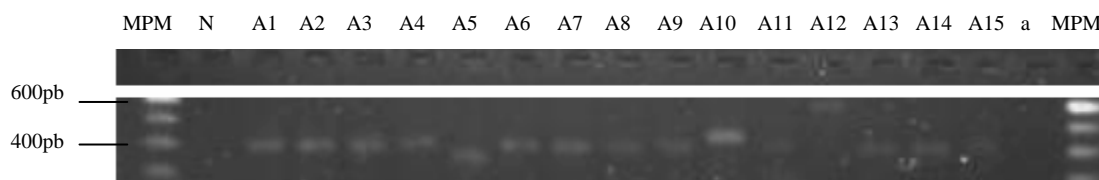
**Tabla 3:** Se muestran las características del DNA genómico, identificadas con las letras A, B, C, D. Absorbancia a 260° y 280° (A 260°, A280°).

Muestra	°A 260	°A280	RELACION DE PUREZA	CONCENTRACION (ng/μL)	VOL μL Para 150 ng/μL.
A	0.291	0.169	1.43	602	0.25
B	0.102	0.055	1.87	255	0.59
C	0.029	0.019	1.52	73	2.06
D	0.123	0.69	1.79	307	0.49

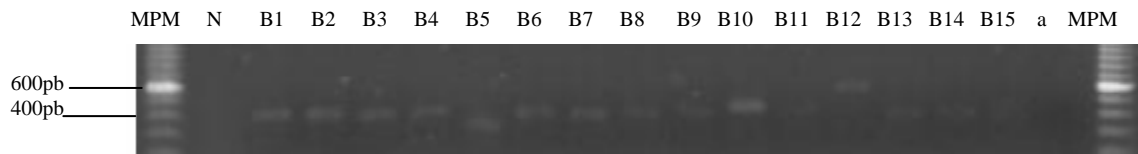
### VERIFICACION DE PRODUCTOS DE AMPLIFICACION MEDANTE GELES DE AGAROSA

Se realizó la amplificación de los fragmentos del exón 11 del gen BRCA1 de acuerdo a las condiciones de cada iniciador (cebador), utilizando 150ng de DNA de cada una de las muestras (descrito en métodos).

Se realizaron geles de agarosa al 2%, con la finalidad de verificar que cada uno de los fragmentos correspondía al tamaño esperado de acuerdo a su diseño. Se cargaron 2μL de cada producto de PCR y se colocó en cada pozo, destinando el primer pozo para el marcador de peso molecular de 100pb. Se muestran los productos de amplificación utilizando la letra correspondiente a la paciente seguida del número de fragmento amplificado.



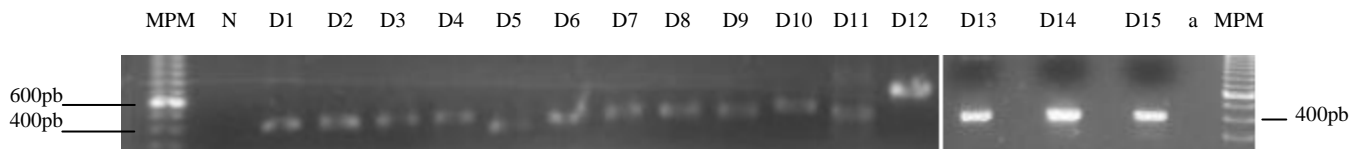
**Figura 9:** Productos de amplificación a partir de DNA de la paciente A, se aprecian los diferentes tamaños de acuerdo al diseño de los iniciadores. El marcador de peso molecular (MPM) es de 100pb y se señala la banda correspondiente al tamaño de 400 y 600pb. N: negativo. a: Agua.



**Figura 10:** Productos de amplificación a partir de DNA de la paciente B, se aprecian los diferentes tamaños de acuerdo al diseño de los iniciadores. El marcador de peso molecular es de 100pb. N: negativo. a: Agua.



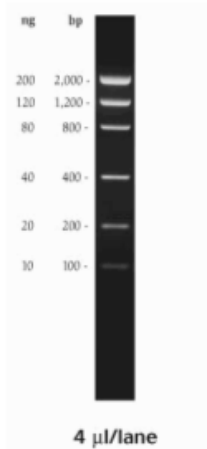
**Figura 11:** Productos de amplificación a partir de DNA de la paciente C, se aprecian los diferentes tamaños de acuerdo al diseño de los iniciadores. El marcador de peso molecular es de 100pb. N: negativo. a: Agua.



**Figura 12:** Productos de amplificación a partir de DNA de la paciente D, se aprecian los diferentes tamaños de acuerdo al diseño de los iniciadores. El marcador de peso molecular es de 100pb. N: negativo. a: Agua.

Posteriormente los productos fueron purificados mediante el Kit denominado “Protocolo de extracción rápida de DNA a partir de gel”, de la marca Marligen-Bioscience Inc. número 11456-027. Una vez obtenidos los purificados se tomaban 2 $\mu$ L para ser visualizados en un gel de agarosa al 1% a fin de conocer la integridad del DNA y se colocó en uno de los pozos 2 $\mu$ L de marcador de masa de 100pb, de acuerdo a la intensidad de la banda se realizaron comparativos en cada

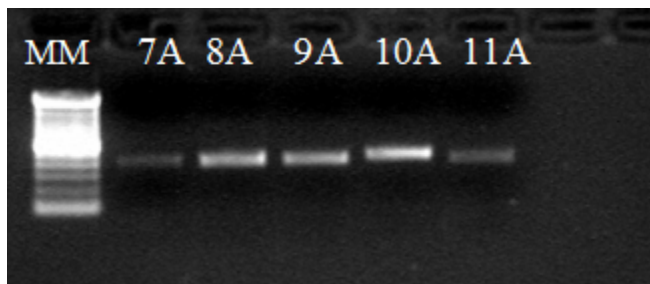
una de las muestras para establecer la cantidad de DNA que se tenia en cada caso. Las muestras fueron almacenadas a -30°C y posteriormente se realizó la reacción de secuenciación.



**Figura 13:** Marcador de masa:

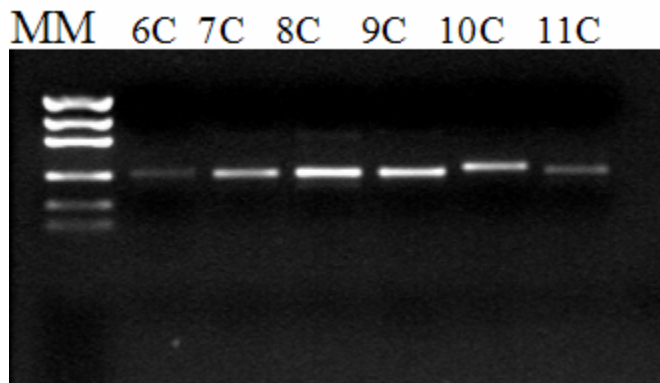
La banda de 100pb equivale a 10ng de DNA  
 La banda de 200pb equivale a 20ng de DNA  
 La banda de 400pb equivale a 40ng de DNA  
 La banda de 800pb equivale a 80ng de DNA

De acuerdo a la intensidad se calcula la cantidad de DNA obtenido del purificado del producto de PCR a partir de gel.



Gel de agarosa a 1.5%

7A 20ng  
 8A 40ng  
 9A 40ng  
 10A 40ng  
 11A 20ng



Gel de agarosa a 1.5%

6C 20ng  
 7C 40ng  
 8C 80ng  
 9C 80ng  
 11C 20ng

**Figura 14:** Se muestra la cantidad de DNA obtenida a partir del purificado del producto de PCR, mediante la técnica previamente descrita.

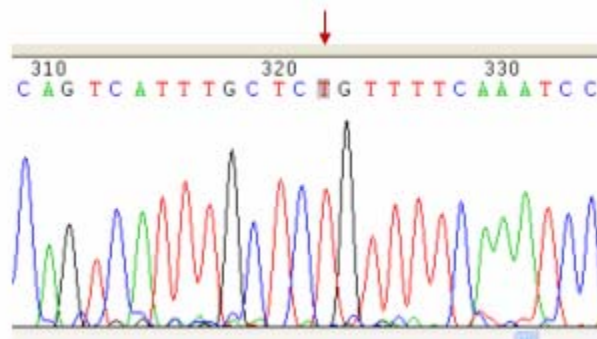
## SECUENCIACION DEL DNA:

El exón 11 del gen BRCA1 fue secuenciado utilizando el kit BigDye (Perkin Elmer) en un secuenciador automático de capilar, encontrando lo siguiente en las muestras analizadas.

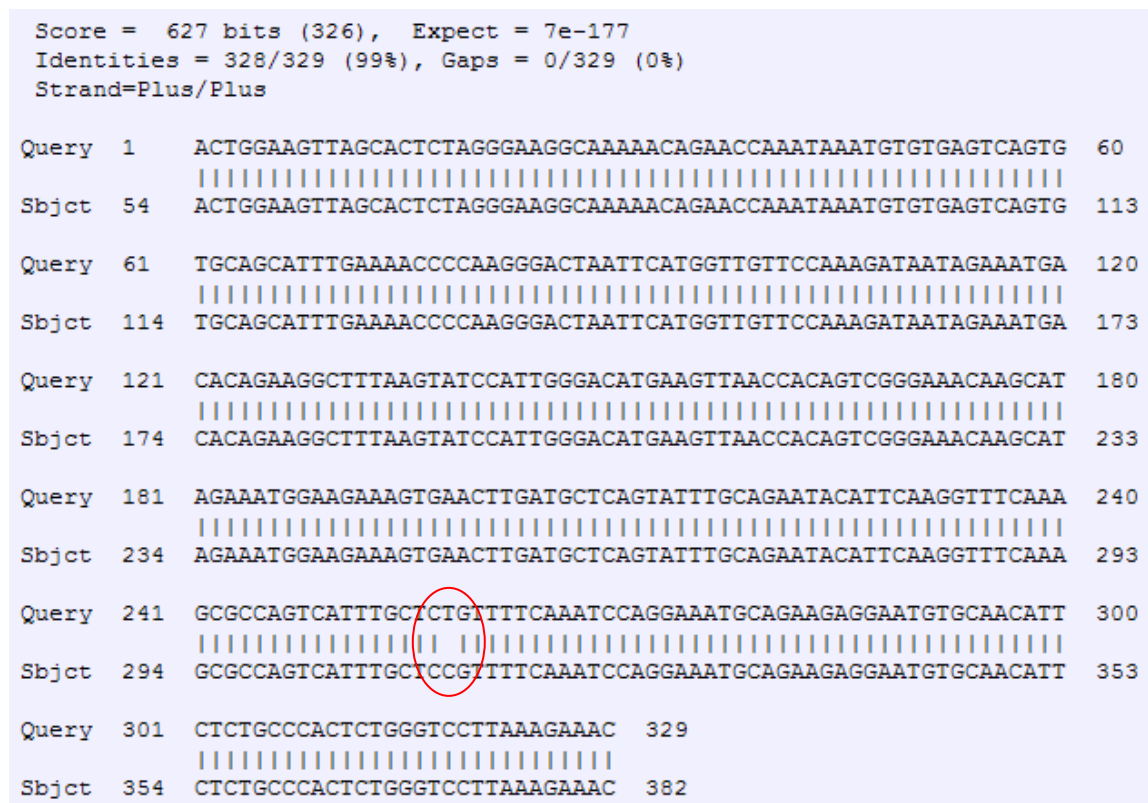
PACIENTE	REPORTE
A	Polimorfismo <a href="#">33133:C/T</a> en estado homocigoto (rs799917)
B	Sin cambios en el exón 11
C	Polimorfismo <a href="#">33133:C/T</a> en estado heterocigoto (rs799917)
D	Si cambios en el exón 11

**Tabla 4:** Dos de las muestras analizadas presentan alteraciones en la secuencia de nucleótidos, se encontró un polimorfismo de nucleótido sencillo (de sus siglas en inglés SNP) conocido como rs799917 en la base de datos del Gene Bank. Las otras dos muestras presentaron la secuencia idéntica a la original.

### PACIENTE A:



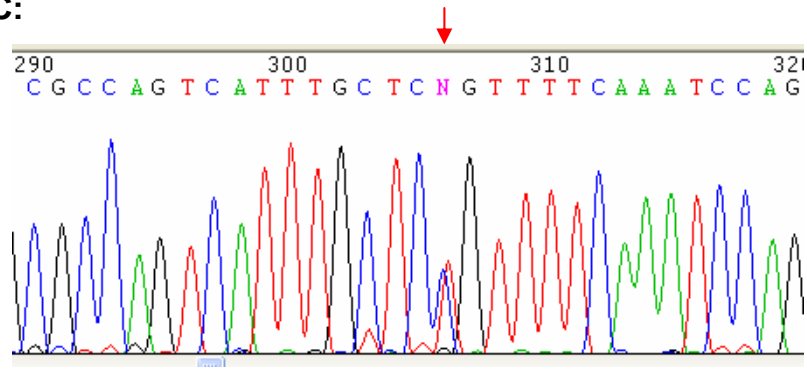
**Figura 15:** La secuencia que se muestra corresponde al segmento 9 de la paciente A, en el cual se encontró un cambio en la secuencia de nucleótidos en la posición 322, en la secuencia original se esperaba una citosina (C) misma que no se aprecia y en su lugar se encuentra una timina (T), esto origina un cambio en la secuencia del mRNA de CCG a CUG por lo que se codifica un aminoácido Leucina (Leu) en lugar del correspondiente Prolina (Pro). Ambos son aminoácidos no polares. En la imagen se aprecia la timina en estado homocigoto.



**Figura 15.1:** Una vez que se alinea con la secuencia original se aprecia que las secuencias presentan un porcentaje de identidad del 99%, sin espacios entre ellas; se señala con un círculo rojo la presencia del cambio.

Q: paciente. S: Secuencia original.

**PACIENTE C:**



**Figura 16:** La secuencia que se muestra corresponde al segmento 9 de la paciente C, en el cual se encontró un cambio en la secuencia de nucleótidos en la posición 306, en la secuencia original se esperaba una citosina (C) misma que se aprecia con la cresta en color azul, pero en el mismo lugar se aprecia una timina

(T) en color rojo, esto origina un cambio en la secuencia del mRNA de CCG a CUG por lo que se codifica un aminoácido leucina (Leu) en lugar del correspondiente prolina (Pro). Ambos son aminoácidos no polares. En la imagen se aprecia el cambio en estado heterocigoto.

```

Score = 665 bits (346), Expect = 0.0
Identities = 347/348 (99%), Gaps = 0/348 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAGTATCTCGTTACTGGAAGTTAGCACTCTAGGGAAGGCCAAAAACAGAACCAAATAAATG 60
      |||
Sbjct 42 AAGTATCTCGTTACTGGAAGTTAGCACTCTAGGGAAGGCCAAAAACAGAACCAAATAAATG 101

Query 61 TGTGAGTCAGTGTGCAGCATTGAAAACCCCAAGGGACTAATTCATGGTTGTTCCAAAGA 120
      |||
Sbjct 102 TGTGAGTCAGTGTGCAGCATTGAAAACCCCAAGGGACTAATTCATGGTTGTTCCAAAGA 161

Query 121 TAATAGAAATGACACAGAAGGCTTTAAGTATCCATTGGGACATGAAGTTAACCACAGTCG 180
      |||
Sbjct 162 TAATAGAAATGACACAGAAGGCTTTAAGTATCCATTGGGACATGAAGTTAACCACAGTCG 221

Query 181 GGAAACAAGCATAGAAATGGAAGAAAGTGAAGTGGTCTCAGTATTTGCAGAATACATT 240
      |||
Sbjct 222 GGAAACAAGCATAGAAATGGAAGAAAGTGAAGTGGTCTCAGTATTTGCAGAATACATT 281

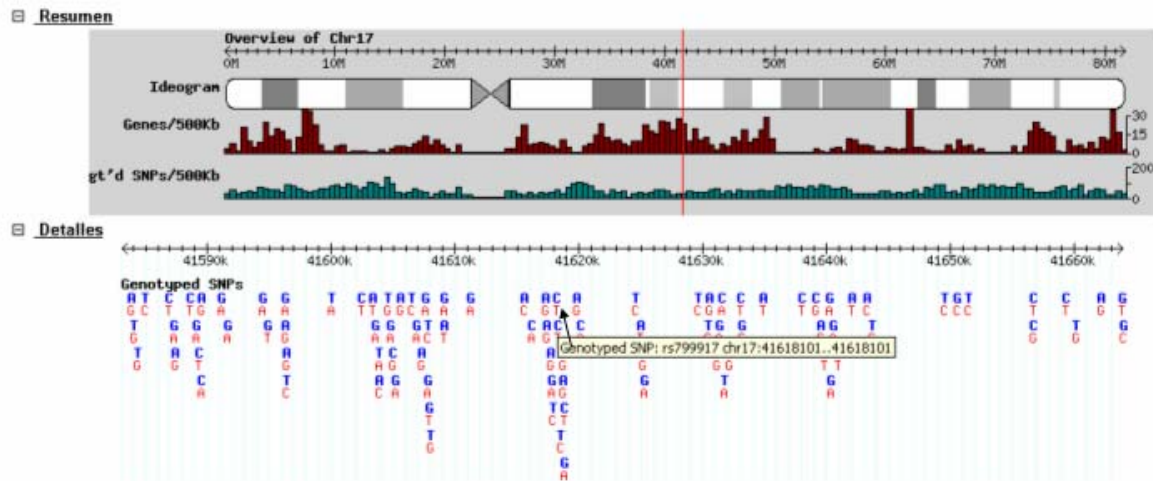
Query 241 CAAGGTTTCAAAGCGCCAGTCATTGCTCNGTTTCAAATCCAGGAAATGCAGAAGAGGA 300
      |||
Sbjct 282 CAAGGTTTCAAAGCGCCAGTCATTGCTCCGTTTCAAATCCAGGAAATGCAGAAGAGGA 341

Query 301 ATGTGCAACATTCTCTGCCCACTCTGGGTCCTTAAAGAAACAAAGTCC 348
      |||
Sbjct 342 ATGTGCAACATTCTCTGCCCACTCTGGGTCCTTAAAGAAACAAAGTCC 389

```

**Figura 16.1:** Una vez que se alinea con la secuencia original se aprecia que las secuencias presentan un porcentaje de identidad del 99%, sin espacios entre ellas; se señala con un círculo rojo la presencia del cambio.

El SNP rs799917 ha sido reportado en la literatura, se ha caracterizado de la siguiente manera para su consulta.



**Figura 17:** Se señala con una flecha el polimorfismo y el número asignado que es rs799917 que tiene como sinónimos a TSC1750018 ó 33133 C/T, según la base de datos consultada. Además se muestran los polimorfismos en el cromosoma 17 localizados en rangos de 10Kb, esto nos da un panorama sobre la localización del polimorfismo y su relación con otros (Tomado de HAP-MAP-PROJECT, referencia 35).

### Linkage disequilibrium report: SNP rs799917

<b>Focus: SNP</b>	<a href="#">rs799917</a> (dbSNP 126)	
<b>Prediction method</b>	LD values were calculated by a pairwise estimation between SNPs genotyped in the same individuals and within a 100kb window. An established method was used to estimate the maximum likelihood of the proportion that each possible haplotype contributed to the double heterozygote.	
<b>Population</b>	<b>Population:</b> <a href="#">CNUH-GRCHD:Korean_POP</a> [size: unknown] <b>Description:</b> Continent:East Asia,Nation:Korea,Phenotype:Normal <b>SNP in tagged set for this population:</b> Yes <b>Super-population:</b> EAST ASIA [size: unknown] <b>Description:</b> Samples from Eastern and South Eastern Mainland Asia, Northern Pacific Island Nations.	
<b>Population</b>	<b>Population:</b> <a href="#">GENETICS_UKB:migraine47</a> [size: unknown] <b>Description:</b> Continent:europe,Nation:all,Phenotype:migraine <b>SNP in tagged set for this population:</b> Yes <b>Super-population:</b> EUROPE [size: unknown] <b>Description:</b> Samples from Europe north and west of Caucasus Mountains, Scandinavia, Atlantic Islands.	
<b>Population</b>	<b>Population:</b> <a href="#">PERLEGEN:AFD_EUR_PANEL</a> [size: unknown] <b>Description:</b> These 24 samples from the Coriell Cell Repository are primarily of,European American descent <b>SNP in tagged set for this population:</b> Yes <b>Super-population:</b> NORTH AMERICA [size: unknown] <b>Description:</b> All samples north of Tropic of Cancer	

**Figura 18:** Se muestra las poblaciones en las cuales ha sido reportado el polimorfismo, la cuales como se puede apreciar han sido descritas en diferentes regiones del mundo sin embargo no se ha asociado a enfermedad alguna por si solo. (Tomado de ENSEMBL-GENOME-BROWSER referencia 36).



## DISCUSION

No se conoce la frecuencia del polimorfismo del SNP rs799917, en población mexicana, tampoco se sabe si este se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, dado que no se ha realizado algún estudio al respecto. Esto resulta interesante y plantea nuevos retos ya que aun cuando se ha descrito en diversas poblaciones su papel no ha sido dilucidado ampliamente y sería importante conocer la frecuencia en nuestra población.

Aún no se documenta si la sustitución del aminoácido Prolina por Leucina tiene algún efecto particular sobre la proteína BRCA1, dado que no se conoce a nivel funcional de la misma, alguna repercusión, si bien ambos aminoácidos pertenecen al grupo de los no polares y en teoría dicho cambio no afecta de manera drástica la proteína, desconocemos si genera algún impedimento estérico sobre la estructura secundaria de la proteína, es decir que las propiedades estructurales de la misma cambien y por ende repercutan en su funcionamiento (37,38).

En un estudio practicado por Cox *et al* 2005 (39), en el que estudiaron un haplotipo conformado por 4 SNPs del gen BRCA1 que incluía al polimorfismo rs799917, reportaron que éste estaba asociado aproximadamente en un 20% de incremento en el riesgo de cáncer de mama esporádico en la población general. Sin embargo la variante funcional responsable para la asociación no estaba del todo clara. Por otra parte un estudio realizado por Freedman *et al* 2005 (40), realizó una cohorte multiétnica en mujeres utilizando 28 polimorfismos de nucleótido sencillo entre ellos 9 del gen BRCA1 y estaba incluido el SNP rs799917, con el fin de establecer asociaciones de haplotipos de BRCA1 y riesgo para cáncer de mama, en el cual no se encontró asociación estadísticamente significativa.

Por lo anterior podemos darnos cuenta de que no hay resultados concluyentes, es bien sabido que las diferencias en cuanto a la frecuencia y tipo de polimorfismos de nucleótido sencillo varían considerablemente de una población a otra.

Por otro lado no se encontraron mutaciones en el exón 11 del gen BRCA1, no podemos afirmar categóricamente que la frecuencia de mutaciones en el gen BRCA1 se encuentra en una proporción baja, dado que solo se analizó el exón 11, por lo que es importante analizar la secuencia del gen completo, sin embargo aún cuando éste se encontrara sin alteraciones a nivel de su secuencia, por el método empleado, no se pueden detectar alteraciones en los patrones de metilación o defectos a nivel del mRNA.

Es importante mencionar que en ninguna de las pacientes se ha presentado cáncer de ovario, solo en la familia D se documenta la presencia de un familiar en segundo grado con cáncer de ovario pero la paciente falleció a la edad de 76 años es probable que tenga relación con el padecimiento familiar sin embargo la edad de presentación que fue a los 72 años.

### **CONCLUSIONES:**

Se encontró el polimorfismo rs799917, llama la atención que se presenta en dos de las 4 muestras analizadas y sería importante conocer la frecuencia del mismo tanto en mujeres sanas como en afectadas con cáncer de mama. Así mismo conocer los polimorfismos presentes en el gen BRCA1 de la población mexicana para posteriormente investigar si estos pueden conferir un riesgo mayor para cáncer de mama o por el contrario un factor de protección.



## **ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

Consentimiento informado para el protocolo:

### **“BÚSQUEDA DE MUTACIONES EN EL EXON 11 DEL GEN BRCA1 EN FAMILIAS MEXICANAS CON ANTECEDENTE DE CANCER DE MAMA HEREDITARIO “.**

#### 1. Información sobre el estudio.

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación, el cual consiste en analizar las muestras de sangre de tanto de pacientes afectadas como de mujeres en riesgo, que pertenezcan a familias con historia de cáncer de mama hereditario, para conocer la presencia o no de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. Dichos genes cuando están alterados son de susceptibilidad para la presentación del cáncer de mama hereditario, para lo cual es importante conocer si las familias con dicha enfermedad presentan mutaciones en alguno de estos genes y así brindar asesoramiento genético.

Por este conducto se le solicita su consentimiento informado para realizar la búsqueda de mutaciones en los genes denominados BRCA1 y BRCA2 en sangre periférica que servirá para conocer la presencia de alteración de dichos genes en mujeres de familias mexicanas con historia de cáncer de mama hereditario.

#### 2. Procedimiento.

Se tomarán 5 ml de sangre periférica del paciente siempre y cuando reúnan los criterios de inclusión establecidos previamente y solo si desean participar de manera libre en este protocolo de investigación. Al término del estudio, el investigador proporcionará la información completa sobre los resultados.

### 3. Beneficios.

El estudio “Búsqueda de mutación en los genes BRCA1 y BRCA2 en familias mexicanas con antecedente de cáncer de mama hereditario“ constituye una herramienta diagnóstica para aquellas pacientes y mujeres en riesgo de dichas familias, para poder brindar asesoramiento genético con respecto al riesgo de predisposición. A quienes presenten mutaciones se ofrecerá vigilancia y manejo por parte del servicio de tumores de mama del hospital de oncología de centro médico nacional siglo XXI.

### 4. Confidencialidad.

La información que se obtenga de este estudio, incluyendo registros clínicos y/o de hospital será tratada como privilegiada y confidencial y no será divulgada o revelada a ninguna persona sin su consentimiento por escrito.

### 5. Participación / suspensión.

La participación de usted en este estudio es voluntaria. Usted está en libertad de retirarse del estudio en cualquier momento. Su decisión de rehusarse a participar o suspender el estudio no afectará la calidad ni disponibilidad de la atención médica.

### 6. Consentimiento.

El doctor Fabio Salamanca Gómez especialista en Genética Médica se ha encargado de explicarle los pormenores del mismo y los riesgos y beneficios potenciales que este implica. Se ha dado una plática informativa a usted como participante del estudio para dar a conocer los beneficios anteriormente comentados así como la importancia de realizar el estudio. Usted ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tiene alguna duda deberá comunicarse con los responsables del estudio.

Al firmar este documento, usted accede voluntariamente a participar en este estudio.

Lugar: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Firma del paciente: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_

## **ANEXO 2. MANEJO DE LAS PACIENTES QUE RESULTEN CON ALGUNA MUTACIÓN EN LOS GENES BRCA1 Y BRCA2.**

Las pacientes que se incluirán en el estudio son derechohabientes del IMSS, aquellas que resulten con alguna mutación en los genes BRCA1 o BRCA2 serán evaluadas por el servicio de tumores de mama del Hospital de Oncología del CMNSXXI, de la siguiente manera:

1.- Pacientes menores de 30 años de edad se realizará examen físico de manera semestral, ultrasonido mamario bilateral, ultrasonido ovárico, mamografía y lavado ductal de forma anual (los cuales serán seriados, es decir con un intervalo de 4 meses). En caso de no encontrar alteración alguna se evaluará de la misma manera hasta la edad de 30 años. En caso de encontrar algún nódulo mamario las pacientes pasaran a una segunda fase de estudio el cual consistirá en realizar gamagrama mamario o imagen por resonancia magnética según sea cada caso y a consideración del servicio de tumores de mama, dependiendo del resultado de esta última se procederá a cirugía. Se realizará Ca19-9 de forma anual.

Cabe mencionar que en la platica informativa que se les ofrecerá, se comentará que si en algún momento alguna de las pacientes independientemente de su edad decide mastectomía profiláctica bilateral, ésta se realizará. Del mismo modo se ofrecerá la realización de mastectomía a aquellas pacientes quienes ya han cursado con tumoración unilateral por el potencial riesgo que representa el ser portadora de mutación en alguno de los genes ya comentados previamente y desarrollar cáncer de mama contralateral.

2.- Para las pacientes mayores de 30 años de edad se realizará examen físico de manera semestral, ultrasonido mamario bilateral y ovárico cada 6 meses. Mamografía y lavado ductal de forma anual. En caso de encontrar algún nódulo mamario las pacientes pasarán a una segunda fase de estudio el cual consiste en realizar gamagrama mamario o imagen por resonancia magnética según sea cada caso a consideración de servicio de tumores de mama, posteriormente cirugía.

El Dr. Sinuhé Barroso Bravo jefe del servicio de tumores de mama del Hospital de Oncología del Centro Medico Nacional Siglo XXI, quien es colaborador de este proyecto será encargado de dicha vigilancia.

En caso de incluir alguna paciente que no sea derechohabiente del IMSS ésta será canalizada al Hospital General de México lugar en el cual se realizará esta vigilancia

### ANEXO 3. CLASIFICACION TNM DE CANCER DE MAMA.

#### Tumor primario

Las definiciones para clasificar el tumor primario (T) son las mismas para la clasificación clínica y patológica. Si las mediciones son hechas por exploración física, el médico debe usar los estadios mayores (T1, T2 o T3). Si se realizan otras mediciones tales como la mamografía o estudio histopatológico puede usarse los subgrupos de los estadios mayores (9).

Tx	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
Tis (DCIS)	Carcinoma Ductal in situ
Tis (LCIS)	Carcinoma lobular in situ
Tis (Paget)	Enfermedad de Pager del pezón sin tumor
T1	Tumor de 2 cm o menor
T1mic	Microinvasión de 0.1 cm o menos
T1a	Tumor mayor de 0.1 cm y menor de 0.5 cm
T1b	Tumor mayor de 0.5 cm y menor de 1 cm
T1c	Tumor mayor de 1 cm y menor de 2 cm
T2	Tumor mayor de 2 cm y menor de 5 cm
T3	Tumor mayor de 5 cm
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión a pared torácica o piel
T4a	Extensión a pared torácica sin incluir músculo pectoral
T4b	Edema (incluye piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama
T4c	Ambos T4a y T4b
T4d	Carcinoma inflamatorio

#### Ganglios linfáticos regionales

##### Clínico

NX	Ganglios linfáticos no pueden ser evaluados
N0	Sin metástasis a ganglios linfáticos
N1	Metástasis a ganglios linfáticos axilares, móviles ipsilaterales
N2	Metástasis a ganglios linfáticos axilares, fijos o ganglios linfáticos mamaros internos en ausencia de ganglios linfáticos axilares.
N2a	Metástasis en ganglios linfáticos axilares ipsilaterales fijos
N2b	Metástasis en ganglios linfáticos mamaros internos
N3	Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares con o sin afección de ganglios linfáticos axilares
N3a	Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales
N3b	Metástasis en ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamaros internos ipsilaterales
N3c	Metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales



Patológico (pN)

pNX	No pueden evaluarse ganglios linfáticos regionales
pN0	No hay metástasis a ganglios linfáticos histológicamente. Pruebas adicionales (moleculares o inmunohistoquímicas negativas).
pN0(i-)	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales. Inmunohistoquímica negativa.
pN0 (i+)	No hay metástasis histológicamente en ganglios linfáticos regionales. Inmunohistoquímica positiva.
pN0 (mol-)	No hay metástasis a ganglios linfáticos regionales. RT-PCR negativa.
pN0 (mol+)	No hay metástasis histológicamente en ganglios linfáticos regionales. RT-PCR positiva.
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y/o ganglios mamaros internos con enfermedad microscópica detectada por disección de ganglio centinela pero no identificable clínicamente.
pN1mic	Micrometástasis (mayor de 0.2 mm y menor de 2.0 mm)
pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares
pN1b	Metástasis en ganglios mamaros internos con enfermedad microscópica detectada por ganglio centinela
pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamaros internos
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares o clínicamente con ganglios mamaros internos
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos axilares
pN2b	Metástasis en apariencia clínica en ganglios mamaros internos en ausencia de ganglios linfáticos axilares
pN3	Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares
pN3a	Metástasis en 10 o más ganglios linfáticos axilares o metástasis a ganglios infraclaviculares ipsilaterales
pN3b	Metástasis clínicamente aparentes en ganglios mamaros internos ipsilaterales en presencia de 1 o más ganglios linfáticos axilares positivos; o en más de 3 ganglios linfáticos axilares y en ganglios mamaros internos con enfermedad microscópica detectada por un ganglio centinela sin afección clínica aparente.
pN3c	Metástasis en ganglios superclaviculares ipsilaterales

Metástasis a distancia

MX	No puede evaluarse metástasis a distancia
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia

Clasificación por estadios

ESTADIO 0	Tis	N0	M0
ESTADIO I	T1	N0	M0
ESTADIO IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
ESTADIO IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
ESTADIO IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
ESTADIO IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
ESTADIO IIIC	CUALQUIER T	N3	M0
ESTADIO IV	CUALQUIER T	CUALQUIER N	M1

#### **ANEXO 4:**

#### **EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE CON CLORURO DE SODIO Y SDS**

Ver referencia: 34.

Extracción de DNA de sangre con cloruro de sodio y SDS.

1. Tomar de 5-10ml de sangre periférica de un individuo. Transferirla a tubo de cristal con 0.2ml de EDTA (pH 7.6). No usar heparina porque inhibe diversas enzimas empleadas en Biología Molecular.
2. Centrifugar la muestra a 3000 rpm, 10 min., a temperatura ambiente.
3. Tomar con una pipeta Pasteur o con pipeta graduada (preferentemente usar pipetas que empleen puntas azules), la capa de células blancas, localizadas en la superficie del paquete (interfase), sin importar que haya eritrocitos contaminantes y pasarla a otro tubo. Preferente tubos plásticos, como los eppendorf o falcon.
4. Para tubos eppendorf agregar al tubo 1.5ml de solución RCLB, para tubos falcón agregar 10ml de la misma solución. Mezclar fuertemente, de preferencia usar el vortex (agitador).
5. Centrifugar la muestra a 3000rpm, 10 min., a temperatura ambiente.
6. Eliminar el sobrenadante, que corresponde a los eritrocitos lisados.
7. Repetir los pasos 4, 5 y 6, dos o tres veces más.
8. Resuspender el botón de células blancas en 886 $\mu$ l de NaCl 5mM, agitando fuertemente con pipeta graduada.
9. Dividir la muestra en dos tubos eppendorf.
10. Agregar a cada tubo 46 $\mu$ l de SDS al 10%. Agitar el tubo fuertemente, sin usar vortex.
11. Agregar a cada tubo 308 $\mu$ l de NaCl saturado. Agitar el tubo fuertemente, sin usar vortex.
12. Centrifugar los tubos 15 min. a 15,000rpm. Tomar el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo eppendorf.
13. Realizar 2 extracciones fenólicas (25:24:1 fenol -cloroformo-isoamílico)
14. Precipitar el DNA con un volumen de isopropanol o dos volúmenes de etanol absoluto.

15. Lavar la pastilla de DNA dos veces con etanol al 70%.

16. Resuspender la pastilla de DNA en 500 µl de agua desionizada esterilizada.

Comentarios.

Componentes de las soluciones empleadas.

Sol. RCLB.      10 mM de Tris HCl pH 7.6.  
                    5 mM de Mg Cl<sub>2</sub>.  
                    10 mM de NaCl.

Fenol-cloroformo-isoamílico (25-24-1).

25 ml de fenol destilado y saturado con Tris pH 8.0  
24 ml de cloroformo y  
1 ml de alcohol isoamílico.

La extracción con fenol-cloroformo-isoamílico es la forma comúnmente utilizada para eliminar proteínas. Las extracciones se realizan de la siguiente forma:

Agregar un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico 25-24-1, al tubo donde se tiene el DNA. Mezclar suavemente y centrifugar a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Transferir la parte superior (es donde se encuentra el DNA) a otro tubo y repetir la extracción una vez más.

Precipitación del DNA. Una vez que se agrega el alcohol mezclar suavemente. El DNA se hará visible.

Los lavados del DNA consisten en agregar al tubo donde se encuentra el DNA, 1 ml de alcohol al 70%, invertir el tubo suavemente y centrifugarlo a 15000 rpm, 5 min. Eliminar el sobrenadante y repetir el lavado una vez más.

Sí el DNA no sé resuspende bien en el agua, calentar la muestra a 65°C de 5-15 min.

La integridad y concentración del DNA se puede definir mediante electroforesis en gel de agarosa y/ o por la lectura de absorbancia a 269 nm, en un espectro con UV.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Judy E. *et al.* Hereditary Cancer Predisposition Syndromes. *J Clin Oncol* 2005; 23:276-292.
2. Thorlacius S. *et al.* Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population. *Am J Hum Genet* 60:1079-1084, 1997.
3. Unger MA *et al.* Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation- sensitive gel electrophoresis or sequencing. *Am J Hum Genet* 67:841-850, 2000.
4. Estadísticas demográficas. Cuaderno número 14. INEGI, edición 2002.
5. IMSS. Boletín Estadístico Anual de Mortalidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Mortalidad General por Causas agrupadas según magnitud 1996.
6. Ruiz-Flores. *et al.* Genética del cáncer de mama. BRCA1 y BRCA2: Los principales genes de predisposición a la enfermedad. *Rev Invest Clin* 2001; 53: 46-64.
7. Steven A. *et al.* Prevention and Management of Hereditary Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:1656-1663.
8. Thull D. *et al.* Recognition and Management of Hereditary Breast Cancer Syndromes. *The Oncologist* 2004; 9:13-24.
9. Lawrence M. *et al.* Current Medical Diagnosis and Treatment, USA 2006. Lange. 41a Ed. pp 615-616
10. Instituto Mexicano del Seguro Social. Información. DTIES. Morbilidad < en línea> 2005 <01/08/06> disponible en <http://www.imss.gob.mx/dpm/dties/>
11. Kriegue *et al.* Efficacy of MRI and Mammography for Breast-Cancer Screening in Women with a Familial or Genetic Predisposition. *New J Engl Med.* 2004; 351(5), 427-437.
12. Acea B. Implicaciones éticas de los test BRCA1/2 en el estudio de la predisposición al cáncer de mama. *Cir Esp* 2003;73(5):309-13.

13. Lynch HT *et al.* Insurance adjudication favouring prophylactic surgery in hereditary breast-ovarian cancer syndrome. *Gynecol Oncol* 1995;57:23-6.
14. Calderon AL *et al.* Clinical follow up of mexican women with early onset of breast cancer and mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Salud Publica Mex.* 2005 Mar-Apr;47:110-5.
15. Steven A. *et al.* BRCA1 and BRCA2: 1994 and Beyond. *Nature rev* 2004; 4:665-677.
16. Allan Balmain *et al.* The genetics and genomics of cancer. *Nature genet* 2003; 33:238-244.
17. Thompson L. *et al.* Recombinational DNA repair and human disease. *Mutation Res* 2002; 509, 49-78
18. Piri L. *et al.* BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Molec Genet* 2001; 10: 705-713.
19. Pellegrini L. *et al.* Insights into recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 2002; 420: 287-293.
20. Grompe M. *et al.* Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Molec Genet* 2001: 2253-2259.
21. Ganesan S. *et al.* BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 2002;111:393-405.
22. Witt E. *et al.* D-Day for BRCA2. *Science* 2002; 297: 534.
23. Malgorzata Z. *et al.* Breast cancer and Fanconi anemia: what are the connections?. *Trends Molec Medicine* 2002; 8: 458-460.
24. Ashok R. Tracing the Network Connecting BRCA and Fanconi Anaemia Proteins. *Nature rev* 2004; 4:266-276.
25. Bing-Bing S. *et al.* The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408: 433-439.
26. Meijers-Heijboer H. *et al.* Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a *BRCA1* or *BRCA2* mutation. *New Engl J Med* 2001; 345:159-164.
27. Rebbeck TR. *et al.* Bilateral prophylactic mastectomy in carriers of *BRCA1* and *BRCA2* mutations. *J Clin Oncol* 2004; 22:1055-1062.

28. Metcalfe K. *et al.* Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 2004; 22:2328-2335.
29. Kauff ND. *et al.* Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a *BRCA1* or *BRCA2* mutation. *New Engl J Med* 2002; 346:1609-1615.
30. Narod S A. *et al.* Tamoxifen and the risk of contralateral breast cancer in *BRCA1* and *BRCA2* carriers. *Lancet* 2000; 356:1876-1881.
31. García H N. *et al.* A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor simples of Mexican females. *BMC Cancer* 2005, 1471-2407 5:93
32. López Muñoz E. *et al.* Expresión del gen Bik en células sanguíneas de mujeres mexicanas sanas y con cáncer de mamario en diferentes estadios. Tesis para obtener el grado de Especialista en Genética Médica (2004). Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI.
33. Valladares A. *et al.* Identification of chromosomal changes with comparative genomic hybridization in sporadic breast cancer in Mexican women. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004 Jul 15; 152(2): 163-166.
34. Sambrook et al. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, third edition 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
35. International HapMap Project.  
[http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap20\\_B35/](http://www.hapmap.org/cgi-perl/gbrowse/hapmap20_B35/)
36. Ensembl Genome Browser.  
[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/ldview?snp=rs799917;w=20000;bottom=opt\\_pop\\_PERLEGEN:AFD\\_EUR\\_PANEL:on](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/ldview?snp=rs799917;w=20000;bottom=opt_pop_PERLEGEN:AFD_EUR_PANEL:on)
37. Savas S. *et al.* Phosphorylation states of cell cycle and DNA repair proteins can be altered by de nsSNPs. *BMC Cancer.* 2005, 5:107; 1471-1407.
38. Rollinson S. *et al.* High-Troughput Association testing on DNA Pools to Identify Genetic Variants that Confer Susceptibility to Acute Mieloid Leukemia. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev.* 2004; 13: 5; 795-800.
39. Cox G *et al.* Haplotype analysis of common variants in the BRCA1 gene and risk of sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research.* 2005: 7, 2. 171-175.
40. Freedman M. *et al.* A Haplotype-Based Case-Control Study of BRCA1 and Sporadic Breast Cancer Risk. *Cancer Res* 2005, 65: 16; 7516-7522.