



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN DE ARREGLOS MOLECULARES DE LOS GENES BRCA1 Y BRCA2, Y
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN LOS GENES P53 Y P21 EN
CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO, EN PACIENTES DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. HERNÁNDEZ VÁZQUEZ ALFONSO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN DE ARREGLOS MOLECULARES DE LOS GENES BRCA1 Y BRCA2, Y
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN LOS GENES P53 Y P21 EN
CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO, EN PACIENTES DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. HERNÁNDEZ VÁZQUEZ ALFONSO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/770/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas y Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de marzo de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **HERNÁNDEZ VÁZQUEZ ALFONSO** con número de cuenta **413049979** con la tesis titulada **“IDENTIFICACIÓN DE ARREGLOS MOLECULARES DE LOS GENES BRCA1 Y BRCA2, Y DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN LOS GENES P53 Y P21 EN CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO, EN PACIENTES DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LUZ MARÍA GONZÁLEZ HUERTA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Vocal: DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG
Vocal: DR. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
Vocal: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS
Secretario: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de agosto de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Primeramente quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por las grandes enseñanzas, por mi formación académica, por todo el conocimiento transmitido y brindado, lo cual me permitirá tener las bases necesarios para continuar mi vida académica y profesional. Por permitirme ser parte de sus alumnos privilegiados que tienen el honor de pertenecer a esta gran casa de estudios y a este posgrado.

También agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca nacional otorgada (CVU: 959490), la cual me permitió llevar a cabo mis estudios de maestría y la presente tesis.

Agradezco ampliamente a la Dra. Luz María González Huerta por ser mi asesora principal, por el tiempo dedicado, apoyo, consejos y por los conocimientos brindados, los cuales me ayudarán a crecer en mi vida profesional.

Agradezco profundamente a los miembros de mi comité tutor la Dra. Rocío Ángeles García Becerra y Dra. María Isabel Soto Cruz por todos los consejos, observaciones, sugerencias que siempre fueron con el objetivo de contribuir, mejorar, elaborar y perfeccionar el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco profundamente a mi familia, papá, mamá y hermanos por brindarme el apoyo, motivación y por darme todas las bases para poder continuar con mis proyectos académicos, ser parte de este trabajo y por siempre estar en mi vida.

Agradezco a cada uno de mis amigos: Rosa, Mónica Jazmín, Kalid, Yazmin, Eyra, Clarisa, Monse, Francisco, Jesús e Iván por estar siempre en los momentos difíciles y complicados de mi vida, pero también por compartir muchos momentos de convivencia, alegría, por los ánimos y todos los consejos brindados. Pero principalmente por demostrarme que siempre estarán a mi lado para brindarme su apoyo.

A la Dra. Rocío Ángeles García Becerra por todo el apoyo brindado durante la elaboración de la presente tesis, por los consejos, opiniones y por el conocimiento que amablemente me compartió, pero especialmente porque me permitió realizar parte de este trabajo en su laboratorio, demostrando que en momentos difíciles de los alumnos, como tutora nunca te dejara solo y siempre tendrás ese brazo que te ayude a continuar.

A la Dra. Luz María por todo el apoyo brindado, porque a pesar de los problemas de salud que presentó siempre estuvo al pendiente y me dio los ánimos para continuar. La Dra. Soto Cruz porque sin sus consejos sería más complicado obtener el presente trabajo.

A cada uno de los miembros de mi Jurado Dra. Marcela Lizano Soberón, Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg, Dra. María Isabel Soto Cruz, Dr. Hugo López Muñoz y Dra. Aliesha Araceli González Arenas por el tiempo brindado para la revisión de la presente tesis, sus observaciones, correcciones, sugerencias y comentarios brindados para mejorar el presente trabajo.

También agradezco a la Dra. Isela Martínez y Dra. Adriana Zarate por los conocimientos compartidos, apoyo incondicional, especialmente por enseñarme, aclarar dudas y siempre estar en la mejor disposición de transmitir sus conocimientos.

Agradezco al Dr. Alfonso León por la gran amabilidad y accesibilidad que demostró al prestar sus instalaciones en el Instituto de Investigaciones Biomédicas para la realización de los análisis de PCR.

A la Unidad de Genética y al Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, ubicados en el HGM. Agradezco sinceramente a los compañeros de la unidad de Genética por el apoyo proporcionado Jorge, Carlos, Joselyn y Sandra.

DEDICATORIAS

A mi familia, por ser el soporte y apoyo principal que se necesita en la vida.

A mi Papá, Alfonso Hernández Morales, por enseñarme que cuando uno se propone un objetivo con mucho trabajo y esfuerzo se puede lograr lo que sea. Desearía poder tenerte a mi lado para juntos compartir estos logros y metas obtenidas en esta trayectoria académica; sin embargo, he aceptado que no sucederá, hace 5 años que te perdí y desde entonces no supe que es volver a decir papá ni escuchar esos grandes consejos que tuve de esa persona tan inteligente que eras. Pero los consejos que siempre me brindaste fueron suficientes para poder continuar con los objetivos y metas que me he propuesto, siempre me dijiste que el mejor regalo de un padre es el estudio, ahora me doy cuenta que es cierto y tú me diste ese gran regalo. Cuantas cosas daría porque me acompañaras en esta trayectoria sin embargo solo me queda agradecerte hasta donde te encuentres por todo el apoyo y consejos que me regalaste. Te quiero.

A mi Mamá, Modesta porque junto con mi papá han sido los dos brazos y pilares que me han ayudado a levantarme en los momentos más complicados y ser los responsables de mi vida académica. Por ser la mujer que me anima a continuar cuando las cosas se complican, por enseñarme que el trabajo es la base para lograr los objetivos. Te quiero mamá.

A mi Hermana, Elizabeth porque sin ti definitivamente no podría continuar con mis estudios, por ser quien en momentos difíciles y complicados de la familia nos ayuda para sustentar los problemas familiares. Por ello reconozco que parte de este logro es gracias a esta mujer trabajadora, reconozco que sin ella no tendría el tiempo ni la disponibilidad para concluir este trabajo. Te quiero.

A mi Hermano, Israel porque me has enseñado que se puede lograr lo que se quiera cuando uno se lo propone, que la vida implica desvelos, horas extras de trabajo y en momentos dejar actividades sociales, pero solo eso te lleva a las metas y hasta lograr estudiar dos carreras. Al final las recompensas son mayores. Te quiero.

A todos mis amigos porque han sido parte de mi vida académica y personal, aunque muchos piensan que los amigos son difíciles de encontrar, tengo la fortuna de encontrarme a unas increíbles personas.

A Rosa porque siempre has estado conmigo en los momentos de alegrías y en los momentos más complicados, siempre he tenido un consejo y los ánimos, cuando he pensado que no puedo continuar siempre tengo esa persona que me recuerda lo que se puede hacer con un poco de esfuerzo. Gracias por ser esa persona en quien siempre se puede contar.

A Mónica Jazmín por ser esa amiga que todo mundo desearía tener a su lado, por todos los momentos compartidos, por ser siempre esa persona en quien se puede confiar y con quien puedes contar.

A Kalid por ser esa amiga que siempre te da increíbles consejos y siempre te da ánimos para continuar. Gracias por ser esa persona en quien se puede confiar y que así mismo confía en mí. Gracias por siempre hacerme ver lo que puedo lograr.

A Eyra porque me has enseñado que cuando se quiere ayudar y apoyar a las personas no importa que se tenga que hacer para estar presente, gracias por los ánimos y por siempre hacerme ver que puedo lograr muchas cosas.

A Yazmín por ser esa increíble amiga y persona, que me ha enseñado que no importa que no tenga que dar, pero hace lo imposible por darte lo que tiene y con lo que puede ayudar, haciendo que eso que brinda sea más valioso que obtener miles de cosas. Por ser esa amiga en quien siempre se puede esperar un apoyo.

A Clarisa por todos los momentos compartidos desde la licenciatura y maestría. Por el apoyo y ánimos que nos brindamos en momentos complicados, por todas las experiencias y aprendizajes que hemos tenido a lo largo de todos estos años.

Monserrat por siempre brindarme el apoyo en los momentos más complicados por los cuales he pasado.

A Francisco, por ser ese increíble amigo, esa persona tan humilde en quien siempre se puede confiar, porque sabes que nunca te dejará solo y siempre estará en los momentos más complicados por lo que puedas atravesar. Por ser esa persona que ha demostrado que no importa horario, distancia o situación siempre está dispuestos a extenderte la mano para ayudarte en lo que sea posible, ya sea académica o personalmente.

Iván y Jesús por el gran apoyo que siempre me han brindado, por ser esos dos amigos que siempre están presentes y en los que siempre puedes contar en los momentos más complicados.

ÍNDICE

FIGURAS Y TABLAS

ABREVIATURAS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN GENERAL	4
3.1. Cáncer de mama	4
3.2. Incidencia y mortalidad del cáncer de mama	5
3.3. Factores que aumentan el riesgo de cáncer de mama	7
3.4. Factores que pronostican cáncer de mama hereditario	8
3.5. Predisposición a cáncer de mama por mutaciones en BRCA1 y BRCA2	9
3.6. Estructura del gen y la proteína BRCA1 y BRCA2	10
3.6.1. Estructura del gen y la proteína BRCA1	10
3.6.2. Estructura del gen y la proteína BRCA2	12
3.7. Funciones de las proteínas supresoras de tumores BRCA1 y BRCA2	14
3.7.1. Funciones de la proteína supresora de tumores BRCA1	14
3.7.1.1. BRCA1 regula positivamente el desarrollo embrionario	14
3.7.1.2. BRCA1 es esencial para la morfogénesis, diferenciación y desarrollo de las estructuras mamarias	15
3.7.1.3. BRCA1 regula vías de señalización activadas por los estrógenos	15
3.7.1.4. BRCA1 juega un papel importante en las modificaciones epigenéticas	16
3.7.1.5. BRCA1 como regulador de la transcripción	16
3.7.1.6. BRCA1 presenta actividad ubiquitina ligasa E3	17
3.7.1.7. BRCA1 regula la recombinación genética durante la meiosis	17
3.7.1.8. BRCA1 en la reparación del daño al ADN por recombinación homóloga	18
3.7.1.9. BRCA1 regula la reparación del ADN por mismatch	19
3.7.1.10. BRCA1 regula el número de centrosomas en la formación del huso mitótico	19
3.7.1.11. BRCA1 relacionado a la estabilidad cromosómica y genética	20
3.7.1.12. BRCA1 regula el ciclo celular	20
3.7.1.13. BRCA1 induce muerte celular	21
3.7.2. Funciones de la proteína supresora de tumores BRCA2	21
3.7.2.1. BRCA2 regula positivamente el desarrollo embrionario	21
3.7.2.2. BRCA2 es esencial para la morfogénesis, diferenciación y desarrollo de las estructuras mamarias	21
3.7.2.3. BRCA2 probablemente presente actividad transcripcional	22
3.7.2.4. BRCA2 posiblemente regula el número de centrosomas	22
3.7.2.5. BRCA2 regula la recombinación genética durante la meiosis	23
3.7.2.6. BRCA2 regula el ciclo celular de manera menos eficiente que BRCA1	23
3.7.2.7. BRCA2 relacionado a la estabilidad cromosómica y genética	24
3.7.2.8. BRCA2 en la reparación del ADN por recombinación homóloga	24
3.7.2.9. BRCA2 controla la frecuencia de mutaciones y el proceso del cáncer	26

3.7.3. BRCA1 y BRCA2 tienen funciones y vías de señalización en común	26
3.8. BRCA regula el ciclo celular a través de P53 y P21	27
3.9. P53 y P21 juegan un papel importante en la inhibición del ciclo celular y activación de la muerte celular apoptótica.....	28
3.10. Vía de señalización BRCA1-BRCA2-P53-P21	31
3.11. Mutaciones en BRCA ocasionan un mal funcionamiento de P53-P21 y riesgo de cáncer	32
3.12. BRCA1 y BRCA2 pueden presentar mutaciones a lo largo de toda la secuencia de codificación.....	32
3.13. Mutaciones de BRCA1 y BRCA2 en México	36
4. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	39
5. HIPÓTESIS.....	40
6. OBJETIVO GENERAL	41
6.1. Objetivos particulares.....	41
7. METODOLOGÍA.....	42
7.1. Análisis de expedientes clínicos y selección de pacientes.....	42
7.2. Reclutamiento de pacientes que cumplan con los criterios de inclusión.....	42
7.3. Selección de tres mujeres control	42
7.4. Obtención de muestra de sangre periférica y separación de los leucocitos.....	43
7.5. Extracción de ácidos nucleicos	43
7.6. Cuantificación, pureza e integridad de los ácidos nucleicos	43
7.7. Elaboración de librerías	43
7.8. Preparación de templados.....	44
7.9. Secuenciación por semiconducción.....	44
7.10. Análisis de mutaciones detectadas en las pacientes.....	44
7.11. Cultivo de 5 líneas celulares de cáncer de mama, una con mutación en BRCA1 y 4 sin mutación	44
7.12. Extracción y cuantificación del ARN de las líneas celulares de cáncer de mama.....	45
7.13. Síntesis de ADNc.....	46
7.14. Niveles de expresión de los genes P53 y P21 por qPCR	46
7.15. Análisis estadístico.....	46
8. RESULTADOS.....	47
9. DISCUSIÓN	58
10. CONCLUSIONES.....	71
11. PERSPECTIVAS.....	72
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
13. APÉNDICE	86

Figuras y Tablas**Página**

Figura 1. Anatomía de la estructura mamaria femenina	4
Figura 2. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer a nivel mundial y nacional en la población general.....	5
Figura 3. El cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad a nivel mundial entre la población femenina	6
Figura 4. El cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia entre las mujeres mexicanas.....	6
Figura 5. Dominios principales de la proteína supresora de tumores BRCA1	11
Figura 6. Dominios principales de la proteína supresora de tumores BRCA2	14
Figura 7. P53 induce la transcripción de P21 para bloquear el ciclo celular	29
Figura 8. P53 induce muerte celular apoptótica cuando el daño al ADN celular perdura	30
Figura 9. BRCA1 inhibe el ciclo celular y genera muerte celular al activar a P53 y P21 e induce la reparación del ADN a través de BRCA2.....	31
Figura 10. Mutaciones en regiones específicas de BRCA se han asociado a cáncer de mama o cáncer de ovario.....	33
Figura 11. Regiones de los genes <i>BRCA1</i> y <i>2</i> con la presencia de mutaciones fundadoras en algunos países europeos.....	34
Figura 12. Porcentaje de pacientes positivas y negativas para mutaciones en <i>BRCA</i>	47
Figura 13. Porcentaje de pacientes por rango de edad al momento del diagnóstico	48
Figura 14. Porcentaje de pacientes por subtipo de cáncer histológico	48
Figura 15. Porcentaje de pacientes diagnosticadas de acuerdo a cada perfil molecular.....	49
Figura 16. Frecuencia de pacientes por cada estadio del cáncer	50
Figura 17. Frecuencia de pacientes que presentaron antecedentes familiares con respecto a cada uno de los diferentes tipos de cáncer	51
Figura 18. Árboles genealógicos de las siete pacientes portadoras de mutación y de los controles 1 y 2.....	54
Figura 19. Posición de las mutaciones identificadas en los genes BRCA de las pacientes analizadas y la mutación presente en la línea celular HCC1937	55
Figura 20. Los niveles de expresión de los genes P53 y P21 fueron mayores en la línea celular con mutación en comparación con las células sin mutación.....	57
Tabla 1. Frecuencia de pacientes con cáncer de mama bilateral y cáncer de mama/ovario	50
Tabla 2. Principales características de las pacientes positivas a mutación	52
Tabla 3. Características de cada una de las mutaciones detectadas por secuenciación.....	52
Tabla 4. Frecuencia de mutaciones presentes en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	54
Tabla 5. Frecuencia de mutación fundadora y de mutaciones reportadas por primera vez en población mexicana	55
Tabla 6. Tipo de quimioterapia, hormonoterapia y cirugía empleada en el tratamiento de las pacientes positivas a mutación	56

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AF-1	Función de activación independiente del ligando N-terminal
AF-2	Función de activación inducible por ligando C-terminal
Apaf-1	Del inglés Apoptotic Protease Activating Factor-1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutado
ATR	Del inglés Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
BACH1	Del inglés transcription factor BTB and CNC homology 1
BAP1	Del inglés BRCA1 Associated Protein 1
BARD1	Del inglés BRCA1-associated RING domain protein 1
BASC	Del inglés BRCA1-associated genome surveillance complex
Bcl-2	Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B
BRCA1	Cáncer de mama de inicio temprano 1
BRCA2DBD	Dominio de unión a ADN / DSS1
BRCA2	Cáncer de mama de inicio temprano 2
BRCT	Del inglés BRCA1 C Terminus
BRIP1	Del inglés BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1
Caspasa	Del inglés cysteinyl aspartate-specific proteases
CDK	Del inglés Cyclin Dependent Kinase
CtBP	Del inglés C-terminal binding protein
CtIP	Del inglés CtBP-interacting protein
DMC1	Del inglés DNA Meiotic Recombinase 1
D-MEM	Del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSS1	Del inglés Deleted in spilt hand/spilt foot 1
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FANCD2	Del inglés Fanconi anemia group D2 protein
GADD45	Del inglés Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45
GAPDH	Del inglés Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HDAC	Histona desacetilasas
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HER-2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
NBS	Del inglés Nijmegen breakage syndrome
NES	Del Inglés Nuclear Export Sequences
PALB2	Del inglés Partner and localizer of BRCA2
RP	Proteína de retinoblastoma
RE- α	Receptor de estrógenos alfa
RING	Del inglés Really Interesting New Gene
RHA	RNA helicasa A
RPMI	Del inglés Roswell Park Memorial Institute
SCP3	Del inglés Synaptonemal Complex Protein 3
SFB	Suero Fetal Bovino
SWI/SNF	Del inglés SWItch/Sucrose Non Fermentable

1. RESUMEN

El cáncer de mama es el principal problema de salud relacionado con neoplasias malignas entre la población femenina tanto a nivel mundial como nacional. Existen diferentes factores de riesgo, pero 5-10% de los casos tienen un origen hereditario, de los cuales el 90% son causados por mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2*. Los cuales presentan varias funciones e interactúan con varias proteínas, entre ellas los supresores de tumores *P53* y *P21*. En los últimos años, se ha visto la necesidad de identificar las mutaciones presentes en *BRCA* entre las diferentes poblaciones; sin embargo, en México existen muy pocos estudios donde se identifiquen las principales variantes presentes en la población mexicana y la mayoría de los estudios publicados ocupan técnicas poco sensibles, los estudios con secuenciación de nueva generación (NGS) son casi inexistentes. Por otro lado, se desconoce como las mutaciones en los genes *BRCA* pueden afectar los niveles de expresión en *P53* y *P21*. Esto llevo a la realización del presente trabajo con el objetivo de identificar las mutaciones presentes en un grupo de pacientes con cáncer de mama con características específicas que las hacían susceptibles a presentar mutaciones en estos genes. Complementando los hallazgos se realizaron experimentos utilizando cultivos de líneas celulares con y sin mutaciones en *BRCA* para evaluar los cambios en los niveles de expresión de los genes *P53* y *P21*.

La identificación de variantes se realizó mediante secuenciación de nueva generación con la plataforma Ion S5, las características de las mutaciones detectadas fueron obtenidas de ClinVar y reafirmadas por BRCA Exchange. De las pacientes secuenciadas, 34.78% fueron positivas a alguna mutación, el 26% presentaron mutaciones patogénicas. Con respecto a las pacientes portadoras de mutación patogénica, la edad media de diagnóstico fue de 40.5 años, el 87.5% presentaron cáncer lobulillar, 50% fueron diagnosticadas con cáncer triple negativo, el estadio más frecuente con 25% fue el IIA y el 75% mostraron historia familiar de algún tipo de cáncer. En total se detectaron 12 mutaciones de las cuales 58.33% fueron mutaciones patogénicas; de ellas, el 85.71% estaban presentes en *BRCA1*. De las mutaciones patogénicas detectadas, el 71.42% ya se habían reportado en población mexicana y el 28.57% se reportan por primera vez en este trabajo. De acuerdo a la literatura y las posiciones de cada mutación en la estructura de la proteína se determinó que es muy probable que 5 pacientes muestren alteraciones en los niveles de expresión ya sea en *P53*, *P21* o en ambos. Por otro lado, se encontró que la línea celular con mutación en *BRCA1* presentó mayor expresión en *P53* y *P21* que las líneas celulares sin mutación.

Estos resultados demuestran que la implementación de la secuenciación de nueva generación llevó a obtener el porcentaje más alto de pacientes positivas a mutación que se ha reportado en estudios hasta este momento en población mexicana. Además, permitió identificar nuevas variantes no reportadas en esta población, lo que conlleva a tener un mejor diagnóstico, permitiendo suministrar el tratamiento adecuado y más eficiente para este grupo de

pacientes que desarrollan cáncer asociado a mutaciones en alguno de estos genes *BRCA*, por lo cual, con estas evidencias se ratifica la necesidad de implementar este tipo de técnicas en el sector salud en México para mejorar los índices de mortalidad de cáncer de mama hereditario, enfatizando la trascendencia familiar que esto implica. Es necesario realizar estudios claros que identifiquen como las mutaciones en *BRCA* afectan los niveles de expresión de *P53* y *P21* en pacientes con cáncer de mama relacionado a *BRCA*.

2. ABSTRACT

Breast cancer is the main cancer-related health problem among the female population both globally and nationally. There are different risk factors, but 5-10% of cases are hereditary, of which 90% are caused by mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* tumor suppressor genes. Both genes have various functions and interact with various proteins, including the tumor suppressors *P53* and *P21*. In recent years, there has been a need to identify the mutations present in *BRCA* among the different populations, however, in Mexico, there are very few studies where the main variants present in the Mexican population are identified, and most of the published studies use techniques little sensitive, next-generation sequencing (NGS) studies are almost non-existent. On the other hand, it is unknown how mutations in the *BRCA* genes can affect the expression levels in *P53* and *P21*. This led to the realization of the present work to identifying the mutations present in a group of patients with breast cancer that presented characteristics that made them susceptible to showing mutations in these genes and cultures of cell lines with or without mutations in *BRCA* to evaluate changes in the expression levels of *P53* and *P21*.

The identification of variants was carried using of new generation sequencing with the Ion S5 platform, the characteristics of the detected mutations were obtained from ClinVar and reaffirmed by BRCA Exchange. Of the sequenced patients, 34.78% were positive for some mutation, 26% had pathogenic mutations. Regarding the patients with the pathogenic mutation, the mean age of diagnosis was 40.5 years, 87.5% presented lobular cancer, 50% were diagnosed with triple-negative cancer, the most frequent stage with 25% was IIA, and 75% showed a family history of any cancer. In total, 12 mutations were detected, of which 58.33% were pathogenic mutations, of which 85.71% were present in *BRCA1*. Of the pathogenic mutations detected, 71.42% had already been reported in the Mexican population, and 28.57% of the mutations are reported for the first time in this work. According to the literature and the positions of each mutation in the protein structure, it was determined that it is very likely that 5 patients show alterations in the expression levels of either *P53*, *P21*, or both. On the other hand, it was found that cell lines with a *BRCA1* mutation presented higher expression in *P53* and *P21* than cell lines without mutation.

These results show that the implementation of next-generation sequencing led to the highest percentage of mutation-positive patients that has been reported in studies to date in the Mexican population. In addition, it allowed the identification of new variants not reported in this population, which leads to a better diagnosis of patients allowing the provision of adequate and more efficient treatment for the group of patients who develop cancer due to mutations in any of these *BRCA* genes, herefore, this evidence confirms the need to implement this type of techniques in the health sector in Mexico to improve the mortality rates of hereditary breast cancer, emphasizing the family significance that this implies. Clear studies are needed to identify how *BRCA* mutations affect *P53* and *P21* expression levels in patients with *BRCA*-related breast cancer.

3. INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es un tumor maligno generado por el crecimiento, desarrollo y multiplicación descontrolado de células malignas en el tejido mamario (Gobierno de México, 2020; INFOCÁNCER, 2019; American Cancer Society, 2019). Este grupo de células cancerosas pueden invadir los tejidos circundantes o propagarse (metástasis) a áreas distantes del cuerpo (INFOCÁNCER, 2019). Este tipo de cáncer ocurre casi por completo en las mujeres, pero los hombres también lo pueden padecer (INFOCÁNCER, 2019; American Cancer Society, 2019).

Existen dos tipos principales de cáncer de mama, el carcinoma lobulillar que se genera en las estructuras denominadas lobulillos, encargadas de la producción de la leche materna (20% de los casos) y el carcinoma ductal (el más frecuente con el 80 % de los casos) que comienza en los conductos que transportan la leche desde los lobulillos hasta el pezón, figura 1 (American Cancer Society, 2019; INFOCÁNCER, 2019; Instituto Nacional del Cáncer, 2020).

El cáncer de mama también se ha clasificado de acuerdo a su fenotipo molecular, el cual se ha subdividido en base al perfil de expresión génica de las células tumorales en luminal A (40%), Luminal B (20%), HER-2 sobreexpresado (15-20%) y tipo basal o triple negativo (15%) (Cárdenas *et al.*, 2019; Instituto Nacional del Cáncer, 2020; Wang & Di, 2014).

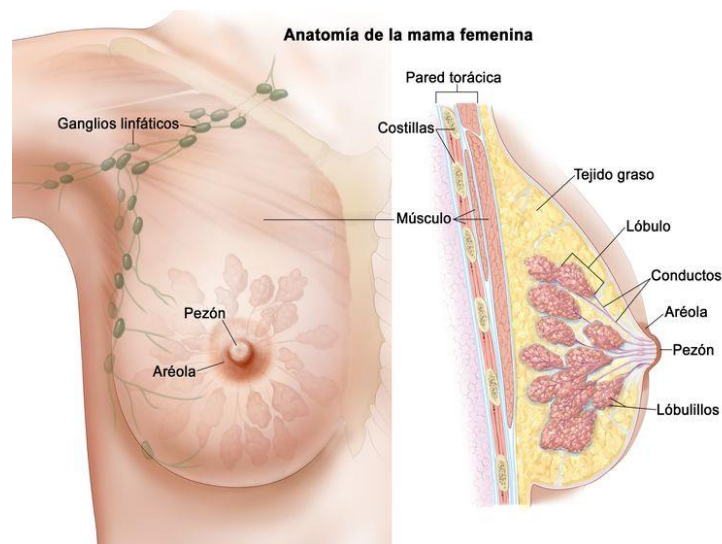


Figura 1. Anatomía de la estructura mamaria femenina. Las principales estructuras que componen la mama se muestran en la figura, en ella se puede observar el tejido graso, aréola, pezón, los lóbulos los cuales están formados de estructuras más pequeñas denominadas lobulillos encargados de la producción de la leche durante la lactancia, finalmente se encuentran los conductos, encargados de transportar la leche desde el lugar de producción hasta el pezón donde podrá ser eliminada. Los lobulillos y los conductos son las estructuras donde se dan principalmente los procesos carcinogénicos. Tomada de: Instituto Nacional del Cáncer, 2020.

3.2 INCIDENCIA Y MORTALIDAD DEL CÁNCER DE MAMA

En el 2018 GLOBOCAN estimó 18.1 millones de nuevos casos de cáncer y 9.6 millones de defunciones asociados a esta patología en todo el mundo, de los cuales el 11.6% y 6.6% correspondía a cáncer de mama, respectivamente (Bray *et al.*, 2018; GLOBOCAN, 2018). Esta patología ocupa el primer lugar en incidencia a nivel mundial y nacional en la población general (figura 2).

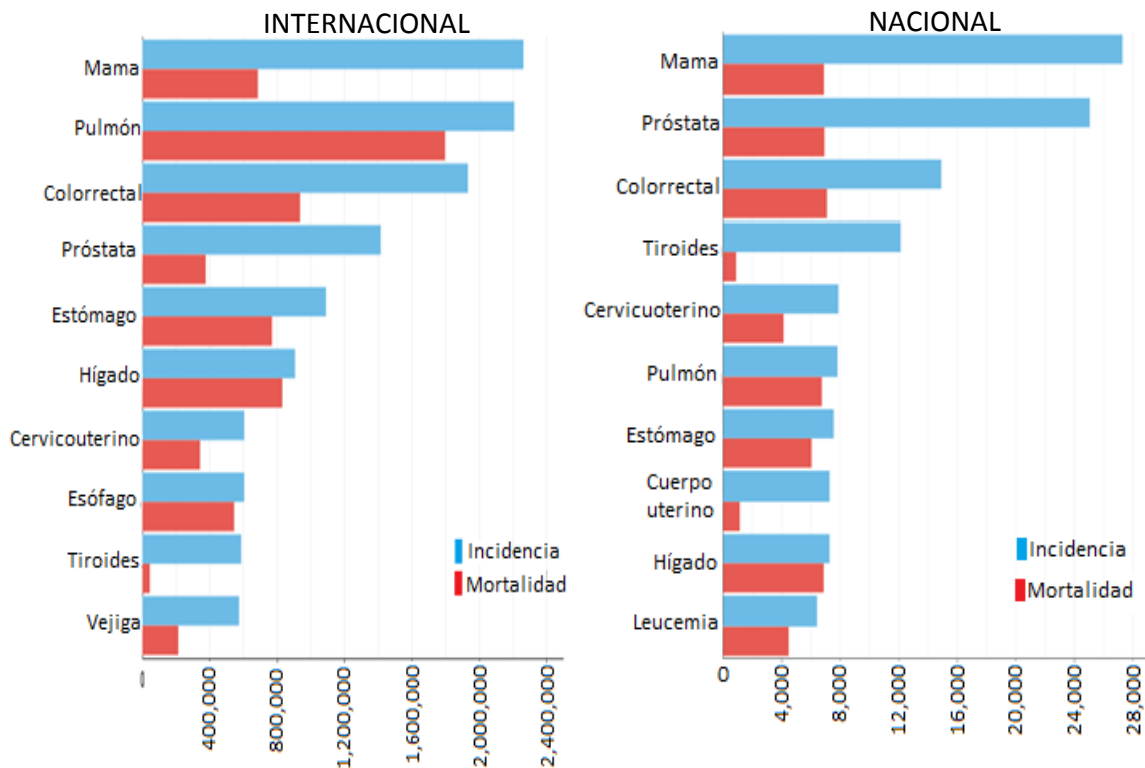


Figura 2. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer a nivel mundial y nacional en la población general. El cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y segundo lugar en mortalidad, por debajo del cáncer de pulmón a nivel mundial (Izquierda). A nivel nacional se presenta el mismo comportamiento, primer lugar en incidencia y segundo lugar en mortalidad por debajo del cáncer colorrectal (Derecha). Tomado de GLOBOCAN, 2018.

El cáncer de mama ocupa el primer lugar tanto en incidencia (154 de 185 países) como causa de muerte (103 países) a nivel mundial entre los diferentes tipos de cáncer que afectan a las mujeres (GLOBOCAN, 2018; INSP, 2020) con 2,088,849 casos nuevos y 626,679 defunciones, equivalentes al 24.2% y 15.0%, respectivamente, como se muestra en la figura 3 (Bray *et al.*, 2018; GLOBOCAN, 2018), lo que representa casi 1 de cada 4 casos de cáncer entre las mujeres (Bray *et al.*, 2018). Para el año 2040 se ha estimado que los casos nuevos incrementarán a 3,059,829 y 991,904 las defunciones (GLOBOCAN, 2018).

Cada año en las Américas, más de 462,000 mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama, y casi 100,000 mueren a causa de esta enfermedad (OPS, 2020b).

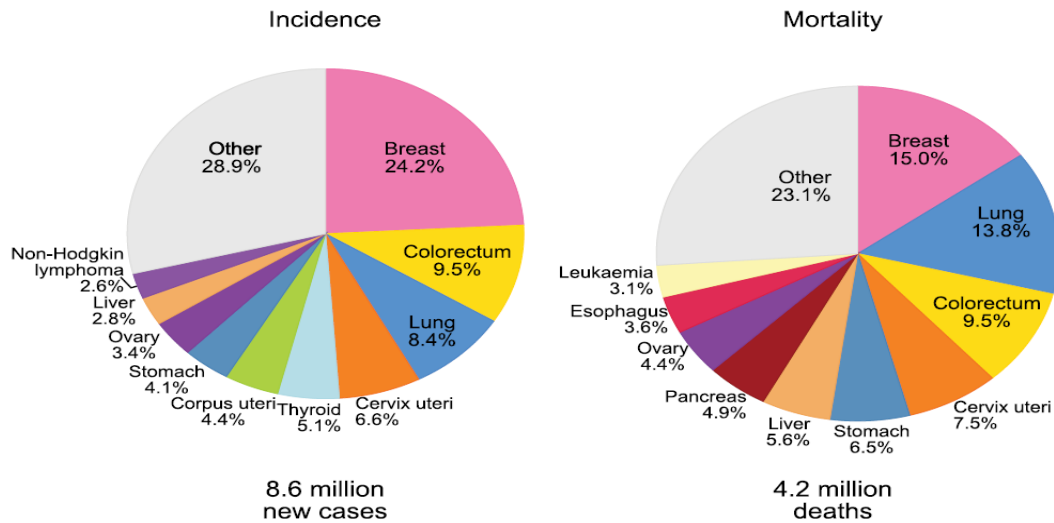


Figura 3. El cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad a nivel mundial entre la población femenina. Los dos gráficos representan la incidencia y mortalidad de cáncer de mama entre los diferentes tipos de cáncer que afectan a las mujeres, el 24% de nuevos casos diagnosticados de cáncer pertenecen al de mama (izquierda). Del lado derecho se presenta la tasa de mortalidad por tumores malignos, donde se observa que el 15% de las muertes fueron causadas por cáncer de mama. Tomado de Bray *et al.*, 2018.

GLOBOCAN en el 2018 reportó para México 27,283 nuevos casos y 6,884 defunciones por cáncer de mama entre las mujeres (GLOBOCAN, 2018), aunque el INEGI informó para el mismo año 7,257 defunciones (INEGI, 2020), ocupando el primer lugar tanto en incidencia como mortalidad entre la población femenina mexicana (Cárdenas *et al.*, 2019; GLOBOCAN, 2018; INSP, 2020). De los casos recién diagnosticados en mujeres con cáncer representa el 26%, figura 4 (GLOBOCAN, 2018) y el 8.2% de mortalidad en 2018 (OPS, 2020a), para el 2020 se reportó el 16 % de mortalidad (INEGI, 2020).

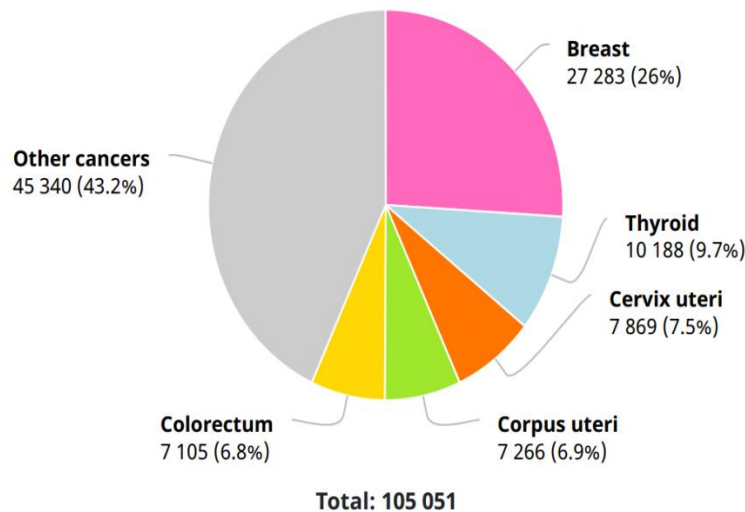


Figura 4. El cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia entre las mujeres mexicanas. Se muestran los principales tipos de cáncer que afectan a la población femenina en México, la neoplasia mamaria es el principal problema de cáncer, al tener que una cuarta parte de los casos diagnosticados en el 2018, pertenecen a este tipo de tumor. Tomado de GLOBOCAN, 2018.

En 2019 se informó que por cada 100 mil mujeres se tuvieron 35.25 nuevos casos y 17.19 defunciones, en hombres es de 1.03 casos nuevos por 100 mil habitantes (INEGI, 2020).

Entre las mujeres que fallecen, 1% son jóvenes de 15 a 29 años, 13% tienen entre 30 a 44 años y más de la tercera parte (38%), está entre los 45 a 59 años; la mayoría fallece después de los 59 años (48%) (INEGI, 2020).

3.3 FACTORES QUE AUMENTAN EL RIESGO DE CÁNCER DE MAMA

Las causas que originan este tipo de cáncer son multifactoriales. El principal factor de riesgo es el sexo, las mujeres son las que tienen mayor riesgo de padecer cáncer de mama a diferencia de los hombres, seguido de la edad debido a que el riesgo aumenta conforme aumenta la edad, dos de tres mujeres diagnosticadas son mayores de 55 años. La estructura de la mama también juega un papel muy importante, debido que las mujeres con mamas densas tienen mayor riesgo de padecer esta patología (American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019; INFOCÁNCER, 2019).

La exposición hormonal durante periodos de tiempo prolongados favorece el riesgo de cáncer, las mujeres que presentaron su primer periodo de menstruación a edad temprana o menarca precoz (antes de los 12 años) y menopausia tardía (después de los 55 años), tienen más riesgo de desarrollar cáncer. El uso excesivo de anticonceptivos orales a base de hormonas (más de 5 años) y la terapia de reemplazo hormonal posmenopáusica y uso de hormonas para prevenir la osteoporosis (American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019; Gobierno de México, 2020; INFOCÁNCER, 2019; INSP, 2020; Instituto Nacional del Cáncer, 2020; OMS, 2020).

Las mujeres que no han tenido hijos o que tuvieron su primer hijo después de los 30 años tienen mayor riesgo, por otro lado, la lactancia (más de 12 meses) y los embarazos múltiples disminuyen el riesgo de cáncer (American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019; Gobierno de México, 2020; INFOCÁNCER, 2019; INSP, 2020).

El consumo de bebidas alcohólicas está claramente asociado con el aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama. Así mismo, la mala alimentación (alimentos ricos en calorías como las grasas), obesidad y la falta de actividad física son factores importantes en el desarrollo de esta enfermedad (American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019; Gobierno de México, 2020; INFOCÁNCER, 2019; Instituto Nacional del Cáncer, 2020; OMS, 2020).

La exposición a la radiación (radioterapia) especialmente cuando son niñas o en la pubertad, aumenta el riesgo. Exposición a agentes cancerígenos presentes en el medio ambiente y el hábito de fumar de manera excesiva (humo de tabaco) son también factores de riesgo (American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019; INFOCÁNCER, 2019).

La raza y el origen étnico es un factor muy importante, ya que las mujeres de raza blanca son más propensas (American Cancer Society, 2020).

Las personas que presentan algunos síndromes como son de Ataxia-telangiectasia, Lynch II, Li-Fraumeni, Cowden, Bannayan-Riley-Ruvalcaba, síndrome Peutz-Jeghers y las personas que presentan cáncer gástrico difuso hereditario (CDH1) tienen mayor riesgo de desarrollar esta patología (Chirivella & Garcés, 2018; INFOCÁNCER, 2019; Instituto Nacional del Cáncer, 2018; NIH, 2017).

Un factor de riesgo y de gran relevancia, al cual se le asocia un importante número de casos de cáncer, es el factor hereditario, causado por mutaciones en genes específicos que aumentan el riesgo, por lo tanto, antecedentes familiares de cáncer de mama multiplican el riesgo. Mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son la causa más común de cáncer de mama hereditario (American Cancer Society, 2020; Calderón del Valle & Gallón, 2012; Cárdenas *et al.*, 2019; INFOCÁNCER, 2019; Instituto Nacional del Cáncer, 2018; INSO, 2020; OMS, 2020).

3.4 FACTORES QUE PRONOSTICAN CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

El cáncer de mama hereditario se caracteriza por presentarse a edades más jóvenes, menor a 50 años de edad (Calderón del Valle & Gallón, 2012; Cárdenas *et al.*, 2019; INFOCÁNCER, 2019; Torres-Mejía *et al.*, 2015; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012) llegando a tener hasta una media de edad de 35 años, generalmente se presenta cáncer bilateral, con el riesgo del 50-64% durante los 25 años posteriores al diagnóstico de cáncer de mama unilateral (Calderón del Valle & Gallón, 2012; Instituto Nacional del Cáncer, 2020; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012). Se tiene un riesgo muy alto de desarrollar otros tipos de cáncer en la misma paciente, particularmente cáncer de ovario (Calderón del Valle & Gallón, 2012; INFOCÁNCER, 2019; Instituto Nacional del Cáncer, 2018; Narod & Faulkes, 2004; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012).

Generalmente la paciente cuenta con antecedentes familiares directos (consanguíneos) con múltiples casos de cáncer de mama y ovario principalmente (Narod & Faulkes, 2004). Familiares con cáncer de páncreas, próstata, de trompas de Falopio y peritoneal o cualquier cáncer relacionado a *BRCA* a lo largo de varias generaciones. A mayor número de familiares con algún tipo de cáncer y más cercano sea el parentesco, se incrementa el riesgo (Calderón del Valle & Gallón, 2012; Chirivella & Garcés, 2018).

Cuando se presenta cáncer de mama en familiares de primer grado como madre, hermana o hija se duplica el riesgo de cáncer hereditario. Y este aumenta aproximadamente tres veces, si dos familiares de primer grado padecen la enfermedad (American Cancer Society, 2020; INFOCÁNCER, 2019; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012). La edad al momento del diagnóstico de los familiares es un factor determinante, entre más temprana la edad, mayor riesgo (menor a 50 años) (American Cancer Society, 2020), especialmente si son diagnosticados en etapas premenopáusicas (Calderón del Valle & Gallón, 2012).

El riesgo de padecer cáncer de mama hereditario aumenta cuando se tiene historia familiar de cáncer de mama en hombres, como padre o hermano, así mismo, antecedentes de cáncer de

próstata (American Cancer Society, 2020; Chirivella & Garcés, 2018; INFOCÁNCER, 2019; Instituto Nacional del Cáncer, 2018).

El fenotipo tumoral triple negativo se relaciona con mutaciones en *BRCA*, principalmente *BRCA1*. Hasta 20% de las pacientes con este fenotipo tumoral son portadoras de mutaciones germinales (American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012). Por otro lado, el cáncer de mama relacionado a *BRCA1*, alrededor del 70-80% de los casos son receptor de estrógenos (RE) negativo (Wang & Di, 2014).

3.5 PREDISPOSICIÓN A CÁNCER DE MAMA POR MUTACIONES EN *BRCA1* Y *BRCA2*

Aproximadamente el 5 al 10% de todos los casos de cáncer de mama presentan un origen genético/hereditario (Aleamar *et al.*, 2016; American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019; Quezada *et al.*, 2018; Venkitaraman, 2001). Los genes más frecuentes responsables de esta patología son *BRCA1* y *BRCA2* (Chirivella & Garcés, 2018; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012). Mutaciones en ambos genes predisponen a los portadores a cáncer de mama y ovario (Venkitaraman, 2001), por ello se ha mencionado que son los responsables del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (Cárdenas *et al.*, 2019; NIH, 2017; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012) y se hereda de forma autosómica dominante (Calderón del Valle & Gallón, 2012; Chirivella & Garcés, 2018; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012; Venkitaraman, 2001).

Las mutaciones en *BRCA1* son responsables de aproximadamente el 50% de los cánceres de mama hereditarios y 90% de los ováricos (Calderón del Valle & Gallón, 2012). Los portadores de la mutación en *BRCA1* tienen el riesgo de desarrollar cáncer de mama en un 80-90% y del 30-60% de ovario (Cárdenas *et al.*, 2019; Hollis, Churchman y Gourley, 2017). Mutaciones en este gen también aumenta el riesgo de otros tipos de cáncer, con 4-6% mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon con respecto a la población general y en varones aumenta el 8% de riesgo de desarrollar cáncer de próstata antes de los 70 años (Calderón del Valle & Gallón, 2012; Karakasis *et al.*, 2016).

Las mutaciones en *BRCA2* son responsables de aproximadamente el 40% de los cánceres de mama hereditarios y del 5 a 10% de los ováricos. Los portadores de la mutación tienen el riesgo de desarrollar cáncer de mama en un 80-90% y del 10-20% de ovario (Cárdenas *et al.*, 2019; Hollis, Churchman y Gourley, 2017). Este gen es el responsable del cáncer de mama masculino, además genera un riesgo del 7% y 8% mayor de desarrollar cáncer de próstata y páncreas respectivamente (Karakasis *et al.*, 2016; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019).

Sin embargo, *BRCA1* y 2 predisponen a otros tipos de cáncer como son: gástrico, endometrio y piel (melanomas) (Cárdenas *et al.*, 2019), vías biliares (Venkitaraman, 2001), cabeza y cuello

(Calderón del Valle & Gallón, 2012), cáncer de peritoneo y de tropas de Falopio, esófago, pulmón, leucemia mieloide aguda y anemia de Fanconi (Instituto Nacional del Cáncer, 2018).

Aunque mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* son los principales genes asociados a cáncer de mama, existen otros genes que se presentan pero con menos frecuencia y por lo general no aumentan el riesgo de cáncer significativamente como los genes *BRCA*, es por ello que se han dividido en genes de alta susceptibilidad: *P53*, *STK11*, *CDH1*, *NF1* y *PTEN*, moderada susceptibilidad: *ATM*, *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD50*, *RAD51* y *NBS1*, baja susceptibilidad *FGFR2*, *FACC*, *LSP1*, *MAP3K1*, *TGFB1* y *TOX3* (American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019; Chirivella & Garcés, 2018; INFOCÁNCER, 2019; NIH, 2017; Quezada *et al.*, 2018).

3.6 ESTRUCTURA DEL GEN Y LA PROTEÍNA BRCA1 Y BRCA2

3.6.1 ESTRUCTURA DEL GEN Y LA PROTEÍNA BRCA1

El gen *BRCA1* se localiza en el cromosoma 17, abarca 80 Kb de ADN genómico (Karakasis *et al.*, 2016), su secuencia de codificación está constituida de 5589 nucleótidos (Vaca-Paniagua *et al.*, 2012) y genera un transcrito de ARNm de 7.8 kb (Karakasis *et al.*, 2016; Ruffner & Verma, 1997). Constituido de 23 exones (Hansen *et al.*, 2009) de los cuales solo 22 son codificantes (Hakem *et al.*, 1996), dando origen a una proteína de 1863 residuos de aminoácidos (Hakem *et al.*, 1996; Hollis, Churchman y Gourley, 2017; Hsu & White, 1998; Ruffner *et al.*, 2001; Venkitaraman, 2001; Yarden & Brody, 1999), con peso molecular aproximado de 220 Kda (Chen *et al.*, 1996; Harkim *et al.*, 1999; Hsu & White, 1998; Ruffner *et al.*, 2001; Ruffner & Verma, 1997; Yarden & Brody, 1999).

La proteína BRCA1 presenta varios dominios a lo largo de la secuencia (Figura 5), portando una región ampliamente conservada en el extremo N terminal denominado dominio RING (Clark *et al.*, 2012) exones 2-7 (Hollis, Churchman y Gourley, 2017), donde se encuentra inmerso el dominio finger RING, caracterizado por ser rico en residuos de cisteína (Wu *et al.*, 1996), el cual ha demostrado presentar actividad ubiquitina ligasa E3 (Clark *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 1996). El dominio RING también está implicado en interacciones proteína-proteína, principalmente con BARD1, el complejo BRCA1-BARD1 es una ubiquitina ligasa (E3) (Wu *et al.*, 1996). Esta región también permite la interacción de BRCA1 con el factor de transcripción E2F, el inhibidor del ciclo celular BAP1 (Deng & Brodie, 2000) y con la ARN pol II (Chiba & Palvin, 2002).

Pegado a este dominio se encuentran dos regiones que permite la interacción con el RE- α (Receptor de estrógenos alfa) y una secuencia de exportación nuclear (NES) (Xian *et al.*, 2005).

Muy cerca se localizan dos sitios de unión al oncogén c-Myc, denominados MB1 y MB2 (exón 8-11), entre estos dos sitios se encuentra una región de unión al supresor de tumores RB

(retinoblastoma) (Clark *et al.*, 2012). Parte de estas mismas secuencias permiten la interacción con P53 (Deng & Brodie, 2000) y con los oncogenes SWI-SNF (Bochar *et al.*, 2000).

Posteriormente, se localiza un sitio de unión a RAD50 (Clark *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 1999), parte de esta secuencia también se ha visto que puede interactuar con γ -tubulina presente en los centriolos (centrosomas) (Hsu, Doan y White, 2001), a lo largo de esta misma región se localizan dos secuencias de localización nuclear (NLS) (Clark *et al.*, 2012; Monteiro, August y Hanafusa, 1996) que se unen a las importina- α para mediar el transporte de BRCA1 desde el citosol al núcleo (Clark *et al.*, 2012). A continuación, se localiza un sitio de unión a RAD51 (Clark *et al.*, 2012; Scully *et al.*, 1997c). En la parte central de la proteína se encuentra una secuencia que permite la interacción con el ADN (Paull *et al.*, 2001).

BRCA1 presenta una secuencia rica en residuos de serina (S), treonina (T) y glutamina (Q) formando parejas (SQ o TQ), son sitios de fosforilación y se les ha dado el nombre de dominios ricos en serina (SCD), siendo blanco de la cinasa ATM (ataxia telangiectasia mutada) (Cortez *et al.*, 1999; Gatei *et al.*, 2001; Hollis, Churchman y Gourley, 2017). ATM fosforila a BRCA1 a través de este dominio en varias serinas, principalmente las serinas 1423, 1524 (Cortez *et al.*, 1999) y 1457 (Gatei *et al.*, 2001). Por otro lado, el complejo CDK2-ciclina E fosforila a BRCA1 en la serina 1497 (Deng & Brodie, 2000).

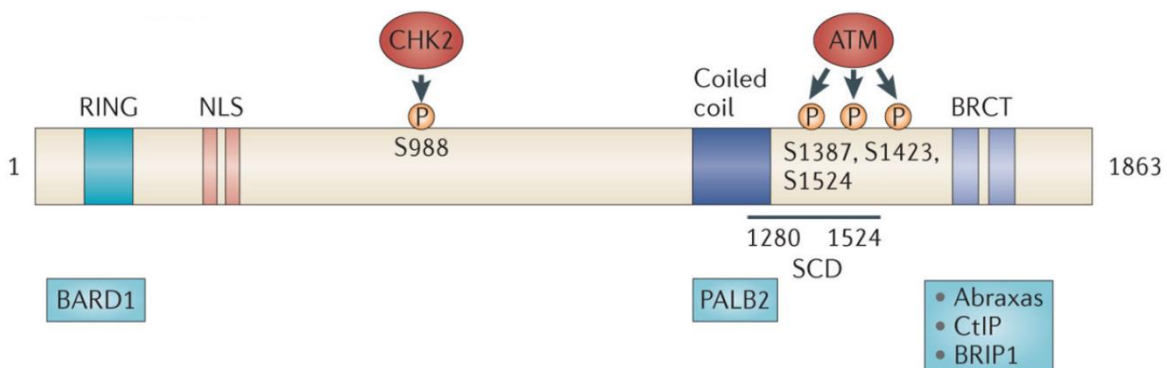


Figura 5. Dominios principales de la proteína supresora de tumores BRCA1. La proteína BRCA1 está formada de 1863 aminoácidos, a lo largo del polipéptido se encuentran varios dominios, en el extremo amino está el dominio RING, seguido de dos secuencias de localización nuclear (NLS), dominio coiled-coil, un dominio rico en serinas denominado SDC el cual es un sitio de fosforilación de varias proteínas como ATM y finalmente dos dominios BRCT responsables de la actividad transcripcional de BRCA1. Tomado de: Roy, Chun y Powell, 2016.

Parte del dominio SCD forma otro dominio denominado coiled-coil que tiene afinidad por PALB2 (Clark *et al.*, 2012; Hollis, Churchman y Gourley, 2017). También se ha encontrado, que parte del dominio SCD y unos residuos aledaños en dirección del extremo C terminal son responsables de la interacción con BRCA2 (Chen *et al.*, 1998a).

Cuenta con una región ampliamente conservada en el extremo C, en donde se encuentran dos copias en tándem, denominados dominios BRCT, cada uno formado aproximadamente de 95 residuos (Koonin, Altschul y Bork, 1996), que abarcan los aminoácidos 1685-1863 (Wu *et al.*, 1996; Yarden & Brody, 1999) y corresponde a los exones 16-24 (Hollis, Churchman y Gourley, 2017).

Estos dominios presentan actividad transcripcional (son los causantes que BRCA1 sea un factor de transcripción), para su regulación interaccionan con activadores de la transcripción como son ARN pol II (Yarden & Brody, 1999) y co-represores como CtIP (Clark *et al.*, 2012; Deng & Brodie, 2000). Estos dominios también interaccionan con histonas desacetilasas (HDAC) y la helicasa RHA (Champan & Verma, 1996).

Las repeticiones BRCT juegan un papel muy importante en la interacción con aquellas proteínas fosforiladas en respuesta al daño en el ADN como BACH1 y CCDC98 / abraxas (estas principalmente reconocidas por la hendidura formada entre BRCT1 y 2, donde se forma un bolsillo) (Clark *et al.*, 2012) esta misma región forma parte de una segunda región de unión a P53 y RB (Deng & Brodie, 2000).

3.6.2 ESTRUCTURA DEL GEN Y LA PROTEÍNA BRCA2

El gen *BRCA2* se localiza en el cromosoma 13, en la posición 13q12-q13 (Wooster *et al.*, 1995). Abarca 70 Kb de ADN genómico, la secuencia codificante está formada de 10,254 nucleótidos (Vaca-Paniagua *et al.*, 2012) y genera un transcrito de 11.4 Kb (Karakasis *et al.*, 2016).

Está compuesto de 27 exones (Hollis, Churchman y Gourley, 2017; Marston *et al.*, 1999; Tavtigian *et al.*, 1996) de los cuales solo 26 son codificantes (Tavtigian *et al.*, 1996) dando origen a una proteína de 3,418 aminoácidos (Bignell *et al.*, 1997; Hollis, Churchman y Gourley, 2017; Marston *et al.*, 1999; Tavtigian *et al.*, 1996). Se caracteriza por presentar un exón 11 muy grande (4932 pb) (Tavtigian *et al.*, 1996), el cual codifica los aminoácidos 638-2280 (Wong *et al.*, 1997) y presenta varios dominios a lo largo de la proteína (Figura 6).

La proteína tiene varios dominios a lo largo de la secuencia, en el extremo amino terminal, el exón 3 presenta actividad transcripcional en levaduras (Milner *et al.*, 1997), sin embargo, se tienen muy poca evidencia de este dominio y esta función. Esta región principalmente permite la interacción entre BRCA2 y PALB2 (Roy, Chun y Powell, 2016).

En la parte central de la proteína se han identificado ocho secuencias repetidas, son motivos de 30-40 residuos cada uno, a los cuales se les ha dado el nombre de repeticiones BRC, que cubren aproximadamente un tercio de la proteína (Bork, Blomberg y Nilges, 1996; Hollis, Churchman y Gourley, 2017; Esashi *et al.*, 2005; Wooster *et al.*, 1995). Las repeticiones BRC se

encuentran codificadas por el exón 11 (Chen *et al.*, 1998b; Wong *et al.*, 1997), las cuales están muy conservadas entre varias especies de mamíferos, pero hay una diversificación en la secuencia que existe intermedia entre cada motivo BRC, lo que sugiere que tienen una función esencial y se han mantenido por generaciones (Bignell *et al.*, 1997). La función más importante de los motivos BRC es la interacción entre BRCA2 y RAD51, necesario para la reparación de roturas de doble cadena de ADN (DSB) (Chen *et al.*, 1998b; Hollis, Churchman & Gourley, 2017; Thorslund, Esashi y West, 2007; Venkitaraman, 2001; Wong *et al.*, 1997). La interacción se da principalmente entre los aminoácidos conservados que forman la base de la secuencia consenso, ubicados en la parte central de cada uno de los motivos BRC (aproximadamente 59 residuos), con RAD51 (Sharan *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997). Las repeticiones BRC principales para esta interacción son BRC 1, 2, 3, 4 y 5 (Esashi *et al.*, 2005; Thorslund, Esashi y West, 2007) aunque otros mencionan que BRC 5 y 6 no se unen (Wong *et al.*, 1997).

A continuación, se localiza un dominio altamente conservado denominado PhePP (₂₄₀₄ KVFVPPFK ₂₄₁₁) que le permite unirse con la recombinasa DMC1 (Thorslund, Esashi y West, 2007).

En el extremo carboxilo terminal de BRCA2 se localiza el dominio BRCA2DBD (Yang *et al.*, 2002), el cual está constituido de un dominio helicoidal que interactúa con la proteína represora DSS1 (Marston *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002), presenta tres pliegues de unión a oligonucleótidos (OB); OB1, el cual también se une a DSS1 y débilmente con ssADN (ADN de cadena sencillas), OB2 y OB3 interactúan fuertemente con ssADN (Hollis, Churchman y Gourley, 2017; Yang *et al.*, 2002).

En el OB2 se localiza el dominio Towel (~130 aminoácidos), formado de un tallo (par de hélices antiparalelas) que sostiene en la parte superior el motivo 3HB (tres hélices formadas de 35 aminoácidos). El 3HB contiene el motivo HTH (hélice-giro-hélice), motivo con gran relevancia porque interactúa con dsADN (ADN de cadena doble). El complejo BRCA2DBD se ha relacionado con la estimulación de RAD51 durante la reparación del ADN (Yang *et al.*, 2002).

Además de las repeticiones BRC, en el extremo carboxilo existe otra región que permite la unión y activación de RAD51 (Hollis, Churchman y Gourley, 2017; Marston *et al.*, 1999; Mizuta *et al.*, 1997; Sharan *et al.*, 1997; Thorslund, Esashi y West, 2007; Tutt *et al.*, 2001a), por otro lado, parte de esta secuencia también permite la interacción con la recombinasa DMCI con menor afinidad que RAD51 (Thorslund, Esashi y West, 2007).

Finalmente, se encuentran dos NLS (Esashi *et al.*, 2005; Hollis, Churchman y Gourley, 2017; Spain *et al.*, 1999; Tutt *et al.*, 2001a) estas mismas regiones se encuentran en ratón (Moynahan, Pierce y Jasin, 2001). En la NLS1 se localiza la serina 3291, muy importante para la fosforilación de BRCA2 por CDK2 (Esashi *et al.*, 2005).

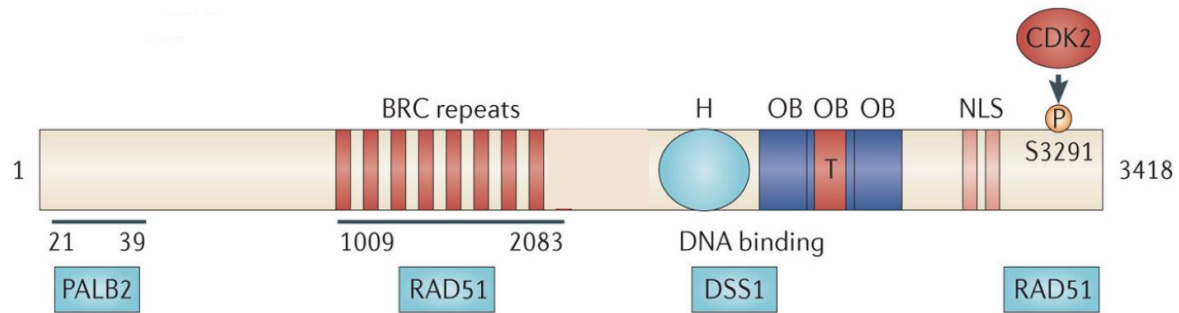


Figura 6. Dominios principales de la proteína supresora de tumores BRCA2. BRCA2 es más grande que BRCA1, pero presenta una menor cantidad de dominios e interacciona con menos proteínas. El extremo amino terminal permite la interacción con PALB2, en la parte central se localizan las 8 repeticiones BRC responsables de la interacción con RAD51, seguido del dominio helicoidal y tres pliegues de unión a nucleótidos (OB1-OB3), dentro del OB2 se localiza el dominio Towel (T) responsable de la unión con el dsADN. En el extremo carboxilo se localizan dos secuencias de localización nuclear (NLS), seguido de una región que permite la interacción con RAD51 y la serina 3291, muy indispensable para la fosforilación por CDK2. Tomado de: Roy, Chun y Powell, 2016.

3.7 FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS SUPRESORAS DE TUMORES BRCA1 Y BRCA2

3.7.1 FUNCIONES DE LA PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES BRCA1

3.7.1.1 BRCA1 regula positivamente el desarrollo embrionario

BRCA1 se ha relacionado principalmente con procesos de supresión del crecimiento celular; sin embargo, se ha demostrado que juega un papel muy importante en el desarrollo embrionario. Al examinar el patrón de expresión de *BRCA1* durante la embriogénesis de ratón, la mayor expresión se vió en células que componen los diferentes órganos con altas tasas de proliferación y en proceso de diferenciación (Marquis *et al.*, 1995).

La presencia de mutaciones en diferentes partes de la proteína BRCA1, como deleciones en los exones 2, 5, 6 u 11 en embriones de ratón, inducen letalidad embrionaria entre los días 5.5-18.5 del desarrollo (Gowen *et al.*, 1996; Hakem *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999b).

En embriones que lograron sobrevivir se observó retraso en el desarrollo y tamaño más pequeño con respecto al wild-type (Gowen *et al.*, 1996; Hakem *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001), principalmente en las estructuras relacionadas a la formación del sistema nervioso (Gowen *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998).

Se observaron alteraciones, malformaciones y ausencia de estructuras embrionarias (Gowen *et al.*, 1996; Hakem *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1998). Los embriones con deleción de *BRCA1* muestran inestabilidad cromosómica (Shen *et al.*, 1998).

Estos efectos podrían ser causados por un ciclo celular lento o prolongado (Hakem *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1999b). Por lo tanto, BRCA1 funciona como un estímulo para la proliferación celular embrionaria, es decir, regula positivamente la proliferación celular y mantiene la

estabilidad genética embrionaria (Hakem *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998), además regula la diferenciación en una gran variedad de estados tempranos del desarrollo (Gowen *et al.*, 1996).

3.7.1.2 BRCA1 es esencial para la morfogénesis, diferenciación y desarrollo de las estructuras mamarias

BRCA1 es esencial para la morfogénesis de las estructuras mamarias (Venkitaraman, 2001). En ratones hembra, antes del inicio de la pubertad las estructuras mamarias contienen un pequeño árbol epitelial ramificado que se origina en el pezón, los niveles de expresión de *BRCA1* son mínimos. A medida que comienza la pubertad, aparecen yemas terminales en los extremos de los conductos mamarios constituidos de células que proliferan y se diferencian, marcando el inicio del rápido crecimiento y la morfogénesis ductal. Durante todo el periodo de pubertad y la morfogénesis ductal los niveles de ARNm de *BRCA1* aumentan en las estructuras mamarias, los cuales incrementan aún más durante el embarazo, en las yemas alveolares marcando el crecimiento y formación de alvéolos maduros (Marquis *et al.*, 1995).

Células epiteliales mamarias de ratón con delección en *BRCA1*, presentan retraso en el desarrollo general de la estructura mamaria y anomalías, principalmente en el desarrollo de los ductos (Xu *et al.*, 1999a). También, se observó inhibición de la ramificación del conducto mamario aún en presencia de estrógenos y presentaron ovarios ramificados (Bannett *et al.*, 2000), determinando que mutaciones en *BRCA1* conlleva a un bloqueo de la diferenciación celular.

3.7.1.3 BRCA1 regula vías de señalización activadas por los estrógenos

Las células de cáncer de mama al ser estimuladas con estrógenos y progesterona regulan los niveles de ARNm y de la proteína BRCA1 (Gudas *et al.*, 1995), demostrando que BRCA1 regula señales y vías de señalización acopladas a hormonas, particularmente los estrógenos (Fan *et al.*, 1999; Wang & Di, 2014; Xian *et al.*, 2005). BRCA1 coinmunoprecipita con el RE- α (Fan *et al.*, 2001) por la interacción directa de BRCA1 con la región del dominio de unión al ligando/función de activación-2 (LBD / AF-2) del RE- α inhibiendo su actividad transcripcional (Fan *et al.*, 1999; Wang & Di, 2014; Xian *et al.*, 2005), mutaciones en BRCA1 genera pérdida de la interacción BRCA1-RE- α y la actividad transcripcional del RE- α se encuentra activa constantemente (Fan *et al.*, 2001; Xian *et al.*, 2005) y con ello sus genes blanco como ciclina D y c-Myc (Wang & Di, 2014; Zheng *et al.*, 2001).

Pero BRCA1 también regula la actividad transcripcional del RE- α de una forma independiente de ligando, relacionado al dominio AF1 (Zheng *et al.*, 2001). Así mismo el dominio BRCA1-BARD1 monoubiquitina el LBD del RE- α para reprimir su actividad transcripcional (Eakin *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2001; Wang & Di, 2014; Xian *et al.*, 2005).

BRCA1 limita el grado de estimulación estrogénica sobre la proliferación de células epiteliales mamarias regulando la actividad transcripcional del RE- α (Fan *et al.*, 2001; Kitagishi, Kobayashi y Matsuda, 2013) y la pérdida de esta regulación contribuye a la tumorigenesis (Fan *et al.*, 1999).

En los últimos años se descubrió que el RE- α regula la expresión de *BRCA1*, pero a su vez *BRCA1* promueve la expresión del RE- α por lo que estas dos proteínas se encuentran en un ciclo de regulación (Kitagishi, Kobayashi y Matsuda, 2013; Wang & Di, 2014). Durante la pubertad y el embarazo hay incremento del RE pero también de *BRCA1* (Suba, 2015), por lo cual la señalización de *BRCA1* y el RE regulan sinérgicamente la proliferación y diferenciación de las células epiteliales mamarias (Wang & Di, 2014).

3.7.1.4 BRCA1 juega un papel importante en las modificaciones epigenéticas

Durante la transcripción de genes se requiere la remodelación de la cromatina que permita abrir las hebras del ADN y exponer los promotores de cada gen. La acetilación de histonas generalmente se asocia con la activación de genes. *BRCA1* interactúa con HDAC1 y HDAC2, estas enzimas tienen el papel de eliminar grupos acetilos del ADN generando la condensación del nucleosoma y la represión transcripcional del ADN. Por lo cual *BRCA1* puede potencialmente reprimir la transcripción de genes que promueven la proliferación celular (Yarden & Brody, 1999).

Por otro lado, *BRCA1* interactúa con SWI/SNF encargados de relajar el ADN (Bochar *et al.*, 2000) y con P300 que posee actividad histona acetiltransferasa (Wang & Di, 2014; Yarden & Brody, 1999), modificaciones epigenéticas relacionadas con la activación transcripcional.

3.7.1.5 BRCA1 como regulador de la transcripción

Desde el descubrimiento que *BRCA1* presenta actividad transcripcional (Champan & Verma, 1996; Monteiro, August y Hanafusa, 1996), ha sido implicado en la activación de la transcripción de varios genes inducidos en respuesta al daño en el ADN (Venkitaraman, 2001). Mutaciones en el extremo carboxilo generan pérdida de esta actividad de *BRCA1* (Li *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Monteiro, August y Hanafusa, 1996; Ouchi *et al.*, 1998) por lo tanto se ha mencionado que *BRCA1* es un factor de transcripción (Scully *et al.*, 1997a).

El dímero CtIP-CtBP es el encargado de reprimir la actividad transcripcional de *BRCA1* al interactuar con el dominio BRCT, cuando hay daño al ADN, CtIP y CtBP se liberan de *BRCA1* permitiendo su actividad transcripcional (Li *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000).

BRCA1 así mismo interacciona con un conjunto de proteínas que le permiten la regulación de la transcripción, como la helicasa RHA, la holoenzima ARN pol II (Anderson *et al.*, 1998; Chiba & Parvin, 2002; Scully *et al.*, 1997a), HDAC1/2 (Yarden & Brody, 1999) y con otras varias helicasas como son BACH1, BLM y BRIP1. Por otro lado, BRCA1 juega un papel importante en la regulación de factores de transcripción como RB y el factor de transcripción c-Myc, inhibiendo su actividad oncogénica (Clark *et al.*, 2012).

3.7.1.6 BRCA1 presenta actividad ubiquitina ligasa E3

La proteína BRCA1 es una ubiquitina ligasa E3, esta actividad se ve incrementada cuando interacciona con BARD1 (Chen *et al.*, 2002). Mutaciones en el dominio RING de BRCA1 o BARD1 conllevan a la pérdida de esta actividad (Eakin *et al.*, 2007; Hashizume *et al.*, 2001; Nishikawa *et al.*, 2004; Ruffner *et al.*, 2001) reflejada en la supresión de la ubiquitinación de sus blancos como en el RE- α (Eakin *et al.*, 2007).

BRCA1 principalmente monoubiquitina y la posición de la ubiquitinación generalmente es en Lys-6, ninguna de las dos marcas es de degradación vía proteosoma (Nishikawa *et al.*, 2004) concluyendo que BRCA1-BARD1 no marcan a las proteínas para su degradación, posiblemente sea una marca de reparación del ADN y de regulación de la actividad de la proteína blanco (Chen *et al.*, 2002; Nishikawa *et al.*, 2004; Starita *et al.*, 2004), por ejemplo, la monoubiquitinación de las histonas se ha asociado a la remodelación de la cromatina permitiendo que la maquinaria de reparación del ADN acceda al ADN dañado (Chen *et al.*, 2002).

El complejo BRCA1-BARD1 puede autoubiquitinarse a sí mismo (Chen *et al.*, 2002; Mallery, Vandenberg y Hiom, 2002; Nishikawa *et al.*, 2004) por poliubiquitinación (Mallery, Vandenberg y Hiom, 2002). Pero BRCA1 monoubiquitina a la histona H2A y su variante H2AX así como su forma fosforilada (γ H2AX fosforilada en la serina 139), histonas H2B, H3 y H4 pero no a H1 (Mallery, Vandenberg y Hiom, 2002) al igual que ubiquitina a la proteína relacionada a la anemia de Fanconi, FANCD2 (Chen *et al.*, 2002; Liu & West, 2002) y γ -tubulina del centrosoma (Starita *et al.*, 2004).

3.7.1.7 BRCA1 regula la recombinación genética durante la meiosis

BRCA1 interacciona y colocaliza con RAD51 durante la replicación celular (Scully *et al.*, 1997b). RAD51 se asocia específicamente con el desarrollo de complejos sinaptonemales en células meióticas (Scully *et al.*, 1997c).

Se encontró que BRCA1 y RAD51 colocalizan junto con la proteína de los elementos axiales SCP3 en los complejos sinaptonemales, formado entre cromosomas homólogos durante la recombinación, particularmente durante el zigoteno de las células en meiosis (Scully *et al.*, 1997c).

BRCA1 interactúa con el complejo MRN, que tiene como función generar el rompimiento de doble cadena y los extremos del ADN para permitir el proceso de recombinación homóloga durante la meiosis (Haber, 1998).

3.7.1.8 BRCA1 en la reparación del daño al ADN por recombinación homóloga

Una de las funciones más importante de BRCA1 es la reparación de DSB por recombinación homóloga (Deng & Scott, 2000; Venkitaraman, 2001) donde se requiere de una cadena de ADN homóloga, es decir la cromátida hermana (Venkitaraman, 2001).

Células tumorales (Venkitaraman, 2001) y embriones de ratón (Moynahan *et al.*, 1999) carentes de *BRCA1* cuando son expuestas a radiación ionizante, muestran una hipersensibilidad, demostrando que existe defecto en la reparación de DSB. Por otro lado, células (Zhong *et al.*, 1999), fibroblastos (Xu *et al.*, 1999b) y embriones de ratón (Shen *et al.*, 1998) con mutación en *BRCA1* mostraron sensibilidad a radiación y decremento en la formación de complejos proteicos relacionados a la reparación por DSB.

Esto podría ser causado por falta de interacción entre BRCA1 y RAD51 (Scully *et al.*, 1997c; Zhong *et al.*, 1999), ya que BRCA1 al ser hiperfosforilado después del daño al ADN, conduce a RAD51 al sitio del daño (Scully *et al.*, 1997b). Lo que confirma porque mutaciones en BRCA1 generan un mecanismo de reparación DSB deficiente y no se observa la colocalización (Xu *et al.*, 1999b). Pero también BRCA1 podría regular a RAD51 por intermediarios, BRCA1 al interactuar con BARD1 (Wu *et al.*, 1996), por medio de este último también interactúa con RAD51 (Scully *et al.*, 1997b).

Por otro lado, BRCA1 también interactúa con el complejo denominado MRN (Venkitaraman, 2001) formado de las proteínas RAD50-MRE11-NBS1 (Haber, 1998; Wang *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 1999) cuya función es la reparación de DSB (Maser *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1999) por recombinación homóloga (Haber, 1998), para después poder interactuar con otras proteínas formando un complejo más grande denominado BASC (complejo de vigilancia del genoma asociado a BRCA1) que incluye MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM, RFC y MRN, que funciona como sensor de daño a ADN y como regulador de procesos de reparación. BRCA1 colocaliza con todos estos complejos de proteínas en puntos nucleares cuando células se tratan con agentes que dañan el ADN, especialmente en horquillas de replicación (Wang *et al.*, 2000).

Células que presentan una mutación en *BRCA1* al ser expuestas a radiación, no se ve la colocalización y coinmunoprecipitación del complejo MRN-BRCA1 a nivel nuclear, pero cuando se transfectan las células con *BRCA1* wild-type se observa que se recupera la capacidad de colocalización nuclear (Zhong *et al.*, 1999).

BRCA1 interactúa con RAD50 y RAD51 ejerciendo diferentes funciones en la reparación del daño al ADN (Haber, 1998; Maser *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1999) ya que nunca se ha observado que RAD50 colocalice con RAD51 (Maser *et al.*, 1997). Se postula que el complejo MRN es responsable del procesamiento de los extremos del ADN cuando es fragmentado y RAD51 está involucrado en el intercambio de cadenas durante una fase posterior, por lo cual BRCA1 puede facilitar el acoplamiento de estos dos pasos (Zhong *et al.*, 1999).

BRCA1 puede interactuar directamente con el ADN formando estructuras en forma de horquillas, con el objetivo de rodear y delimitar los extremos del ADN que surgieron como consecuencia del DSB y sitios de daño oxidativo (Paull *et al.*, 2001).

3.7.1.9 BRCA1 regula la reparación del ADN por mismatch

BRCA1 también se ha relacionado con reparaciones de mismatch o acoplada a la transcripción, al interactuar con los heterodímeros MSH2 / MSH6 y PMS2 / MLH1, formando parte del complejo BASC. Mecanismo por el cual se eliminan las bases dañadas por radiación u oxidación de la cadena de ADN transcrita (Wang *et al.*, 2020).

3.7.1.10 BRCA1 regula el número de centrosomas en la formación del huso mitótico

BRCA1 colocaliza con el centrosoma durante la mitosis (prometáfase a anafase temprana) y coinmunoprecipita con γ -tubulina, componente esencial de los centriolos para la nucleación de microtúbulos (Hsu & White, 1998). Las células carentes de *BRCA1* presentan mayor número de centrosomas funcionales, teniendo husos multipolares los cuales tiran de los cromosomas en diferentes direcciones y conducen a una segregación cromosómica desigual y a la formación de micronúcleos (Xu *et al.*, 1999b). El bloqueo de la interacción entre BRCA1 y γ -tubulina lleva a la incorrecta regulación en la duplicación de centrosomas presentando más de dos, mala formación de huso mitótico y segregación inadecuada de los cromosomas durante la mitosis (Hsu, Doan y White, 2001). Por otro lado, BRCA1 monoubiquitina a γ -tubulina presente en el centrosoma, cuando hay fallas en la marca de ubiquitinación se observa alteración en el número de centrosomas (Starita *et al.*, 2004). BRCA1 es un regulador del ensamblaje del huso mitótico, asegura una distribución apropiada de los cromosomas y la correcta división celular (Hsu & White, 1998; Xu *et al.*, 1999b).

3.7.1.11 BRCA1 relacionado a la estabilidad cromosómica y genética

La incorrecta reparación en el ADN y el aumento en el número de centrosomas por ausencia de *BRCA1* conllevan a la inestabilidad genética y las aberraciones cromosómicas (Xu *et al.*, 1999b).

En fibroblastos embrionarios de ratón con mutaciones en *BRCA1* muestran duplicación de genes y aberraciones cromosómicas estructurales como translocaciones, deleciones, ruptura cromosómica y de cromátidas en la metafase (Xu *et al.*, 1999b). Además se ha presentado hasta 31.9% de células con anormalidades cromosómicas, ya sea en un mayor o menor número de cromosomas o bien reordenamientos cromosómicos (translocaciones, pérdida de cromosomas y cromosomas dicentricos) (Shen *et al.*, 1998). *BRCA1* juega un papel importante en la protección contra la inestabilidad genómica y cromosómica (Paull *et al.*, 2001) por lo cual un mal funcionamiento de *BRCA1* puede generar inestabilidad genética que conlleva a la inactivación de genes supresores de tumores y/o la activación de oncogenes sometiendo a las células a un alto riesgo de transformación maligna (Deng & Scott, 2000).

3.7.1.12 BRCA1 regula el ciclo celular

Al analizar los niveles del ARNm de *BRCA1* en células epiteliales mamarias normales y líneas celulares tumorales, en las fases G0 y G1 temprano, los niveles fueron mínimos pero más altos en la transición G1/S; seguido de un pequeño decremento aunque permanece el nivel alto hasta la fase G2 (Vaughn *et al.*, 1996b). Este patrón de expresión concuerda perfectamente con los niveles de expresión a nivel de proteína y correlaciona con la fosforilación de *BRCA1*, la cual se ve que decremanta y se desfosforila de forma transitoria después de la fase M (Chen *et al.*, 1996; Ruffner & Verma, 1997) lo que indica que *BRCA* está siempre presente a lo largo del ciclo celular.

En células que son expuestas a agentes que dañan el ADN, la expresión de la proteína es detectable en la fase S, alcanzando los niveles más altos entre la fase G2/M (Zhong *et al.*, 199) así como su relocalización a nivel nuclear en la fase S media a tardía y G2 (Wang *et al.*, 2000). Fibroblastos embrionarios de ratón que presentan una mutación en *BRCA1* y que fueron sometidos a radiación carecen del funcionamiento correcto del punto de control G2-M (Xu *et al.*, 1999b). La sobreexpresión de *BRCA1* mutante, en la cual se pierde más de la mitad de la proteína, resulta en el aumento de la proliferación celular y mal funcionamiento del punto de control G2-M (Larso *et al.*, 1997). Pero cuando se sobreexpresa *BRCA1* wild-type se induce la detención del ciclo celular en fase S (Somasundaram *et al.*, 1997). Lo que ha llevado a concluir que *BRCA1* juego un papel importante en el punto de control del ciclo celular G1/S y G2/M.

BRCA1 interacciona con CDK2, CDK4, ciclina B, ciclina D, ciclina A, proteínas encargadas de la activación y progresión del ciclo celular, de tal manera que suprime su función (Wang *et al.*,

1997), la regulación del ciclo celular también puede ser causada por la interacción entre BRCA1 con ATM (Cortez *et al.*, 1999) y ATR (Gatei *et al.*, 2001) proteínas que censan el daño al ADN.

Así mismo, BRCA1 interacciona con RB en su estado hipofosforilado y lo mantiene de esta forma para evitar su activación, impidiendo la liberación del factor de crecimiento E2F, que transcribe la ciclina E, imposibilitando el paso de G1 a S regulado por CDK2–ciclina E, por otro lado se encontró que este mismo complejo CDK2–ciclina E fosforila y activa BRCA1 (Deng & Brodie, 2000).

3.7.1.13 BRCA1 induce muerte celular

BRCA1 estimula la transcripción del inductor de muerte celular GADD45 cuando hay daño al ADN. Está proteína activa JNK/SAPK induciendo a las células a una muerte celular apoptótica. La activación de JNK/SAPK puede ser por el intermediario MTK1/MEKK4 (Harkim *et al.*, 1999).

3.7.2 FUNCIONES DE LA PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES BRCA2

3.7.2.1 BRCA2 regula positivamente el desarrollo embrionario

Durante el desarrollo embrionario de ratón, *BRCA2* tiene alta expresión en las células de las estructuras que proliferan rápidamente y que se encuentran en proceso de diferenciación (Rajan *et al.*, 1997; Sharan *et al.*, 1997).

Embriones de ratón que presentan deleciones de los exones 10 u 11 de *BRCA2* muestran letalidad embrionaria entre el día embrionario 7.5-9.5 (Ludwig *et al.*, 1997; Sharan *et al.*, 1997; Susuki *et al.*, 1997). Otros embriones muestran retraso en su desarrollo, presentándose embriones pequeños (Ludwig *et al.*, 1997; Sharan *et al.*, 1997; Susuki *et al.*, 1997), se observa retraso en la formación de varias estructuras (Sharan *et al.*, 1997; Susuki *et al.*, 1997) ausencia y malformación de estructuras embrionarias (Sharan *et al.*, 1997; Susuki *et al.*, 1997).

Indicando que *BRCA2* es esencial para el control y desarrollo embrionario temprano, supervivencia y / o proliferación de células madre embrionarias (Rajan *et al.*, 1997; Sharan *et al.*, 1997; Susuki *et al.*, 1997).

3.7.2.2 BRCA2 es esencial para la morfogénesis, diferenciación y desarrollo de las estructuras mamarias

Células de epitelio mamario, al ser inhibida su proliferación por contacto, los niveles de *BRCA2* bajaron. Pero cuando se expusieron a hormonas lactogénicas, que inducen la diferenciación,

como prolactina, insulina e hidrocortisona, se observó aumento en la expresión de *BRCA2* y la inducción de la diferenciación, al considerar a la β -caseína como marca de este proceso celular (Rajan *et al.*, 1996).

Ratonas antes de iniciar la pubertad presentan unas yemas en los extremos de los conductos indiferenciados, cuando entran en edad de pubertad aumenta la expresión de *BRCA2* en las yemas para dar origen a los conductos (morfogénesis ductal). Al principio del embarazo se observó aumento en la expresión del ARNm de *BRCA2* en las yemas alveolares que inician un proceso de rápida proliferación y diferenciación para formar alvéolos maduros productores de leche, posterior al periodo de lactancia bajan los niveles (Rajan *et al.*, 1997).

Pero cuando ratonas fueron ovariectomizadas se observó menor expresión de *BRCA2* en las estructuras mamarias, sin embargo, cuando se sometieron a una dieta que contiene 17 β -estradiol y progesterona se observó la recuperación en la expresión de *BRCA2*, demostrando que las hormonas regulan la expresión de este gen en la diferenciación de estructuras mamarias (Rajan *et al.*, 1997). Aunque no se sabe si *BRCA2* puede regular directamente las señales hormonales, es muy probable que requiera de intermediarios como *BRCA1*, ya que *BRCA2* no se ha encontrado que tenga sitios de reconocimiento del receptor hormonal como los que presenta *BRCA1*.

3.7.2.3 *BRCA2* probablemente presente actividad transcripcional

Se ha mencionado que el extremo amino terminal de *BRCA2* presenta actividad transcripcional cuando se une al dominio de unión al ADN de GAL4 y con el inhibidor de transcripción Lex A, tanto en levaduras como en dos líneas celulares de cáncer de mama U2OS y NMuMG. Al cambiar la Tyr 42 por Cys (Y42C) se pierde la actividad transcripcional (Milner *et al.*, 1997). Sin embargo, no hay evidencia suficiente para sustentar esta función, por otro lado no se ha demostrado que *BRCA2* interaccione con helicasas, factores de transcripción o que presente un dominio específico que funcione como factor de transcripción.

3.7.2.4 *BRCA2* posiblemente regula el número de centrosomas

En fibroblastos embrionarios de ratón con la proteína *BRCA2* truncada en el residuo 2014 (2014tr), se presentó formación de micronúcleos, los cuales aumentaban a medida que incrementaba el número de divisiones celulares, causados por una mala segregación de los cromosomas, que conllevó también a la formación de aneuploidías. Al analizar el huso mitótico, se encontró que existía más de un par de centrosomas, lo que hace pensar que *BRCA2* regula la replicación de centrosomas; por lo cual, la ausencia de esta proteína genera aumento en el número de centrosomas (Tutt *et al.*, 1999). Sin embargo, no se ha identificado

una región específica de interacción con γ -tubulina ni existen estudios suficientes que sustenten esta regulación.

3.7.2.5 BRCA2 regula la recombinación genética durante la meiosis

Al analizar núcleos espermáticos humanos, se detectó que BRCA2 colocaliza con la proteína del elemento axial SCP3 en fase de cigoto tardío-paquiteno temprano. Lo que indica que BRCA2 regula las fases de la meiosis que anteceden a la formación del complejo sinaptomérico, es decir, antes que se dé la sinapsis entre cromosomas (Chen *et al.*, 1998a). Además, BRCA2 se une a la recombinasa DMC1, capaz de unirse al ADN y formar filamentos de nucleoproteína helicoidales que catalizan el intercambio de cadenas durante la meiosis (Thorslund, Esashi y West, 2007). Con esto se demuestra que BRCA2 juega un papel importante en la coordinación de ambas recombinasas durante la recombinación meiótica de mamíferos, formando un complejo BRCA2-RAD51-DMC1.

3.7.2.6 BRCA2 regula el ciclo celular de manera menos eficiente que BRCA1

Los niveles del ARNm de *BRCA2* incrementan a medida que avanza el ciclo celular llegando a su nivel máximo entre la fase G1/S en células de mama, fibroblastos y en cultivos de células epiteliales mamarias humanas normales. Al detener la división celular, los niveles de expresión disminuyen (Rajan *et al.*, 1996; Vaughn *et al.*, 1996a), el mismo patrón de expresión se observó a nivel de proteína (Bertwistle *et al.*, 1997).

Esto hace pensar que la expresión de *BRCA2* es dependiente del ciclo celular y probablemente los estímulos proliferativos modulan la expresión del ARNm (Bertwistle *et al.*, 1997; Rajan *et al.*, 1996; Vaughn *et al.*, 1996a). Se sugiere un posible bucle regulador en el que la proliferación induce la expresión de *BRCA2*, que a su vez, regula negativamente la proliferación (Bertwistle *et al.*, 1997; Rajan *et al.*, 1996).

Mutaciones en BRCA2 que generan pérdida de interacción con RAD51 provocan el mal funcionamiento del punto de control G2/M pero no G1/S, aun cuando hay alteraciones genéticas causadas por radiación γ (Chen *et al.*, 1999). En células que presentan una proteína BRCA2 no funcional, cuando se sobreexpresa BRCA2 wild-type se inhibe la proliferación celular (Wang *et al.*, 2002).

Pero otros estudios mencionan que BRCA2 no tiene efecto en la regulación del ciclo celular. En células embrionarias de ratón homocigotas para una proteína BRCA2 truncada en el aminoácido 1492 no se observó el bloqueo en los puntos de control del ciclo celular (Patel *et*

al., 1998). Esto podría estar relacionado con que BRCA2 no interacciona con proteínas ni transcribe genes que tengan la capacidad de inducir muerte celular como es el caso de BRCA1.

3.7.2.7 BRCA2 relacionado a la estabilidad cromosómica y genética

En células embrionarias de ratón con mutaciones en *BRCA2* se observó acumulación espontánea de anomalías cromosómicas que incluyen roturas, intercambios de cromátidas caracterizado por la presencia de cromátides trirradiales y cuadrirradiales, núcleos poliploides aberrantes y células con metafases anormales (Patel *et al.*, 1998; Tutt *et al.*, 2001b). En fibroblastos embrionarios de ratón con una mutación se presentaron aneuploidías y micronúcleos (Tutt *et al.*, 1999).

Linfocitos con mutación en *BRCA2*, presentaron aumento en el número de reordenamientos cromosómicos de manera espontánea o bien después de estar expuestos a agentes que dañan el ADN, llegando a observar casos con un segmento acéntrico que contiene fragmentos de los cromosomas 13, 16 y 5, y múltiples translocaciones que involucran diferentes cromosomas: t (X; 6), t (12; 16), t (13; 14) y t (X; 16) y presencia de aneuploidías (Yu *et al.*, 2000).

Por lo cual, la pérdida de *BRCA2* genera aberraciones en la segregación cromosómica durante la mitosis, inestabilidad genética y cromosómica que recuerda al síndrome de Bloom y la anemia de Fanconi (Moynahan, Pierce y Jasin, 2001; Patel *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000). Desencadenando los cambios genéticos adicionales necesarios para la transformación neoplásica en individuos portadores de mutaciones en la línea germinal (Moynahan, Pierce y Jasin, 2001; Yu *et al.*, 2000).

3.7.2.8 BRCA2 en la reparación del ADN por recombinación homóloga

La función principal de BRCA2 como supresor tumoral es la respuesta celular al daño del ADN (Chen *et al.*, 1999), involucrada en la reparación de DSB por recombinación homóloga (Moynahan, Pierce y Jasin, 2001; Tutt *et al.*, 2001b). BRCA2 interacciona con RAD51 (Chen *et al.*, 1998b; Venkitaraman, 2001; Wong *et al.*, 1997) y en lisados celulares se observa su coimmunoprecipitación (Chen *et al.*, 1998b).

Mutaciones en los dominios BRC generan pérdida de interacción con RAD51, mostrando hipersensibilidad a la radiación y, causada por una mala reparación en el DSB, además se pierde la colocalización de RAD51 y BRCA2 a nivel nuclear (Chen *et al.*, 1999). En células embrionarias de ratón con *BRCA2* mutado se observa la misma hipersensibilidad (Patel *et al.*, 1998; Sharan *et al.*, 1997). Al transfectar BRCA2 wild-type se revierten estos defectos y las células se vuelven más resistentes a agentes que dañan el ADN (Chen *et al.*, 1998b).

Células con mutación en BRCA2 muestran ausencia de reparación por recombinación al generar DSB por medio de la endonucleasa I-SceI (Moynahan, Pierce y Jasin, 2001). En linfocitos con mutaciones en BRCA2 se ha observado ADN fragmentado, especialmente en DSB, observándose ausencia del mecanismo de reparación por recombinación homóloga. Cuando los linfocitos fueron expuestos a radiación γ , no se observó la translocación de RAD51 a sitios con ADN dañado (Yu *et al.*, 2000).

El principal papel de las repeticiones BRC es bloquear la función de RAD51, la unión BRCA2-RAD51 impide que RAD51 se adhiera al ADN y se formen filamentos de nucleoproteínas. Mutaciones en BRC generan pérdida de la interacción BRCA1-RAD51 permitiendo que las funciones de RAD51 se normalicen (Davies *et al.*, 2001). Llegando a concluir que la función de BRCA2 es transportar a RAD51 al sitio de daño del ADN (Davies *et al.*, 2001).

BRCA2 se une con RAD51 en células normales, impidiendo que los monómeros de RAD51 puedan autoasociarse y se unan al ADN, es decir, BRCA2 está precargado y RAD51 inactivo, pero está listo para ser relocalizado y activado en sitios potenciales de reparación como parte de la respuesta al daño del ADN (Davies *et al.*, 2001; Esashi *et al.*, 2005; Venkitaraman, 2001). Cuando llega una señal de daño al ADN, se activaría BRCA2 y de esta forma se estimularía la actividad de RAD51, BRCA2 también ayuda en la translocación de RAD51 al núcleo (Davies *et al.*, 2001; Esashi *et al.*, 2005; Venkitaraman, 2001). Por tal motivo se dice que el complejo BRCA2-RAD51 existe en dos estados *in vivo*: inactivo y el activo (Venkitaraman, 2001).

En el extremo carboxilo terminal de BRCA2 se encuentra otro sitio involucrado en la reparación del ADN, segundo sitio de unión a RAD51 (Mizuta *et al.*, 1997; Moynahan, Pierce y Jasin, 2001; Sharan *et al.*, 1997) alteraciones en esta región muestran defectos en la reparación del ADN por recombinación homóloga (Chen *et al.*, 1998b; Mizuta *et al.*, 1997; Tutt *et al.*, 2001b). En esta región también se encuentran sitios de fosforilación.

La fosforilación es baja en la fase S cuando la recombinación está activa, aumentando a medida que las células progresan hacia la mitosis (G2 tardía y todo M). Esta fosforilación bloquea las interacciones entre el extremo C terminal de BRCA2 y RAD51. El daño del ADN disminuye la fosforilación y estimula las interacciones con RAD51. Al inducir DSB por la endonucleasa I-SceI, en células que sobreexpresan la región carboxilo terminal de BRCA2, se observa ausencia en la reparación del ADN, debido que BRCA2 mantiene capturado a RAD51. Esto demuestra que el estado de fosforilación es crucial para activar a BRCA2 y RAD51 en la reparación del ADN por recombinación homóloga (Esashi *et al.*, 2005).

Por lo tanto, las repeticiones BRC pueden servir para inactivar a RAD51 proporcionando un andamio para la unión de monómeros y el extremo carboxilo terminal de BRCA2 es el responsable de la activación de RAD51. Lo que hace pensar, que después del daño al ADN, se genera la pérdida de la fosforilación y se da la activación del dominio de interacción RAD51 C-

terminal de BRCA2, de esta forma se permitiría tomar los monómeros de RAD51 inactivos en las repeticiones BRC y cargarlos en el ADN monocatenario para la reparación del ADN (Esashi *et al.*, 2005).

BRCA2 es un cofactor esencial en la reparación del ADN dependiente de RAD51 en el DSB al generar la interacción entre ambos procesos (Moynahan, Pierce y Jasin, 2001; Sharan *et al.*, 1997).

3.7.2.9 BRCA2 controla la frecuencia de mutaciones y el proceso de cáncer

Ratones con mutaciones homocigotas de la población judía *Ashkenazi* 6174delT mostraron aumento en la frecuencia de mutaciones espontáneas, aproximadamente 100 mutaciones adicionales por célula somática con respecto a los ratones wild-type, las cuales aumentan su frecuencia cuando los ratones fueron expuestos a radiación ionizante (hasta 320 mutaciones somáticas adicionales), causado por una reparación distinta a la recombinación homóloga. La reparación anormal del ADN y la consiguiente inestabilidad genómica pueden acelerar el proceso mutacional y con ello el cáncer (Tutt *et al.*, 2001b).

En ratones heterocigotos no se observa este efecto, esto apoya el argumento de que se requiere la mutación o pérdida de ambas copias de *BRCA2* antes de que se adquiera un fenotipo mutante. Se presume que la pérdida del alelo *BRCA2* wild-type restante es un evento muy temprano en el desarrollo del cáncer de mama familiar (Tutt *et al.*, 2001b).

3.7.3 BRCA1 Y BRCA2 TIENEN FUNCIONES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN COMÚN

BRCA1 y BRCA2 tienen muchas funciones en común (Ludwig *et al.*, 1997; Rajan *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1997; Vaughn *et al.*, 1996a), al analizar conjuntamente ambos genes, se identificó que los niveles de expresión de *BRCA1* y *BRCA2* aumentan a medida que avanza el ciclo celular llegando a su nivel máximo en fase G1/S (Rajan *et al.*, 1996; Vaughn *et al.*, 1996a).

Cuando se analizaron ambas proteínas en embriones de ratón se encontró que tienen patrones de expresión espacial y temporal muy semejantes. El mismo comportamiento se observó en algunos órganos de ratones adultos como son: testículo, próstata, timo, bazo, hígado, intestino delgado, placenta, ovarios y mama (Rajan *et al.*, 1997). Al mutar a *BRCA1* y *BRCA2* en ratones se encontró que ambos generan letalidad embrionaria, retraso en el desarrollo y daños estructurales (Ludwig *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997). Además se ha demostrado que las hormonas, especialmente los estrógenos regulan la expresión de ambos genes. También, BRCA1 y BRCA2 se han involucrado en la diferenciación de la estructura mamaria durante la pubertad y la lactancia, así como en la espermatogénesis (Rajan *et al.*, 1997).

Estas evidencias llevaron a demostrar que BRCA1 tiene un sitio específico de unión a BRCA2, formando un complejo, en el cual coprecipitan ambas proteínas, complejo que les permite regularse y activarse entre ellas. De esta forma coexisten en focos nucleares de células en fase S en mitosis y en elementos axiales de los complejos sinaptonémicos en desarrollo durante la meiosis. Por otro lado, existe un complejo BRCA1-BRCA2-RAD51, que colocaliza en focos subnucleares cuando las células son expuestas a agentes que dañan al ADN y en elementos axiales (Chen *et al.*, 1998a).

Por lo cual BRCA1 y BRCA2 son inducidos por los mismos agentes y sus vías de acción interaccionan para regular la reparación del ADN, recombinación homóloga, proliferación, diferenciación y supresión tumoral (Ludwig *et al.*, 1997; Rajan *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1997; Vaughn *et al.*, 1996a).

3.8 BRCA REGULA EL CICLO CELULAR Y MUERTE CELULAR A TRAVÉS DE P53 Y P21

Se ha demostrado que BRCA1, P53 y P21 tienen funciones en común, tanto en la regulación del desarrollo embrionario como en los procesos tumorales. Embriones de ratón con mutaciones en *BRCA1* y *p53* presentaron gran cantidad de aberraciones cromosómicas (reordenamientos y aneuploidías) que conllevan a la letalidad embrionaria (Shen *et al.*, 1998). Así mismo, se ha demostrado que *BRCA1* mutado genera aumento en la expresión de *p53* y *p21* (Hakem *et al.*, 1996), cuando está mutado *BRCA2* se observa aumento de la expresión de *p21* pero no de *p53* (Suzuki *et al.*, 1997), estos eventos podrían explicar el retraso en el crecimiento de los embriones (Hakem *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando los ratones con *BRCA1* mutado son inducidos a mutaciones en *p53* se revierte significativamente los efectos en el retraso del desarrollo embrionario (Ludwig *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2001), con *BRCA2* se observa el mismo efecto pero en menor medida, lo que demuestra que *BRCA1* regula la fase embrionaria a través de *p53* y *p21* al inhibir el ciclo celular (Ludwig *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2001).

Las mutaciones en *BRCA1* han demostrado, que conllevan a la pérdida del punto de control regulado por P53 (G1/S), permitiendo la acumulación de anomalías cromosómicas (Shen *et al.*, 1998). En un modelo animal en el que *BRCA1* se encuentra mutado se presentó tumorigenesis en las glándulas mamarias de ratón con muy baja frecuencia, la introducción de un alelo mutado de *p53* aceleró el proceso tumoral (Deng & Scott, 2000). BRCA1 tiene dos sitios de unión específica para P53 (Deng & Brodie, 2000; Ouchi *et al.*, 1998), esta interacción permite regular la actividad transcripcional de P53, activando la transcripción de genes inductores de muerte celular (Ludwig *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2001) y BRCA1-P53 funcionan como coactivadores de la transcripción (Ouchi *et al.*, 1998). La proteína P53 regula la transcripción de BRCA1 tanto *in vitro* como *in vivo*, y BRCA1 participa en la acumulación de P53 después de la irradiación y mediante la regulación de su fosforilación y expresión de MDM2 (Deng, 2006).

Por otro lado, BRCA1 permite la activación transcripcional de *P21* (Li *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000) inhibiendo la progresión del ciclo celular en la fase S, células con mutaciones en BRCA1 son defectuosas en la transcripción de *P21* y presentan fallas en la inhibición del ciclo celular (Somasundaram *et al.*, 1997). Lo que demuestra que BRCA1, P53 y P21 tiene un papel muy importante en el desarrollo tumoral de mama.

3.9 P53 Y P21 JUEGAN UN PAPEL IMPORTANTE EN LA INHIBICIÓN DEL CICLO CELULAR Y ACTIVACIÓN DE LA MUERTE CELULAR APOPTÓTICA

Las proteínas P53 y P21 juegan un papel muy importante en la supresión tumoral al inhibir la progresión del ciclo celular e inducir muerte celular apoptótica a través de una vía de muerte intrínseca o mitocondrial, de las células que presentan daño en el ADN.

Cuando una célula se expone a luz UV, radiación, quimioterapia, hipoxia o alta concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO), se genera daño al ADN. Este daño es detectado por las proteínas ATM o ATR, las cuales fosforilan al factor de transcripción P53, induciendo su activación. Una vez activado P53, se une a los promotores de los genes que presentan elementos de respuesta a P53, entre ellos *P21*, induciendo su transcripción (Brugarolas *et al.*, 1995; Kitagishi, Kobayashi y Matsuda, 2013; Pitolli *et al.*, 2019).

La proteína P21 es un supresor de tumores, debido a que puede bloquear el ciclo celular en el punto de regulación G1/S al inhibir la actividad del complejo cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2)-ciclina E (Brugarolas *et al.*, 1995), principales reguladores de la transición entre la fase G1 a S. Se ha considerado como el principal punto de regulación de P21, debido a que el complejo CDK2-ciclina E también induce la liberación del factor de transcripción E2F de su represor Rb, necesario para la progresión del ciclo celular, demostrando que otro papel de P21 es inhibir la acción de E2F a través del bloqueo de CDK2-ciclina E como se muestra en la figura 7. Sin embargo, puede regular otros puntos del ciclo celular como G1 al bloquear el complejo CDK4 y 6-ciclina D, CDK1-ciclina A que regula la fase de síntesis y CDK1-ciclina B regulando la transición de la fase G2-M (Karimian, Ahmadi, y Yousefi, 2016; Wong E. 2008) como se observa en la figura 7.

Al bloquear el ciclo celular se mandan señales de reparación del ADN, si no se puede reparar el daño, P53 entonces puede iniciar la activación de muerte celular, activando proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas (Elmore, 2007; Martínez, 2009; Cascales A.M., 2003; Jordán, 2003).

La principal función de las proteínas pro-apoptóticas es la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial e inducción de muerte celular, entre ellas se encuentran Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, PUMA y NOXA (Elmore, 2007).

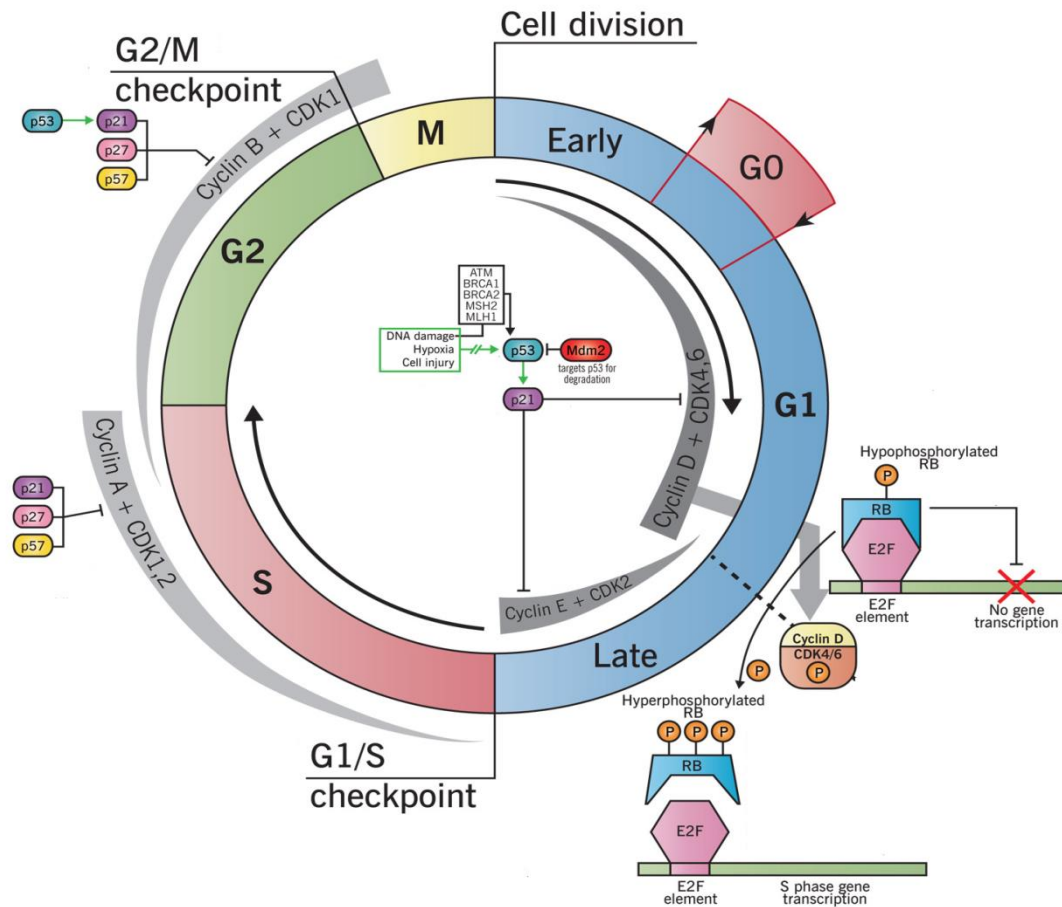


Figura 7. P53 induce la transcripción de P21 para bloquear el ciclo celular. La proteína P53 es activada por proteínas que censan el daño en el ADN, induciendo la transcripción de P21. El supresor de tumores P21 bloquea los complejos CDK-ciclina, encargados de regular positivamente el ciclo celular, de esta manera se le da tiempo a la célula de reparar el daño que ha sido detectado. El complejo CDK2-ciclina E juega un papel muy importante en la fosforilación de Rb, el represor del factor de transcripción de E2F, el cual es necesario para transcribir genes relacionados a la progresión del ciclo celular. De esta manera cuando Rb se hiperfosforila libera a E2F y el ciclo progresa de manera normal, pero cuando P21 inhibe el complejo CDK2-ciclina E, también se inhibe la liberación de E2F. Tomado de: Wong E. 2008.

Cuando el ADN dañado no puede ser reparado, P53 estará activo de manera constante, de tal manera que P53 activará genes de las proteínas pro-apoptóticas como Bax o Bak, los oligómeros de estas proteínas se dirigen a la membrana mitocondrial y se anclan sobre ella, donde inician su polimerización (Cascales A.M., 2003; Taylor, Cullen y Martin, 2008; Pitollí *et al.*, 2019) formando un poro de permeabilidad transitoria mitocondrial que conlleva a cambios en la membrana mitocondrial interna, pérdida del potencial transmembrana de la mitocondria y la liberación de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembranal hacia el citosol como son citocromo C y Apaf-1 (Elmore, 2007).

Una vez liberado el citocromo C se une y activa Apaf-1, los cuales oligomerizan formando un complejo de 7 subunidades de cada uno, el mismo número de homodímeros de la procaspasa 9 y ATP, formando un complejo denominado "apoptosoma". Posteriormente, procaspasa 9 se activa, adquiriendo su forma activa (Caspasa 9) que puede hidrolizar sus moléculas blanco denominada procaspasa 3, 6 y 7 que funcionan como caspasas ejecutoras de la apoptosis (Elmore, 2007; Huerta *et al.*, 2007; Taylor, Cullen y Martin, 2008; Cascales A.M., 2003).

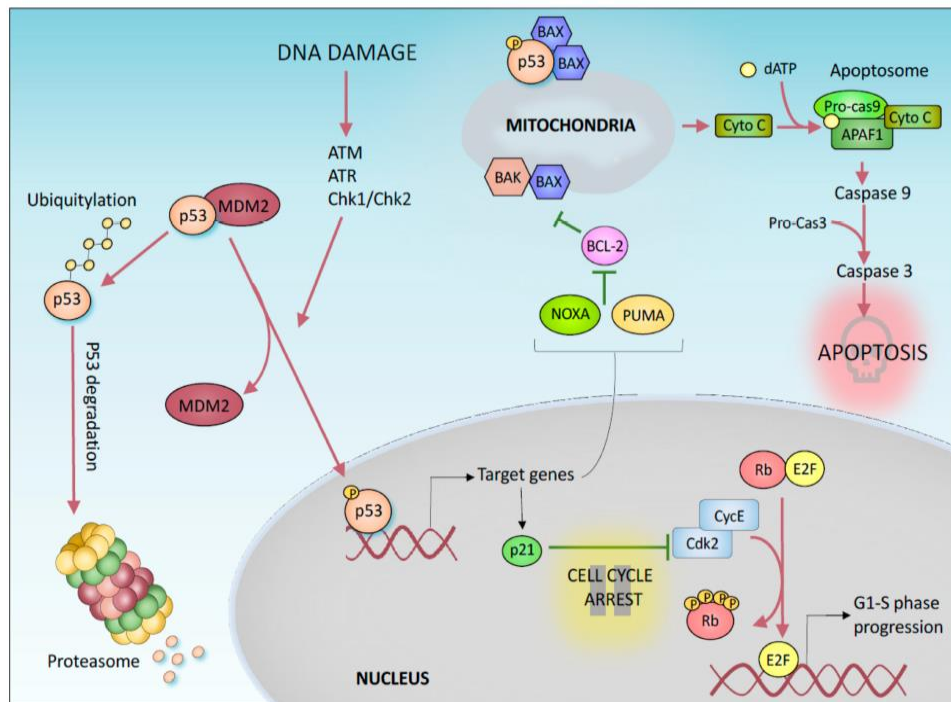


Figura 8. P53 induce muerte celular apoptótica cuando el daño al ADN celular perdura. Cuando P53 es activado por proteínas que censan el rompimiento del ADN, primeramente activa a P21 para arrear el ciclo celular. Si el daño no se ha podido reparar, P53 activa la transcripción de NOXA y PUMA que bloquean la actividad antiapoptótica de BCL-2 y al mismo tiempo activa proteínas proapoptóticas como BAX y BAK que se anclan en la superficie de la membrana mitocondrial, generando poros que permiten la salida de componentes mitocondriales como son el citocromo C, el cual interactúa con APAF 1, Procaspasa-9 y ATP generando el complejo denominado apoptosoma. De esta forma procaspasa 9 se convierte en caspasa 9 activa que a su vez hidroliza a las procaspasas ejecutoras como es caspasa 3 lo que conduce a muerte celular. Esto lleva a la eliminación de células con daños en el ADN que pueden ser causantes de la aparición de cáncer. Tomada de: Pitolli *et al.*, 2019.

Cuando se escinde procaspasa 3 se genera caspasa 3 activa iniciándose la fase de ejecución de la apoptosis. Esto resulta en la fragmentación del ADN, la degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, entrecruzamiento de proteínas, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas y finalmente absorción por las células fagocíticas (Elmore, 2007) como se muestra en la figura 8.

3.10 VÍA DE SEÑALIZACIÓN BRCA1-BRCA2-P53-P21

La vía de señalización relacionada con BRCA inicia cuando hay daño en el ADN, ATM y ATR tienen la capacidad de censar el daño, la traducción de la señal continuará a través de la activación de dos cinasas denominadas CHK1 y CHK2 las cuales fosforilan y activan a BRCA1 (Carr, A.M., 2000). Por otro lado, ATM (Cortez *et al.*, 1999; Gatei *et al.*, 2001) y ATR (Gatei *et al.*, 2001) pueden fosforilar directamente a BRCA1, la hiperfosforilación de BRCA1 lleva a su activación lo que permite que tenga afinidad por P53, de esta forma esta proteína es activada induciendo su actividad transcripcional de tal manera que BRCA1 regula la expresión de genes dependientes de P53 (Ouchi *et al.*, 1998), uno de sus genes blancos de P53 es el promotor de su mismo gen y de P21 (Kitagishi, Kobayashi y Matsuda, 2013; MacLachlan, Takimoto y El-Deiry, 2002). La transcripción de P21 llevaría al arresto del ciclo celular en la fase G1/S (Carr, A.M., 2000), tasas altas de transcripción y fosforilación de P53 llevarían a una muerte celular, sin embargo BRCA1 se ha observado que no favorece mucho este proceso, dando prioridad a la transcripción de genes que bloquean el ciclo celular (MacLachlan, Takimoto y El-Deiry, 2002).

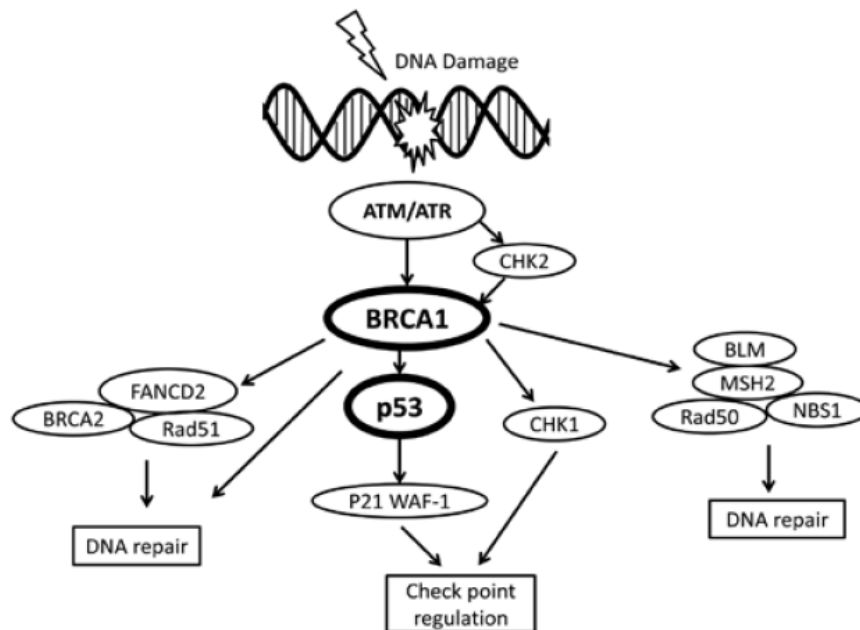


Figura 9. BRCA1 inhibe el ciclo celular y genera muerte celular al activar a P53 y P21 e induce la reparación del ADN a través de BRCA2. Representación esquemática y descripción general donde se muestra que BRCA1 se activa por moléculas censoras de daño al ADN. BRCA1 activo interacciona con P53 para inducir muerte celular apoptótica o bloqueo del ciclo celular a través de P21. Por otro lado, BRCA1 activa a BRCA2 y otros complejos proteicos para reparar el rompimiento del ADN por agentes mutagénicos, para eliminar los procesos tumorales. Tomado de: Kitagishi, Kobayashi y Matsuda, 2013.

Por otro lado, la fosforilación de ATM y ATR directa sobre BRCA1 (Gatei *et al.*, 2001) permite que este último se libere de su represor CtIP, lo que conlleva a la activación de su actividad

transcripcional (Li *et al.*, 1999), induciendo la transcripción de *P21* (Somasundaram *et al.*, 1997).

Cuando *BRCA1* es activado puede iniciar el proceso de reparación del ADN; sin embargo, también interactúa con *BRCA2*, de tal forma que este último se activa para reparar el daño del ADN por recombinación homóloga (Kitagishi, Kobayashi y Matsuda, 2013), como se muestra en la figura 9.

3.11 MUTACIONES EN BRCA OCASIONAN UN MAL FUNCIONAMIENTO DE P53-P21 Y RIESGO DE CÁNCER

Mutaciones en *BRCA1* conllevan a un mal funcionamiento de la proteína que repercute en la inestabilidad genómica, lo cual permite el aumento en las tasas de mutaciones de los genes, incluidos los oncogenes y genes supresores de tumores como *P53* (Deng, 2006; Deng & Scott, 2000), dando origen a deleciones homocigotas y posterior pérdida de *P53* (Deng, 2006).

En tumores de ratones relacionados a *BRCA1*, el 80% de los mismos perdieron la heterocigosidad de *p53* (Deng & Scott, 2000). En otro estudio de ratonas con mutación homocigota en *BRCA1* y heterocigota en *p53* desarrollan tumores mamarios a lo largo del tiempo con pérdida del alelo wild-type de *p53*. La mutación heterocigota de *p53* puede disminuir los niveles de proteína y dar como resultado una apoptosis atenuada y el punto de control G1-S se ve comprometido (Shen *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001). Por otro lado, mutaciones en *BRCA1* conducen a una mala transcripción del inhibidor del ciclo celular *p21* (Kitagishi, Kobayashi y Matsuda, 2013; Somasundaram *et al.*, 1997).

Los cánceres de mama familiares asociados a *BRCA1* tienen frecuencias significativamente más altas de mutaciones en *P53* y daño cromosómico que los cánceres esporádicos (Ouchi *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001) pero no se sabe con exactitud como las mutaciones en estas pacientes alteren los niveles de *P53* y *P21*.

3.12 BRCA1 Y BRCA2 PUEDEN PRESENTAR MUTACIONES A LO LARGO DE TODA LA SECUENCIA DE CODIFICACIÓN

BRCA1 y *BRCA2* tienen una gran cantidad de funciones, las cuales se encuentran distribuidas y asociadas en diferentes regiones de la proteína, dependiendo del dominio que se localiza en cada región y con las proteínas con las que interactúen es la función que desempeñarán.

Los genes *BRCA1* y *BRCA2* son muy grandes y a lo largo de toda la región de codificación así como en los sitios de empalme se han identificado una gran cantidad y variedad de mutaciones (Karakasis, *et al.*, 2016; Ossa & Torres, 2016; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012). La mayoría son pequeñas inserciones o deleciones que generan un cambio en el marco de

lectura que generalmente dan como resultado el truncamiento de la proteína codificada en el 90% de los casos. También se han identificado mutaciones puntuales de cambio de bases generando alteraciones missense y nonsense; sin embargo, el número de mutaciones patogénicas son menores (Scully *et al.*, 1997a; Vasickova *et al.*, 2007; Venkitaraman, 2001).

Se han reportado 19,638 y 20,715 mutaciones de las cuales 2,228-3,241 y 2,672-3,733 son patogénicas, para *BRCA1* y *BRCA2*, respectivamente (ClinVar, NCBI y BRCA Exchange).

Sin embargo, existe una variación muy grande en la distribución de las mutaciones a lo largo de toda la proteína, no existen mutaciones específicas o mutaciones Hot spots, por lo cual es muy difícil identificarlas (Karakasis, *et al.*, 2016; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012).

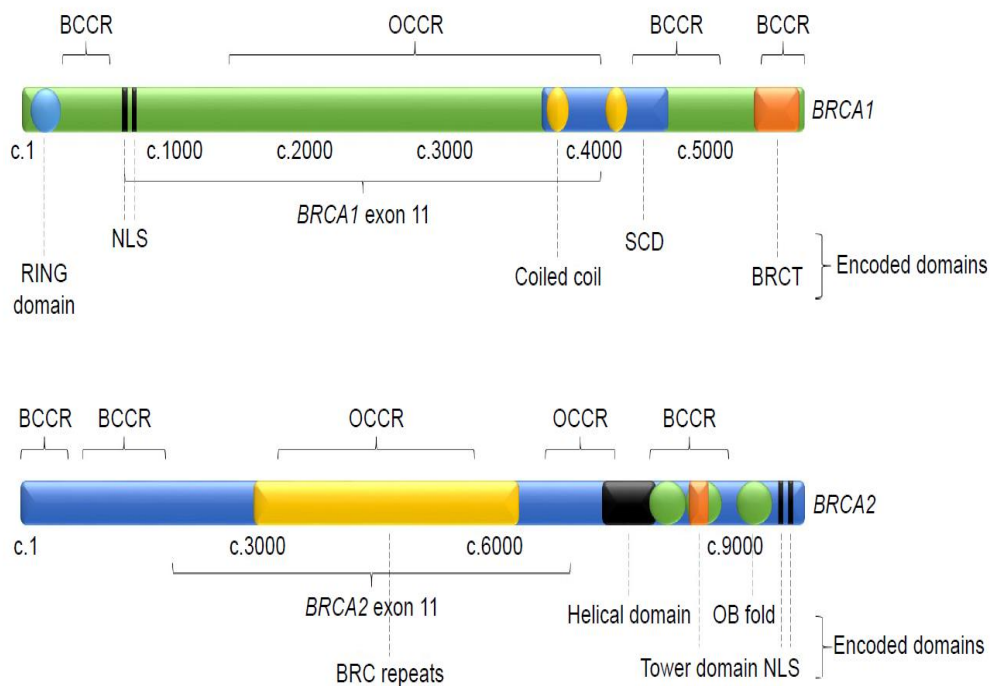


Figura 10. Mutaciones en regiones específicas de BRCA se han asociado a cáncer de mama o cáncer de ovario. En BRCA1 se han identificado tres regiones de mayor susceptibilidad a cáncer de mama (BCCR), dos se encuentran en el extremo carboxilo terminal y una más en el extremo amino, en la parte central, abarcando casi todo el exón 11, se localiza la región de mayor susceptibilidad a cáncer de ovario (OCCR). En BRCA2 se tiene la misma asociación, dos regiones BCCR se han identificado en el extremo amino y una en el extremo carboxilo, en la parte central que incluyen las repeticiones BRC, hay dos regiones OCCR. Tomada de: Hollis, Churchman y Gourley, 2017.

En los últimos años se ha encontrado la asociación entre la localización de la mutación y un mayor riesgo de cáncer de mama o de ovario, por lo cual ambas proteínas han sido divididas en regiones, a estas secuencias se les ha denominado región del grupo de cáncer de mama (BCCR) o cáncer de ovario (OCCR) (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020; Hollis, Churchman y Gourley, 2017) como se observa en la figura 10. Pero el riesgo también depende del tipo de mutación

(Karakasis, *et al.*, 2016), historia familiar y el país de residencia (Ossa & Torres, 2016; Torres-Mejía *et al.*, 2015).

Existen algunos países (Figura 11), regiones y en particular algunas etnias donde se ha identificado algunas mutaciones fundadoras (Karakasis, *et al.*, 2016; Ossa & Torres, 2016; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012; Venkitaraman, 2001), el ejemplo más estudiado es la población judía Ashkenazi donde se han identificado dos mutaciones en *BRCA1* (185delAG y 5382insC) y una en *BRCA2* (6174delT) las cuales representan el 98-99% de las mutaciones presentes en esta población lo que permite hacer la identificación de una manera más específica (Karakasis, *et al.*, 2016; Ossa & Torres, 2016). Varias mutaciones fundadoras se han identificado en diferentes países (Instituto Nacional del Cáncer, 2018).

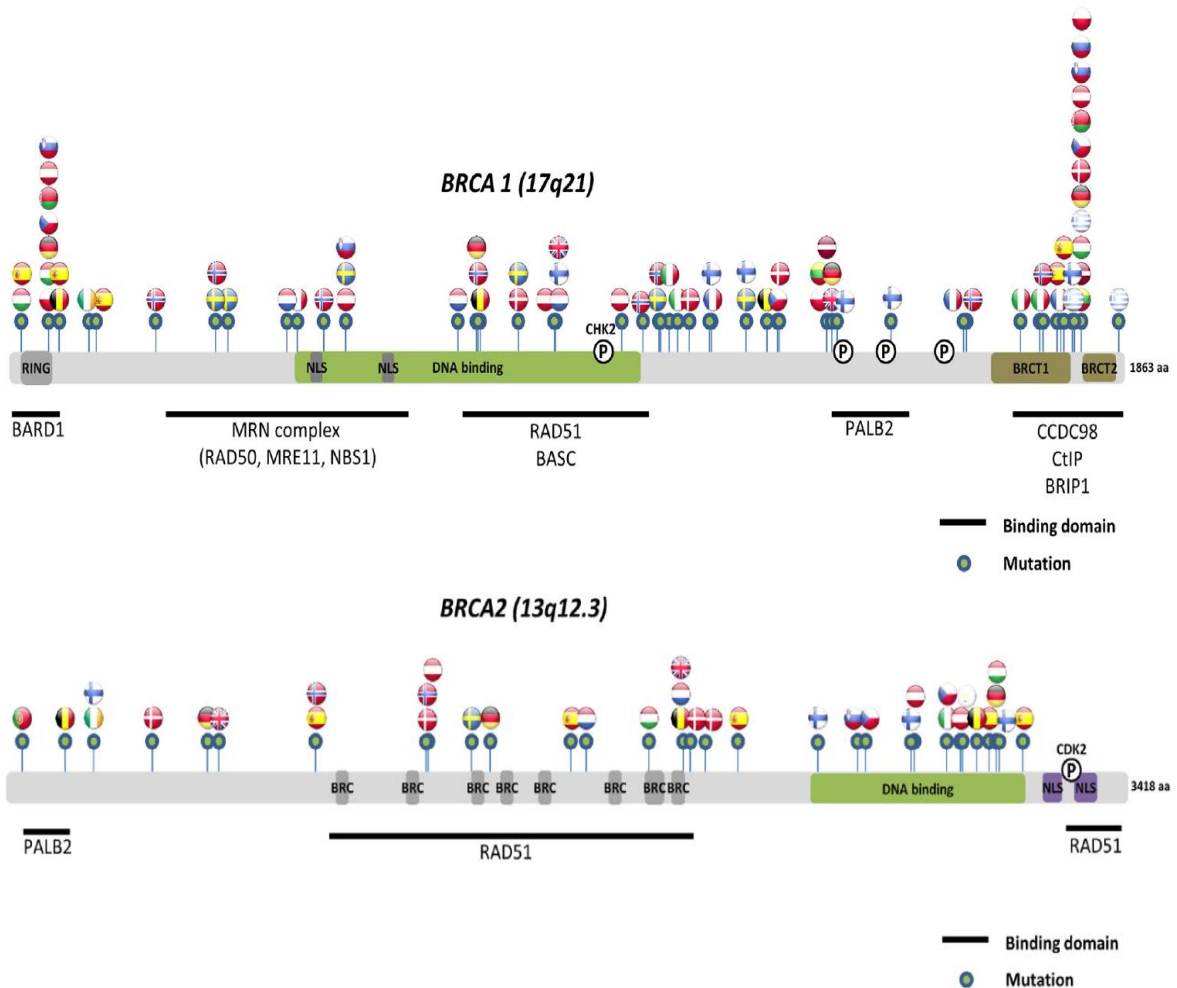


Figura 11. Regiones de los genes *BRCA1* y *2* con la presencia de mutaciones fundadoras en algunos países europeos. En los países desarrollados donde se tiene un mayor acceso al análisis genético para la detección de mutaciones, han permitido identificar las mutaciones fundadoras y su localización en cada gen de su población, permitiendo identificar con mayor especificidad y rapidez las mutaciones presentes en las pacientes. Demostrando que cada país es susceptible a una mutación en una región diferente del gen y las mutaciones se pueden encontrar dispersas a lo largo de toda la secuencia de codificación. Tomado de: Karakasis *et al.*, 2016.

En general tanto el número como la frecuencia de las mutaciones de la línea germinal en *BRCA1* y *BRCA2* varían entre las poblaciones y países (Alemar *et al.*, 2016; Fernández-Lopez *et al.*, 2019; Karakasis, *et al.*, 2016) como se muestra en la figura 11.

El impacto que ha generado la detección de mutaciones en *BRCA*, ha llevado a buscar nuevas estrategias para elaborar paneles que identifiquen las mutaciones fundadoras y las más frecuentes en una región que permitan la elaboración de pruebas genéticas específicas, basadas en cada una de las poblaciones, con el objetivo de disminuir costos y trabajo (Karakasis, *et al.*, 2016; Ossa & Torres, 2016; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012; Villarreal- Garza *et al.*, 2015a).

Para los países de América latina se ha desarrollado un panel denominado HISPANEL que permite detectar 115 mutaciones entre ambos genes (Alemar *et al.*, 2016; Ossa & Torres, 2016; Villarreal- Garza *et al.*, 2015a). Al utilizar este panel en la detección de mutaciones una gran cantidad de ellas no son detectadas en las pacientes (Ossa & Torres, 2016; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019) teniendo hasta un 77% de detección de HISPANEL en comparación con la secuenciación completa (Villarreal- Garza *et al.*, 2015a). El uso de paneles y métodos de detección que se centran en mutaciones puntuales o pequeñas inserciones/deleciones pueden llevar a dar un resultado falso negativo (Vasickova *et al.*, 2007), un tratamiento inadecuado, una mala asesoría genética con falta de medidas de prevención como son las cirugías o tratamientos, ausencia de un monitoreo de los familiares con alto riesgo de cáncer de mama y un mal manejo de la enfermedad con una detección tardía llevando a un cáncer que ya no pueda ser tratado.

Esto ha llevado a la conclusión que no se puede ocupar este panel para todos los países latinos dada su heterogeneidad (Ossa & Torres, 2016). Por otro lado, es necesario secuenciar completamente toda la región de codificación de ambos genes (Calderón del Valle & Gallón, 2012), para poder identificar cualquier mutación que no sea frecuente en la población o identificar mutaciones que no se han reportado, dado que hay variantes genéticas en *BRCA* que no han sido identificadas hasta el momento por ausencia de técnicas que permitan identificar todas las mutaciones en toda la región de codificación.

Existe la necesidad de implementar nuevas metodologías de diagnóstico más eficientes (Vaca-Paniagua *et al.*, 2012). Con el surgimiento de la secuenciación de nueva generación se ha permitido secuenciar ambos genes de manera completa a menor costo y tiempo, hace menos laborioso el proceso lo que permite tener un resultado mucho más rápido y una mayor eficiencia en la detección, lo que ha llevado a la identificación de nuevas mutaciones y a un mayor porcentaje de pacientes positivas convirtiéndose en una gran herramienta (Fernández-Lopez *et al.*, 2019). Esto también ha permitido localizar cada una de las mutaciones en la región BCCR u OCCR y determinar el riesgo de cáncer en personas sin la presencia de la

enfermedad (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020). Las mutaciones también podrían determinar el mal funcionamiento o la falta de transcripción de algunas proteínas como P21 y P53.

La identificación de mutaciones en la línea germinal en *BRCA1/2* pueden impactar tanto en la mujer afectada, sus hijos y otros miembros de la familia con alto riesgo de desarrollar cáncer de mama, para quienes se pueden implementar estrategias de prevención específicas como cirugía profiláctica o quimioprevención (Fernández-Lopez *et al.*, 2019; Karakasis, *et al.*, 2016; Ossa & Torres, 2016; Torres-Mejía *et al.*, 2015; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012) reduciendo el riesgo de desarrollo de cáncer y reducción de la mortalidad (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2005; Vasickova *et al.*, 2007).

3.13 MUTACIONES DE BRCA1 Y BRCA2 EN MÉXICO

Las pruebas genéticas para la identificación de mutaciones en *BRCA* no están ampliamente disponibles en México y muy pocas instituciones, brindan servicios de evaluación del riesgo de cáncer genético (Fernández-Lopez *et al.*, 2019; Ossa & Torres, 2016; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012; Villareal-Garza *et al.*, 2015b). Las pruebas están disponibles solo en el sector privado a través de laboratorios ubicados en el extranjero (Villareal-Garza *et al.*, 2015b). Este problema se ve muy reflejado en el Hospital General de México, a pesar de ser uno de los hospitales más grandes del país y de América Latina, el cual atiende a un gran porcentaje de pacientes con cáncer de mama, muy pocas pacientes cuentan con perfil genético de *BRCA*.

Las barreras para implementar el asesoramiento y las pruebas genéticas para las mujeres mexicanas incluyen los costos de las pruebas, falta de cobertura de seguro público para los servicios genéticos y la falta de infraestructura (Ossa & Torres, 2016; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012; Villarreal-Garza *et al.*, 2015a; Villarreal-Garza *et al.*, 2015b).

Por otro lado, en México existen muy pocos estudios que identifiquen la prevalencia de mutaciones en *BRCA* presentes en la población Mexicana (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2005; Fernández-Lopez *et al.*, 2019; Ruiz-Flores *et al.*, 2002; Torres-Mejía *et al.*, 2015; Villarreal-Garza *et al.*, 2015a; Villareal-Garza *et al.*, 2015b). Los pocos estudios que se han realizado identifican mutaciones específicas (Torres-Mejía *et al.*, 2015) con protocolos que requieren mucho tiempo, son muy laboriosos y no se logra secuenciar el gen completamente (Vaca-Paniagua *et al.*, 2012) como los casos donde se ha ocupado el panel HISPANEL (Villarreal-Garza *et al.*, 2015a; Villareal-Garza *et al.*, 2015b), llegando a tener solamente el 2.7% de identificación de las mutaciones con este panel (Torres-Mejía *et al.*, 2015) y en algunos de los estudios las muestras ni siquiera son analizadas en México (Torres-Mejía *et al.*, 2015; Villarreal-Garza *et al.*, 2015b). Existiendo muy pocos estudios donde se analice la secuencia completa de ambos genes (Torres-Mejía *et al.*, 2015; Villarreal-Garza *et al.*, 2015a; Villarreal-Garza *et al.*, 2015b).

En estudios donde se analizó la secuencia completa de todos los exones de los genes *BRCA* en México, el método empleado para el análisis tiene baja eficiencia y solo detecta mutaciones puntuales, no permite identificar deleciones de varios nucleótidos ni pérdida de exones completos, lo que llevó a identificar pocas mutaciones (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2005; Ruiz-Flores *et al.*, 2002; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012).

Durante la elaboración del presente trabajo se publicó un estudio donde se analizó completamente la secuencia de ambos genes mediante secuenciación de nueva generación en pacientes con cáncer de ovario; sin embargo, las muestras no fueron secuenciadas en México (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020). Los estudios obtenidos con secuenciación de nueva generación es prácticamente escasa (Zayas-Villanueva *et al.*, 2019).

A pesar de las limitaciones se ha demostrado que México presenta una mutación fundadora en el gen *BRCA1*, en el cual hay una deleción de los exones 9-12 (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020; Torres-Mejía *et al.*, 2015; Ossa & Torres, 2016; Villarreal- Garza *et al.*, 2015a; Villareal-Garza *et al.*, 2015b). Por otro lado, se ha demostrado que México es uno de los países que presenta una gran variedad de mutaciones, es un país genéticamente heterogéneo (Torres-Mejía *et al.*, 2015; Villareal-Garza *et al.*, 2015b; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019) en comparación con estudios de otras regiones, así mismo México presenta una prevalencia de mutaciones mayor a la establecida en otros países (Villarreal- Garza *et al.*, 2015a).

Además se ha encontrado que un porcentaje grande de mutaciones en *BRCA* se presentan en mujeres con cáncer de mama triple negativo y México tiene uno de los porcentajes más altos de mujeres con este perfil molecular en comparación con la media normal (Villarreal- Garza *et al.*, 2015a; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019) reportándose hasta 35 % de este subtipo (Villarreal-Garza *et al.*, 2015a; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019).

La edad promedio de diagnóstico de cáncer de mama en México es de 51 años (aproximadamente una década más joven que las mujeres en Europa o América del Norte) y casi la mitad de las mujeres mexicanas son premenopáusicas en el momento del diagnóstico de cáncer de mama (Torres-Mejía *et al.*, 2015; Villarreal-Garza *et al.*, 2015a; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019) llegando a tener una media de edad hasta de 30-35 años (Vaca-Paniagua *et al.*, 2012). Generalmente, el cáncer de mama se diagnostica en una etapa avanzada (Torres-Mejía *et al.*, 2015). Lo que sugiere factores y un perfil hereditario, pero a pesar de eso no se ha empeñado en detectar todas las mutaciones presentes en la población Mexicana.

La ausencia de estudios hacen que después de 25 años del descubrimiento de estos genes, no se conozcan con claridad las mutaciones presentes en la población, dificultando los esfuerzos para desarrollar políticas de detección en México (Torres-Mejía *et al.*, 2015).

Se necesitarían estudios más grandes y la secuenciación completa de ambos genes para determinar todo el espectro de variación genética, mutaciones fundadoras y la etiología

genética del cáncer de mama en mujeres mexicanas (Fernández-Lopez *et al.*, 2019; Torres-Mejía *et al.*, 2015). Por lo cual, la implementación de nuevas técnicas como la secuenciación de nueva generación en México es necesaria para la evaluación de mutaciones en *BRCA* (Zayas-Villanueva *et al.*, 2019).

4. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La falta de estudios y técnicas eficientes de detección de mutaciones en *BRCA*, ha generado un retraso en el conocimiento de mutaciones y estrategias de tratamiento en pacientes con cáncer de mama en población mexicana. Es necesario estudios con secuenciación de nueva generación en esta población, que nos permita detectar un mayor número de pacientes con mutaciones en los genes *BRCA*, así como el aumento en el porcentaje de variantes que se puedan identificar, determinar cuáles son las principales mutaciones presentes en la población y probablemente encontrar variantes que no se tengan reportadas, al poder secuenciar toda la región genómica de ambos genes. Así mismo, es necesario comprender el efecto que tienen las mutaciones en *BRCA* sobre los niveles de expresión de los genes *P53* y *P21*, determinando la correlación entre estos supresores de tumores en pacientes con cáncer de mama, resultaría indispensable para determinar el pronóstico y tratamiento de las pacientes.

5. HIPÓTESIS

La secuenciación de nueva generación permitirá detectar un mayor número de pacientes con cáncer de mama positivas a mutaciones en *BRCA*, en relación con estudios previos en la población mexicana.

En este grupo de pacientes, probablemente se presenten mutaciones en *BRCA* que no se han reportado previamente.

La línea celular con mutación en *BRCA* presentará niveles de expresión más bajos de *P53* y *P21* en comparación con las líneas celulares sin mutación en estos genes.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar en pacientes con cáncer de mama hereditario los arreglos moleculares de los genes *BRCA1* y *BRCA2* por secuenciación de nueva generación, así como las diferencias en los niveles de expresión de los genes *P53* y *P21* entre líneas celulares con mutación en *BRCA* y sin mutación como posibles marcadores tumorales.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1- Analizar los expedientes clínicos de pacientes con cáncer de mama con la finalidad de seleccionar a las pacientes que cumplan con los criterios de inclusión para el estudio de mutaciones en los genes *BRCA1* y *2*.
- 2- Extraer, cuantificar y determinar la integridad del material genético de muestras de sangre periférica de cada paciente.
- 3- Secuenciar los genes *BRCA1* y *BRCA2* de muestras de sangre periférica de las pacientes por la técnica de secuenciación de nueva generación.
- 4- Identificar los antecedentes reportados y las características de cada una de las mutaciones detectadas.
- 5- Describir el significado clínico de cada mutación identificada.
- 6- Determinar si las mutaciones ya se han reportado en población mexicana o la secuenciación de nueva generación permitió identificar nuevas variantes.
- 7- Deducir el posible efecto de las mutaciones sobre los niveles de expresión de los genes supresores de tumores *P53* y *P21*.
- 8- Determinar los niveles de expresión de los genes *P53* y *P21* en 5 líneas celulares de cáncer de mama mediante RT-qPCR.

7. METODOLOGÍA

7.1 ANÁLISIS DE EXPEDIENTES CLÍNICOS Y SELECCIÓN DE PACIENTES

En la base de datos de la unidad de Genética del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” se buscaron a las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama que tuvieran expediente clínico tanto en la unidad de Genética, como en la unidad de Oncología del mismo hospital durante el año 2018.

En los expedientes clínicos disponibles, se identificaron a las pacientes que cumplían con los criterios de inclusión que nos llevaran a un posible caso de cáncer de mama hereditario, los cuales fueron:

- Diagnóstico de cáncer de mama a edad temprana (antes de los 50 años de edad).
- Presentar múltiples tipos de cáncer en la misma paciente, en especial cáncer de mama uni o bilateral y cáncer de ovario.
- Pacientes diagnosticadas con cáncer de mama bilateral.
- Diagnóstico molecular con cáncer de mama triple negativo.
- Antecedentes familiares de cáncer de mama y ovario.
- Antecedentes de historia familiar de algún otro tipo de cáncer que se asocie a *BRCA* como son cáncer de próstata, páncreas, colon, pulmón ya sea de primer o segundo grado.
- Las pacientes deberían cumplir al menos dos criterios de inclusión para poder ser candidatas para participar en el presente trabajo.

7.2 RECLUTAMIENTO DE PACIENTES QUE CUMPLÍAN CON LOS CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Las pacientes seleccionadas fueron localizadas a través del número de contacto proporcionado en el expediente clínico. Por medio del cual, se les informó de los objetivos de la investigación y se les hizo una invitación a participar en el proyecto. Un total de 23 pacientes aceptaron participar, fueron invitadas a pasar a la unidad de Genética para realizarles un pequeño cuestionario que rectificara la información presente en el expediente clínico y rescatar alguna información que no estuviera presente en el mismo, de tal manera que nos permitió hacer su árbol genealógico.

Una vez terminado el cuestionario y de explicar los objetivos del estudio, cada una de las pacientes dio su consentimiento informado.

7.3 SELECCIÓN DE TRES MUJERES CONTROL

Se seleccionaron, 3 mujeres, que formaron parte de nuestros controles, que incluyeron: El primer control presenta hiperplasia ductal usual de mama con antecedentes de cáncer de mama en primer y segundo grado, el segundo control presenta carcinoma seroso de alto

grado (cáncer de ovario) y antecedentes de cáncer de ovario de tercer grado. El control tres pertenece a una mujer sana y no cuenta con antecedentes de cáncer, ver apéndice. Las tres mujeres también fueron notificadas del estudio y dieron su consentimiento informado.

7.4 OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA Y SEPARACIÓN DE LOS LEUCOCITOS

5 ml de sangre periférica se obtuvieron por medio de venopunción, la muestra fue colectada en tubos vacutainer con EDTA (BD Franklin Lakes NJ, USA).

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 2,000 rpm durante 5 minutos. Una vez obtenidas las tres fases sanguíneas, la fase superior, que contiene el plasma, fue retirada con mucho cuidado para evitar resuspender los glóbulos blancos. Con ayuda de una micropipeta, 200 µl del anillo de leucocitos fueron colectados y transferidos a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

7.5 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

200 µl de leucocitos recuperados de la muestra sanguínea se utilizaron para la extracción de ácidos nucleicos mediante el Kit de extracción, usando un equipo de extracción automático de ácidos nucleicos (magLEAD 6Gc, Japón). Una vez obtenido el ADN fue almacenado a -80 ° C hasta su uso, para evitar su degradación.

7.6 CUANTIFICACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

La cuantificación del ADN y la pureza, esta última determinada mediante la relación 280/260, se evaluaron utilizando el espectrofotómetro nanodrop (DeNovix DS-11, USA). Para determinar la integridad del ADN, los ácidos nucleicos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

7.7 ELABORACIÓN DE LIBRERÍAS

Se cuantificaron 10 ng de ADN por medio de Qubit (Invitrogen™ Q33216) con el Kit de cuantificación Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™ Q32854) en 15 µl totales de solución de cada una de las muestras, concentraciones necesarias para la elaboración correcta de librerías.

Las librerías se generaron con el Kit for Chef DL8 (Thermo Fishern Scientific, USA) y el panel Oncomine™ BRCA Research Assay (Thermo Fisher Scientific, USA) con ayuda del equipo Ion Chef (Thermo Fisher Scientific, USA) y el Software Ion S5 (Thermo Fisher Scientific, USA). En cada placa de 96 pozos se cargaron 8 muestras de pacientes y las librerías se hicieron en las condiciones de 2 pools, 18 ciclos y 4 minutos de extensión.

La síntesis de librerías consistió en tres pasos amplificación, digestión y ligación, finalmente fueron cuantificadas por Qubit (Invitrogen™ Q33216) con el Kit de cuantificación Invitrogen™

Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™ Q32854) y por qPCR con el Kit Ion Library TaqMan™ Quantitation con un equipo de PCR tiempo real StepOne (Thermo Fisher Scientific, USA).

7.8 PREPARACIÓN DE TEMPLADOS

Una vez cuantificadas las librerías, se realizó una mezcla de dos de ellas a una concentración equimolar de 40 pM en un volumen final de 40 µl, es decir, cada librería con 8 muestras de pacientes debería estar a una concentración de 40 pM en 20 µl, cuando se mezclaron se obtuvo un volumen final de 40 µl con una concentración equimolar de 40 pM. Los cuales fueron necesarios para la elaboración de los templados.

Los templados se realizaron por emulsión con el Kit para después ser cargados en dos Chips Ion 510, ambos procesos fueron realizados en el equipo Ion Chef System (Thermo Fisher Scientific, USA).

7.9 SECUENCIACIÓN POR SEMICONDUCCIÓN

Ambos chips fueron cargados y secuenciados por pirosecuenciación en el secuenciador de nueva generación Ion S5 System (Thermo Fisher Scientific, USA) con el Kit de secuenciación.

El equipo solo puede secuenciar un chip, por lo cual mientras se secuenciaba el primer chip, el segundo fue almacenado a 4°C en un contenedor bien sellado que no permitiera la pérdida de humedad.

7.10 ANÁLISIS DE MUTACIONES DETECTADAS EN LAS PACIENTES

El análisis de la secuenciación, llamado e identificación de las variantes en los genes *BRCA1/2* de cada una de las pacientes fue realizada con el Softwert Ion Reporter (Thermo Fisher Scientific, USA).

Las variantes identificadas fueron determinadas como patogénicas o no patogénicas en base a ClinVar y confirmadas por BRCA Exchange.

7.11 CULTIVO DE 5 LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA, UNA CON MUTACIÓN EN *BRCA1* Y 4 SIN MUTACIÓN

Cinco líneas celulares de cáncer de mama se seleccionaron, cuatro de ellas caracterizadas por no presentar mutación en *BRCA*; HCC1806, SUM-229PE, T-47D y MDA-MB-231. Y la línea celular HCC1937 positiva a una mutación en *BRCA1*, una inserción de una C en el nucleótido 5382 (Glu1756fs). La línea celular SUM-229PE fue obtenida de Asterand; HCC1937, HCC1806, T-47D y MDA-MB-231 de American Type Culture Collection (ATCC).

Las líneas celulares HCC1937, HCC1806 y T-47D fueron sembradas en botellas de cultivo de 75 cm², con 15 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) previamente inactivado a 56°C por 30 min y 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (Gibco, USA).

La línea celular SUM-229PE fue sembrada con 15 ml de medio de cultivo HAM's (Gibco, USA) suplementado con 5% de SFB previamente inactivado y 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina. Finalmente, la línea celular MDA-MB-231 se sembró en 15 ml de medio de cultivo DMEM (Gibco, USA) suplementado con 5% de SFB inactivado y 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (Gibco, USA).

Todos los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nuair US, Autoflow, USA) a una temperatura de 37°C a 5% de CO₂ y a una atmosfera de saturación húmeda. El medio de cultivo fue cambiado cada 3 días, los cultivos fueron utilizados a un 70-80% de confluencia.

7.12 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

En el momento que se tuvo una cantidad suficiente de células de cada línea celular, se lavó el cultivo con PBS, posteriormente se colocaron 5 ml de EDTA por 5 min para despegar las células de la caja de cultivo. Todas las células fueron colectadas y transferidas a un tubo de 15 ml para ser centrifugadas a 1,500 rpm durante 5 min. El botón obtenido fue lavado, resuspendiendo el botón celular en PBS y transferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml para nuevamente ser centrifugado.

Posteriormente, para la extracción del ARN total, al botón celular se le agregaron 750 µl de TRIzol (Ambion. Thermo Fisher Scientific, USA) y se resuspendió perfectamente. A continuación 250 µl de cloroformo se agregaron, la muestra se agitó perfectamente con un vortex y se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C por 20 min con ayuda de una microcentrifuga refrigerada (Labnet). Tres fases fueron obtenidas, la fase superior transparente se recuperó y se transfirió a otro tubo nuevo, donde se le agregó 1 ml de isopropanol frío dejando incubar a 4°C por una hora. La muestra se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm a 4°C por 20 min. El isopropanol se decantó con mucho cuidado para evitar la pérdida del botón del ARN, se agregó etanol al 75% para lavar y se centrifugó por última vez a 8,000 rpm a 4°C por 10 min. El etanol se decantó y el tubo se dejó secar perfectamente, para eliminar todos los residuos de alcohol, cabe mencionar que todo el proceso se realizó en frío.

El ARN fue resuspendido en agua libre de nucleasas, a continuación fue cuantificado y se evaluó su pureza de acuerdo a la relación 280/260 con un nanodrop. Finalmente, el ARN fue almacenado a -80°C hasta su uso.

7.13 SÍNTESIS DE ADNc

Para la síntesis del ADNc se utilizó el Kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, USA), usando 2µg de ARN, para la preparación de la mezcla de polimerasa y buffers de forma correcta se siguieron los pasos del manual. Para el proceso, se ocupó un termociclador (Labnet, USA) bajo las siguientes condiciones: 25°C por 10 min, 50°C por 30 min y finalmente 85°C durante 5 min. Terminada la corrida, los ADNc se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.14 NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES P53 Y P21 POR qPCR

Para la amplificación del ADNc se utilizó el Kit de LightCycler 480 Probes Master (Roche, USA), en un tubo eppendor se adicionó para cada reacción los siguientes reactivos: 1 µl de ADNc de cada línea celular, 5.2 µl de Taq-polimerasa, 0.1 µl de los oligos forward y reverse a la concentración de 20 µM y 0.1 µl de la sonda a la concentración de 20 µM. Para los genes *P53*, *P21* y *GAPDH* se emplearon las sondas 56, 32 y 60, respectivamente (Roche, USA). Por último, se agregó el volumen necesario de agua grado PCR para llevar a un volumen final de 10 µl totales por reacción, todo el proceso fue en frío. Los oligonucleótidos usados son los siguientes: P53-F, 5' GTCCAAGCAATGGATGATT-3'; P53-R, 5'-TCTGGACCTGGGTCTTCAGT-3'; P21-F, 5' TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC-3'; P21-R, 5'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA-3' y para el gen constitutivo GAPDH-F, 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'; GAPDH-R, 5' GCCCAATACGACCAAATCC-3'.

La mezcla fue transferida a una placa de 96 pozos y el ADNc se amplificó en un equipo de PCR tiempo real (LightCycler 96. Roche, USA). Las condiciones de corrida fueron preincubación a 95°C por 10 min, seguidos de 45 ciclos conformados de 95°C por 10 seg de desnaturalización y 60°C por 30 seg de alineamiento y finalmente 40°C por 10 seg.

7.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar (S.D.). Los análisis estadísticos se realizaron por medio de una prueba ANOVA de una vía seguido de una prueba de Holm-Sidak.

8. RESULTADOS

Un total de 23 pacientes con cáncer de mama fueron las que cumplieron con los criterios de inclusión y se seleccionaron para este trabajo, tres mujeres se incluyeron como controles, la primera con hiperplasia ductal usual de mama, la segunda con cáncer de ovario y la tercera sin patología de cáncer ni antecedentes familiares. Las 26 muestras de las mujeres incorporadas en el estudio fueron secuenciadas. Los resultados demostraron que de las 23 pacientes con cáncer de mama, ocho de ellas fueron positivas para mutaciones en *BRCA*, lo que corresponde al 34.78% de positividad (Figura 12). El segundo control, mujer diagnosticada con cáncer de ovario también presentó mutación en *BRCA1* (Tabla 1 y Figura 1).

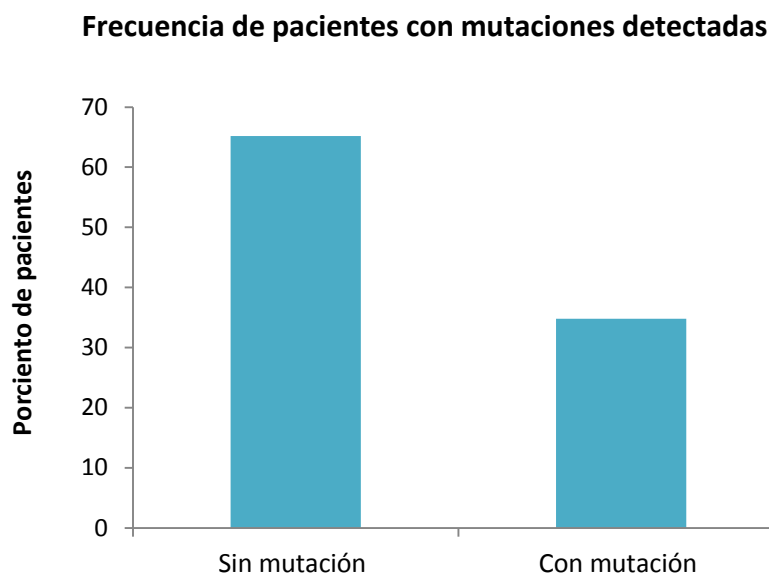


Figura 12. Porcentaje de pacientes positivas y negativas para mutaciones en *BRCA*. De las 23 pacientes analizadas, el 65.21% fueron negativas para alguna variación de *BRCA* y 34.78% presentaron mutación en alguno de los dos genes. Los porcentajes presentados no incluyen la mutación detectada en el control 2.

La edad promedio al momento del diagnóstico de cáncer de mama fue de 36.56 años con un rango de edad de 24 a 53 años, el mayor porcentaje con el 26% de las pacientes, se concentró en el rango de edad de 36-40 años (Figura 13). Las mujeres positivas para mutación en *BRCA* presentaron una media de edad al momento del diagnóstico de 41.87 años y en las portadoras de mutación patogénica fue de 40.5 años (6/23) (Tabla 2).

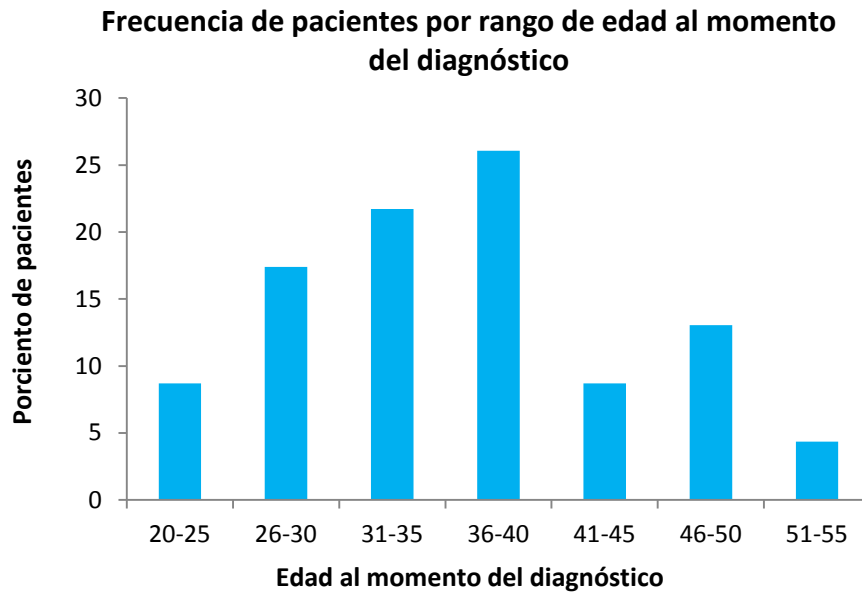


Figura 13. Porcentaje de pacientes por rango de edad al momento del diagnóstico. Las 23 pacientes seleccionadas fueron distribuidas de acuerdo a su edad de diagnóstico de cáncer de mama en rangos de 5 años. El mayor número de pacientes se encuentran concentradas entre los 26 a 40 años y la media de edad es de 36.56 años.

Con respecto al subtipo histológico, de las 23 pacientes con cáncer de mama el 86.95% fueron ductales, 8.69% lobulillares, 4.34% tubulolobulillares y 4.34% se desconoce la histología del cáncer (Figura 14). De los casos positivos a mutación el 87.5% fueron lobulillares, 12.5% presentaron el tipo tubulolobulillar, la paciente SH3 presentó tanto cáncer lobulillar como tubulolobulillar, 12.5% se desconoce el tipo de cáncer histológico (Tabla 2).

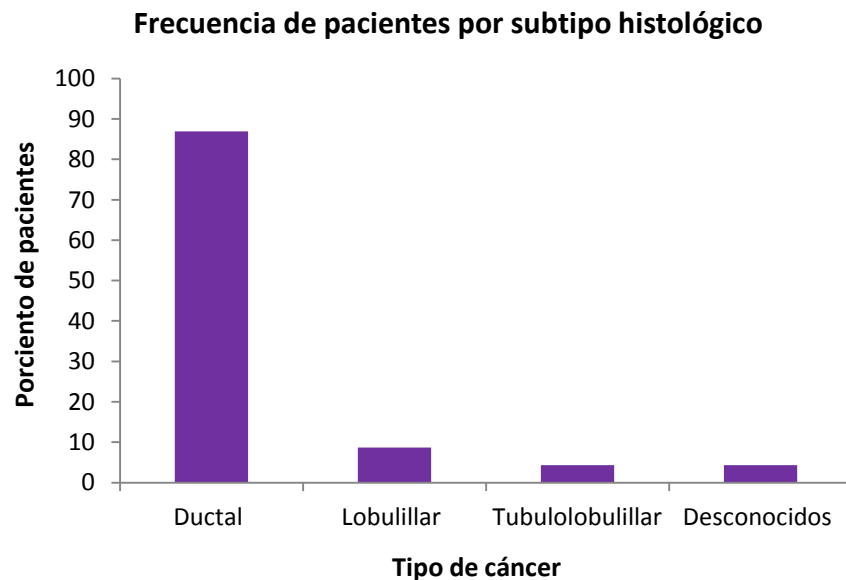


Figura 14. Porcentaje de pacientes por subtipo de cáncer histológico. Las 23 pacientes seleccionadas fueron distribuidas de acuerdo al subtipo histológico de cáncer diagnosticado. 20 pacientes presentaron cáncer de mama ductal de las cuales 7 tuvieron mutación, dos pacientes con cáncer lobulillar, una misma paciente presentó tanto cáncer ductal como tubulolobulillar y fue positiva para mutación, por último, en un caso se desconoce el tipo histológico de cáncer.

De acuerdo al perfil molecular, 39% de las pacientes fueron luminales (26% correspondieron a Luminal A y 13% a Luminal B), 8.69% fueron HER-2 positivo, 47.82% fueron triple negativo siendo el más frecuente y 8.69% se desconoce su perfil molecular (Figura 15). De las pacientes positivas a mutaciones en *BRCA*, 50% fueron triple negativo, 25% luminal A y 25% se desconoce su perfil molecular. La paciente SH3 se diagnosticó con dos tipos de perfil molecular, triple negativo y HER-2 positivo, las pacientes de las cuales se desconoce su perfil molecular tuvieron mutación en *BRCA* (Tabla 2).

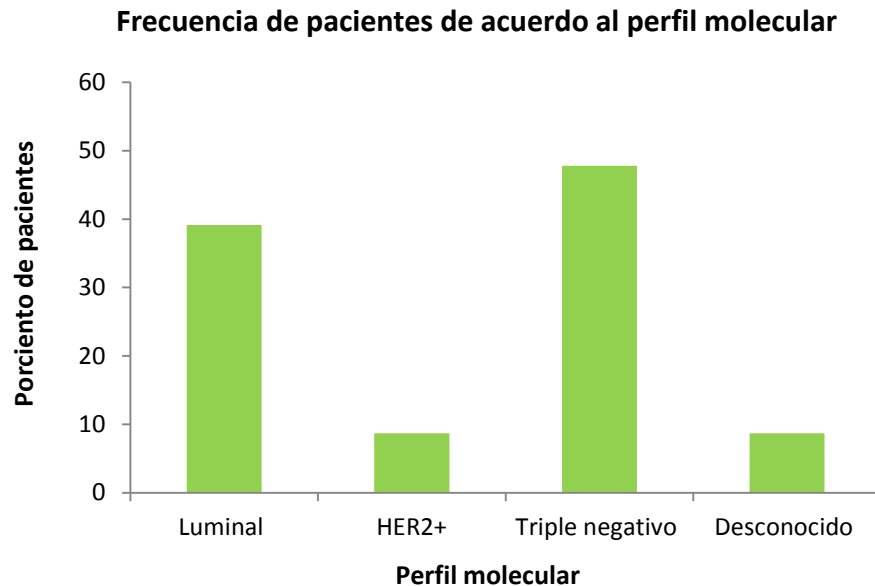


Figura 15. Porcentaje de pacientes diagnosticadas de acuerdo a cada perfil molecular. Las 23 pacientes seleccionadas fueron clasificadas en relación al perfil molecular, basado en el reporte de inmunohistoquímica presente en su expediente clínico. Se presentaron 9 pacientes con cáncer Luminal, 2 de ellas presentaron mutación, 2 fueron HER-2 positivo, 11 triple negativo de las cuales 4 fueron positivas a mutaciones, 2 de las pacientes se desconoce su perfil molecular.

El estadio del cáncer fue muy variado en la muestra, siendo el de mayor frecuencia el estadio IIIA con el 34.8%, seguido del estadio IIA con el 26% y 13% representado por el estadio IIB como se muestra en la figura 16. De las pacientes con mutaciones en *BRCA*, el 25% presentaron estadio IIA, 12.5% estadio IA, IIB y IIIA, el 37.5% se desconoce el estadio (Tabla 2).

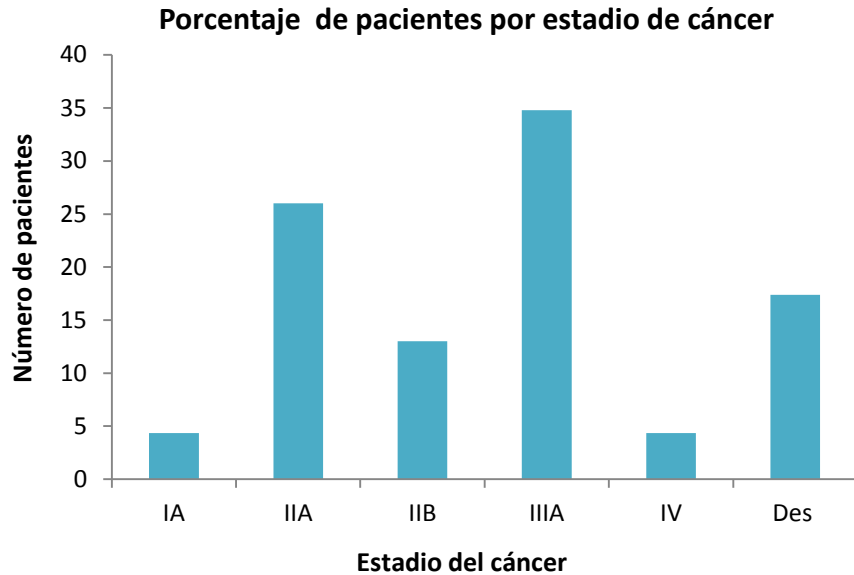


Figura 16. Frecuencia de pacientes por cada estadio del cáncer. El grupo de pacientes mostraron una estadificación muy variada, presentándose la mayor frecuencia en el estadio IIIA con 8 pacientes, seguido del estadio IIA con 6 pacientes, 3 pacientes presentaron estadio IIB y solamente una paciente presentó estadio IA y otra estadio IV. Se desconoce el estadio clínico de 4 pacientes (Des).

De las pacientes seleccionadas el 8.69% presentaron cáncer de mama bilateral y el 13.04% tuvieron tanto cáncer de mama y cáncer de ovario (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencia de pacientes con cáncer de mama bilateral y cáncer de mama/ovario. De la población que fue secuenciada, 2 de las pacientes presentaron cáncer de mama bilateral y tres de ellas tuvieron tanto cáncer de mama como de ovario.

Características patológicas	Número de pacientes	%
Cáncer de mama bilateral	2	8.69
Cáncer de mama unilateral	21	91.30
Cáncer de mama y ovario	3	13.04
Cáncer de mama	20	86.95

De las 23 pacientes, el 78.26% presentó antecedentes familiares de algún tipo de cáncer y el 21.73% dijo no saber de antecedentes de cáncer en su familia. De las pacientes con antecedentes familiares, el 94.44% tenían al menos un familiar con cáncer de mama, siendo el mayor tipo de cáncer presente entre los antecedentes familiares, 27.77% tenían antecedentes de cáncer de ovario o piel, 22.22% cáncer de colon, 16.66% con de cáncer de próstata, 11.11% tenían familiares con cáncer cervicouterino y endometrio, 5.5 % de las pacientes tenían casos con cáncer gástrico, pulmón, leucemia y esófago (Figura 17). Es de suma importancia mencionar que las pacientes SH1, SH2 y SH3 son trillizas, tabla 2 y figura 18.

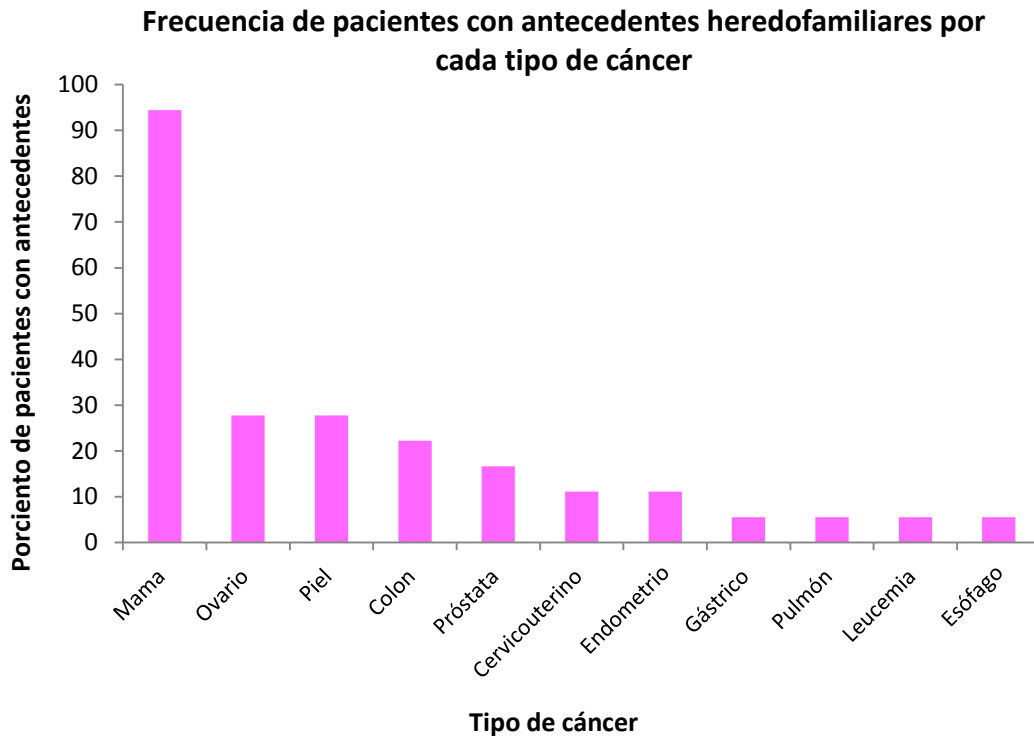


Figura 17. Frecuencia de pacientes que presentaron antecedentes familiares con respecto a cada uno de los diferentes tipos de cáncer. Se identificaron a las pacientes con antecedentes familiares de algún tipo de cáncer, 17 de las pacientes tienen antecedentes de cáncer de mama, 5 de ellas tenían antecedentes de cáncer de ovario y piel, 3 presentaron antecedentes de cáncer de próstata, 2 tenían familiares con cáncer cervicouterino y endometrio, solo una paciente tenía antecedentes de cáncer gástrico, pulmón, leucemia y esófago.

De las 8 pacientes con mutación en *BRCA*, el 87.5% presentaron al menos un familiar con antecedentes de algún tipo de cáncer y 12.5% no reportaron antecedentes. De las pacientes con historia familiar de cáncer el 75% tenía al menos un familiar con cáncer de mama y el 50% cáncer de ovario (Tabla 2 y Figura 18).

De las pacientes positivas a mutación, 6 presentaron mutaciones patogénicas, 2 tuvieron mutaciones benignas, aunque una de ellas la han reportado como de significado incierto (Tabla 2 y 3). Tres de las ocho pacientes mostraron más de una mutación (Tabla 2) detectando en total 12 variantes (Tabla 3) de las cuales 58.33% fueron mutaciones patogénicas, 33.33% mutaciones benignas y 8.33% mutación con significado incierto. Del total de mutaciones patogénicas, tres de las pacientes (42.85%) presentaron grandes arreglos genéticos (Tabla 3).

De las 12 mutaciones encontradas el 83.33% fueron en *BRCA1* y 16.66% en *BRCA2*, con respecto a las mutaciones patogénicas el 85.71% estaban presentes en *BRCA1* y 14.28% se encontraron en *BRCA2* (Tabla 4). Las mutaciones identificadas por secuenciación, fueron posicionadas en un diagrama de ambas proteínas (Figura 19).

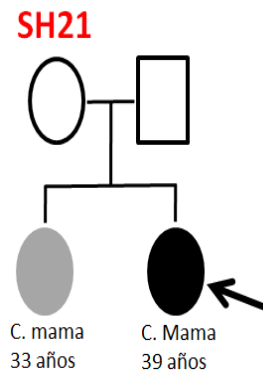
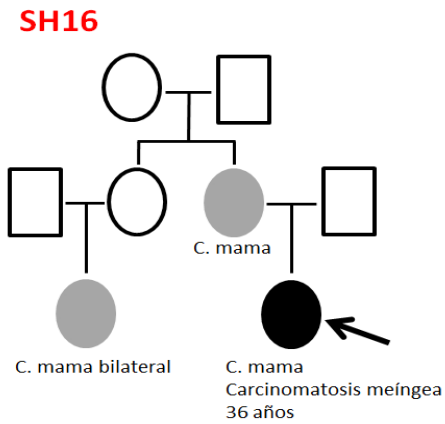
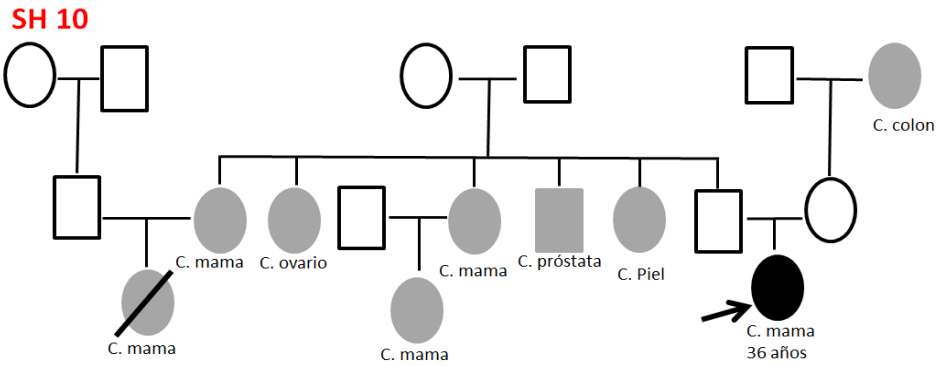
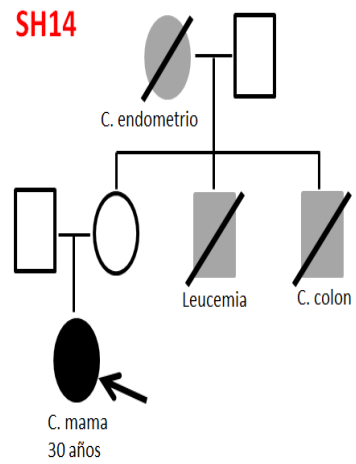
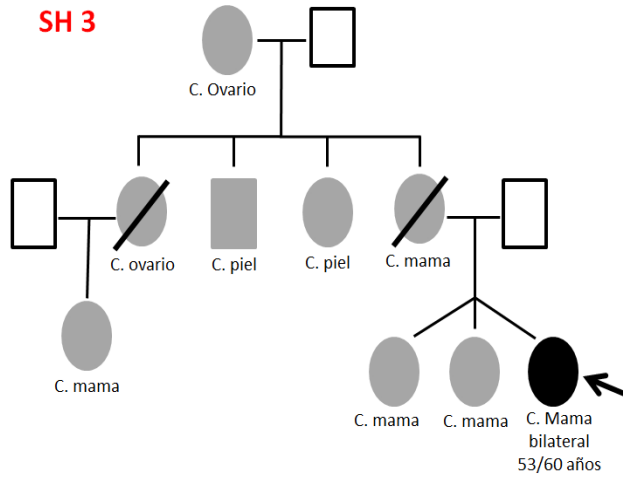
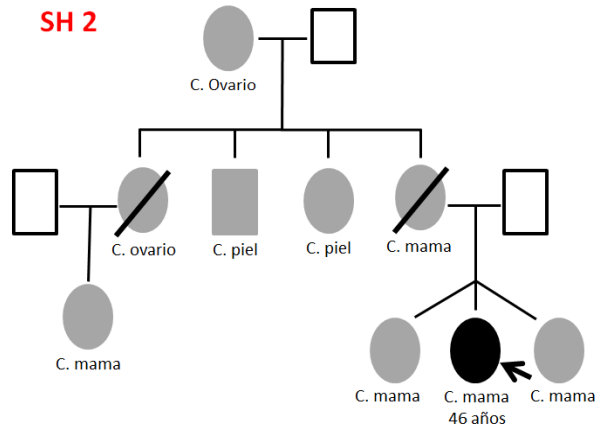
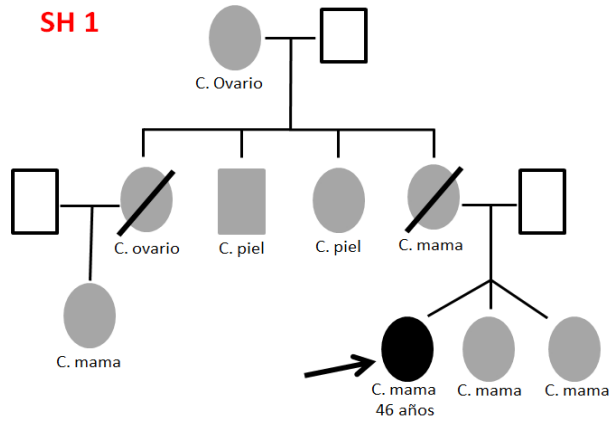
Tabla 2: Principales características de las pacientes positivas a mutación. Se muestran las mutaciones identificadas en cada una de las 8 pacientes positivas a variantes en los genes *BRCA*, edad de diagnóstico, características del cáncer (tipo histológico, cáncer de mama bilateral y cáncer de mama/ovario simultaneo), perfil molecular, estadio y antecedentes de cáncer. Donde no se tenía la información, se reportó como desconocido. También se presentan las características de la paciente control 2, que fue positiva a mutación en *BRCA*. Las pacientes SH1, SH2 y SH3 son trillizas.

Paciente	Mutación	Edad de diagnóstico (años)	Características del cáncer	Perfil molecular	Estadio	Antecedentes de cáncer
SH1	p.Ser 1634 Gly p.Pro 871 Leu p.Glu 1038 Gly p.Lys 1183 Arg	46	Desconoce	Triple negativo	Desconocido	Si
SH2	p.Ser 1634 gly p.Pro 871 Leu p.Glu 1038 Gly p.Lys 1183 Arg	46	Ductal	Desconocido	IIA	Si
SH3	p.Ala 1729 Glu p.Lys 3326 ter Exón 18del	53/60	Ductal y tubulolobulillar Cáncer de mama bilateral	Triple negativo y HER-2 positivo	IA	Si
SH10	p.Asp 936 fs	36	Ductal	Triple negativo	IIA	Si
SH12	Exón 8-11 del	45/49	Ductal Cáncer de ovario y mama	Desconocido	Desconocido	No
SH14	p.Tyr 3009 fs	30	Ductal	Luminal A	IIB	Si
SH16	p.Arg 1443 ter	36	Ductal	Luminal A	IIIA	Si
SH21	Exón 18-19del	39	Ductal	Triple negativo	Desconocido	Si
Con 2	p.Glu575fs	40	Cáncer de Ovario Carcinoma seroso	NA	NA	SI

NA: No aplica

Tabla 3: Características de cada una de las mutaciones detectadas por secuenciación. Las 12 mutaciones identificadas fueron buscadas en ClinVar, identificando su nomenclatura por HGVS, gen afectado, bases y codón modificado, efecto en la proteína y el significado clínico.

Mutación	Nomenclatura HGVS	Gen	Exón	Bases Modificadas	Codón	Efecto	Significado Clínico
Ser 1634 Gly	c.4837A>G	BRCA1	16	1pb (A>G)	AGT=GGT	Missense	Benigna
Lys 1183 Arg	c.3548A>G	BRCA1	11	1pb (A>G)	AAA=AGA	Missense	Benigna
Glu 1038 Gly	c.3113A>G	BRCA1	11	1pb (A>G)	GAA=GGA	Missense	Benigna/ Significado incierto
Pro 871 Leu	c.2612C>T	BRCA1	11	1 pb (C>T)	CCG=CTG	Missense	Benigna
Lys 3326 ter	c.9976A>T	BRCA2	27	1 pb (A>T)	AAA=TAA	Stop	Benigna
Ala 1729 Glu	C.5123C>A	BRCA1	18	1 pb (C>A)	GCG=GAG	Missense	Patógena
Exón 18 del	-	BRCA1	18	53 pb	-	Incompleta	Patogénica
Asp 936 fs	c.2806_2809del	BRCA1	11	4 pb	TATC	Frameshift	Patogénica
Del exón 8-11	c.548-?_4185+? Del	BRCA1	8-11	6346 pb	-	Incompleta	Patogénica
Tyr 3009 fs	c.9026_9030del	BRCA2	23	5 pb	ATCAT	Frameshift	Patogénica
Arg 1443 ter	c.4327C>T	BRCA1	13	1 pb (C>T)	CGA=TGA	Stop	Patogénica
Del exón 18-19	-	BRCA1	18-19	-	-	Incompleta	Patogénica



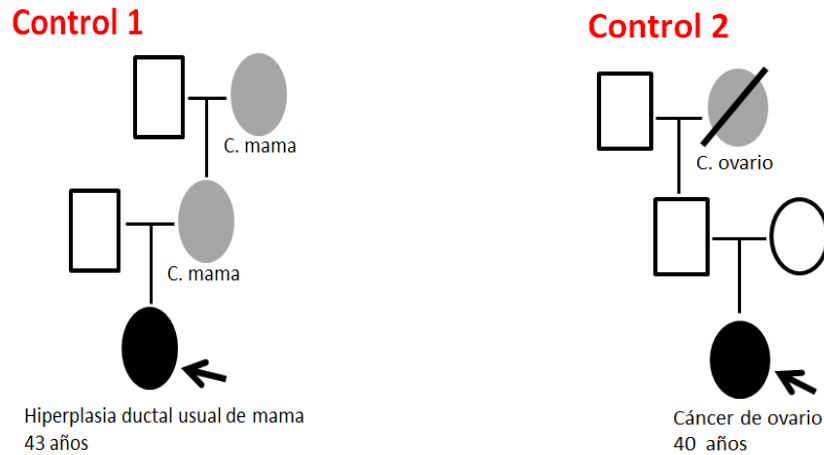


Figura 18: Árboles genealógicos de siete pacientes portadoras de mutación y de los controles 1 y 2. Se muestra en forma de árboles genéticos la historia familiar de cáncer de siete pacientes y 2 controles, debido a que una paciente con mutación y el control tres no tienen antecedentes; donde se muestra en círculos a las mujeres y en cuadros los hombres, los familiares portadores de algún tipo de cáncer se encuentran de color gris y en la parte inferior se especifica el tipo de cáncer, los de color blanco son sanos, la presencia de una diagonal indica al familiar fallecido. De color negro y señalado con una flecha se encuentra el probando del cual se indica el tipo de cáncer y la edad al momento de diagnóstico.

Tabla 4: Frecuencia de mutaciones presentes en *BRCA1* y *BRCA2*. De las mutaciones identificadas se encontró una mayor prevalencia en el gen *BRCA1* y en menor medida se presentaron mutaciones en *BRCA2*, tanto en mutaciones totales como mutaciones únicamente patogénicas.

Mutaciones Generales			Mutaciones Patogénicas	
Gen	Pacientes	%	Pacientes	%
BRCA1	10	83.33	6	85.71
BRCA2	2	16.33	1	14.28
Total	12	100	7	100

De las 12 mutaciones detectadas, dos de ellas (Tyr3009fs y Exón 18 del) equivalentes al 12% no se habían reportado anteriormente en población mexicana, tomando en cuenta solo mutaciones patogénicas, corresponden al 28.57% (2/7). Cada una de estas mutaciones se presentó en un paciente diferente (Tabla 2 y 3).

La delección de los exones 8-11 también conocida como la mutación fundadora mexicana, solamente 1 paciente fue portadora de esta mutación de las 23 pacientes analizadas (4.34%). De las 12 mutaciones detectadas el 8.33% pertenecían a esta variante y con respecto a las mutaciones patogénicas el 14.28% correspondían a esta mutación, como se muestra en la tabla 5.

Del total de mutaciones detectadas, 16.6% no habían sido reportadas en población mexicana correspondiendo al 28.57% entre las mutaciones patogénicas (Tabla 5).

Tabla 5: Frecuencia de mutación fundadora y de mutaciones reportadas por primera vez en población mexicana. La frecuencia y porcentaje de mutación fundadora mexicana, mutaciones reportadas y no reportadas en pacientes mexicanas se determinaron con base al número total de mutaciones detectadas (patogénicas y no patogénicas) y también respecto al número de mutaciones únicamente patogénicas que se identificaron.

Mutaciones Generales			Mutaciones Patogénicas	
Características	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Mutación fundadora Mexicana	1	8.33	1	14.28
Mutaciones reportadas en México	10	83.33	5	71.42
Mutaciones no reportadas en México	2	16.66	2	28.57

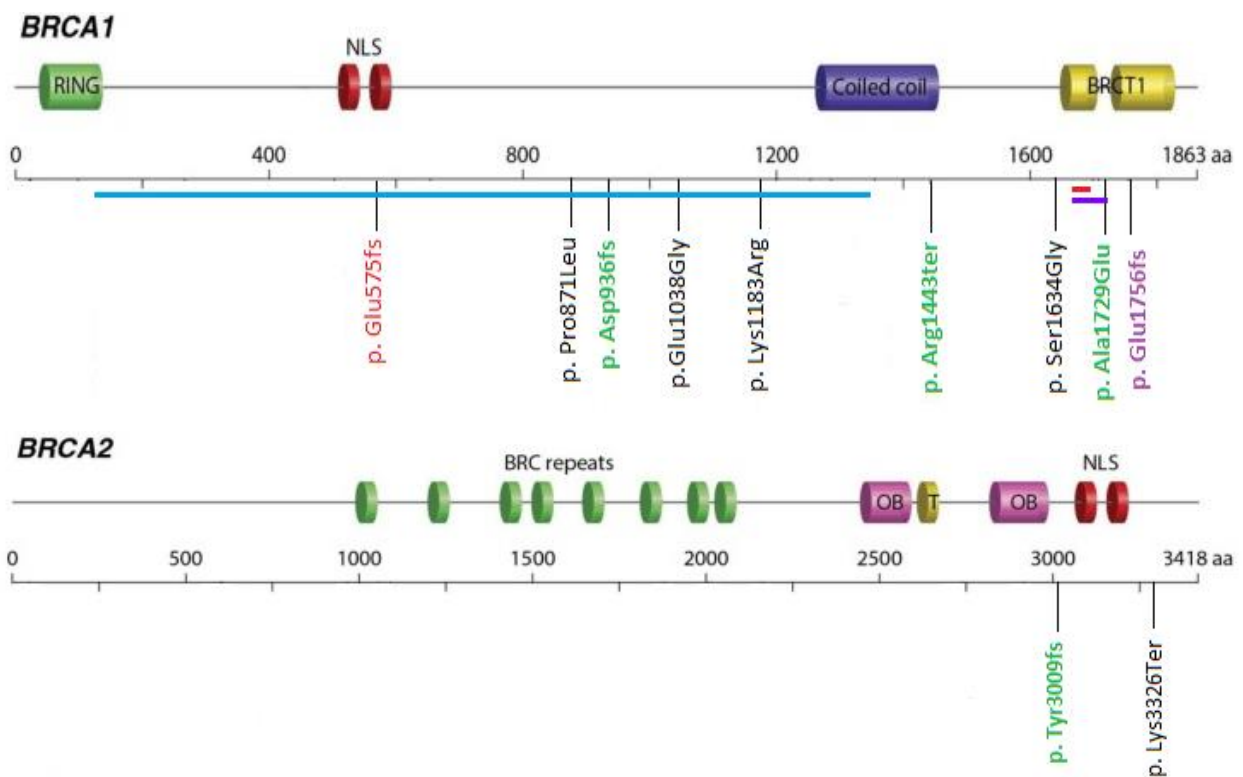


Figura 19. Posición de las mutaciones identificadas en los genes *BRCA* de las pacientes analizadas y la mutación presente en la línea celular HCC1937. La posición de la mutación se identificó en la estructura proteica, las mutaciones en color negro son benignas, en color verde son patogénicas tanto en *BRCA1* como en *BRCA2*. En *BRCA1*, la mutación de color rojo fue la identificada en la paciente control 2 diagnosticada con cáncer de ovario, la variante color morado es la mutación presente en la línea celular HCC1937. Las líneas horizontales presentes en *BRCA1* muestran los tres grandes rearrreglos identificados, de color azul se muestra la delección de los exones 8-11, color rosa delección del exón 18 y la morada representa la delección de los exones 18-19. El modelo de la proteína fue tomado de Millan *et al.*, 2019.

De las pacientes que presentaron una mutación patogénica, el 57.14% tuvieron alguna intervención quirúrgica. Todas las pacientes con alguna cirugía fueron intervenidas para retirar parte de la estructura mamaria y a dos les extirparon los ovarios. Todas las pacientes

con mutación patogénica recibieron en algún momento quimioterapia, entre ellas solo el 16.6 % recibió quimioterapia a base de platino (SH10), tabla 6.

Tabla 6: Tipo de quimioterapia, hormonoterapia y cirugía empleada en el tratamiento de las pacientes positivas a mutación. Se muestra el tipo de fármaco empleado en algún momento del tratamiento de las pacientes positivas a alguna variante, así como el tipo de cirugía practicada, de acuerdo a lo reportado en el expediente clínico. Los tratamientos hormonales y quimioterapia no se encuentran en orden de secuencia de acuerdo a como fueron suministrados.

Paciente	Tratamiento	Cirugía
SH1	Desconocida	Desconocida
SH2	Hormonoterapia -Tamoxifeno y Anastrozol Quimioterapia [§]	Mastectomía radical de mama derecha
SH3	Hormonoterapia -Tamoxifeno -Anastrozol Quimioterapia -Floruracilo -Doxorrubicina (adriamicina) -Ciclofosfamida -Paclitaxel -Capecitabina	Mastectomía radical modificada de mama izquierda Cirugía conservadora de mama derecha
SH10	Hormonoterapia -Tamoxifeno Quimioterapia -Doxorrubicina (adriamicina) -Ciclofosfamida -Carboplatino -Paclitaxel	Mastectomía simple de mama izquierda Salpingooforectomía
SH12	Quimioterapia [§]	Histerectomía Ooforectomía Mastectomía
SH14	Hormonoterapia ^δ Quimioterapia -Paclitaxel	Mastectomía radical modificada mama izquierda
SH16	Quimioterapia -Doxorrubicina -Ciclofosfamida -Paclitaxel	Ausente
SH21	Quimioterapia -Doxorrubicina -Ciclofosfamida -Docetaxel	Ausente

§: El expediente clínico en la unidad de genética no especifico el tipo de quimioterapia administrada

Dado las complicaciones que se presentaron para evaluar los niveles de expresión de los genes *P53* y *P21* en las pacientes con mutación en *BRCA*, se ocuparon líneas celulares como modelos, que nos permitieran identificar los posibles efectos de las mutaciones identificadas en *BRCA* en las pacientes portadoras de alguna variante, sobre los niveles de expresión en *P53* y *P21*. Para ello, se ocupó la línea celular HCC1937, positiva para una mutación en el extremo carboxilo de *BRCA1* (Tomlinson *et al.*, 1998) y 4 líneas celulares sin mutación: HCC1806, SUM-229PE, T-47D y MDA-MB-231.

Nuestros resultados demuestran que la línea celular HCC1937 positiva a mutación para *BRCA* presenta niveles de expresión mayor en *P53* y *P21* en comparación con las cuatro líneas celulares restantes que no presentan la mutación.

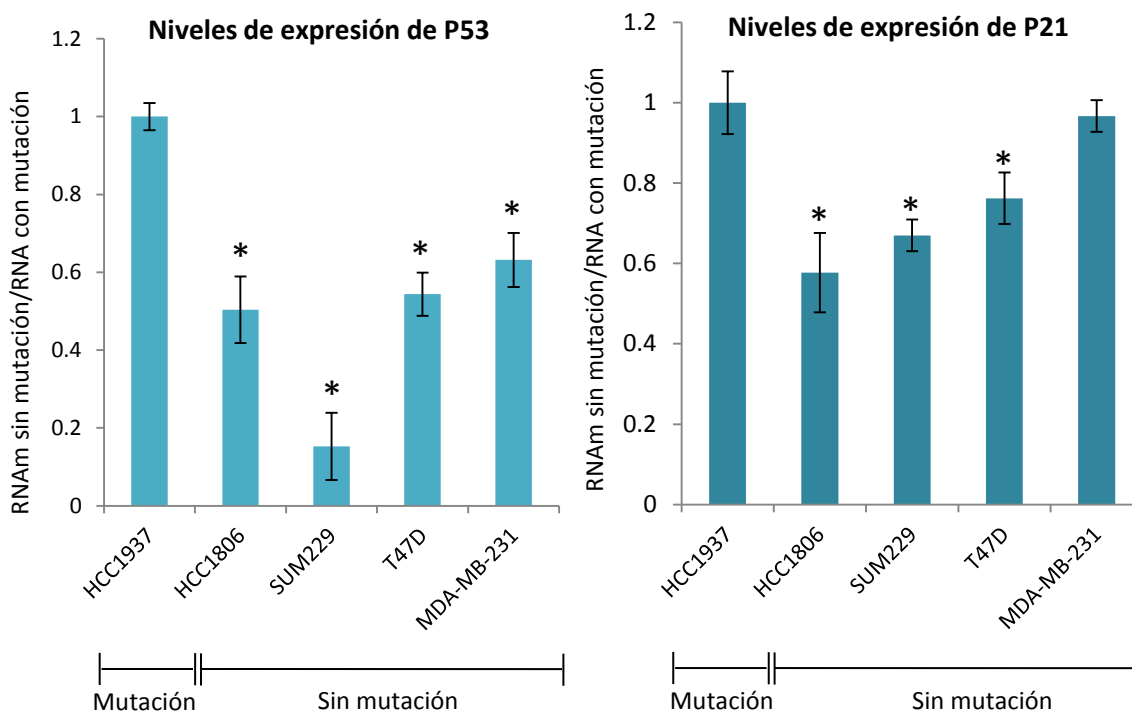


Figura 20. Los niveles de expresión de los genes *P53* y *P21* fueron mayores en la línea celular con mutación en comparación con las células sin mutación. Tanto las líneas celulares sin mutación (HCC1806, SUM-229PE, T-47D y MDA-MB-231) como la positiva a mutación (HCC1937) fueron sembradas, el ARN se extrajo y se corrieron las PCR, los resultados fueron normalizados con GAPDH y posteriormente se sacó la diferencia de cada una de las líneas celulares con respecto a la línea celular con mutación. Los resultados muestran la media \pm S.D. de cuatro experimentos independientes. La relación de HCC1937/HCC1937 se le dio el valor de 1. Los datos fueron sometidos a una prueba de ANOVA seguido de una prueba de Holm-Sidak, $*p < 0.05$ de cada línea celular contra la línea celular HCC1937.

9. DISCUSIÓN

El cáncer de mama sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública, ocupando el primer lugar de nuevos casos de cáncer entre la población femenina, un porcentaje importante de casos se asocia a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*. La gran importancia de detectar mutaciones en estos genes en la población mexicana llevó a la elaboración del presente trabajo donde se secuenciaron muestras de 23 pacientes con cáncer de mama mediante la técnica de secuenciación de nueva generación, el 34.78% de las pacientes fueron portadoras de alguna mutación (Figura 12), de las cuales el 26.08% tienen una mutación patogénica.

En estudios realizados en población mexicana se han reportado solamente el 6% de pacientes con mutaciones patogénicas en *BRCA* (Ruiz-Flores *et al.*, 2002) en otro caso el 9% (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2005) a pesar que se analizaron completamente las regiones codificantes de ambos genes, pero la técnica empleada, análisis de heterodúplex, es inespecífica y no permite identificar grandes deleciones, lo que podría explicar el bajo número de mutaciones identificadas. Vaca-Paniagua *et al.* (2012) reportaron 10.2% de pacientes con variantes patogénicas a pesar de que utilizaron pirosecuenciación en su estudio, este método presenta limitaciones en la detección de exones completos deletados, lo que explicaría porque al ser una técnica de secuenciación más sofisticada la frecuencia de mutaciones fue tan baja. Por otro lado, un estudio identificó 4.19% de mutaciones patogénicas por medio de la prueba de truncamiento de proteínas (Torres-Mejía *et al.*, 2015).

La implementación del panel HISPANEL en la población mexicana llevó a la identificación del 15% de pacientes positivas a mutaciones (Villarreal-Garza *et al.*, 2015a). Así mismo, otro estudio demostró aumento en el porcentaje de positividad con 23% cuando se seleccionaron pacientes con cáncer de mama triple negativo (Villarreal-Garza *et al.*, 2015b); sin embargo, el porcentaje de pacientes positivos aún se encuentra por debajo del reportado en el presente trabajo, esto podría ser causado por el bajo número de mutaciones que permite identificar este panel (Alema *et al.*, 2016).

Lo anterior demuestra la necesidad de implementar nuevas técnicas con mayor eficiencia, lo cual llevaría al aumento en la frecuencia de variantes identificadas. Esto se puede ver reflejado con una publicación muy reciente que utilizó la secuenciación de nueva generación para un estudio en población mexicana con cáncer de ovario donde el 33% de las pacientes analizadas fueron positivas a mutación (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020).

Durante la elaboración del presente trabajo, 4 estudios en pacientes con cáncer de mama se publicaron en México donde utilizaron secuenciación de nueva generación. En Quezada *et al.*, (2018) donde se identificó 7.6% de pacientes positivas a mutación; sin embargo, no se secuenciaron los genes completamente, lo que podría ser la razón de una positividad baja.

Fernández-Lopez *et al.* (2019) reportaron que 18% de su grupo de estudio mostraron mutaciones patogénicas y otras 13 pacientes con mutaciones se identificaron por amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples en total 22.72%. Al mismo tiempo, se publicaron otros estudios donde el 15% dieron positivos a mutación (Millan *et al.*, 2019) y en Zayas-Villanueva *et al.* (2019) encontraron 13.8% de pacientes con mutación (Zayas-Villanueva *et al.*, 2019).

En el presente estudio se determinó que el porcentaje de pacientes con mutaciones detectadas es mayor a los trabajos reportados anteriormente en pacientes con cáncer de mama en población mexicana, a pesar de que el tamaño de la muestra secuenciada fue pequeña. Lo cual demuestra que usar técnicas para la identificación de mutaciones poco sensibles o panel HISPANEL limita la identificación de todas las mutaciones. Por lo tanto, la implementación de secuenciación de nueva generación es indispensable en los estudios clínicos, ya que esta técnica, nos permite secuenciar regiones grandes del genoma con mayor eficiencia, mayor precisión y en menor tiempo. Sin embargo, el porcentaje también es mayor a lo reportado en trabajos recientes donde la secuenciación de nueva generación se utilizó. Para este resultado pudieron repercutir las características de las pacientes seleccionadas en este trabajo, lo que proporcionaría mayor número de pacientes positivas a mutación.

La edad media al momento del diagnóstico de las pacientes secuenciadas fue de 36.56 años (Figura 13), lo que concuerda perfectamente con lo reportado, donde la población mexicana presenta una edad más temprana de padecer la enfermedad (35 años) (Zayas-Villanueva *et al.*, 2019). Sin embargo, la edad promedio de diagnóstico de las pacientes con mutación patogénica en *BRCA* (Tabla 2) fue de 40.5 años, existiendo una diferencia de casi 10 años con respecto a otros estudios de población mexicana donde se ha reportado que las mutaciones se han presentado en pacientes con una edad ≤ 35 años (Ruiz-Flores *et al.*, 2002; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012), esta diferencia podría ser explicada por las características de las pacientes, ya que estos estudios ocuparon como criterios inclusión la edad al momento de diagnóstico y no antecedentes de cáncer de mama. Pero nuestra media de edad es muy semejante a la reportada por Torres-Mejía *et al.* (2015). La media de edad de las pacientes sin mutación fue de 34 años, menor a la reportada en otro estudio donde se reportó de 52 años (Torres-Mejía *et al.*, 2015). Por otro lado, la paciente SH3 presentó una edad superior a los 50 años al momento del diagnóstico con resultado positivo de mutación (Tabla 2); sin embargo, tenía antecedentes familiares de primer grado y fue diagnosticada con cáncer de mama bilateral, ambos factores explicarían la presencia de cáncer (Calderón del Valle & Gallón, 2012; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012) y de mutación aunque la edad sea superior a la reportada.

En el presente estudio, 78.26% de las pacientes analizadas tenían antecedentes familiares de algún tipo de cáncer (Figura 17) en comparación con estudios donde esta característica fue del 27% (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2005) y 6% (Ruiz-Flores *et al.*, 2002), en ambos estudios solo 2 pacientes presentaron mutación en *BRCA* y las dos tenían antecedentes de cáncer.

Villarreal-Garza *et al.* (2015a) analizaron a un grupo de pacientes utilizando el panel HISPANEL mediante espectroscopia de masas y ensayo de PCR, las pacientes que fueron negativas se analizaron a base de amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiple; sin embargo, el número de pacientes con mutación no aumentó significativamente, mostrando un porcentaje menor al que reportamos, dentro de su población solo el 6% de las pacientes tenían antecedentes de cáncer. Justificando sus resultados limitados por el principio de la técnica, la cual solo contiene sondas dirigidas a zonas con mutaciones específicas.

Los estudios recientes donde se implemento la secuenciación masiva mostraron un bajo porcentaje de pacientes con antecedentes de cáncer. Quezada *et al.*, (2018) reportaron 71.3% de pacientes con familiares de cáncer (siendo el más alto con respecto a los 3 estudios publicados posteriormente), a diferencia de Zayas-Villanueva *et al.* (2019) que informaron el 53%, Millan *et al.*, (2019) su población de estudio fueron pacientes con cáncer de mama esporádico. Fernández-Lopez *et al.* (2019) analizaron 3482 individuos mexicanos sin cáncer de mama, solamente 0.43% presentaron mutaciones patogénicas en *BRCA*. El bajo porcentaje y ausencia de antecedentes de cáncer en las pacientes serían factores determinantes de un bajo número de variantes identificadas en *BRCA*. En el presente estudio, la frecuencia alta de mutaciones en *BRCA* podría ser a causa del porcentaje alto de pacientes con antecedentes de cáncer, esto se ve reflejado ya que el 87.5 % de las pacientes positivas a mutación tenían al menos un familiar con cáncer.

Entre los diferentes tipos de cáncer presentes en los familiares de las pacientes positivas a mutación, predomino el cáncer de mama, ovario, próstata, colon y endometrio (Figura 17); sin embargo, 4 de las 6 pacientes con mutaciones presentan antecedentes de cáncer de piel, dos de ellas con mutaciones patogénicas, patología que no se ha asociado tan frecuentemente con mutaciones en *BRCA* (Figura 18).

La paciente SH12 (Tabla 1 y 2) no tuvo antecedentes de carcinoma mamario, pero pesentó cáncer de mama y de ovario, lo que apoya el supuesto que pacientes con múltiples tipos de cáncer, especialmente estas dos neoplasias malignas, tienen mayor riesgo de presentar mutaciones en *BRCA* como se reportó en un estudio de población mexicana, donde el 50% de las pacientes con mutación fueron diagnosticadas con ambos tipos de cáncer (Vaca-Paniagua *et al.* 2012).

El cáncer de mama asociado a *BRCA*, al presentar un origen hereditario se esperaría que las mutaciones a lo largo de varias generaciones fueran las mismas; sin embargo, en el presente trabajo se analizaron unas trillizas las cuales corresponden a las pacientes SH1, SH2 y SH3 (Tabla 2 y Figura 18) todas diagnosticadas con cáncer de mama. No obstante, las mutaciones detectadas fueron diferentes; en SH1 y SH2 las cuatro mutaciones identificadas fueron benignas y la edad al diagnóstico fue similar. Pero si comparamos la paciente SH1 y SH2 con SH3 observamos resultados totalmente diferentes, primeramente no se observaron las 4

mutaciones benignas, aunque si se presentó una mutación benigna en SH3 pero diferente, la cual se encontró en *BRCA2* y se detectaron dos mutaciones patogénicas en *BRCA1*. Por otro lado, la edad al diagnóstico fue 7 años posteriores a la edad de SH1 y SH2. Estos resultados son diferentes a los que se reportó en otras trillizas, donde todas presentaron la misma mutación aunque solo dos habían desarrollado el cáncer, las cuales tuvieron cáncer de mama bilateral y la edad de diagnóstico fue la misma (Tomlinson *et al.*, 1998).

La presencia de estas variantes patogénicas en SH3 podrían ser las responsables del diagnóstico de cáncer de mama bilateral, como ha sido informado previamente, ya que estas mutaciones aumentan el riesgo de un fenotipo de cáncer más agresivo y bilateral (Calderón del Valle & Gallón, 2012; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012). Por otro lado, comprobamos que las mutaciones heredadas en *BRCA* no se heredan de la misma forma a todos los descendientes, aunque la relación sea muy estrecha. Pero también, es muy probable que exista en estas tres pacientes alguna mutación en otros genes que se asocian a cáncer de mama hereditario, que explique el origen de cáncer en la paciente SH1 y SH2 como *P53*, *RAD51*, *STK11*, *CDH1*, *NF1* y *PTEN* (Cárdenas *et al.*, 2019; Chirivella & Garcés, 2018; INFOCÁNCER, 2019; Quezada *et al.*, 2018).

Los porcentajes de cáncer de mama ductal y lobulillar obtenidos en este trabajo concuerdan claramente con los reportados en la literatura (American Cancer Society, 2019; Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2005; Instituto Nacional del Cáncer, 2020). La mayor frecuencia se presentó en el tipo ductal (86.95%) con respecto al lobulillar (8.69%) (Figura 14), muy semejante a lo reportado anteriormente en población mexicana (Millan *et al.*, 2019; Torres-Mejía *et al.*, 2015; Villarreal-Garza *et al.*, 2015a; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019). También en nuestro estudio se presentó bajo porcentaje, con el 4.34% de pacientes con cáncer tubulolobulillar, como se ha reportado que tiene una baja frecuencia, con un valor entre 3-5.2%, siendo de los tipos de cáncer más extraños que se presentan (Millan *et al.*, 2019; Villarreal-Garza *et al.*, 2015a).

De acuerdo con el perfil molecular de las pacientes estudiadas se obtuvo que 39.13% fueron luminal y 47.82% triple negativo (Figura 15), porcentajes que se salen de los establecidos de manera normal, con 60% y 15% respectivamente (Cárdenas *et al.*, 2019; Instituto Nacional del Cáncer, 2020; Wang & Di, 2014), los HER-2 positivo no presentaron una variedad tan grande. Especialmente se observa el aumento en el número de pacientes triple negativos, aunque se sabe que la población mexicana presenta mayor número de casos con este perfil molecular (Cárdenas *et al.*, 2019), en un rango del 27-35% de este subtipo (Villarreal-Garza *et al.*, 2015a; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019). Sin embargo, nuestro trabajo demuestra casi 10 veces más los casos con este perfil molecular, esto se podría asociar con uno de los criterios de inclusión, al seleccionar pacientes triples negativos lo que explica el incremento en el número de pacientes con este perfil.

Se encontró que 50% de las pacientes con mutaciones patogénicas tuvieron cáncer de mama triple negativo, mayor a lo reportado anteriormente con un rango de 20-27% (Millan *et al.*, 2019; Villarreal- Garza *et al.*, 2015a) este menor porcentaje en comparación a lo reportado por este trabajo, podría estar asociado con el uso del panel de detección de 115 mutaciones específicas y no toda la región de codificación (Alema *et al.*, 2016; Villarreal-Garza *et al.*, 2015b).

Esto indica que la secuenciación de nueva generación es una herramienta que ayudaría a identificar una mayor cantidad de mutaciones siempre y cuando se seleccione a la población de pacientes de manera óptima tomando en cuenta varios criterios que den un mejor beneficio a la población como son: Edad al momento de diagnóstico menor a los 35 años cuando no se tenga antecedentes de cáncer, si tiene antecedentes la edad de diagnóstico se puede extender hasta los 55 años, presencia de cáncer de mama y ovario, pero especialmente cáncer de mama triple negativo. En consecuencia, esto ayudaría a tener un mayor beneficio en pacientes mexicanas, generando un mayor porcentaje de mutaciones detectadas en las pacientes, con un impacto en el sistema de salud en México para combatir la enfermedad y tener mejores estrategias de tratamiento.

La proporción de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* de nuestro estudio (Tabla 4) se asemeja mucho a lo que se reporta generalmente 80% y 20%, respectivamente. En contraste, un estudio reciente en la población mexicana informó 40% de mutaciones en *BRCA1* y 60% en *BRCA2* cuando se utilizó secuenciación de nueva generación (Fernández-Lopez *et al.*, 2019) lo que podría hacer creer que esta nueva técnica de secuenciación, estuviera descubriendo que la población mexicana presenta mayor cantidad de mutaciones en *BRCA2*. Sin embargo, nuestro estudio demuestra que a pesar de la implementación de una técnica de secuenciación similar, el porcentaje de mutaciones patogénicas en *BRCA1* (85.71%) fue mayor a la de *BRCA2* (14.28), como ya se había reportado anteriormente en población mexicana (50-80% en *BRCA1* y 15-40% en *BRCA2*) (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020; Millan *et al.*, 2019; Quezada *et al.*, 2018; Torres-Mejía *et al.*, 2015; Villarreal- Garza *et al.*, 2015a; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019). Esta diferencia entre ambos genes, podría ser explicada por la cantidad de repeticiones Alu presentes en *BRCA1* (Narod & Faulkes, 2004), teniendo en total 138 lo que corresponde al 41.5% de la secuencia del gen, también el 41.9% de *BRCA1* está compuesto de elementos repetitivos intercalados no Alu, estas regiones repetidas favorecen y son las causantes de los reordenamientos genéticos y cromosómicos (Hansen *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 1996) y aunque *BRCA2* es más grande que *BRCA1*, las repeticiones Alu son menores (Hansen *et al.*, 2009) lo que podría explicar el menor número de mutaciones en *BRCA2* y ausencia de grandes arreglos genéticos.

El 42.87% de las mutaciones patogénicas detectadas correspondían a grandes arreglos genéticos, todos localizados en *BRCA1* presentes en las pacientes SH3, SH12 y SH21 (Tabla 2), en otros estudios se ha encontrado solamente el 9.2 % (Hansen *et al.*, 2009). En varios países

se ha encontrado que la proporción va de 8-15% y se ha reportado que en los Países Bajos e Italia es en donde se localiza el mayor porcentaje de grandes rearrreglos (Vasickova *et al.*, 2007), por lo cual, la secuenciación de nueva generación también aumenta la posibilidad de detectar un mayor número de grandes arreglos debido a la secuenciación completa de los genes *BRCA*.

De las 12 diferentes mutaciones reportadas, el 16.66% (Tabla 5) no se habían informado anteriormente en población Mexicana (Exón18del y Tyr3009fs). Las 5 mutaciones no patogénicas p.Pro871Leu, p.Ser1634Gly (p.Ser1613Gly), p.Lys1183Arg, p.Glu1038Gly y p.Lys3326Ter (Tabla 3) ya habían sido reportadas anteriormente (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2005; Fernández-Lopez *et al.*, 2019; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019).

La mutación Ala1729Glu también conocida como Ala1708Glu ya se ha reportado en pacientes mexicanas (Fernández-Lopez *et al.*, 2019; Millan *et al.*, 2019; Torres-Mejía *et al.*, 2015; Villarreal-Garza *et al.*, 2015a; Villareal-Garza *et al.*, 2015b; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019) es una mutación fundadora española y colombiana (Ossa & Torres, 2016; Torres-Mejía *et al.*, 2015; Villarreal-Garza *et al.*, 2015b) y se ha encontrado con alta frecuencia en población Latina del sur de California (Ossa & Torres, 2016; Torres-Mejía *et al.*, 2015).

Es un cambio de base que podría afectar la interacción entre BRCA1 y varios reguladores de la transcripción (Figura 19), principalmente modificadores epigenéticos como HDAC (Champan & Verma, 1996) y las helicasas BACH1 (Clark *et al.*, 2012) y RHA (Champan & Verma, 1996), ya que se ha demostrado que la mutación M1775E ocasiona la pérdida de interacción BRCA1 y RHA (Anderson *et al.*, 1998). Por otro lado, podrían presentarse fallas en la interacción con la ARN pol II (Yarden & Brody, 1999), debido a que la pérdida de 11 aminoácidos en el extremo carboxilo de BRCA1 demostró ausencia en la interacción con esta polimerasa (Scully *et al.*, 1997a); sin embargo, se sabe que en el extremo amino existe otro sitio que permite la interacción con la ARN pol II (Chiba & Palvin, 2002). Todas estas proteínas involucradas en la regulación transcripcional interaccionan con los dominios BRCT.

La ausencia de estas interacciones podría ser explicada porque la mutación estaría presente en el primer dominio BRCT (1649-1737 aminoácidos) (Yarden & Brody, 1999), ambos dominios son los responsables de la actividad transcripcional de BRCA1. El conjunto de alteraciones explicarían la pérdida de la actividad transcripcional generada por esta mutación como ya se había reportado antes (Chapman & Verma, 1996; Monteiro, August y Hanafusa, 1996) lo que llevaría a la baja transcripción de genes activados por daño en el ADN, entre ellos los involucrados en la muerte celular por apoptosis como *GADD45* (Harkim *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000) y los represores del ciclo celular como *P21* ya que el dominio BRCT es fundamental para la transcripción de este supresor tumoral (Li *et al.*, 1999) llevando a una proliferación celular descontrolada, por lo que es muy probable que los niveles de expresión de *P21* en esta paciente se encuentren bajos.

La mutación exón 18-19del se ha reportado en dos pacientes con cáncer de ovario en México (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020; Villarreal-Garza *et al.*, 2015a), por lo cual, este es el primer trabajo donde se reporta la mutación en una paciente con cáncer de mama en población mexicana. También se tiene reporte de esta mutación en una paciente de República Checa (Vasickova *et al.*, 2007). Se ha predicho que la delección de ambos exones puede llevar al truncamiento de la proteína en el codón 1693 y su origen es por la presencia de una secuencia Alu (Vasickova *et al.*, 2007). Los exones 18 y 19 codifican los residuos que forman parte de los dominios BRCT (Figura 19) (Hollis, Churchman y Gourley, 2017; Wu *et al.*, 1996; Yarden & Brody, 1999), por lo cual los efectos serían muy similares a los mencionados en la mutación Ala1729Glu, principalmente ausencia de actividad transcripcional, lo que llevaría a niveles disminuidos de *P21* en esta paciente. Como se observó en células transfectadas con BRCA1 carentes de estos dominios de transactivación, donde las células fueron deficientes en la expresión de *P21* (Somasundaram *et al.*, 1997).

La delección del exón 18 no se ha reportado anteriormente, sin embargo, ClinVar menciona que esta delección también se conoce como delección del exón 19, mutación de la cual existe solo un reporte (Hansen *et al.*, 2009). Esta mutación estaría completamente relacionada a fallas en interacciones con proteínas reguladoras de la transcripción y ausencia de los dominios BRCA (Figura 19), lo que llevaría a la pérdida transcripcional de BRCA1 como se describió en las mutaciones Ala1729Glu y exón 18-19del, por ello se esperaría que la pacientes tenga niveles de expresión de *P21* disminuidos.

La mutación Arg1443ter ya se ha reportado anteriormente en México en pacientes con cáncer de mama (Fernández-Lopez *et al.*, 2019; Millan *et al.*, 2019; Torres-Mejía *et al.*, 2015; Villarreal-Garza *et al.*, 2015a; Villareal-Garza *et al.*, 2015b; Zayas-Villanueva *et al.*, 2019) y en cáncer de ovario (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020). Es una mutación principalmente observada en mujeres de origen Europeo occidental (Villareal-Garza *et al.*, 2015b).

Esta mutación carece de los residuos que forman parte del dominio SCD (aminoácidos 1280-1524) (Cortez *et al.*, 1999; Gatei *et al.*, 2001; Hollis, Churchman y Gourley, 2017), lo que llevaría a la ausencia de residuos de serina necesarios para la activación de BRCA1 por parte de proteínas sensoras de daño como son ATM (Cortez *et al.*, 1999; Gatei *et al.* 2001) y ATR (Gatei *et al.* 2001) (Figura 19). En ensayos donde células a las cuales se les cambiaron los residuos de serina por alanina en el dominio SCD, no mostraron fosforilación en BRCA1 por ATM y se volvieron sensibles a la radiación con actividad proliferativa alta (Cortez *et al.*, 1999). Por otro lado también existiría ausencia de los residuos que forman parte del dominio coiled-coil (aminoácidos 1364-1473) (Clark *et al.*, 2012; Hollis, Churchman y Gourley, 2017), por lo cual BRCA1 no podría interactuar con PALP2, así mismo tampoco activar a BRCA2 ya que los residuos que permiten la interacción con BRCA2 no estarían presentes (1314-1756) (Chen *et al.*, 1998a). Esta mutación probablemente también estaría involucrada en la mala regulación de RB, ya que mutaciones en el extremo carboxilo (Y1853X y M1775R), han demostrado

pérdida de interacción entre BRCA1 y RB, lo que lleva a que este último supresor de tumores libere al factor de transcripción E2F induciendo a proliferación (Yarden & Brody, 1999).

El truncamiento de la proteína también llevaría a fallas en la regulación de la transcripción al estar ausente los dominios BRCT (Wu *et al.*, 1996) repercutiendo en la disminución de los niveles de *P21*, por las características mencionadas en las mutaciones anteriores (Ala1729Glu y Exón 18-19del), esta idea se ve reforzada porque células que fueron transfectadas con BRCA1, la cual presentaba 7 mutaciones diferentes a lo largo del extremo carboxilo, todas las variantes mostraron alteración en su actividad transcripcional (Monteiro, August y Hanafusa, 1996).

Por otro lado, los residuos 1760-1863 permiten la interacción con P53 (Deng & Brodie, 2000), por lo cual, la ausencia de estos residuos llevaría a fallas en la activación de P53 y muy probablemente bajos niveles en la expresión de esta proteína debido a la falta de autoactivación de su promotor, ya que P53 al ser activado induce su propia transcripción (Kitagishi, Kobayashi y Matsuda, 2013; MacLachlan, Takimoto y El-Deiry, 2002) y tampoco podría inducir la transcripción de *P21* (Brugarolas *et al.*, 1995; Kitagishi, Kobayashi y Matsuda, 2013; Pitolli *et al.*, 2019).

Sin embargo, los cambios en los niveles de expresión de *P53* podrían no ser tan significativos porque BRCA1 presenta otro sitio de unión a este supresor de tumores, correspondiendo a los residuos 521-557 (Deng & Brodie, 2000), este sitio podría reemplazar la función del segundo sitio presente en el extremo carboxilo terminal que estaría ausente. Todas estas alteraciones podrían conducir a la pérdida del control del ciclo celular y al aumento en la proliferación, como se observó en una línea celular no tumoral donde se introdujo una secuencia que incluye los aminoácidos 1293-1863, de tal forma que compitiera con BRCA1 wild-type por sus proteínas blanco, esto produjo, que P53 fuera capturado por la secuencia de aminoácidos, llevando a una pérdida de los puntos de control y las células mostraron tasas de crecimiento más rápido adquiriendo características tumorales (Larso *et al.*, 1997).

Asp936fs ya se ha reportado en pacientes mexicanas con cáncer de mama (Millan *et al.*, 2019; Vaca-Paniagua *et al.*, 2012; Villarreal- Garza *et al.*, 2015a; Villareal-Garza *et al.*, 2015b) y en cáncer de ovario (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020). La pérdida de 4 pares de bases lleva al cambio en el marco de lectura, con una proteína formada de una secuencia de aminoácidos diferente a la original, esto genera una proteína no funcional o que se forme un codón de parada produciendo una proteína truncada (Chapman & Verma, 1996). Lo que repercute muy probablemente en la pérdida de la secuencia correcta de una parte de la región que permite la interacción con RAD51 (758-1064) (Clark *et al.*, 2012; Scully *et al.*, 1997c) y de la región que interacciona con el ADN (452-1079) (Paull *et al.*, 2001) lo que estaría implicado en fallas en la reparación del mismo (Figura 19). Por otro lado, es muy probable que los efectos presentados en las mutaciones anteriores también se presenten, por lo que se verían comprometidas las

regiones de actividad transcripcional, el cambio en el marco lectura afectaría hasta el aminoácido 1863, llevando a un decremento en la transcripción de *P21* y así mismo se vería afectada la región que interacciona con *P53* llevando a un decremento del mismo.

La delección de los exones 8-11 también se ha conocido como delección de los exones 9-12 (Clin Var), la cual corresponde a la mutación fundadora mexicana (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020). Esta mutación presentó una frecuencia muy baja en nuestro estudio, correspondiendo al 14.28% de todas las mutaciones patogénicas. Esto en contraste con otros estudios que reportaron 21.4% (Zayas-Villanueva *et al.*, 2019), 29% (Quezada *et al.* 2018; Villarreal-Garza *et al.*, 2015a) y hasta 41% (Villarreal-Garza *et al.*, 2015b) de los casos que presentaron esta mutación.

Esta mutación lleva a la pérdida de más del 50% de la proteína debido a la delección del exón 11 (residuos 224-1365), la ausencia de la región codificada por estos exones llevaría a la falta de interacción entre BRCA1 y c-Myc (aminoácidos 175-511) (Clark *et al.*, 2012), conduciendo a la ausencia de la represión de la actividad del oncogén c-Myc y la mala regulación del supresor de tumores RB (304-394 aminoácidos) (Clark *et al.*, 2012) favoreciendo señales de proliferación. Estos exones también codifican las dos secuencias de localización nuclear (NLS1 500-508 y NLS2 609-615 aminoácidos) (Clark *et al.*, 2012; Monteiro, August y Hanafusa, 1996) generando pérdida de la translocación a sitios con daño en el ADN. Parte de estas secuencias codificadas por estos exones permiten la interacción con RAD50 (aminoácidos 341-748) (Clark *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 1999) y RAD51 (aminoácidos 758-1064) (Clark *et al.*, 2012; Scully *et al.*, 1997c), por lo cual llevaría a fallas en los mecanismos de reparación del ADN. También se pierde la secuencia que permite la interacción de BRCA1 con el ADN (aminoácidos 452-1079) (Paull *et al.*, 2001).

Estos exones también codifican la región que permite la interacción con γ -tubulina (aminoácidos 504-803) (Hsu, Doan y White, 2001), lo cual podría llevar al aumento en el número de centrosomas y a un proceso de división celular inadecuado conduciendo a aberraciones cromosómicas. Estos exones también codifican la primera región que permite la interacción con *P53* (aminoácidos 224-803) (Deng & Brodie, 2000), ratonas que presentan una delección del exón 11 en *BRCA1* muestran ausencia en la interacción entre ambas proteínas lo que acelera la formación de tumores (Xu *et al.*, 1999). Es por ello, que esta paciente probablemente tenga disminuidos los niveles de expresión de *P53* por falta de su activación, sin embargo podrían no ser tan bajos, recordemos que se tiene el segundo sitio de unión a *P53* en el extremo carboxilo (Deng & Brodie, 2000), pero los niveles de expresión de *P21* es muy probable que sean normales, ya que la región responsable de la actividad transcripcional en el extremo carboxilo no se vería afectada.

Pero las fallas de la proteína no solo se pueden atribuir a la ausencia de la región de aminoácidos que se asocia con una función en particular, sino que también por los defectos

en el plegamiento de la proteína causado por las mutaciones, se ha observado que la proteína BRCA1 puede tolerar truncamientos de solo ocho aminoácidos, la eliminación de nueve codones conduce a defectos de plegamiento (Vasickova *et al.*, 2007) lo que podría explicar el mal funcionamiento de las mutaciones exón 18-19del, Arg1443ter y exón 8-11del, por lo cual es probable que las pacientes SH3, SH12 y SH21 tengan una proteína mal plegada.

La mutación Tyr3009fs es la única de tipo patogénica que se identificó en *BRCA2*, no se ha reportado en población mexicana y se ha asociado con descendencia española (Campos *et al.*, 2003). Recientemente, esta mutación se identificó en una paciente con cáncer de mama en Argentina, también por secuenciación de nueva generación (Solano *et al.*, 2018).

La delección de 5 pares de bases lleva al cambio en el marco de lectura y con ello modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína a partir del aminoácido 3009. Esto llevaría muy probablemente a la pérdida de la interacción con RAD51 ya que cambiaría la secuencia de aminoácidos responsables de esta interacción (aminoácidos 3265-3302) (Hollis, Churchman y Gourley, 2017; Marston *et al.*, 1999; Mizuta *et al.*, 1997; Sharan *et al.*, 1997; Thorslund, Esashi y West, 2007; Tutt *et al.*, 2001a), que es indispensable para la actividad de *BRCA2* en la reparación del ADN por recombinación homóloga, muy parecido a lo demostrado en ratones, donde la introducción de una región de aminoácidos (3056-3328) que compite con *BRCA1* wild-type por RAD51, llevó a que RAD51 no se encontrara disponible y *BRCA2* no se uniera con RAD51 demostrando fallas en la reparación del ADN (Mizuta *et al.*, 1997). El extremo carboxilo también contiene los dos sitios de localización nuclear (NLS 1: 3266-3269 y NLS: 3313-3330 aminoácidos) (Esashi *et al.*, 2005; Hollis, Churchman y Gourley, 2017; Spain *et al.*, 1999; Tutt *et al.*, 2001a), por lo cual, es muy probable que *BRCA2* no pueda ser dirigido al núcleo y no pueda traslocar a RAD51 a sitios con daño en el ADN, debido a que proteínas *BRCA2* que fueron deletadas de los residuos 2889-3414 no pudieron ser traslocadas al núcleo permaneciendo siempre en el citoplasma (Spain *et al.*, 1999). En células embrionarias ausentes del exón 27 en *BRCA2* mostraron ausencia en la reparación por recombinación homóloga y fallas en la localización nuclear de RAD51 después que las células fueron expuestas a radiación (Tutt *et al.*, 2001a).

El cambio en el marco de lectura afectaría la serina 3291 (Esashi *et al.*, 2005) y daría origen a otro aminoácido, este aminoácido es indispensable para la activación de *BRCA2* que permite la regulación y activación de RAD51 durante el daño al ADN. Cuando se sustituyó la serina por glutamato o alanina se perdió la interacción de *BRCA2* con RAD51, y se observaron fallas en la reparación del DSB (Esashi *et al.*, 2005). Por lo cual, esta mutación estaría implicada completamente en fallas en la reparación del ADN. Esta paciente es muy probable que no presente alteraciones en los niveles de expresión de *P53* ni *P21*, dado que *BRCA2* no tienen ninguna interacción con ninguno de estos supresores de tumores.

La presencia de la mutación p.Glu575fs en la paciente que fungió como control 2 diagnosticada con cáncer de ovario, con el subtipo carcinoma seroso de alto grado, este subtipo de cáncer es el principalmente causado por mutaciones en *BRCA* (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020). Esta mutación se reportó recientemente en la población mexicana en una paciente con cáncer de ovario (Gallardo-Rincón *et al.*, 2020) lo que es muy probable que sea una mutación exclusiva de cáncer de ovario.

Al analizar el tratamiento suministrado a las 6 pacientes portadoras de mutaciones patogénicas (Tabla 6), solamente la paciente SH10 fue tratada con quimioterapia a base de sales de platino, lo que demuestra un tratamiento inadecuado en este grupo de pacientes. Se ha demostrado que la base principal de la quimioterapia en las pacientes con mutaciones en estos genes son las sales de platino como el carboplatino y cisplatino, demostrando que el uso de carboplatino genera una mayor supervivencia libre de enfermedad (Cárdenas *et al.*, 2019). Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que el uso de inhibidores de PARP, como el Olaparib, muestra muy buena respuesta entre las pacientes con cáncer de mama causado por *BRCA* (Karakasis *et al.*, 2016), demostrando una mayor supervivencia libre de progresión en las pacientes (Cárdenas *et al.*, 2019). Lo que ha llevado a determinar que la base de tratamientos de estas pacientes es Olaparib más carboplatino o cisplatino (Cárdenas *et al.*, 2019; Karakasis *et al.*, 2016), sin embargo, en el grupo de pacientes positivas a mutaciones en este estudio no se cumple con este plan de tratamiento, esto podría ser ocasionado por la usencia de estudios que identifiquen estas mutaciones. Esto lleva a pérdidas de vidas innecesarias, ocasionado por la falta de tratamientos adecuados que ya se han demostrado que tienen un mejor beneficio y ya se tienen implementados en las áreas clínicas.

Sin embargo, también demostramos que existe un retroceso en los tratamientos, dado que las pacientes SH3 y SH10 (Tabla 5) fueron tratadas con hormonoterapia cuando su subtipo molecular es triple negativo, los beneficios obtenidos son mínimos o peor aún nulos, cuando el tratamiento principal para los subtipos triple negativo es la quimioterapia a base de sales de platino (Cárdenas *et al.*, 2019). En 2019, el medicamento de inmunoterapia Atezolizumab (Tecentriq), fue aprobado junto con el medicamento de quimioterapia nab-paclitaxel (Abraxane) para su uso en mujeres con cáncer de mama triple negativo avanzado que produce la proteína PD-L1 (American Cancer Society, 2019).

Las pacientes que responderían mejor a los tratamientos hormonales, como los inhibidores de aromatasas o los antiestrógenos, serían las pacientes SH14 y SH16 que presentan el subtipo molecular Luminal A, ya que se ha encontrado que responden muy bien aunque tengan la mutación (American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019), sin embargo la paciente SH16 no ha recibido alguno de estos tratamientos. Por su edad se le debería de dar antiestrógenos y no inhibidores de aromatasas, este es para pacientes postmenopáusicas.

Es muy importante que los descendientes y familiares cercanos de estas pacientes puedan ser revisadas constantemente y realizar la secuenciación para identificación de variantes, ya que existe una probabilidad alta que presenten la mutación. La identificación de mutaciones podría llevar a la implementación de estrategias de prevención muy eficientes. Se ha recomendado hacer seguimiento clínico desde los 25 años y hacer cada año una resonancia magnética en estas mujeres o familiares, la cual tiene mayor capacidad de detectar tumores en pacientes más jóvenes y causar menos daño (Instituto Nacional del Cáncer, 2018). Por otro lado, se ha recomendado que las mujeres portadoras de una mutación aumenten el periodo de lactancia, dado que se ha encontrado que la lactancia en mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA1* disminuye el riesgo de desarrollar cáncer (Zayas-Villanueva *et al.*, 2019).

Los tratamientos hormonales se recomiendan como métodos de prevención y en estado temprano de cáncer (American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019). Asimismo, la cirugía preventiva entre ellas la mastectomía reductora de riesgo (MRR) también denominada mastectomía profiláctica (puede ser contralateral o bilateral), la ooforectomía o la salpingooforectomía profiláctica (American Cancer Society, 2020; Cárdenas *et al.*, 2019; Instituto Nacional del Cáncer, 2018; Karakasis *et al.*, 2016). La MRR reduce el riesgo de cáncer de mama en un 90% en pacientes portadoras de mutaciones y en un 95% cuando se acompaña de una salpingooforectomía bilateral (Cárdenas *et al.*, 2019), por otro lado la salpingooforectomía sola presenta una reducción de riesgo del 56% (Instituto Nacional del Cáncer, 2018).

Las pruebas genéticas de *BRCA* son de gran relevancia porque proporcionan información sobre el posible efecto en la proteína y las alteraciones en la interacción con sus proteínas blanco, permiten un tratamiento clínico adecuado y nuevas estrategias para las pacientes afectadas, así como un enfoque clínico preventivo a los miembros de la familia antes del desarrollo del cáncer (Vaca-Paniagua *et al.*, 2012).

Para confirmar los posibles efectos de las mutaciones detectadas en *BRCA* en las pacientes portadoras de alguna mutación sobre los niveles de expresión en *P53* y *P21*, se ocupó la línea celular HCC1937 y otras 4 líneas celulares sin mutación. La línea celular HCC1937 fue seleccionada por ser obtenida de una paciente trilliza, diagnóstico molecular triple negativo y ser portadora de una mutación (Tomlinson *et al.*, 1998).

Las células HCC1937 presentan una mutación en el extremo carboxilo de *BRCA1* (Glu1756fs), una inserción de una citosina en el nucleótido 5382 generando un cambio de marco de lectura y dando origen a un codón de paro en la posición 1829 (Li *et al.*, 1999; Tomlinson *et al.*, 1998). Por lo cual, el mal funcionamiento de la proteína se relaciona principalmente a daños en los dominios BRCT, especialmente el segundo dominio BRCT (1756-1858 residuos) (Yarden & Brody, 1999) es decir fallas en la actividad transcripcional de *BRCA1* como se describió en las mutaciones Ala1729Glu, exón 18-19del y la delección del exón 18. Por tal motivo se esperaría

una disminución en los niveles de *P21* y fallas en el arresto del ciclo celular, se ha demostrado que esta línea celular presenta fallas en el punto de control G2/M, cuando se transfecta con *BRCA1* wild-type se recupera la funcionalidad del punto de control (Ruffner et al., 2001). También se esperaría disminución en la activación de *P53* y en sus niveles de expresión al estar alterada la región de *BRCA1* que permite la interacción con *P53* (1760-1863) (Deng & Brodie, 2000).

Sin embargo, cuando analizamos los niveles de expresión de *P53* y *P21* los resultados no fueron los esperados, ya que los niveles de expresión en ambos genes fueron superiores en HCC1937 en comparación al resto de las líneas celulares que no presentan mutación (Figura 20).

Esto se podría explicar porque *BRCA1* presenta la mutación en el extremo carboxilo, sin embargo la segunda región (residuos 224-500) que permite la interacción con *P53* (Deng & Brodie, 2000), podría recuperar la función de activación de este gen. De tal forma que *BRCA1* al activarse induce la autotranscripción de *P53* y transcripción de *P21* (Brugarolas et al., 1995; Kitagishi, Kobayashi y Matsuda, 2013; Pitolli *et al.*, 2019), lo que explicaría los niveles elevados de ambos genes. Sin embargo, los niveles de transcripción entre líneas celulares tendrían que ser muy similares, porque ninguna línea fue expuesta a agentes que indujeran muerte o estrés celular.

Estos resultados podrían llevar a pensar que las pacientes portadoras de mutación en *BRCA* no presentan alteraciones en los niveles de expresión de *P53* ni *P21*, sin embargo, el ambiente y condiciones de un cultivo celular a un ambiente tumoral es muy diferente, lo que podría ocasionar que no se tenga realmente los patrones de expresión, esto dificulta comprender como las mutaciones presentes en las pacientes en los genes *BRCA* afectan la expresión de ambos genes.

Por lo cual, es necesario hacer estudios de las variaciones en los niveles de expresión en *P53* y *P21* en pacientes portadoras de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* que nos permitan determinar con claridad si las mutaciones repercuten en la represión transcripcional de otros genes supresores de tumores como son *P53* y *P21*.

10. CONCLUSIONES

La secuenciación de nueva generación llevó a tener el mayor porcentaje de pacientes con cáncer de mama con mutaciones en *BRCA* que se ha reportado en población mexicana.

La secuenciación de nueva generación podría presentar un beneficio mayor en pacientes que sean seleccionadas con criterios rigurosos que aumenten el riesgo de presentar mutaciones en *BRCA*. Con este punto se enfatiza la necesidad de la colaboración multidisciplinaria en beneficio a la salud.

La implementación de una nueva técnica de detecciones permitió la identificación de dos nuevas mutaciones que no se habían reportado anteriormente en población mexicana. Por lo cual hay mutaciones que siguen sin ser identificadas.

La ausencia de estudios y técnicas que permitan la identificación adecuada de mutaciones en *BRCA* en México, influyen en el manejo y pronóstico tardío de las pacientes e incorrecto tratamiento.

Se sugiere retomar la evaluación del nivel de expresión de *P53* y *P21* en las pacientes con las mutaciones identificadas en *BRCA*.

La secuenciación de nueva generación debe ser implementada en el sector salud para el diagnóstico de cáncer de mama hereditario y en otras patologías de origen genético, lo que llevaría a un beneficio tanto de la paciente como de la Secretaría de Salud en los tratamientos, costos y disminuir el índice de mortalidad.

La importancia del análisis de padecimientos de origen genético es importante, ya que se minimizaría el riesgo de presentarse la enfermedad en generaciones futuras.

11. PERSPECTIVAS

El presente trabajo abre una ventana muy importante y demuestra la necesidad de implementar la secuenciación de nueva generación en la identificación de variantes en los genes *BRCA* para el correcto diagnóstico de las pacientes con cáncer de mama en población mexicana que lleve a un tratamiento correcto y eficiente para esta población de mujeres.

Sin embargo, es necesario un estudio con mayor cantidad de pacientes que puedan ser analizadas para incrementar la muestra de pacientes con mutaciones, así mismo, es indispensable realizar un estudio que incluya muestras de pacientes originarias de diferentes estados de la republica, mediante secuenciación de nueva generación. Lo anterior, permitiría conocer las principales variantes de los genes *BRCA* que se encuentran en la población mexicana, las cuales se desconocen por ausencia de métodos precisos de detección de variantes y por falta de estudios en poblaciones de varios estados de la república mexicana.

Las complicaciones en el presente trabajo para evaluar los niveles de expresión en los genes supresores de tumores *P53* y *P21* en pacientes con mutación en *BRCA*, llevó a suponer en base a la literatura, cuales podrían ser los efectos de cada mutación detectada sobre los niveles de expresión en estos genes supresores, pero es necesario comprobar si las pacientes SH10, SH12 y SH16 presentan alteraciones en los niveles de expresión de *P53*; y si las pacientes SH3, SH10, SH16 y SH21 presentan alteración en la expresión de *P21*.

Aunque nuestro modelo de líneas celulares demostró que los niveles de expresión en *P53* y *P21* se ven menos afectados en la línea celular con mutación, se tendría que comprobar este comportamiento en los pacientes. Por lo cual, es indispensable determinar las alteraciones en los niveles de expresión de estos genes supresores de tumores, en las pacientes que son positivas a mutación, para comprender la forma de regulación en *BRCA1*, *P21* y *P53*.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aleamar, B., Herzog, J., Netto, C. B. O., Artigalás, O., Schwartz, I. V. D., Bittar, C. M., Ashton-Prolla, P. y Weitzel, J.N. (2016). Prevalence of Hispanic BRCA1 and BRCA2 mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations. *Cancer Genetics*. 209: 417-422.

American Cancer Society. (2019). Acerca del cáncer de seno. Consultado: 7 de noviembre del 2020. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html>.

American Cancer Society. (2020). Riesgo y prevención del cáncer de seno. Consultado: 8 de noviembre del 2020. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/riesgos-y-prevencion/factores-de-riesgo-del-cancer-de-seno-que-usted-no-puede-cambiar.html>

Anderson, S. F., Schlegel, B. P., Nakajima, T., Wolpin, E. S. y Parvin, J. D. (1998). BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nature Genetics*. 19: 254-256.

Bignell, G., Micklem, G., Stratton, M. R., Ashworth, A. y Wooster, R. (1997). The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Human Molecular Genetics*. 6, 53-58.

Bennett, L. M., McAllister, K. A., Malphurs, J., Ward, T., Collins, N. K., Seely, J. C., Gowen, L. C., Koller, B. H., Davis, B. J. y Wiseman, R. W. (2000). Mice heterozygous for a BRCA1 or BRCA2 mutation display distinct mammary gland and ovarian phenotypes in response to diethylstilbestrol. *Cancer Research*. 60: 3461-3469.

Bertwistle, D., Swift, S., Marston, N. J., Jackson, L. E., Crossland, S., Crompton, M. R., Marshall, C. J., y Ashworth, A. (1997). Nuclear location and cell cycle regulation of the BRCA2 protein. *Cancer Research*. 57: 5485-5488.

Bochar, D. A., Wang, L., Beniya, H., Knew, A., Xue, Y., Lane, W. S., Wang, W., Kashanchi, F. y Shiekhattar, R. (2000). BRCA1 Is Associated with a Human SWI/SNF-Related Complex: Linking Chromatin Remodeling to Breast Cancer. *Cell*. 102: 257-265.

Bork, P., Blomberg, N. y Nilges, M. (1996). Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nature Genetics*. 13: 22-23.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. y Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 68: 394-424.

BRCA Exchange. Consultado: 8 de diciembre del 2020. Disponible en: <https://brcaexchange.org/>

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T. y Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*. 377: 552-557.

Calderón del Valle, S. A. & Gallón, V.L.J. (2012). Cáncer de mama asociado a mutaciones genéticas de los BRCA 1 y 2. *Revista CES Medicina*. 26 (2): 185-199.

Calderón-Garcidueñas, A. L., Ruiz-Flores, P., Cerda-Flores, R. M. y Barrera-Saldaña H. A. (2005). Clinical follow up of Mexican women with early onset of breast cancer and mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Salud Pública de México*. 47 (2): 110-115.

Campos, B., Diez, O., Odefrey, F., Domenech, M., Moncoutier, V., Martínez-Ferrandis, J. I., Osorio, A. *et al.* (2003). Haplotype Analysis of the BRCA2 9254delATCAT Recurrent Mutation in Breast/Ovarian Cancer Families from Spain. *Human Mutation*. 21 (452): 1-6.

Cárdenas, S. J., Valle, S. A. A. E., Arce, S. C., Bargalló, R. J. E., Bautista, P. V., Cervantes, S. G., Flores, B. C. H., Lluch, H. A., Maffuz, A. A., Pérez, S. V. M., Poitevin, C. A., Salas, G. E., Torrecillas, T. L. y Valero, C. V. (2019). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Octava revisión. Colima 2019. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 18: 141-231.

Carr, A. M. (2000). Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science*. 287: 1765-1766.

Cascales, A. M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 69: 36-64.

Chapman, M. S. & Verma, I. M. (1996). Transcriptional activation by BRCA1. *Nature*. 382: 678-679.

Chen, A., Kleiman, F. E., Manley, J. L., Ouchi, T. y Pan, Z. Q. (2002). Autoubiquitination of the BRCA1-BARD1 RING Ubiquitin Ligase. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (24): 22085–22092.

Chen, C. F., Chen, P. L., Zhong, Q., Sharp, Z. D. y Lee, W. H. (1999). Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G2/M checkpoint control. *Journal of Biological Chemistry*. 274 (46): 32931-32935.

Chen, J., Silven, D. P., Walpita, D., Cantor, S. B., Gazdar, A. F., Tomlinson, G., Couch, F. J., Weber, B. L., Ashley, T., Livingston, D. M. y Scully, R. (1998a). Stable Interaction between the Products of the BRCA1 and BRCA2 Tumor Suppressor Genes in Mitotic and Meiotic Cells. *Molecular Cell*. 2: 317-328.

Chen, P. L., Chen, C. F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, Z. D. y Lee, W. H. (1998b). The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 95: 5287–5292.

Chen, Y., Farmer, A. A., Chen, C. F., Jones, D. C., Chen, P. L. y Lee, W. H. (1996). BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Research*. 56: 3168-3172.

Chiba, N. & Parvin, J. D. (2002). The BRCA1 and BARD1 Association with the RNA Polymerase II Holoenzyme. *Cancer Research*. 62: 422-4228.

Chirivella, G. I. & Garcés, H. V., (2018). Cáncer de mama hereditario más allá de BRCA1/BRAC2. *Genética Medica y Genómica*. 2 (2): 67-77.

Clark, S. L., Rodríguez, A. M., Snyder, R. R., Hankins, G. D. V. y Boehning, D. (2012). Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1. *Computational and Structural Biotechnology Journal*: 1-8.

ClinVar. NCBI. Consultado: 8 de diciembre del 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. y Elledge, S. J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*. 286: 1162-1166.

Davies, A. A., Masson, J. Y., McIlwraith, M. J., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A. R. y West, S. C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Molecular Cell*. 7: 273-282.

Deng, C. X. & Brodie, S. G. (2000). Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *BioEssays*. 22: 728-737.

Deng, C. X. & Scott, F. (2000). Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene*. 19: 1059-1064.

Deng, C. X. (2006). BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Research*. 34 (5). 1416-1426.

Eakin, C. M., MacCoss, M. J., Finney G. L. y Klevit, R. E. (2007). Estrogen receptor α is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (14): 5794-5799.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35 (4): 495-516.

Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M. y West, S. C. (2005). CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*. 434: 598-604.

Fan, S., Wang, J. A., Yuan, R., Ma, Y., Meng, Q., Erdos, M. R., Pestell, R. G., Yuan, F., Auborn, K. J., Goldberg, I. D., Rosen, E. M. (1999). BRCA1 Inhibition of Estrogen Receptor Signaling in Transfected Cells. *Science*. 284: 1354-1356.

Fan, S., Xian, M. Y., Wang, C., Yuan, R. Q., Meng, Q., Wang, J. A., Erdos, M., Goldberg, I. D., Webb, P., Kushner, P. J., Pestell R. G. y Rosen, E. M. (2001). Role of direct interaction in BRCA1 inhibition of estrogen receptor activity. *Oncogene*. 20: 77-87.

Fernández-Lopez, J. C., Romero-Córdoba, S., Rebollar-Vega, R., Alfaro-Ruiz, L. A., Jiménez-Morales, S., Beltrán-Anaya, F. *et al.*, (2019). Population and breast cancer patients' analysis reveals the diversity of genomic variation of the BRCA genes in the Mexican population. *Human Genomics*. 13 (3): 1-9.

Gallardo-Rincón, D., Álvarez-Gómez, R. M., Montes-Servín, E., Toledo-Leyva, A., Montes-Servín, E., Michel-Tello, D., Alamilla-García, G. *et al.*, (2020). Clinical Evaluation of BRCA1/2 Mutation in Mexican Ovarian Cancer Patients. *Translational Oncology*. 13 (3): 212-220.

Gatei, M., Zhou, B. B., Hobson, K., Scott, S., Young, D. y Khanna, K. K. (2001). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (20): 17276-17280.

GLOBOCAN. (2018). Observatorio Global del Cáncer. Consultado: 2 de Noviembre del 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>.

Gobierno de México. (2020). Toma conciencia sobre el cáncer de mama. Consultado: 6 de noviembre del 2020. Disponible en: <https://www.gob.mx/issste/articulos/toma-conciencia-sobre-el-cancer-de-mama?idiom=es>.

Gowen, L. C., Johnson, B. L., Latour, A. M., Sulik, K. K., y Koller, B. H. (1996). BRCA1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nature Genetics*. 12: 191-194.

Gudas, J. M., Nguyen, H., Li, T. y Cowan, K. H. (1995). Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells. *Cancer Research*. 55: 4561-4565.

Haber, J. E. (1998). The Many Interfaces of Mre11. *Cell*. 95: 583-586.

Hakem, R., de la Pomba, J. L., Sirard, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A. *et al.*, (1996). The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell*. 85: 1009–1023.

Hansen, T. V. O., Jonson, L., Nielsen, F. C., Albrechtsen, A., Andersen, M. K. y Ejlersen B. (2009). Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Research and Treatment*. 115: 315-323.

Harkin, D. P., Bean, J. M., Miklos, D., Song, Y. H., Truong, V. B., Englert, C., Christians, F. C., Ellisen, L. W., Maheswaran, S., Oliner, J. D. y Haber, D. A. (1999). Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*. 97: 575-586.

Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H. y Ohta, T. (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (18): 14537-14540.

Hollis, R. L., Churchman, M. y Gourley, C. (2017). Distinct implications of different BRCA mutations: efficacy of cytotoxic chemotherapy, PARP inhibition and clinical outcome in ovarian cancer. *OncoTargets and Therapy*: 10: 2539-2551.

Hsu, L. C., Doan, T. P. y White, R. L. (2001). Identification of a γ -Tubulin-binding Domain in BRCA1. *Cancer Research*. 61: 7713-7718.

Hsu, L. C. & White, R. L. (1998). BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 12983–12988.

Huerta, S., Goulet, E. J., Huerta-Yepez, S. y Livingston, E. H. (2007). Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research*. 139: 143-156.

INFOCÁNCER. (2019). Cáncer de Mama. Consultado: 3 de Noviembre del 2020. Disponible en: <https://www.infocancer.org.mx/?t=cancer-de-mama>.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2020). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre). Consultado: 6 de noviembre del 2020. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2020/Cancermama20.pdf>

Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). (2020). Cáncer de mama, una prioridad para la salud de las mexicanas. Consultado: 5 de noviembre del 2020. Disponible en: <https://www.insp.mx/avisos/5090-octubre-cancer-mama-19.html>.

Instituto Nacional del Cáncer. (2018). Mutaciones en BRCA: Riesgo de cáncer y pruebas genéticas. Consultado: 9 de noviembre del 2020. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica/hoja-informativa-brca>

Instituto Nacional del Cáncer. (2020). Cáncer de seno (mama). Consultado: 9 de noviembre del 2020. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/pro/tratamiento-seno-pdq>

Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica*. 22(6): 100-106.

Karakasis, K., Burnier, J. V., Bowering, V., Oza A. M. y Lheureux, S. (2016). Ovarian Cancer and BRCA1/2 Testing: Opportunities to improve Clinical Care and Disease Prevention. *Frontiers in Oncology*. 6 (119): 1-10.

Karimian, A., Ahmadi, Y. y Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*. 42: 63-71.

Kitagishi, Y., Kobayashi, M. y Matsuda, S. (2013). Defective DNA repair systems and the development of breast and prostate cancer (Review). *International Journal of Oncology*. 42: 29-34.

Koonin, E. V., Altschul, S. F. y Bork, P. (1996). Functional Motifs. *Nature Genetics*. 13: 266-268.

Larson, J. S., Tonkinson, J. L. y Lai, M. T. (1997). A BRCA1 mutant alters G2–M cell cycle control in human mammary epithelial cells. *Cancer Research*. 57, 3351–3355.

Li, S., Chen, P. L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C. K., Sharp, Z. D. y Lee, W. H. (1999). Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage. *Journal of Biological Chemistry*. 274 (16): 11334-11338.

Li, S., Ting, N. S. Y., Zheng, L., Chen, P. L., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lee, E. Y. H. y Lee, W. H. (2000). Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature*. 406: 210-215.

Liu, Y. & West, S. C. (2002). Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair. *Breast Cancer Research*. 4: 9-13.

Ludwig, T., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E. y Efstratiadis, A. (1997). Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of Brca1, Brca2, Brca1/Brca2, Brca1/p53, and Brca2/p53 nullizygous embryos. *Genes and Development*. 11: 1226–1241.

MacLachlan, T. K., Takimoto, R. y El-Deiry, W. S. (2002). BRCA1 dirige una respuesta transcripcional selectiva dependiente de p53 hacia objetivos de detención del crecimiento y reparación del ADN. *Molecular and Cellular Biology*. 22 (12): 4280-4292.

Mallery, D. L., Vandenberg, C. J. y Hiom, K. (2002). Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *European Molecular Biology Organization Journal*. 21 (24):6755–6762.

Marquis, S. T., Rajan, J. V., Wynshaw-Boris, A., Xu, J., Yin, G-Y., Abel, K. J., Weber, B. L. y Chodosh, L. A. (1995). The developmental pattern of BRCA1 expression implies a role in the differentiation of the breast and other tissues. *Nature Genetics*. 11: 17-26.

Marston, N. J., Richards, W. J., Hughes, D., Bertwistle, D., Marshall, C. J. y Ashworth, A. (1999). Interaction between the Product of the Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA2 and DSS1, a Protein Functionally Conserved from Yeast to Mammals. *Molecular and Cellular Biology*. 19 (7): 4633-4642.

Martínez, S. M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana Biotecnología*. 11(2): 152-166.

Maser, R. S., Monsen, K. J., Nelms, B. E. y Petrini J. H. J. (1997). hMre11 and hRad50 Nuclear Foci Are Induced during the Normal Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology*. 17(10): 6087-6096.

Millan, C. O., Campos-Parra, A. D., Vázquez-Romo, R., Cantú de León, D., Jacobo-Herrera, N., Morales-González, F., López-Camarillo, C., Rodríguez-Dorantes, M., López-Urrutia, E. y Pérez-Plasencia, C. (2019). A Multi-Center Study of BRCA1 and BRCA2 Germline Mutations in Mexican-Mestizo Breast Cancer Families Reveals Mutations Unreported in Latin American Population. *Cancers*. 11: 1-9.

Milner, J., Ponder, B., Hughes-Davies, L., Seltmann, M. y Kouzarides, T. (1997). Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature*. 386: 772-773.

Mizuta, R., LaSalle, J. M., Cheng, H.-L., Shinohara, A., Ogawa, H., Copeland, N., Jenkins, N. A., Lalande, M. y Alt, F. W. (1997). RAB22 and RAB163/mouse BRCA2: proteins that interact specifically with the RAD51 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 6927–6932.

Monteiro, A. N. A, August, A. y Hanafusa, H. (1996). Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 13595-13599.

Moynahan, M. E., Chiu, J. W., Koller, B. H. y Jasin, M. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Molecular Cell*. 4: 511-518.

Moynahan, M. E., Pierce, A. J., y Jasin, M. (2001). BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Molecular Cell*. 7: 263–272.

National Institutes of Health (NIH). (2017). Cáncer de mama hereditario. Consultado: 9 de noviembre del 2020. Disponible en: <https://rarediseases.info.nih.gov/espanol/13358/cancer-de-mama-hereditario>

Narod, S. A. & Foulkes, W. D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews*. 4: 665-676.

Nishikawa, H., Ooka, S., Sato, K., Arima, K., Okamoto, J., Klevit R.E., Fukuda, M. y Ohta. T. (2004). Mass Spectrometric and Mutational Analyses Reveal Lys-6-linked Polyubiquitin Chains Catalyzed by BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (6): 3916–3924.

Organización mundial de la Salud (OMS). (2020). Cáncer de mama: prevención y control. Consultado: 5 de noviembre del 2020. Disponible en: <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index2.html>

Organización Panamericana de Salud (OPS). (2020a). Perfiles de país sobre cáncer, 2020. Consultado: 2 de noviembre del 2020. Disponible es: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es

Organización Panamericana de Salud (OPS). (2020b). Cáncer de mama. Consultado: 2 de noviembre del 2020. Disponible es: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5041:2011-breast-cancer&Itemid=3639&lang=es

Ossa, C. A. & Torres, D., (2016). Founder and Recurrent Mutations in BRCA1 and BRCA2 Genes in Latin American Countries: State of the Art and Literature Review. *The Oncologist*. 21: 832-839.

Ouchi, T., Monteiro, A. N. A., August, A., Aaronson, S. A. y Hanafusa, H. (1998). BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (2): 2302–2306.

Patel, K. J., Yu, V. P. C. C., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F. C., Evans, M. J., Colledge, W. H., Friedman, L. S., Ponder, B. A.J. y Venkitaraman, A. R. (1998). Involvement of BRCA2 in DNA repair. *Molecular Cell*. 1: 347-357.

Paull, T. T., Cortez, D., Bowers, B., Elledge, S. J. y Gellert, M. (2001). Direct DNA binding by Brca1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (11): 6086-6091.

Pitolli, C., Wang, Y., Candi, E., Shi, Y., Melino, G. y Amelio, I. (2019). p53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms. *Cancers*. 11 (1983): 1-14.

Quezada, U. R., Díaz, V. C. E, Gitler, R., Rojo, C. M. P., Sirota, T. M., Figueroa, M. A., Moreno, G. O. *et al.*, (2018). Comprehensive Analysis of Germline Variants in Mexican Patients with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Susceptibility. *Cancers*. 10 (361). 1-19.

Rajan, J. V., Wang, M., Marquis, S. T. y Chodosh, L. A. (1996). Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 13078–13083.

Rajan, J. V., Marquis, S. T., Gardner, H. P. y Chodosh, L. A. (1997). Developmental Expression of *Brca2* Colocalizes with *Brca1* and Is Associated with Proliferation and Differentiation in Multiple Tissues. *Developmental Biology*. 184: 385–401.

Roy, R., Chun, J. y Powell, S. N. (2016). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*. 12: 1-26.

Ruffner, H., Joazeiro, C. A. P., Hemmati, D., Hunter, T. y Verma, I. M. (2001). Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (9): 5134-5139.

Ruffner, H. & Verma, I. M. (1997). BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 7138–7143.

Ruiz-Flores, P., Sinilnikova, O. M., Badzioch, M., Calderon-Garcidueñas, A. L., Chopin, S., Fabrice, O., González-Guerrero, J. F. *et al.* (2002). BRCA1 and BRCA2 Mutation Analysis of Early-Onset and Familial Breast Cancer Cases in Mexico. *Human Mutation*. 47 (2): 1-7.

Scully, R., Anderson, S. F., Chao, D. M., Wei, W., Ye, L., Young, R. A., Livingston, D. M. y Parvin J. D. (1997a). BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 5605–5610.

Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., y Livingston, D.M. (1997b). Dynamic changes of BRCA1 sub- nuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*. 90: 425–435.

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T. y Livingston, D. M. (1997c). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*. 88: 265-275.

Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.-S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P. y Bradley, A. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking BRCA2. *Nature*. 386: 804–810.

Shen, S. X., Weaver, Z., Xu, X., Li, C., Weinstein, M., Chen, L., Guan, X. Y., Ried, T. y Deng, C. X. (1998). A targeted disruption of the murine Brca1 gene causes γ -irradiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene*. 17: 3115–3124.

Smith, T.M., Lee, M.K., Szabo, C.I., Jerome, N., McEuen, M., Taylor, M., Hood, L. y King, M.C. (1996). Complete Genomic Sequence and Analysis of 117 kb of Human DNA Containing the Gene BRCA1. *Genome Research*. 6: 1029-1049.

Solano, A. R., Liria, N. C., Jalil, F. S. Faggionato, D. M., Mele, P. G., Mampel, A., Cardoso, F. C. y Podesta, E. J. (2018). BRCA1 and BRCA2 Mutations Other Than the Founder Alleles Among Ashkenazi Jewish in the Population of Argentina. *Frontiers in Oncology*. 8 (323): 1-7.

Somasundaram, K., Zhang, H., Zeng, Y. X., Houvras, Y., Peng, Y, Zhang, H, Wu, G. S., Licht, J. D., Weber, B. L. y El-Deiry W. S. (1997). Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21^{WAF1/CIP1}. *Nature*. 389 : 187–190.

Spain, B. H., Larson, C. J., Shihabuddin, L. S., Gage, F. H. y Verma, I. M. (1999). Truncated BRCA2 is cytoplasmic: Implications for cancer-linked mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (24): 13920-13925.

Starita, L. M., Machida, Y., Sankaran, S., Elias, J. E., Griffin, K., Schlegel, B. P., Gygi, S. P. y Parvin, J. D. (2004). BRCA1-Dependent Ubiquitination of γ -Tubulin Regulates Centrosome Number. *Molecular and Cellular Biology*. 24 (19): 8457–8466.

Suba, Z. (2015). DNA stabilization by the upregulation of estrogen signaling in BRCA gene mutation carriers. *Drug design, development and therapy*. 9: 2663–2675.

Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Hakem, R., Elia, A., Yoshida, R., Mo, R., Nishina, H. *et al.* (1997). Brca2 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Genes and Development*. 11: 1242–1252.

Tavtigian, S. V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S. *et al.*, (1996). The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature Genetics*. 12: 333-337.

Taylor R. C., Cullen, S. C. y Martin S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 9: 231-241.

Thorslund, T., Esashi, F. y West, S. C. (2007). Interactions between human BRCA2 protein and the meiosis-specific recombinase DMC1. *European Molecular Biology Organization*. 26: 2915–2922.

Tomlinson, G. E., Chen, T. T. L., Stastny, V. A., Virmani, A. K., Spillman, M. A., Tonk, V., Blum, J. L., Schneider, N. R., Wistuba, I. I., Shay, J. W., Minna, J. D. y Gazdar, A. F. (1998). Caracterización of a Breast Cancer Cell Line Derived from a Germ-Line BRCA1 Mutation Carrier. *Cancer Research*. 58: 3237-3242.

Torres-Mejía, G., Royer, R., Llacuachaqui, M., Akbari, M. R., Giuliano, A. R., Martínez-Matsushita, L. *et al.*, (2015). Recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexican women with breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 24 (3): 498-505.

Tutt, A., Bertwistle, D., Valentine, J., Gabriel, A., Swift, S., Ross, G., Griffin, C., Thacker, J. y Ashworth, A. (2001a). Mutation in BRCA2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *European Molecular Biology Organization*. 20 (17): 4704-4716.

Tutt, A., Gabriel, A., Bertwistle, D., Connor, F., Paterson, H., Peacock, J., Ross, G. y Ashworth, A. (1999). Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Brief Communication*. 9 (19): 1107-1110.

Tutt, A. N. J., van Oostrom, C. T. M., Ross, G. M., van Steeg, H. y Ashworth, A. (2001b). Disruption of Brca2 increases the spontaneous mutation rate in vivo: synergism with ionizing radiation. *European Molecular Biology Organización*. 3 (3): 255-260.

Vaca-Paniagua, F., Alvarez-Gomez, R. M., Fragoso-Ontiveros, V., Vidal-Millan, S., Herrera, L. A., Cantú, D., Bargallo-Rocha, E., Mohar, A., López-Camarillo, C. y Pérez-Plasencia, C. (2012). Full-Exon Pyrosequencing Screening of BRCA Germline Mutations in Mexican Women with Inherited Breast and Ovarian Cancer. *PLoS ONE*. 7 (5): e37432.

Vaughn, J. P., Cirisano, F. D., Huper, G., Berchuck, A., Futreal, P. A., Marks, J. R., and Iglehart, J. D. (1996a). Cell cycle control of BRCA2. *Cancer Research*. 56: 4590–4594.

Vaughn, J. P., Davis, P. L., Jarboe, M. D., Huper, G., Evans, A. C., Wiseman, R. W., Berchuck, A., Iglehart, J. D., Futreal, P. A., y Marks, J. R. (1996b). BRCA1 expression is induced before DNA synthesis in both normal and tumor-derived breast cells. *Cell Growth & Differentiation*. 7: 711–715.

Vasickova, P., Machackova, E., Lukesova, M., Damborsky, J., Horkey, O., Pavlu, H., Kuklova, J., Kosinova, V., Navratilova, M. y Foretova L. (2007). High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic. *BMC Medical Genetics*. 8(32): 1-10.

Venkitaraman, A. R. (2001). Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *Journal of Cell Science*. 114: 3591-3596.

Villareal-Garza, C., Alvarez-Gómez, R. M., Pérez-Plasencia, C., Herrera, L. A., Herzog, J., Castillo, D., Mohar, A., Castro, C. *et al.*, (2015a). Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. *Cancer*. 121 (3): 372-378.

Villareal-Garza, C., Weitzel, J.N., Llacuachaqui, M., Sifuentes, E., Magallanes-Hoyos, M.C., Gallardo, L., Alvarez-Gómez, R.M. *et al.*, (2015b). The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among young Mexican women with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 150 (2): 1-11.

Wang, H., Shao, N., Ding, Q. M., Cui, J., Reddy, E. S. P. y Rao, V. N. (1997). BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene*. 15: 143-157.

Wang, L., & Di, L. J. (2014). BRCA1 And Estrogen/Estrogen Receptor In Breast Cancer: Where They Interact?. *International Journal of Biological Sciences*. 10: 566-575.

Wang, S. C., Shao, R., Pao, A.Y., Zhang, S., Hung, M.C. y Su, L.K. (2002). Inhibition of Cancer Cell Growth by BRCA2. *Cancer Research*. 62: 1311-1314.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J. y Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes and Development*. 14: 927-939.

Wong, A. K. C., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V. y Bartel, P. L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Journal of Biological Chemistry*. 272(51): 31941-31944.

Wong, E. (2008). Introduction to Neoplasia. McMaster Pathophysiology Review. Revisado: 24 de noviembre del 2020. Disponible en: <http://www.pathophys.org/introneoplasia/>

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, M., Collins, N. *et al.*, (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 378: 789-792.

Wu, L. C., Wang, Z. W., Tsan, J. T., Spillman, M. A., Phung, A., Xu, X. L., Yang, M. C. W., Hwang, L. Y., Bowcock, A. M. y Baer, R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature Genetics*. 14: 430-440.

Xian, M. Y., Tomita, Y., Fan, S., Wu, K., Tong, Y., Zhao, Z., Song, L.-N., Goldberg, I. D., y Rosen E. M. (2005). Structural determinants of the BRCA1: estrogen receptor interaction. *Oncogene*. 24: 1831-1846.

Xu, X., Qiao, W., Linke, S. P., Cao, L., Li, W. M., Furth, P. A. y Harris, C. C. (2001). Genetic interactions between tumor suppressors Brca1 and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nature Genetics*. 28: 266-271.

Xu, X., Wagner, K. U., Larson, D., Weaver, Z., Li, C., Ried, T., Hennighausen, L., Wynshaw-Boris, A. y Deng, C. X. (1999a). Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nature Genetics*. 22: 37-43.

Xu, X., Weaver, Z., Linke, S. P., Li, C., Gotay, J., Wang, X. W., Harris, C. C., Ried, T. y Deng, C. X. (1999b). Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Molecular Cell*. 3: 389-395.

Yang, H., Jeffrey, P. D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N.H., Zheng, N., Chen, P.-L., Lee, W.-H. y Pavletich, N.K. (2002). BRCA2 Function in DNA Binding and Recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA Structure. *Science*. 297: 1837-1848.

Yarden, R. I. & Brody, L. C. (1999). BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 4983-4988.

Yu, V. P. C. C., Koehler, M., Steinlein, C., Schmid, M., Hanakahi, L., van Gool, A., West, S. C. y Venkitaraman, A. R. (2000). Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes & Development*. 14: 1400-1406.

Zayas-Villanueva, O. A., Campos-Acevedo, L. D., Lugo-Trampe, J. J., Hernández-Barajas, D., González-Guerrero, J. F., Noriega-Iriondo, M. F., Ramírez-Sánchez, I. A. y Martínez-de-Villarreal, L. E. (2019). Analysis of the pathogenic variants of BRCA1 and BRCA2 using next-generation sequencing in women with familial breast cancer: a case-control study. *BMC cancer*. 19 (722): 1-8.

Zheng, L., Annab, L. A., Afshari, C. A., Lee, W.-H. y Boyer, T.G. (2001). BRCA1 mediates ligand-independent transcriptional repression of the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (17): 9587-9592.

Zhong, Q., Chen, C. F., Li, S., Chen, Y., Wang, C. C., Xiao, J., Chen, P. L., Sharp, Z. D. y Lee, W. H. (1999). Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science*. 285: 747-750.

13. APÉNDICE

Tabla 1: Características de las 23 pacientes seleccionadas que fueron secuenciadas y las 3 mujeres incluidas como controles. Se muestran datos de las 26 mujeres secuenciadas: diagnóstico de tipo de cáncer que presentan, edad de diagnóstico, inmunohistoquímica e historia familiar. Las tres muestras control, ninguna presenta diagnóstico de cáncer de mama, sin embargo, el control 1 presenta hiperplasia ductal de mama, control 2 presenta cáncer de ovario y ambas presentan antecedentes heredofamiliares de cáncer de mama y ovario respectivamente. El tercer control no cuenta con ningún tipo de cáncer ni antecedentes familiares.

Paciente	Diagnóstico	Edad	Inmunohistoquímica	Historia Familiar
SH1	Cáncer de mama	46 años	Triple negativo	-Mamá con cáncer de mama + -Dos hermanas con cáncer de mama -Tía materna cáncer de ovario + -Abuela materna cáncer de ovario -Prima materna cáncer de mama -Tía y tío materno cáncer de piel
SH2	Cáncer de mama	46 años	-	-Mamá con cáncer de mama + -Dos hermanas con cáncer de mama -Tía materna cáncer de ovario + -Abuela materna cáncer de ovario -Prima materna cáncer de mama -Tía y tío materno cáncer de piel
SH3	Cáncer de mama bilateral	53 y 69 años	Triple negativo HER2/neu	-Mamá con cáncer de mama + -Dos hermanas con cáncer de mama -Tía materna cáncer de ovario + -Abuela materna cáncer de ovario -Prima materna cáncer de mama -Tía y tío materno cáncer de piel
SH4	Cáncer de mama	29 años	Triple negativo	-Mamá con cáncer de mama -Abuelo materno con cáncer de próstata -Tío paterno con cáncer de piel -Tía materna con cáncer de mama -Hermana con cáncer no especificado
SH5	Cáncer de mama	33 años	Triple negativo	-Tía materna con cáncer de ovario + -Prima materna con cáncer de mama -Tía materna con cáncer de mama -Dos primas maternas con cáncer de ovario +
SH6	Cáncer de mama bilateral	24 y 25 años	Triple negativo	-Abuela materna con cáncer de mama
SH7	Cáncer de mama	38 años	Luminal A	-Abuela materna cáncer de mama + -Abuelo materno con cáncer de pulmón + -3 tías y 2 tíos abuelos maternos cáncer de pulmón + -2 tías maternas cáncer de pulmón + -Prima materna cáncer cervicouterino + -Hermana materna cáncer de mama, con mutación en BRCA2 (c.1813dupA) -Tía paterna cáncer gástrico +
SH8	Cáncer de mama	34 años	Triple negativo	-Hermana cáncer de mama +

SH9	Cáncer de mama	30 años	Luminal A	-2 tías maternas con cáncer de mama -Abuela paterna con cáncer de mama + -Mamá con cáncer cervicouterino +
SH10	Cáncer de mama	36 años	Triple negativo	-2 tías paternas con cáncer de mama -Prima paterna con cáncer de mama -Tía paterna con cáncer de ovario -Abuela materna con cáncer de colon -Tía paterna con cáncer de piel -Prima con cáncer de mama + -Tío paterno cáncer de próstata
SH11	Cáncer de mama Tumor en ovario	37 años	Triple negativo	-Se desconoce
SH12	Cáncer de mama Cáncer de ovario	49 y 45 años	-	-Sin antecedentes heredo familiares
SH13	Cáncer de mama Leucemia	24 años	Luminal B	-Mamá con cáncer de mama -Tía materna con cáncer de mama + -Primo materno con cáncer de colon
SH14	Cáncer de mama	30 años	Luminal A	-Tío materno con cáncer de colon + -Abuela materna con cáncer de endometrio + -Tío materno con leucemia +
SH15	Cáncer de mama	43 años	Luminal B	-Mamá con cáncer de mama + -Abuela materna cáncer de colon
SH16	Cáncer de mama Carcinomatosis meíngea	36 años	Luminal A	-Mamá con cáncer de mama -Prima materna con cáncer de mama bilateral
SH17	Cáncer de mama	35 años	Luminal A	-Prima paterna con cáncer de mama bilateral -Tío paterno con cáncer de esófago + -Abuelo paterno con cáncer de próstata +
SH18	Cáncer de mama	33 años	Triple negativo	-Mamá con cáncer de mama -Media hermana con cáncer de mama, fallecida a los 36 años -Tía materna cáncer de endometrio
SH19	Cáncer de mama	31 años	HER2 +	-Sin antecedentes heredo familiares
SH20	Cáncer de mama Cáncer de ovario	40 años	Luminal A	-Sin antecedentes heredo familiares
SH21	Cáncer de mama	39 años	Triple negativo	-Hermana con cáncer de mama
SH22	Cáncer de mama	49 años	Luminal A	-Mamá con cáncer de mama
SH23	Cáncer de mama	30 años	Triple negativo	-Sin antecedentes heredo familiares
Control 1 SH24	Hiperplasia ductal usual de mama	43 años	NA	-Mamá con cáncer de mama -Abuela con cáncer de mama
Control 2 SH25	Carcinoma seroso de alto grado	40 años	NA	-Abuela paterna cáncer de ovario +
Control 3 SH26	No presenta	40 años	NA	No presenta

+ : Fallecidos

➤ **MEDIOS DE CULTIVO**

D-MEM

- Medio D-MEM (GIBCO)
- Insulina.....1.38 ml
- Hidrocortisona.....1 ml
- HEPES.....10 ml
- Antibiótico penicilina/estreptomicina (Gipco).....10 ml
- SFB.....50 ml

El medio, insulina, hidrocortisona, HEPES y antibiótico fueron disueltos en 850 ml de agua bidestilada. Posteriormente se suplementó con SFB (5%) y se ajustó a un pH entre 7.2-7.3 para finalmente aforar a 1 Lt.

El medio fue esterilizado por medio de filtrado a vacío a través de una membrana de poro de 22 µm. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

HAM's F-12

- Medio HAM's (Gibco)
- Insulina.....1.38 gr
- Hidrocortisona.....1 ml
- HEPES.....10 ml
- Antibiótico penicilina/estreptomicina (Gipco).....10 ml
- SFB inactivado50 ml

El medio, insulina, hidrocortisona, HEPES y antibiótico fueron disueltos en 850 ml de agua bidestilada. Posteriormente se suplementó con SFB (5%) y se ajustó a un pH entre 7.2-7.3 para finalmente aforar a 1 Lt.

El medio fue esterilizado por medio de filtrado a vacío a través de una membrana de poro de 22 µm. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

RPMI 1640

- Medio RPMI (Gibco)
- HEPES.....10 ml
- Piruvato de Sodio.....10 ml
- Glucosa.....2.5 gr
- Bicarbonato de sodio.....2 gr
- Antibiótico penicilina/estreptomicina (Gipco).....10 ml
- SFB inactivado.....100ml

El medio, HEPES, piruvato de Sodio, bicarbonato de sodio, glucosa y antibiótico fueron disueltos en 850 ml de agua bidestilada. Posteriormente se suplementó con SFB (10%) y se ajustó a un pH entre 7.2-7.3 para finalmente aforar a 1 Lt.

El medio fue esterilizado por medio de filtrado a vacío a través de una membrana de poro de 22 μm . Se almacenó a 4°C hasta su uso.

➤ **DESACTIVACIÓN DEL SUERO**

El suero se puso a descongelar primeramente, posteriormente se puso a calentar en baño maría a 36°C durante 30 min. Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

➤ **SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)**

- NaCl..... 8.06 gr
- KCl..... 0.22gr
- Na₂HPO₄..... 1.15gr
- KH₂PO₄..... 0.20gr

Las 4 sales fueron disueltas en 900 ml de agua bidestilada, posteriormente se ajustó el pH a 7.4 y finalmente se aforó a 1 Lt.

La solución fue esterilizada por medio de filtrado a vacío a través de una membrana de poro de 22 μm . Se almacenó a 4°C hasta su uso.

➤ **SOLUCIÓN DE EDTA**

- NaCl.....8 gr
- Na₂HPO₄.....1.45gr
- KCl.....0.2 gr
- KH₂PO₄..... 0.23gr
- EDTA.....0.372

Las 5 sales fueron disueltas en 900 ml de agua bidestilada, posteriormente se ajustó el pH a 7.4 y finalmente se aforó a 1 Lt.

La solución fue esterilizada por medio de filtrado a vacío a través de una membrana de poro de 22 μm . Se almacenó a 4°C hasta su uso.