



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE VARIANTES DE
SIGNIFICADO CLÍNICO INCIERTO ENCONTRADAS
POR SECUENCIACIÓN MASIVA EN LOS GENES
BRCA1 Y *BRCA2* EN MUJERES MEXICANAS CON
CÁNCER DE MAMA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ITZEL SÁNCHEZ CRUZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS G. PÉREZ PLASENCIA**

2014



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.

**A mi madre
María Argelia Cruz Jaramillo †
Por el infinito amor.**

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncogenómica del Instituto Nacional de Cancerología.

Agradezco a los miembros de mi jurado: Dra. Sara Frías Vázquez, Esp. Rosa María Álvarez Gómez, Mtro. Alfonso José Vilchis Peluyera y Lic. Viviana Escobar Sánchez por las revisiones y comentarios para esta tesis.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM. Clave:TB200111. Título: Búsqueda de marcadores moleculares (epigenéticos y de expresión) asociados a la respuesta clínica en pacientes con cáncer cervico-uterino localmente avanzado empleando herramientas de análisis genómico. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Agradezco a la Dirección General de Políticas de Investigación en Salud la beca recibida a través del Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI).

AGRADECIMIENTOS

A mi familia:

Por siempre creer en mí, porque siempre aceptaron el camino que elegí, sin juzgarme.

A mi papá, que gustoso presume el tener una hija bióloga.

A mi hermana, que me salvará de la pobreza XD y hace más ligeros mis tropiezos con sus buenos consejos.

A mi mamá, que vivió para su familia, y me da la fuerza para seguir cada día recordándome que debo ser la mejor persona que pueda.

No pude haber tenido una familia más bonita y unida como la que tuvimos, por ustedes creo que las familias felices y perfectas aún existen.

A él, que aunque físicamente no estuvo conmigo todo el tiempo que estudié la carrera, siempre lo estuvo en mi corazón, haciendo mis días tristes, llenos de sonrisas.

A Rose, por tu grandísima paciencia, por enseñarme que siempre se puede aprender de todo, por preocuparte por mí de cualquier forma posible: por las clases que me diste, las consultas gratis, y la mano que me estiraste cuando a veces ya no podía.

A Mashelita, por hacerme reír incluso en las peores situaciones y escucharme siempre que lo necesité, por las noches que pasamos viendo películas, por soportar mis niñerías, por recordarme cómo debe ser una buena persona, por ser mi amiga.

A Liz, por las mil conversaciones y las porras para terminar mi tesis, por la confianza y la amistad que hicimos cuando ya ninguna estaba en el lab jejeje.

A Arturo, por levantarme tantas veces que hasta perdí la cuenta, por las mil risas, los mil consejos, las mil aventuras.

A mis compañeritos del laboratorio, Mau, Osman, Pedro, Abraham, Vic, Perla, Gaby, Nadia, Mon, Cynthia por las noches de oncohome, los ánimos y las burlas, las boberías y risas aun cuando todos llegábamos a perdernos.

A mis amiguitos de Biología! Juan, Fersi, Mau, Mon, Rho, a Karenina aunque no es de Biología. Sin ustedes hubiera llorado todos los días jajaja, los amo.

A mi Dulcecito, por estar siempre, en las risas, los enojos y los llantos. Eres mi hermana.

...porque de alguna manera todos me han hecho crecer.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
Estructura y función de los genes y proteínas BRCA1 y BRCA2	10
BRCA1	11
Estructura tridimensional de BRCA1	13
BRCA2	14
Mutaciones en BRCA1 y 2	15
Metodología empleada en el análisis molecular de los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	18
Secuenciación Masiva	21
Plataformas	22
Roche 454	23
Metodología para evaluación de VUS	24
Análisis <i>in silico</i>	25
Análisis <i>in vitro</i>	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES	28
JUSTIFICACIÓN	29
DISEÑO EXPERIMENTAL	30
METODOLOGÍA	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Análisis <i>in silico</i>	45
Grupo esporádico vs grupo hereditario.	69
Co-ocurrencia de VUS con mutaciones claramente deletéreas.	70
Variantes encontradas en ambos grupos.	71
Roche 454 vs otras metodologías.	73
Análisis <i>in silico</i> y ensayos funcionales.	74
CONCLUSIONES	75
LITERATURA CITADA	76
ANEXO	81

ABREVIATURAS Y SIGLAS

CaMa Cáncer de mama

SCMOH Síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario

ER Receptor de estrógenos

RP Receptor de progesterona

BRCA1 Breast cancer 1

BRCA2 Breast cancer 2

NLS Señal de localización nuclear

BIC Breast Cancer Information Core

VUS Variantes de significado clínico incierto

PTT Test de proteína trunca

DHPLC Cromatografía líquida de alta eficacia en condiciones desnaturizantes

MLPA Prueba de amplificación dependiente de ligación múltiple

SSCP Conformación de polimorfismos en cadena sencilla

DGGE Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante

HRMCA Análisis de curva de fusión de alta resolución

EmPCR Reacción en cadena de la polimerasa en emulsión

SIFT Sorting Intolerant from Tolerant

PP-2 Polymorphism Phenotyping

INCan Instituto Nacional de Cancerología

UIBC Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer

MID Identificador molecular

PTP Pico Titer Plate

NR No reportado

SIN Sinónima

RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre mujeres de 30 a 54 años en México. Diversos factores se han asociado con el desarrollo de esta enfermedad, entre ellos la predisposición genética asociada principalmente a mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, en algunos casos no se conoce la repercusión biológica ni clínica de mutaciones de sentido erróneo, a éstas se les conoce como variantes de significado clínico incierto o VUS y representan alrededor del 40% de las mutaciones encontradas en los genes *BRCA*.

Hasta la fecha no existen trabajos en los que se caracterice detalladamente la región exónica de *BRCA1* y *BRCA2* en la población mexicana, por lo que se desconocen las VUS que conforman a ésta.

En este trabajo se identificaron las VUS presentes en *BRCA1* y *BRCA2* en 160 pacientes con cáncer de mama del Instituto Nacional de Cancerología mediante secuenciación masiva, y se predijo la posible repercusión de estas variantes en la función de las proteínas *BRCA1* y *BRCA2* a través de análisis *in silico*. Como resultado se obtuvieron 146 variantes diferentes, de las cuales 97 no se habían reportado previamente. Los análisis *in silico* muestran la probable patogenicidad de siete de estas, mientras que el análisis detallado mostró probabilidad de patogenicidad para siete VUS más; sin embargo, para confirmar la predicción es necesario realizar análisis funcionales.

INTRODUCCIÓN.

El cáncer de mama (CaMa) es el tipo de neoplasia más frecuente entre mujeres alrededor del mundo, con alrededor de 1.38 millones de casos nuevos diagnosticados en el 2008, lo que representa el 23% de todos los tipos de cáncer. Por otro lado, tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados, este padecimiento es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (GLOBOCAN, 2008).

En México, a partir del 2006 el CaMa se convirtió en la segunda causa de muerte en mujeres de 30 a 54 años, después de las enfermedades cardio-vasculares, y en la primera causa de muerte por cáncer en mujeres de este mismo rango de edad; desplazando al cáncer cervico-uterino al segundo lugar (Knaul, Nigenda et al. 2009)(Lazcano-Ponce et al., 2007); se estima que para el año 2020, el número de mujeres que se encuentren en edad de riesgo para presentar esta enfermedad en nuestro país será de 29.7 millones (Torres-Arreola, 2007); por lo que el número de casos anuales de CaMa aumentará a 16,531 (CONAPO, 2002).

El CaMa se considera una enfermedad multifactorial, cuya etiología está asociada a factores de riesgo como la edad, la nuliparidad, el uso de anticonceptivos basados en hormonas, menarca prematura, menopausia tardía, entre otros (Turkoz, Solak et al. 2013), a estos casos de CaMa se les conoce con el nombre de CaMa esporádico. Sin embargo, existe otro factor de riesgo al que se le atribuyen entre el 5 y el 10% de los casos de CaMa, y es conocido como predisposición genética (King, Marks et al. 2003). El riesgo genético de desarrollar CaMa está asociado a mutaciones germinales en genes supresores de tumores, divididos en tres grupos en relación al riesgo que confieren para el desarrollo de la enfermedad; estos grupos son: genes de alta susceptibilidad, *BRCA1*, *BRCA2* y *TP53*; genes de susceptibilidad intermedia, *ATM*, *PTEN*, *CDH1*, *STK1*, *NBS1*, *BRIP1/FANCD1* y *PALB2/FANCD2*, y por último, los genes considerados de baja susceptibilidad, *FANCA*, *FANCG*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* y *PMS2* (Robson and Offit 2007) (Tan, Marchio et al. 2008). El mayor riesgo a desarrollar CaMa se atribuye a mutaciones en los genes de alta susceptibilidad *BRCA1* y *2*

con hasta dos terceras partes del total de casos asociados a CaMa por predisposición genética (Carroll, Cremin et al. 2008) y conforman la entidad clínica conocida como síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario (SCMOH) (Gronwald, Byrski et al. 2008), el cual se caracteriza clínicamente por un diagnóstico temprano de CaMa de alrededor de 42-45 años (Marcus, Watson et al. 1996; Martin, Blackwood et al. 2001), y de ovario de alrededor de 54 (Fraumeni, 1969). Los tumores son de rápido crecimiento, por lo que al diagnosticarse, más del 90% de los casos de CaMa son de grado G3 y en ovario se encuentran en etapa III°/IV° según la clasificación FIGO (Lakhani 1999). Los tumores de mama suelen ser medulares o atípicamente medulares, ductales y negativos a receptores de estrógenos (ER), progesterona (PR) y a receptor de factor de crecimiento epidermal HER-2/neu, así como elevado Ki67 (van der Groep, Bouter et al. 2006); es decir, tumores triple negativos de acuerdo a la clasificación molecular del CaMa (Perou, Sorlie et al. 2000), para los cuales no existe una terapia blanco y su pronóstico clínico es pobre (Krishnamurthy, Poornima et al. 2012).

Los individuos portadores de mutaciones deletéreas en el gen *BRCA1* tienen un riesgo aumentado en un 50% a desarrollar CaMa antes de los 50 años y hasta del 80% antes de los 70; así como un riesgo aumentado en un 40% para desarrollar cáncer de ovario, mientras que el aumento de riesgo para los portadores de mutaciones deletéreas en *BRCA2* es de un 31-56% para CaMa y 62% para cáncer de ovario (Boyd, Sonoda et al. 2000).

Los criterios clínicos que se siguen para evaluar el probable diagnóstico de este síndrome son:

- 1) Cáncer de mama diagnosticado antes de los 40 años de edad.
- 2) Cáncer de mama bilateral.
- 3) Cáncer de mama medular o atípico medular
- 4) Cáncer de mama y ovario en la misma persona.
- 5) Casos de cáncer de mama u ovario en familiares de primer grado
- 6) Cáncer de mama en hombres (Swift, Reitnauer et al. 1987)

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS GENES Y PROTEÍNAS *BRCA1* Y *BRCA2*.

Las proteínas *BRCA1* y *BRCA2* participan esencialmente en los mecanismos de reparación de DNA por rompimientos de doble cadena, a través de recombinación homóloga (Narod and Foulkes 2004). En la recombinación homóloga, *BRCA1* se encarga de localizar la región dañada, mientras que *BRCA2* funciona regulando el proceso. *BRCA1* además ayuda al control del ciclo celular, ubiquitinación de proteínas y remodelación de la cromatina (Narod and Foulkes 2004). *BRCA2* también tiene función en la recombinación homóloga de la meiosis (Bertwistle and Ashworth 1998; Scully and Livingston 2000) (Figura 1).

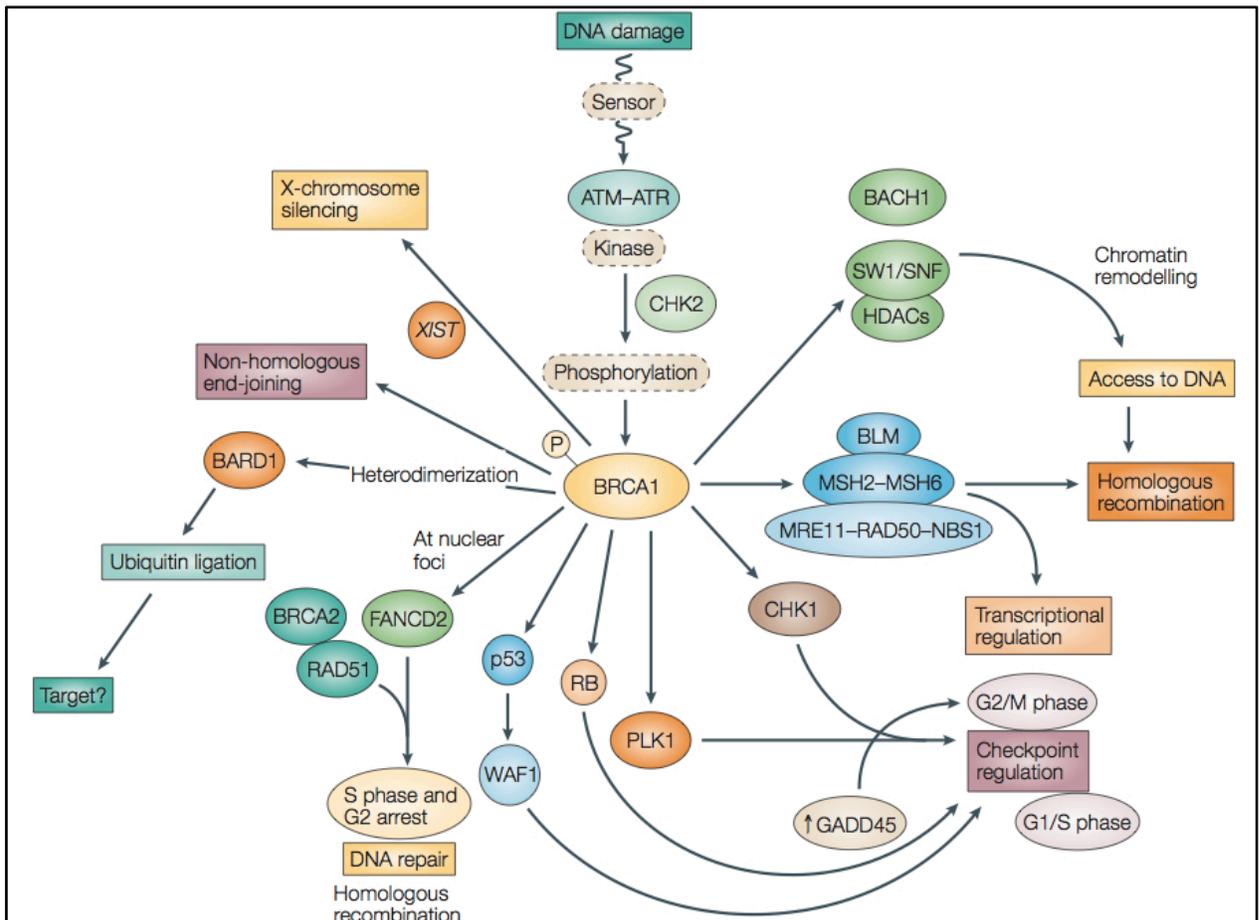


Figura 1. Funciones de las proteínas *BRCA1* y *BRCA2*. Se observan los procesos en los que se encuentran asociados así como las proteínas con las que tienen interacción (Narod and Foulkes 2004).

BRCA1

El gen *BRCA1* (por sus siglas en inglés “BReast CAncer”) se descubrió en 1990 por Mary-Claire King y colaboradores al realizar estudios en familias en las que en dos o más de sus miembros se presentaba cáncer de mama a edad temprana (Hall, Lee et al. 1990; Miki, Swensen et al. 1994). *BRCA1* es un gen de 81,189 pares de bases que está localizado en el cromosoma 17q21 (Hall, Lee et al. 1990) y está formado por 24 exones, dos de los cuales no son codificantes (exon 1 y 4) (Miki, Swensen et al. 1994).

BRCA1 se traduce en una proteína de 1,863 aminoácidos con un peso de 220 kDa (van der Groep, van der Wall et al. 2011) y la constituyen cuatro dominios funcionales: un dominio RING (Miki, Swensen et al. 1994), un dominio de unión a DNA (Miki, Swensen et al. 1994), un dominio SCD y dos repeticiones del dominio BRCT (Koonin, Altschul et al. 1996; Callebaut and Mornon 1997; Williams, Green et al. 2001). Cada uno de estos dominios permite la interacción de *BRCA1* con diferentes proteínas y es a través de estas interacciones que *BRCA1* participa en múltiples procesos (Narod and Foulkes 2004).

El dominio de dedos de zinc “RING” se localiza en el extremo amino terminal de la proteína, entre los aminoácidos 9 y 96; este dominio se ha visto involucrado en el proceso de ubiquitinación de proteínas al tener actividad de ubiquitin-ligasa E3, el cual se encarga de formar un complejo con E2 y la proteína blanco. Mediante este dominio, *BRCA1* se une a la proteína BARD1 (Wu, Wang et al. 1996), formando un heterodímero que promueve la formación de cadenas poliubiquitinadas en la lisina 6 de sus proteínas blanco (Wu-Baer, Lagrazon et al. 2003). De la misma manera, con esta región se une a BAP1 (Jensen, Proctor et al. 1998), proteína que se encarga de inhibir la actividad de ubiquitinación de dicho heterodímero (Nishikawa, Wu et al. 2009); sin embargo, a pesar de la relevancia de la ubiquitinación como mecanismo de señalización intracelular, no se ha podido determinar la importancia de este mecanismo en *BRCA1*, ya que *in vivo* no se sabe si está relacionada con la degradación de proteínas.

El dominio de unión a DNA se ubica desde el aminoácido 452 al 1079, y es importante para llevar a cabo su función en la reparación debido a que parece estar involucrado en el reconocimiento del área dañada. Con dicho dominio, BRCA1 interactúa con otras proteínas involucradas en la vía de reparación por recombinación homóloga, con las que forma un complejo denominado BASC, formado por ATM, CHK2, BLM, MSH2, MSH6, CDK2, MRE11, RAD50 y NBS1 (Wang, Cortez et al. 2000). Además de su participación en el complejo BASC, BRCA1 también se une a RAD51 y BRCA2, proteínas que están directamente involucradas en la invasión de las cadenas homólogas del DNA dañado para iniciar su reparación (Chen, Silver et al. 1998). Entre los residuos 200 y 300, BRCA1 se asocia con las proteínas p53 (Zhang, Somasundaram et al. 1998), RB (Aprelikova, Fang et al. 1999) y MYC (Wang, Zhang et al. 1998), involucradas en la progresión y detención del ciclo celular; además de ubicarse en esta zona la señal de localización nuclear (NLS), la cual permite la translocación de la proteína desde el citoplasma hacia el núcleo (Chen, Li et al. 1996).

Uno de los dominios funcionales que se descubrió debido a la alta frecuencia de mutaciones que alteran la función de BRCA1 es el dominio de grupos de serina (S) y treonina (T), conocido como SCD, ubicado entre los residuos 1280 y 1524.

Estos residuos son blanco de fosforilación para la cinasa ATM (Cortez, Wang et al. 1999), lo que al parecer provoca la acumulación de BRCA1 en la región dañada.

Finalmente, en el extremo carboxilo terminal, en la región comprendida entre los residuos 1646 y 1859, BRCA1 tiene repeticiones en tándem de dominios BRCT (Koonin, Altschul et al. 1996; Callebaut and Mornon 1997; Williams, Green et al. 2001). Estos dominios se encuentran en muchas proteínas de respuesta a daño a DNA y normalmente determinan interacciones con proteínas fosforiladas, ya que tienen motivos específicos de unión a fosfo-serina y fosfo-treonina, importantes para estas respuestas (Rodriguez, Yu et al. 2003); además en ellos se da la unión con la RNA polimerasa II (Scully, Anderson et al. 1997; Krum, Miranda et al. 2003), p300 (Pao, Janknecht et al. 2000), BACH1 (Cantor, Bell et al. 2001; Botuyan, Nomine et al. 2004), HDACs1 y 2, RB (Yarden and Brody 1999), BRCA2 y RAD51 (Chen, Silver et al. 1999) (Figura 2)

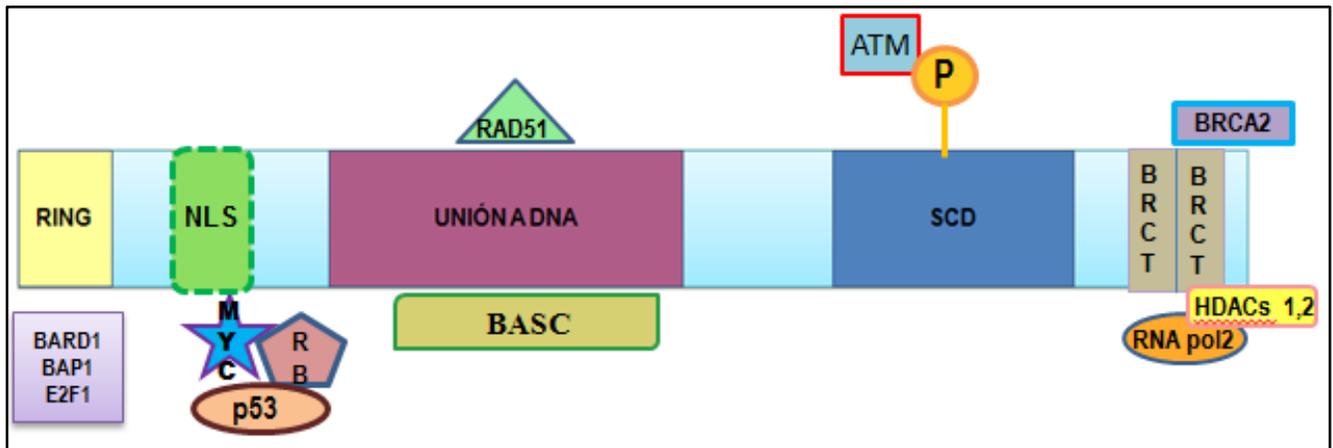


Figura 2. Representación de la estructura de la proteína BRCA1. Se muestran sus dominios funcionales y las proteínas con las que interactúa.

NLS: Señal de localización nuclear. SCD: Cluster de Serina-Treonina.

Debido a sus interacciones, BRCA1 parece tener función en la remodelación de la cromatina al encontrarse unida a proteínas como HDAC1 y 2 (Yarden and Brody 1999), p300 y el complejo SW1/SNF (Narod and Foulkes 2004), involucrados en el proceso de acetilación/desacetilación de histonas, marcaje que produce la apertura de la cromatina

ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE BRCA1

Aunque hasta el momento no ha sido posible determinar la estructura tridimensional de esta proteína completa, la resolución de la estructura de algunos de sus dominios de forma aislada representa un avance importante para el entendimiento de las funciones de esta proteína.

La conformación del dominio BRCT se caracteriza por la presencia de 4 regiones con estructura de hoja plegada β en el centro de tres α -hélices (Figura 3). Esta misma conformación se conserva para ambos dominios al ser cristalizados ya sea como péptidos independientes o formado parte de la misma proteína

(Williams, Green et al. 2001).

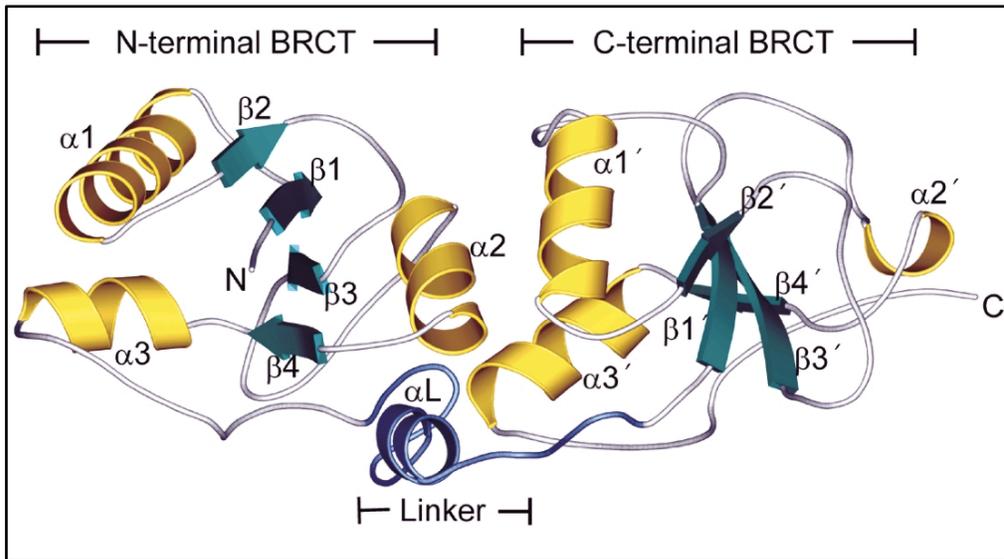


Figura 3. Conformación del dominio BRCT de BRCA1 (Tomada de Williams, Green et al. 2001).

BRCA2.

El gen *BRCA2* se descubrió en 1994 por Wooster y cols., se localiza en el cromosoma 13q12 (Wooster, Neuhausen et al. 1994), cuenta con 27 exones de los cuales el 10 y 11 son los más largos, su promotor está formado por 43 islas CpG (van der Groep, van der Wall et al. 2011). Es una proteína nuclear compuesta por 3418 aminoácidos, tiene 8 copias de repeticiones BRC localizadas en la región central de la proteína (Bork, Blomberg et al. 1996) de la siguiente forma: BRC1 aa 1002-1035, BRC2 aa 1212-1245, BRC3 aa 1421-1454, BRC4 aa 1517-1550, BRC5 aa 1664-1696, BRC6 aa 1837-1870, BRC7 aa 1972-2004, BRC8 aa 2051-2085 (Figura 4).

Este dominio es de importancia para el reconocimiento de la proteína RAD51 (Mizuta, LaSalle et al. 1997; Davies, Masson et al. 2001), la cual se une en su forma monomérica a BRCA2, manteniendo a RAD51 en su estado inactivo (Davies, Masson et al. 2001). Al ocurrir un rompimiento de doble cadena en el DNA, BRCA2 se colocaliza junto con RAD51 en la región dañada (Davies, Masson

et al. 2001). Algunos estudios sugieren que el reconocimiento de BRCA2 al DNA dañado permite que las proteínas de unión a DNA de cadena sencilla RPA se separen del DNA y esto conduzca a la interacción de RAD51 con el ácido nucleico y su subsecuente reparación.

BRCA2 también cuenta con un dominio de unión a DNA, conformado por el sitio α -helicoidal H localizado entre los aminoácidos 2479 al 2667, dos sitios OB que van del aminoácido 2670 al 2791 y 3073 al 3167 respectivamente, y uno TOB desde el 2814 al 3054; estos sitios facilitan la unión de BRCA2 a DNA tanto de cadena sencilla (aa 3086,3087,3088,3128,3139,3141 y 3142) como de cadena doble. Por último, en la región carboxilo terminal existe una señal de localización nuclear NLS que permite su incorporación al núcleo (Roy, Chun et al. 2012) (Figura 4).

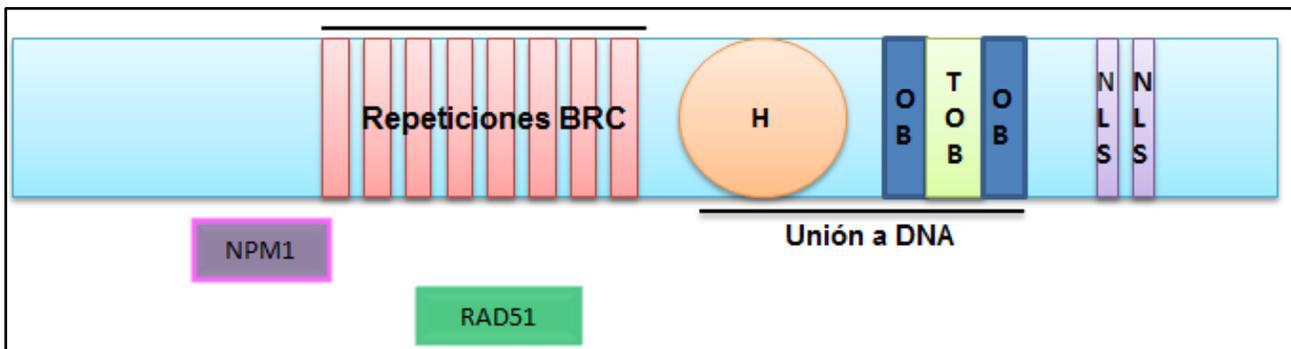


Figura 4. Representación esquemática de la proteína BRCA2.

Se muestran sus dominios funcionales y las proteínas con las que tiene interacción.

NLS:Señal de localización nuclear.

MUTACIONES EN *BRCA1* y 2.

La frecuencia con la que se encuentra determinada mutación en una población, puede cambiar dependiendo de qué población que se estudie, son de interés aquellas que se encuentran aisladas genéticamente como es el caso de los judíos Ashkenazi, en donde se estima que alrededor del 2% de la población tiene alguna de estas mutaciones: *BRCA1* 185delAG, *BRCA1* 5382insC, *BRCA2* 6174delT (Johannsson, Ostermeyer et al. 1996), éstas fueron las primeras mutaciones

fundadoras encontradas en los genes *BRCA1* Y *BRCA2* (Simard, Tonin et al. 1994; Johannsson, Ostermeyer et al. 1996).

Desde su descubrimiento, las mutaciones en estos genes han sido objeto de estudio en cientos de publicaciones (Figura 5) ya que hasta la fecha se siguen encontrando mutaciones no reportadas en cada trabajo divulgado. Estas mutaciones se encuentran distribuidas a lo largo de todo el gen, lo que sugiere que tanto *BRCA1* como *BRCA2* carecen de puntos calientes de recombinación (Ozcelik, Antebi et al. 1996).

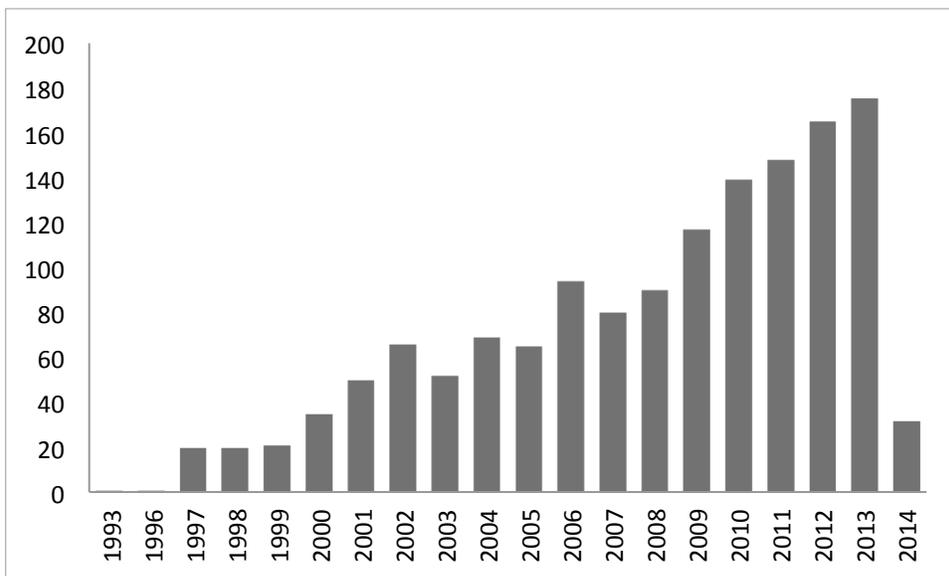


Figura 5. Número de artículos encontrados en la base de datos Pubmed con las palabras “BRCA mutation” desde 1993 hasta 2014.

Se observa un incremento gradual en el número de artículos publicados por año desde el descubrimiento del gen *BRCA1*, en 1993, hasta el primer mes del año 2014.

Debido a esta creciente información, en 1995 se creó la base de datos en línea denominada Breast Cancer Information Core (BIC) (Friend, Borresen et al. 1995), en donde hasta el momento se tienen registradas 1810 mutaciones de *BRCA1* y 2036 de *BRCA2* (BIC, 2013), de las cuales, se estima que el 80% son mutaciones que incapacitan a sus proteínas para realizar su función, por lo tanto se les conoce

como patogénicas o deletéreas (Perrin-Vidoz, Sinilnikova et al. 2002). Dentro de este grupo podemos encontrar 2 tipos de mutaciones: arreglos grandes y mutaciones puntuales (Narod and Foulkes 2004). Las primeras son aberraciones cromosómicas, que pueden cambiar el número normal de cromosomas debido a una mala segregación de éstos en el proceso de división celular (aberración cromosómica numérica) o pueden tener un número cromosómico correcto pero intercambiar regiones cromosómicas de gran tamaño entre distintos cromosomas (aberración cromosómica estructural), y se ha reportado que se encuentran en *BRCA1* y *2* hasta en un 10% (Bunyan, Eccles et al. 2004), siendo mayor en el primer gen que en el segundo (Narod and Foulkes 2004). No obstante, en poblaciones como la holandesa, estos arreglos grandes se pueden encontrar hasta en un 40% (Petrij-Bosch, Peelen et al. 1997).

En cambio, las mutaciones puntuales son:

- Mutaciones de corrimiento (*Frameshift*): Son inserciones o deleciones de tres nucleótidos, o de múltiplos de tres, en la secuencia de DNA, y representan el 40% de las mutaciones deletéreas encontradas en *BRCA1* y el 25% en *BRCA2* (BIC,2013).
- Sin sentido (*Nonsense*): son mutaciones en donde el cambio de nucleótido genera un codón de paro en la proteína, traducándose en una proteína trunca; representan alrededor del 10% en ambos genes (BIC, 2013).
- De sentido erróneo (*Missense*): son mutaciones cuyo cambio de nucleótido genera un codón distinto al original, traducándose en un aminoácido diferente que puede o no tener características similares. En *BRCA1* estas mutaciones representan el 30% y en *BRCA2* el 50% (BIC,2013).
- Silenciosas (*Synonymous*): el cambio de nucleótido genera un codón distinto, sin embargo, debido a la degeneración del código genético, el aminoácido codificado es el mismo.
- Mutaciones intrónicas: deleciones o inserciones cortas que no cambian el marco de lectura de la proteína debido a que no se localizan en regiones codificantes.

La repercusión biológica a nivel de proteína de algunas mutaciones puntuales, - sobre todo mutaciones de sentido erróneo recién descubiertas- no es bien conocida, por lo que no permite saber si son o no patogénicas. A estas mutaciones se les nombra “Variantes de significado clínico incierto” o VUS (Variants of unknown significance) (Judkins, Hendrickson et al. 2005; Radice, De Summa et al. 2011), y pueden ser tanto de sentido erróneo como silenciosas o intrónicas.

METODOLOGÍA EMPLEADA EN EL ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2*.

Existen diferentes estrategias experimentales para la detección de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, la elección depende del tipo de mutación que se busque. Actualmente estas metodologías pueden dividirse en dos grupos:

Métodos de tamizaje molecular y métodos directos. Los primeros son una amplia variedad de técnicas, siendo las más utilizadas:

- El PTT (Test de Proteína Trunca), que identifica mutaciones que se traducen en una proteína con terminación prematura (Ozcelik, Antebi et al. 1996; Monastiri, Ben Ahmed et al. 2002).
- DHPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia en condiciones desnaturalizantes) Funciona a través de la separación de fragmentos de PCR con variaciones internas debido a una retención diferencial de las cadenas a través de la columna. Detecta casi todas las mutaciones intra-exónicas y mutaciones en los sitios de splicing; pero no detecta las deleciones exónicas y el equipo requerido para su realización es costoso (Liu, Smith et al. 1998; Gerhardus, Schleberger et al. 2007) .
- MLPA (Prueba de amplificación dependiente de ligación múltiple). Tiene como fundamento la unión de dos adaptadores enlazados en los “primers” para amplificar la muestra problema, estos oligonucleótidos son ligados a través de una ligasa para obtener una cadena constante que es sometida a

PCR, después el producto amplificado se observa a través de una electroforesis, en la cual se identifican picos más grandes o pequeños de acuerdo a la mutación encontrada. Detecta rearrreglos genómicos complejos como son delección o inserción de exones completos; sin embargo, no detecta mutaciones puntuales (Schouten, McElgunn et al. 2002).

- SSCP (Confirmación de polimorfismos en cadena sencilla). Se basa en la migración diferencial de las cadenas de DNA de acuerdo a sus propiedades a través de un gel de poliacrilamida; detecta mutaciones puntuales (Suzuki, Orita et al. 1990; Hakansson, Johannsson et al. 1997).
- DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante). Se basa en la desnaturalización de las cadenas de DNA de acuerdo a las diferencias entre ellas, observándose el retardo de alguna de las cadenas en una electroforesis con un gradiente de desnaturalización (Fodde and Losekoot 1994).
- HRMCA (Análisis de curva de fusión de alta resolución). Se basa en la diferencia de las curvas que registran las intensidades de fluorescencia de cadenas de productos de PCR al aumentar la temperatura necesaria para desnaturalizar a las dobles cadenas; en DNA heteroduplex, la forma de la curva cambia en comparación con cadenas homoduplex (De Leeneer, Coene et al. 2008).

La sensibilidad de estas técnicas varía entre 50-100% (Gerhardus, Schleberger et al. 2007).

Las metodologías directas son:

- Secuenciación de terminación de cadena, también conocida como secuenciación Sanger: Su principio se basa en la replicación de un DNA molde por medio de dos tipos de nucleótidos: los primeros -desoxirineucleótidos- se utilizan en mayor proporción, mientras que los segundos -didesoxirineucleótidos- se agregan a la reacción en una proporción mucho menor; cada uno de los cuatro didesoxirineucleótidos tiene incorporado un fluoróforo distinto en la posición 3'OH de su desoxirribosa,

lo que le sirve como marca para saber de qué nucleótido se trata. La síntesis comienza por medio de la unión de “primers” complementarios a una región conocida de la cadena molde; estos “primers” son identificados por una polimerasa como lugar de inicio para la síntesis de una nueva cadena. A partir de este momento, la polimerasa se encarga de incorporar los nucleótidos de la nueva cadena, utilizando tanto nucleótidos desoxi como didesoxi de manera indistinta; sin embargo, cuando se inserta un nucleótido didesoxi, al no tener libre el extremo 3' OH de su desoxirribosa, no se permite la incorporación de un siguiente nucleótido, por tanto, cada vez que se agrega un nucleótido didesoxi a la nueva cadena sintetizada (Sanger, Nicklen et al. 1977), la extensión se detiene. Como producto final se obtienen cadenas de las que se conoce cada una de sus bases nitrogenadas gracias al marcaje con fluoróforos diferentes (Smith, Sanders et al. 1986).

Este tipo de secuenciación permite la detección de mutaciones sin sentido, de sentido erróneo, deleciones e inserciones pequeñas; sin embargo, al ser *BRCA1* y *BRCA2* genes con un gran número de nucleótidos, con esta técnica estudiarlos en su totalidad resulta ser muy laborioso y de un costo elevado, ya que se necesita un gran número de primers para poder realizar toda la replicación del gen completo o de las regiones exónicas (De Leeneer, Hellemans et al. 2011). Por lo anterior, algunos investigadores han optado por utilizar esta técnica sólo tomando en cuenta los exones 10 y 11, que representan la mayor parte del cuerpo del gen. A pesar de las desventajas de esta técnica, hoy en día es considerada como el estándar de oro para la detección de estas mutaciones en *BRCA* (Strachan, 2010)(De Leeneer, Hellemans et al. 2011).

- Secuenciación masiva: Es una técnica recientemente utilizada, por medio de la cual, podemos analizar en secuenciadores de última generación (*next generation sequencers*), cientos de miles de nucleótidos simultáneamente.

La secuenciación masiva identifica deleciones e inserciones pequeñas, así como mutaciones sin sentido y de sentido erróneo; sin embargo, no detecta rearrreglos

genómicos complejos y el equipo requerido es de un costo elevado (Narod and Foulkes 2004).

SECUENCIACIÓN MASIVA

Esta metodología comenzó a utilizarse de manera comercial a partir del 2005 con el lanzamiento de la plataforma de pirosecuenciación (Margulies, Egholm et al. 2005); sin embargo, tiempo después surgieron más plataformas (Majewski, Schwartzenruber et al. 2011). No obstante, todas comparten los siguientes pasos principales:

Preparación de la muestra de DNA o templado, inmovilización y secuenciación.

1.- En un inicio, el templado debe ser fragmentado para después incorporar “adaptadores” o secuencias de longitud pequeña conocidas a cada uno de los extremos del DNA fragmentado, ahora llamado librería.

Para el siguiente paso, el templado puede amplificarse de manera clonal o puede utilizarse sólo una molécula de DNA, dependiendo de la plataforma a elegir.

La amplificación clonal se utiliza en plataformas en las que es necesario proveer suficiente señal para ser captada por el equipo que va a secuenciar el DNA y registre así la naturaleza de cada uno de los fragmentos que conforman el templado (Mardis 2013).

La amplificación clonal se puede hacer mediante dos metodologías principales:

- EmPCR (PCR en emulsión) la cual utiliza un sistema de micelas en las que el DNA fragmentado es encapsulado junto con los agentes necesarios para realizar la PCR.
- Amplificación en fase sólida, en la que se realizan tanto la amplificación clonal como la inmovilización.

2.- La inmovilización es requerida para anclar los fragmentos de la librería en una superficie sólida y definir el lugar en donde comienzan las reacciones de secuenciación.

3.- La secuenciación y visualización de la imagen dependen de la metodología de amplificación utilizada. Resaltan 3:

-Terminadores reversibles. Cuyos pasos principales son la incorporación del nucleótido, emisión de fluorescencia y rompimiento del grupo terminador.

-Secuenciación en tiempo real. Se visualiza la incorporación continua de los nucleótidos etiquetados de manera fluorescente.

-Pirosecuenciación. Se mide la liberación de pirofosfato inorgánico al incorporarse un nucleótido a la cadena de DNA (Ronaghi et al, 1996).

PLATAFORMAS

- Illumina: El templado se amplifica de manera clonal en una fase sólida a manera de puente, produciéndose de 100-200 millones de grupos con el templado. Para conocer la secuencia se utilizan terminadores reversibles, utilizando un fluoróforo de distinto color para cada uno de los cuatro nucleótidos (Metzker 2010; Mardis 2013).
- Ion Torrent: Detecta la liberación de iones hidrógeno que surgen como subproducto de la incorporación de nucleótidos. La construcción de la librería se hace por fragmentación de DNA y emPCR (Mardis 2013).
- Pacific Biosciences ZMW: También conocida como secuenciación en tiempo real. Se secuencia como templado una sola molécula de DNA. Se utiliza una DNA polimerasa que ha sido modificada previamente para poder incorporar nucleótidos modificados, ésta se inmoviliza y al unirse el nucleótido a ella, se capta la fluorescencia (Metzker 2010; Mardis 2013).
- Helicos Bioscience: Secuenciación de una sola molécula, requiere menos de 1 µg de DNA. Pueden inmovilizarse el templado o los primers. Se utilizan terminadores reversibles de un solo color (Metzker 2010; Mardis 2013).

- Roche 454: El templado se amplifica de manera clonal por medio de emPCR, y se utiliza la pirosecuenciación como forma de determinar la incorporación de un nucleótido a la cadena. Se conoce la naturaleza del nucleótido incorporado debido a que éstos se van agregando de manera individual (Metzker 2010; Mardis 2013).

ROCHE 454.

Esta plataforma es capaz de determinar la secuencia de hasta 40 millones de pares de bases, identificando las mutaciones existentes en todos ellos en una sola corrida. (Metzker 2010; Mardis 2013)

Para la amplificación clonal del templado de la plataforma de Roche 454, se diseña un número de amplicones que en suma contengan toda la región codificante del gen a secuenciar, por lo que para el diseño de estos amplicones diversas regiones intrónicas de los bordes intrón-exón también son tomadas en cuenta.

Se crea una librería en la que en el extremo de cada fragmento de interés se ligan adaptadores que incluyen sitios universales de apareamiento, con lo cual se asegura la replicación de toda la librería en una misma PCR (Metzker 2010). Después de la ligación, el DNA se desnaturaliza para separar la doble hélice y obtener cadenas sencillas que puedan ser capturadas en perlas, en donde cada perla contenga un solo fragmento de la librería. Estas perlas tienen alrededor de su superficie las secuencias complementarias a los adaptadores unidos al DNA. Las perlas y el DNA son colocados junto con los reactivos necesarios para realizar la PCR, a la cual se le conoce como PCR en emulsión o emPCR. Después, todos ellos son mezclados con micelas de aceite y agua para formar así una emulsión en donde las perlas, el DNA y los reactivos son encapsulados, para después comenzar la amplificación, lo que permite que todas las moléculas de DNA que conforman la librería sean replicadas miles de veces en las mismas condiciones y en la misma corrida (Metzker 2010).

Luego de una exitosa amplificación, debe romperse la emulsión para separar el aceite y la solución acuosa de las perlas, para después poder enriquecerlas y obtener sólo las perlas cuyo DNA sea adecuado para la pirosecuenciación (Mardis 2013).

Por último, las perlas enriquecidas son depositadas en los pozos contenidos dentro de una placa (PTP) en la que se añaden perlas más pequeñas, las cuales tienen unidas a su superficie dos enzimas: una ATP sulfurilasa y una luciferasa; estas perlas pequeñas rodean a las perlas con DNA (Metzker 2010). Además de éstas, también se añade luciferina a los pozos. Los dNTPs se van agregando a la placa de manera individual y comienzan a fluir a través de los pozos, permitiendo su incorporación a la cadena por la DNA polimerasa, esto da como resultado la liberación de pirofosfato inorgánico, el cual es transformado a ATP por la ATP sulfurilasa (Margulies, Egholm et al. 2005). En el siguiente paso, el ATP producido se utiliza como energía para que la luciferasa sea capaz de oxidar a la luciferina y esto genere la liberación de luz, que es captada por un detector acoplado (Nyren 1987; Fakhrai-Rad, Pourmand et al. 2002).

METODOLOGÍAS PARA EVALUACIÓN DE VUS

Para evaluar la relevancia de estas mutaciones, se han propuesto diferentes aproximaciones que pueden dividirse en tres ensayos: teóricos, *in silico* e *in vitro*.

La búsqueda de la mutación a nivel de la proteína para localizar si se encuentra en un dominio funcional o en una región de interés en esta última, es la manera más fácil de predecir si la mutación VUS produce un cambio conformacional que lleva a una proteína disfuncional. De igual manera, se analizan las características tanto del aminoácido original encontrado en la secuencia proteica de referencia, como del aminoácido en donde se localizó la mutación, esto para hipotetizar la posible repercusión en la estructura secundaria y por lo tanto en su interacción con otras moléculas (Ng and Henikoff 2006).

La mutación también se detecta en secuencias homólogas tanto de otros organismos como de proteínas de la misma familia, esto debido a que diversos estudios sostienen que si una mutación se localiza en una región muy conservada evolutivamente, tiene más posibilidades de ser deletérea, mientras que las mutaciones que se localizan en las regiones en donde constantemente se han encontrado cambios, posiblemente sean neutrales (Miller and Kumar 2001; Ng and Henikoff 2001; Yang and Nielsen 2002).

Además, en el caso de BRCA1, se ha propuesto que la co-ocurrencia de una variante con una mutación claramente deletérea podría proporcionar información para su clasificación, debido a que la pérdida completa de la función de la proteína BRCA1 resulta incompatible con la vida, por lo que de existir la co-ocurrencia, la variante sería clasificada como neutral (Tavtigian, Samollow et al. 2006). En BRCA2, sí existe la posibilidad de tener ambos alelos deletados, sin embargo, las personas presentan anemia de Fanconi (Alter, Rosenberg et al. 2007).

Aunado a esto, la información clínica sobre el desarrollo de la enfermedad del paciente, las características histopatológicas y moleculares del tumor también se consideran relevantes (Hofstra, Spurdle et al. 2008).

Análisis in silico.

Los análisis bioinformáticos son una herramienta alternativa con la que se efectúan predicciones a nivel de proteína del grado de patogenicidad que pudiera tener la variante estudiada, este resultado se basa de acuerdo a diversos factores tomados en cuenta por el algoritmo utilizado por el programa computacional. Existen varios disponibles en internet de acceso gratuito, la mayoría utiliza criterios referentes a la secuencia y la estructura de la proteína antes y después del cambio en el codón (Ng and Henikoff 2006). Por ejemplo, el método de predicción del programa SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) se basa en la homología de secuencias. El algoritmo parte del razonamiento de que si un aminoácido es importante para la proteína, este será conservado a través del tiempo en todos los organismos que la utilicen, y de igual manera se conservará en proteínas relacionadas, por lo tanto, realiza alineamientos de secuencias para detectar las

regiones mayormente conservadas y, si la mutación se encuentra en estas zonas, se considera que tiene una mayor probabilidad de ser deletérea. También toma en cuenta las propiedades de los aminoácidos que conforman la proteína, por lo que si en los alineamientos realizados se encontraron sustituciones de aminoácidos con propiedades semejantes, la variante tenderá a ser tolerada. Los puntajes menores a 0.05 se catalogan como deletéreos (Ng and Henikoff 2001; Ng and Henikoff 2003).

Por otra parte, PolyPhen-2 (PP-2) (Polymorphism Phenotyping) se basa en homología de las secuencias, realiza alineamientos múltiples, toma en cuenta el contenido de CG de la secuencia, el área y la hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos (Figura 6) (Adzhubei, Schmidt et al. 2010).

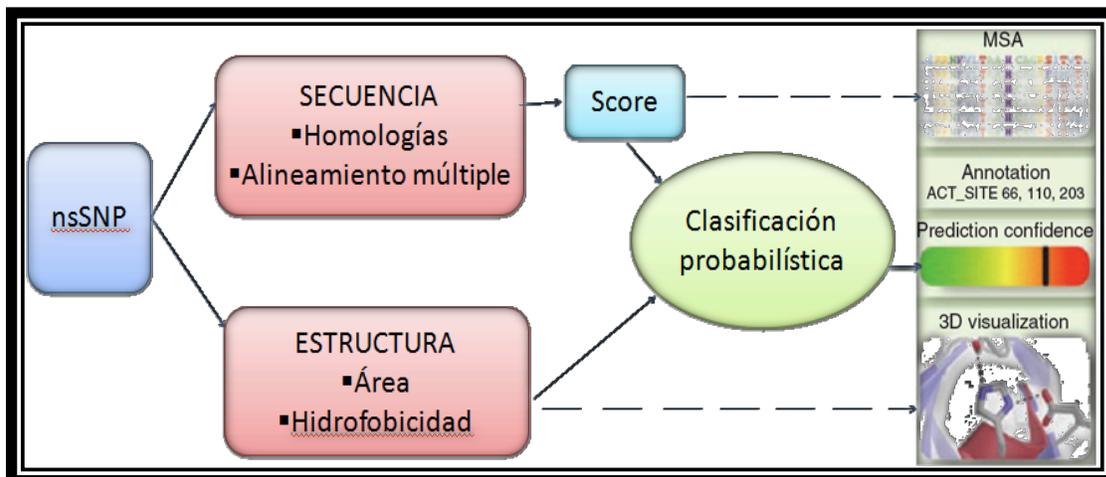


Figura 6. Algoritmo utilizado por el programa PP-2. Toma en cuenta dos criterios principales: la secuencia de aminoácidos y la estructura de la proteína, con ellos, se realiza una clasificación probabilística que determina el puntaje de patogenicidad de la variante.

Como resultado arroja un número que puede ir del 0 al 1, en donde 0 significa poca probabilidad de patogenicidad de la variante y 1 mayor probabilidad de patogenicidad. Además del número, clasifica las variantes como benigna, posiblemente dañina y probablemente dañina (Adzhubei, Schmidt et al. 2010).

Análisis in vitro.

A pesar de las aproximaciones anteriores, siempre es necesario realizar ensayos funcionales para garantizar la neutralidad o patogenicidad de la variante en cuestión. Estos ensayos suelen llevarse a cabo probando a las células con la VUS en cuestión, ensayos en donde se compruebe su correcto o incorrecto desempeño en la reparación del DNA, en su actividad como ubiquitin ligasa, ensayos de formación de colonias, ensayos de recombinación homóloga (BRCA1), ensayos de amplificación del centrosoma, de supervivencia a mitomicina C (BRCA2).

Sin embargo; debido al gran número de variantes que se han reportado, es difícil este último paso pues los ensayos se deben realizar para cada VUS, necesiándose un importante gasto económico en cada ensayo.

HIPÓTESIS

El análisis de la secuencia de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes mexicanas con cáncer de mama tanto esporádico como hereditario, permitirá la identificación de variantes de significado clínico incierto (VUS) reportadas previamente, así como identificación de VUS nuevas. Se espera encontrar un número mayor de VUS en el grupo de pacientes con cáncer de mama hereditario que en el esporádico.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la presencia de VUS silenciosas y de sentido erróneo en *BRCA1* y *BRCA2* encontradas por secuenciación masiva en 160 pacientes con cáncer de mama y ovario tanto hereditario (81) como esporádico (79), así como predecir la posible repercusión de estas variantes en la función de *BRCA1* y *BRCA2*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el número de VUS en ambos grupos de pacientes (esporádico y hereditario).
- Realizar una búsqueda de las VUS identificadas, en las bases de datos especializadas (BIC, SNPdb, etc).
- Determinar la presencia de VUS no descritas previamente.
- Analizar la patogenicidad de las VUS encontradas en ambos grupos (esporádico y hereditario), a través del uso de diferentes herramientas bioinformáticas.
- Predecir el posible efecto de estas variantes en la función de *BRCA1* y *BRCA2* así como su relevancia para conferir un riesgo incrementado para el desarrollo de cáncer de mama y ovario.

JUSTIFICACIÓN

Existe un importante número de publicaciones en donde se caracteriza detalladamente la presencia de VUS en *BRCA1* y *BRCA2* en diferentes poblaciones (europeos, asiáticos, etc). Por otro lado se ha determinado que en cuanto a la presencia de VUS cada población es heterogénea. También se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*, que algunas de estas variantes afectan significativamente la función de *BRCA1* y *BRCA2* y pueden ser factores que incrementen el riesgo de un individuo para padecer algunos tipos de cáncer. El análisis detallado de las variantes y la función de estas proteínas así como el conocimiento de la distribución de estas variantes en otras poblaciones ha permitido la implementación de estrategias orientadas a prevenir el desarrollo de cáncer en personas con riesgo incrementado.

La secuenciación masiva, permite obtener un número de secuencias considerablemente mayor, lo que ha permitido estudiar detalladamente la variabilidad genética existente en diferentes poblaciones.

Está ampliamente documentado el origen multiétnico de la población mexicana y, desde el punto de vista genético, implica una alta heterogeneidad y complejidad en la estructura genética de esta población (Guardado-Estrada, et al. 2008). Hasta la fecha no existen trabajos en los que se caracterice detalladamente la región exónica de *BRCA1* y *BRCA2* en la población mexicana y por lo tanto el conocimiento sobre las variantes presentes en esta población se desconocen. Resulta de gran relevancia caracterizar variantes que puedan formar parte de la variabilidad genética de los mexicanos (polimorfismos) así como variantes que puedan conferir un riesgo incrementado para el desarrollo de estos tipos de cáncer (mama y ovario).

DISEÑO EXPERIMENTAL.

En el presente trabajo se utilizaron dos grupos de pacientes con cáncer de mama, a uno se le llamó grupo esporádico y al otro grupo hereditario y fueron elegidos bajo las siguientes condiciones:

Para la conformación del grupo de pacientes con cáncer hereditario, los pacientes fueron evaluados en la Clínica de Cáncer hereditario del INCAN. Se sustentó la sospecha de Síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario de acuerdo a los siguientes criterios:

- Presentación de cáncer de mama a temprana edad (menor a los 40 años de edad), incluyendo las formas invasivas y ductal del carcinoma de mama.
- Dos tumores primarios de mama o cáncer de mama y ovario/tubas uterinas/peritoneo, en una misma paciente.
- Historia familiar de afectadas (os) con dos tumores primarios de mama o cáncer de mama u/y ovario/tubas uterinas/peritoneo, en una misma paciente, en parientes de 1er, 2º ó 3er grado en la misma rama (materna ó paterna), o de afectados con otros de los tumores relacionados.
- Fenotipo tumoral triple negativo (ausencia de expresión de Her2Neu y receptores hormonales, siendo éstos progesterona y estrógenos) en pacientes premenopáusicas.
- Paciente del sexo masculino con cáncer de mama, independientemente de la edad de presentación.

El grupo de pacientes con cáncer esporádico fue elegido bajo el único criterio de ser pacientes del INCAN con diagnóstico de cualquier tipo de cáncer de mama confirmado. Las muestras de ADN disponibles fueron obtenidas entre los años 2007 a 2011.

La obtención de muestras, así como el proceso de secuenciación masiva en paralelo, que se compone de la construcción de las librerías, la emPCR y la secuenciación, fueron llevadas a cabo por la Doctora Rosa María Álvarez.

METODOLOGÍA

Obtención de muestras:

Los pacientes con sospecha de cáncer hereditario fueron invitados a participar en el estudio mediante una carta de consentimiento informado. Tras la aceptación de la inclusión al protocolo, se obtuvo una muestra de sangre periférica (6 ml.) mediante una venopunción con las medidas de asepsia y antisepsia pertinentes.

Para obtener una muestra de los pacientes pertenecientes al grupo con cáncer de mama esporádico se solicitó la utilización del banco de ADN de pacientes con cáncer de mama del laboratorio de Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer (UIBC).

Obtención de DNA.

Para obtener DNA cuya pureza e integridad fueran de buena calidad se utilizó un método de extracción de DNA por medio de perlas magnéticas, esta metodología se realizó con un equipo automatizado denominado MagNA Pure (Roche), cuyo fundamento se basa en el rompimiento de las células por medio de detergentes (Tritón X-100), proteinasa K, y separación de los componentes celulares por adición de agentes caotrópicos (guanidina); una vez realizado esto, se añaden perlas magnéticas a la solución, las cuales se unen por carga al DNA. Estas perlas magnéticas unidas con el DNA son después separadas del resto de los componentes por la atracción de ellas hacia un imán y después de algunos lavados, son eluidas. Todos los pasos se realizaron siguiendo las instrucciones del proveedor.

Para corroborar la calidad del DNA, se estableció tanto su concentración así como pureza e integridad por medio de espectrofotometría con el equipo Epoch y por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Secuenciación masiva en paralelo.

Se utilizaron 50 ng de DNA de cada paciente.

Se utilizó la plataforma de pirosecuenciación basada en amplicones (Roche 454 Junior) para la secuenciación de toda la región codificante así como de las regiones intrónicas cercanas a las secciones codificantes de ambos genes.

Todos los pasos para la secuenciación con esta plataforma se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche).

Construcción de la librería:

Se comenzó realizando la curva de calibración con DNA estándar y se cuantificó por medio de fluorescencia.

De la misma forma, el DNA de los ocho pacientes de cada corrida se cuantificó tomando como base la curva de calibración realizada anteriormente.

Se realizó la primer PCR para amplificar los 93 amplicones que cubren toda la región exónica de *BRCA1* y *BRCA2* (De Leener et al., 2011) contenidos en cinco plexes o grupos de amplificación.

Después de salir la primer PCR, se realizó una dilución 1:1000 y de ella se utilizó 1 µl como templado para comenzar la segunda PCR.

En la segunda PCR se incorporaron los MIDs (Identificador molecular) o etiquetas correspondientes para identificar a las muestras de cada paciente. Al terminar, se trasladaron los cinco plexes de cada paciente para constituir la librería completa de cada persona, teniendo al final de este paso ocho tubos.

Seguido de completar las ocho librerías, el DNA de cada una de ellas se purificó por medio de la adición de perlas magnéticas previamente vortexeadas. Los tubos con las librerías y las perlas fueron llevados a un rack acoplado a un imán, en el cual los tubos permanecieron inmóviles mientras en su interior el DNA fue separado del resto de los componentes de la solución gracias a su unión con las perlas magnéticas y éstas, a su vez, separándose por su unión a la pared del tubo más cercana al imán. Al encontrarse perfectamente separadas, con una micropipeta se retiró la fase acuosa, y las perlas y el DNA fueron lavados dos veces. En el siguiente paso, los tubos se sometieron al imán de nuevo, pero esta

vez para separar las perlas magnéticas del DNA, para ello, se tomó la fase acuosa y se llevó a un tubo nuevo.

Al encontrarse el DNA libre de contaminantes, se cuantificó para conocer su calidad y se tuvo listo para iniciar con la siguiente PCR.

PCR en emulsión (emPCR)

Para realizar la emulsión, el DNA de la librería se agregó a los tubos contenedores de perlas de captura, así como el estuche de amplificación.

Seguido de esto, se realizó la emulsificación del contenido y después la amplificación. Al terminar, se aseguró de que en ninguno de los tubos existiera un rompimiento de la emulsión.

Acto seguido, se recuperaron las perlas a través de un tubo colector acoplado por un lado a una pipeta multicanal y por otro a una trampa de vacío. Al salir las perlas, se les realizaron múltiples lavados.

Para asegurarse de que sólo existan perlas con suficiente contenido de DNA para la secuenciación, se realizó un enriquecimiento de las perlas a través de un concentrador de partículas magnéticas.

Por último, a las perlas enriquecidas se les adicionó el primer de secuenciación.

Secuenciación.

Se inició con un prelavado del equipo.

Se preparó el dispositivo en el que se inmoviliza el DNA, llamado Pico Titer Plate (PTP).

Se prepararon las perlas de empaquetamiento, perlas de control y muestra, perlas que contiene las enzimas y pipiasa.

Se depositaron las cuatro capas de perlas dentro del dispositivo.

Se prepararon los reactivos de secuenciación.

Se limpió el cartucho de la PTP.

Se comenzó la corrida de secuenciación.

Análisis de cada corrida.

Para identificar las VUS se utilizaron los siguientes criterios:

1. Se requiere un mínimo de 20 lecturas de cada secuencia.
2. La mutación necesita estar presente en por lo menos 30% de las lecturas.
3. Por lo menos una de las direcciones (Sentido o Antisentido) debe tener una alta calidad de secuenciación.
4. Las variantes en homopolímeros mayores a 6 pares de bases no se toman en cuenta, por las limitaciones inherentes a esta metodología.

Búsqueda informática de VUS

Las variantes que pasaron los filtros anteriores, fueron buscadas en las bases de datos de Breast Cancer Mutation Data Base –BIC-; y dbSNP Data Base para saber si ya habían sido previamente referidas y si manejaban un código o rs dentro de la dbSNP. A las VUS que no se encontraron en estas bases de datos se les consideró como no reportadas. Una variante fue tomada como no reportada (NR) en el caso de no encontrarse enlistada con el cambio de secuencia específico registrado por la secuenciación masiva, esto es, desde el cambio de nucleótido y no sólo por el cambio de aminoácido.

Por último, se obtuvo la frecuencia de todas las variantes encontradas en el estudio.

Análisis de VUS no reportadas previamente.

Las VUS originadas por una mutación de sentido erróneo, fueron localizadas a nivel de la proteína para conocer si formaban parte de algún dominio funcional o si se encontraban en algún aminoácido que fuera modificado postraduccionalmente de acuerdo al reporte de Tram, *et al.* (2013).

Se realizaron análisis *in silico* con los programas Polyphen-2 y SIFT para predecir su posible patogenicidad.

Paralelo a esto, de acuerdo a Ellington y Cherry (2001), se analizaron las propiedades fisicoquímicas del cambio del aminoácido generado así como del original para identificar si compartían o no propiedades en común.

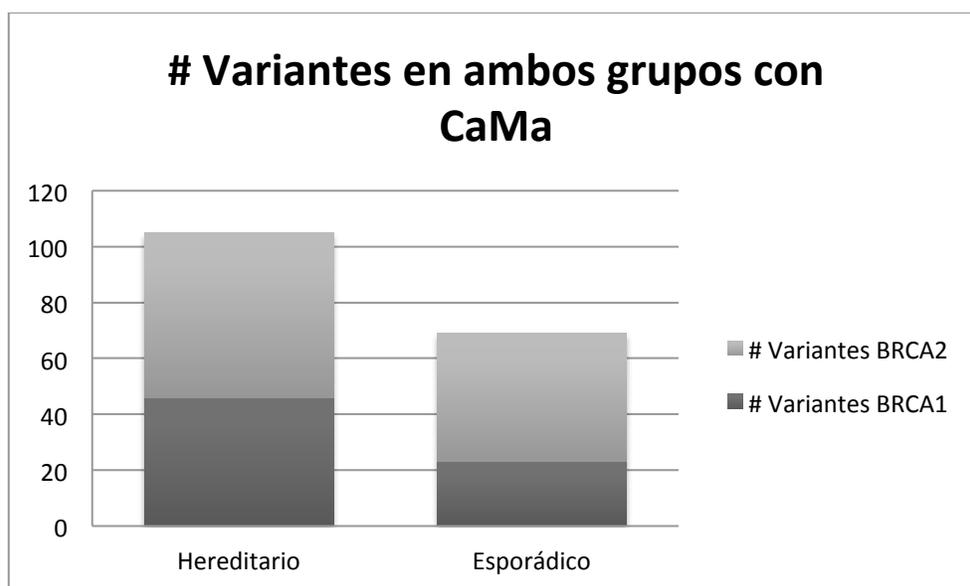
Determinación de VUS en cada uno de los pacientes.

Después de identificar todas las mutaciones, se realizó una lista en la que se incluyó cada una de las mutaciones encontradas en cada paciente comprendido en el estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Después de realizar la secuenciación masiva y, tomando en cuenta los criterios anteriormente mencionados, se obtuvo un total de 174 variantes genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en ambos grupos de pacientes utilizados.

El grupo en el que se encontraron más variantes fue el de los pacientes con cáncer de mama hereditario (Gráfica 1), con 105 variantes (46 en *BRCA1* y 59 en *BRCA2*), mientras que en el grupo de pacientes con cáncer de mama esporádico se encontraron 69 (23 en *BRCA1* y 46 en *BRCA2*).



Gráfica 1. Se observa que el número de variantes encontradas en el grupo hereditario es mayor que las encontradas en el grupo esporádico.

Todas las variantes encontradas en el estudio, se dividieron de acuerdo al grupo y al gen en el que se identificaron y se enlistan a continuación (Tabla 1,2,3 y 4).

Tabla 1. Variantes de BRCA1 en pacientes mexicanos con síndrome de cáncer de mama/ovario hereditario.

GEN	EXON	MUTACIÓN EN DNA	MUTACION EN PROTEÍNA	FRECUENCIA DE ALELOS EN MUESTRA (%) N=162	BIC	Número rs dbSNP
<i>BRCA1</i>	5	g.19027A>G	R71G	0.615	SI	rs80357382
<i>BRCA1</i>	7	g.21225G>A	A102T	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	7	g.21235A>G	Y105C	0.615	SI	rs28897673
<i>BRCA1</i>	7	g.21250A>T	K110M	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	7	g.21298A>G	Q126R	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	7	g.21343A>G	E141G	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	9	g.28202T>C	D185D	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	9	g.28205T>C	S186S	0.615	NR	-
<i>BRCA1</i>	9	g.28220T>C	V191V	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.30913A>G	R320R	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.31020A>G	Q356R	3.085	SÍ	rs1799950
<i>BRCA1</i>	11	g.31040A>G	N363D	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.31236A>G	K428R	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.31437A>G	E495G	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.31914A>C	K654T	2.465	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.32030G>A	D693N	1.85	SI	rs4986850
<i>BRCA1</i>	11	g.32035C>T	S694S	17.28	SI	rs1799949
<i>BRCA1</i>	11	g.32161A>G	E736E	0.615	NR	-
<i>BRCA1</i>	11	g.2237A>G	R762G	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.32264T>C	L771L	17.28	SI	rs16940
<i>BRCA1</i>	11	g.32565C>T	P871L	19.13	SI	-
<i>BRCA1</i>	11	g.32738T>C	F929L	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.33036G>A	R1028H	0.615	SI	rs80357459
<i>BRCA1</i>	11	g.33066A>G	E1038G	17.28	SI	rs16941
<i>BRCA1</i>	11	g.33072G>A	S1040N	1.23	SI	rs4986852
<i>BRCA1</i>	11	g.33353G>A	E1134K	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.33371A>G	S1140G	0.615	SI	rs2227945
<i>BRCA1</i>	11	g.33446T>C	F1165L	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.33484T>A	F1177L	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.33485A>G	S1178G	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.33501A>G	K1183R	17.28	SI	rs16942
<i>BRCA1</i>	11	g.33538T>C	H1195H	0.615	NR	-
<i>BRCA1</i>	11	g.33619G>A	E1222E	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.33985T>A	D1344E	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.34048A>T	L1365F	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	13	g.43031T>C	S1436S	19.135	SI	rs1060915
<i>BRCA1</i>	16	g.54407A>G	S1613G	19.75	SI	rs1799966
<i>BRCA1</i>	16	g.54522C>T	S1651F	0.615	SI	rs80356938
<i>BRCA1</i>	16	g.54529G>T	V1653V	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	16	g.54538C>T	G1656G	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	19	g.62133A>G	E1725E	0.615	NR	rs191373374
<i>BRCA1</i>	20	g.68377T>C	V1741A	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	22	g.76349T>C	F1798L	0.615	NR	NR
<i>BRCA1</i>	23	g.77785T>A	V1804D	0.615	SI	rs80356920

BRCA1	23	g.77804G>A	V1810V	0.615	NR	NR
BRCA1	24	g.79788C>T	I1858I	0.615	NR	NR

BIC: Breast Cancer Information Core. Número rs dbSNP: Número de referencia en la base de datos dbSNP. g.: secuencia genómica.

NR: No reportada. - : Aún no tiene rs dentro de la base de datos.

Tabla 2 Variantes de BRCA2 en pacientes mexicanos con cáncer de mama/ovario hereditario.

GEN	EXON	MUTACIÓN EN DNA	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	FRECUENCIA DE ALELOS EN MUESTRA (%) N=162	BIC	Número dbSNP rs
BRCA2	7	g.11108C>T	P202L	0.615	NR	NR
BRCA2	9	g.15515A>G	S253G	0.615	NR	NR
BRCA2	9	g.15535A>G	R259R	0.615	NR	NR
BRCA2	10	g.16864A>C	N289H	7.4	SI	rs766173
BRCA2	10	g.16993A>C	I332L	0.615	NR	NR
BRCA2	10	g.17052A>C	K351N	2.465	NR	NR
BRCA2	10	g.17113A>C	N372H	22.8	SI	rs144848
BRCA2	10	g.17364A>G	S455S	6.8	SI	rs1801439
BRCA2	10	g.17563G>C	G522R	1.232	SI	rs80358442
BRCA2	10	g.17565T>C	G522G	0.615	NR	NR
BRCA2	10	g.17592A>C	K531N	0.615	NR	NR
BRCA2	10	g.17707A>G	N570D	0.615	NR	NR
BRCA2	10	g.17812A>C	I605L	2.465	NR	NR
BRCA2	11	g.21069A>G	E731E	0.615	NR	NR
BRCA2	11	g.21105T>C	H743H	6.15	SI	rs1801499
BRCA2	11	g.21833A>C	N986T	1.85	NR	NR
BRCA2	11	g.21847A>G	N991D	6.8	SI	rs1799944
BRCA2	11	g.22272A>G	K1132K	21.6	SI	-
BRCA2	11	g.22371T>C	H1165H	0.615	NR	NR
BRCA2	11	g.22529G>C	G1218A	6.8	NR	NR
BRCA2	11	g.22530C>G	G1218G	6.15	NR	NR
BRCA2	11	g.22683T>C	V1269V	15.4	SI	rs543304
BRCA2	11	g.22736A>C	N1287T	0.615	NR	NR
BRCA2	11	g.23099A>G	Q1408R	0.615	NR	NR
BRCA2	11	g.23439A>G (Homócigo)	L1521L	93.8	SI	rs206075
BRCA2	11	g.23557C>A	H1561N	0.615	SI	rs2219594
BRCA2	11	g.23823A>G	K1649K	0.615	NR	NR
BRCA2	11	g.23831C>T	A1652V	0.615	NR	NR
BRCA2	11	g.23867T>G	I1664S	0.615	NR	NR
BRCA2	11	g.23984A>G	E1703G	0.615	NR	NR
BRCA2	11	g.24073T>C	S1733P	0.615	NR	NR
BRCA2	11	g.24075C>T	S1733S	1.235	SI	rs28897734
BRCA2	11	g.24620C>T	T1915M	0.615	SI	rs4987117
BRCA2	11	g.24818C>T	A1981V	0.615	NR	NR

BRCA2	11	g.25288G>T	V2138F	0.615	SI	rs11571659
BRCA2	11	g.25389G>C (Homócigo)	V2171V	100	SI	rs206076
BRCA2	11	g.24934G>A	E2220K	0.615	NR	NR
BRCA2	14	g.39616A>G	S2414S	20.35	SI	rs1799955
BRCA2	15	g.40982T>C	I2490T	10.45	SI	rs11571707
BRCA2	16	g.42280T>C	V2545V	0.615	NR	NR
BRCA2	16	g.42285A>G	K2547R	0.615	NR	NR
BRCA2	18	g.47739A>T	I2672I	1.232	NR	-
BRCA2	18	g.47971A>C	K2750Q	0.615	NR	NR
BRCA2	20	g.55591A>G	K2868E	0.615	NR	NR
BRCA2	21	g.61193A>G	N2879D	0.615	NR	NR
BRCA2	22	g.63933G>T	K2950N	1.232	SI	rs28897754
BRCA2	22	g.63934G>A	A2951T	2.465	SI	rs11571769
BRCA2	22	g.64016C>T	S2978L	0.615	NR	NR
BRCA2	22	g.64017A>C	S2978S	0.615	NR	-
BRCA2	22	g.64029A>C	K2982N	2.465	NR	NR
BRCA2	23	g.64334A>G	Y3006C	0.615	NR	NR
BRCA2	23	g.64410A>G	K3031K	0.615	NR	NR
BRCA2	23	g.64432C>T	P3039S	0.615	NR	NR
BRCA2	26	g.81458A>G	M3181V	0.615	NR	NR
BRCA2	27	g.82911G>A	A3293T	0.615	NR	NR
BRCA2	27	g.83073A>G	I3347V	0.615	NR	NR
BRCA2	27	g.83132T>C	S3366S	0.615	NR	-
BRCA2	27	g.83155C>T	T3374I	0.615	SI	rs56309455
BRCA2	27	g.83268A>G	I3412V	8.02	SI	rs1801426

BIC: Breast Cancer Information Core. Número rs dbSNP:Número de referencia en la base de datos dbSNP. g.: secuencia genómica.

NR:No reportada. - :Aún no tiene rs dentro de la base de datos.

Tabla 3. Variantes en *BRCA1* en pacientes mexicanas con cancer de mama.

GEN	EXON	MUTACIÓN EN DNA	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	FRECUENCIA DE ALELOS EN MUESTRA (%) N=158	BIC	Número rs dbSNP
<i>BRCA1</i>	7	g.21250A>T	K110N	1.895	NR	NR
<i>BRCA1</i>	6	g.21253A>G	E111G	1.895	NR	NR
<i>BRCA1</i>	10	g.29636A>C	K223T	1.265	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.30940T>C	N329N	0.632	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.31020A>G	Q356R	2.53	SI	rs1799950
<i>BRCA1</i>	11	g.31914A>C	K654T	6.96	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.32030G>A	D693N	0.632	SI	rs4986850
<i>BRCA1</i>	11	g.32035C>T	S694S	23.415	SI	rs1799949
<i>BRCA1</i>	11	g.32142A>T	E730V	3.16	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.32264T>C	L771L	22.78	SI	rs16940
<i>BRCA1</i>	11	g.32411A>G	K820E	0.632	SI	rs56082113
<i>BRCA1</i>	11	g.32455A>G	G834G	0.632	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.32513G>A	A854T	0.632	NR	NR
<i>BRCA1</i>	11	g.32565C>T	P871L	29.745	SI	rs799917
<i>BRCA1</i>	11	g.33066A>G	E1038G	24.05	SI	rs16941
<i>BRCA1</i>	11	g.33072G>A	S1040N	1.265	SI	rs4986852
<i>BRCA1</i>	11	g.33501A>G	K1183R	22.78	SI	rs16942
<i>BRCA1</i>	13	g.43031T>C	S1436S	25.945	SI	rs1060915
<i>BRCA1</i>	15	g.51013G>T	S1512I	0.632	SI	rs1800744
<i>BRCA1</i>	16	g.54410C>T	S1587L	0.632	NR	NR
<i>BRCA1</i>	16	g.54407A>G	S1613G	27.845	SI	rs1799966
<i>BRCA1</i>	16	g.54438C>G	A1623G	0.632	SI	rs80356862
<i>BRCA1</i>	21	g.74417C>T	P1776P	0.632	NR	NR

NR:No reportada. - :Aún no tiene rs dentro de la base de datos.

Tabla 4. Variantes en *BRCA2* en pacientes mexicanas con cáncer de mama

GEN	EXON	MUTACIÓN EN DNA	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	FRECUENCIA DE ALELOS EN MUESTRA (%) N=158	BIC	Número rs dbSNP
<i>BRCA2</i>	9	g.15541T>A	A261A	0.63	NR	NR
<i>BRCA2</i>	10	g.16864A>C	N289H	7.59	SI	rs766173
<i>BRCA2</i>	10	g.16955A>C	N319T	0.63	SI	rs55939572
<i>BRCA2</i>	10	g.16993A>C	I332L	1.895	NR	NR
<i>BRCA2</i>	10	g.17113A>C	N372H	24.68	SI	rs144848
<i>BRCA2</i>	10	g.17140G>A	D381N	0.63	NR	NR
<i>BRCA2</i>	10	g.17364A>G	S455S	8.225	SI	rs181439
<i>BRCA2</i>	10	g.17805A>T	G602G	3.795	NR	NR
<i>BRCA2</i>	10	g.17812A>C	I605L	5.695	NR	NR
<i>BRCA2</i>	11	g.21105T>C	H743H	6.96	SI	rs1801499
<i>BRCA2</i>	11	g.21711A>C	K945N	1.265	NR	NR
<i>BRCA2</i>	11	g.21833A>C	N986T	4.43	NR	NR
<i>BRCA2</i>	11	g.21847A>G	N991D	7.592	SI	rs1799944
<i>BRCA2</i>	11	g.22272A>G	K1132K	15.185	NR	-
<i>BRCA2</i>	11	g.22355G>A	R1160K	0.63	NR	rs183920365
<i>BRCA2</i>	11	g.22683T>C	V1269V	11.39	SI	rs543304
<i>BRCA2</i>	11	g.22736A>C	N1287T	1.895	NR	NR
<i>BRCA2</i>	11	g.23040T>G	T1388T	3.16	NR	NR
<i>BRCA2</i>	11	g.23439A>G (Homozygous)	L1521L	98.73	SI	rs206075
<i>BRCA2</i>	11	g.24459A>C	K1861N	1.265	NR	NR
<i>BRCA2</i>	11	g.25358A>G	D2161G	0.63	NR	NR
<i>BRCA2</i>	11	g.25389G>C (Homozygous)	V2171V	88.60	SI	rs206076
<i>BRCA2</i>	11	g.25425A>G	E2183E	0.63	NR	-
<i>BRCA2</i>	11	g.25450A>C	M2192L	0.63	NR	NR
<i>BRCA2</i>	11	g.25477T>A	S2201T	0.63	NR	NR
<i>BRCA2</i>	12	g.29090A>G	I2285V	0.63	SI	rs56272235
<i>BRCA2</i>	13	g.31360A>G	D2317G	0.63	NR	NR
<i>BRCA2</i>	14	g.39397T>C	R2341R	0.63	NR	-
<i>BRCA2</i>	14	g.39518T>C	F2382I	0.63	NR	NR
<i>BRCA2</i>	14	g.39551A>C	M2393L	1.895	NR	NR
<i>BRCA2</i>	14	g.39616A>G	S2414S	13.29	SI	rs1799955
<i>BRCA2</i>	14	g.39656T>G	L2428V	0.63	NR	NR
<i>BRCA2</i>	15	g.40982T>C	I2490T	11.39	SI	rs11571707
<i>BRCA2</i>	18	g.47953A>G	R2744G	0.63	NR	NR
<i>BRCA2</i>	22	g.63934G>A	A2951T	3.795	Yes	rs11571769
<i>BRCA2</i>	22	g.64023A>C	K2980N	12.02	NR	NR
<i>BRCA2</i>	22	g.64029A>C	K2982N	6.96	NR	NR
<i>BRCA2</i>	23	g.64414A>C	T3033P	1.895	NR	NR
<i>BRCA2</i>	24	g.64656G>A	V3082V	1.265	NR	NR
<i>BRCA2</i>	24	g.64657A>G	K3083E	1.265	SI	rs80359190
<i>BRCA2</i>	25	g.79431A>G	N3160D	0.63	NR	NR
<i>BRCA2</i>	25	g.79444A>C	N3164T	1.265	NR	NR
<i>BRCA2</i>	27	g.82772C>T	A3246A	0.63	SI	rs80359811
<i>BRCA2</i>	27	g.83155C>T	T3374I	0.63	SI	rs56309455

BRCA2	27	g.83268A>G	I3412V	8.86	SI	rs1801426
BRCA2	27	g.83282A>C	K3416N	0.63	NR	NR

BIC: Breast Cancer Information Core. Número rs dbSNP:Número de referencia en la base de datos dbSNP. g.: secuencia genómica.

NR:No reportada. - :Aún no tiene rs dentro de la base de datos.

De las 174 variantes encontradas en total, 28 se localizaron en ambos grupos de pacientes, 11 en BRCA1 y 17 en BRCA2 (Figuras 7 y 8), por lo que, si se toma en cuenta sólo las variantes diferentes, el número se reduce a 146 variantes.

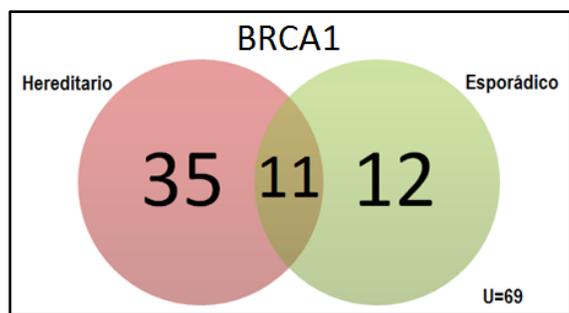


Figura 7. Número de variantes encontradas en *BRCA1* representado por un diagrama de Venn Euler en donde el conjunto rosa indica al grupo hereditario y el conjunto verde al grupo esporádico; la intersección, formada por 11 variantes, indica que éstas se encontraron en ambos grupos de pacientes.

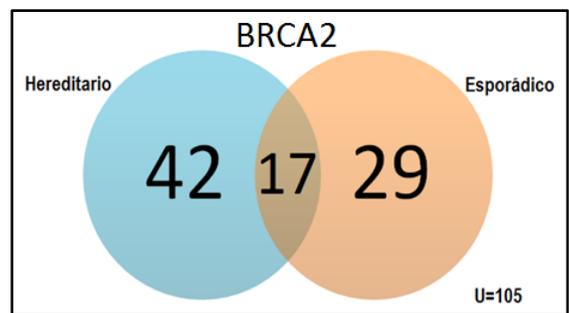
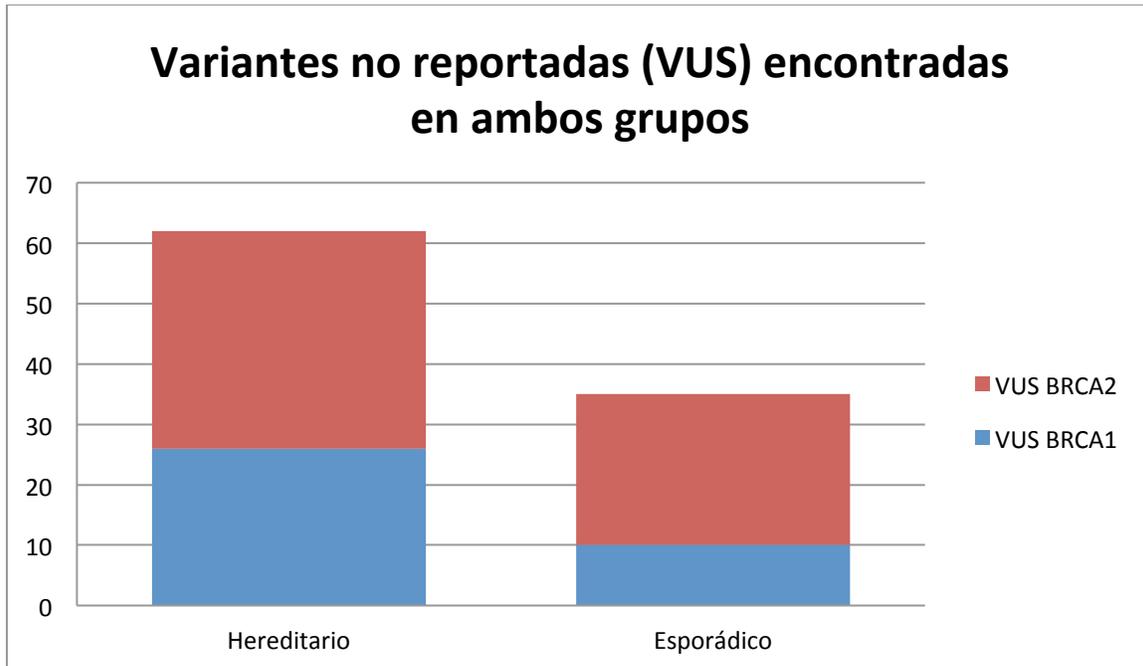


Figura 8. Número de variantes encontradas en *BRCA2* representado por un diagrama de Venn Euler en donde el conjunto azul indica al grupo hereditario y el conjunto naranja al grupo esporádico; la intersección, formada por 17 variantes, indica que éstas se encontraron en ambos grupos de pacientes.

Después de la identificación de todas las variantes, se realizó una búsqueda informática utilizando las bases de datos BIC y dbSNP con el fin de excluir a aquellas variantes que ya tuvieran un reporte de identificación previo. Estos resultados descartaron a 77 variantes ya publicadas, dejando a 97 variantes desconocidas, que a partir de ahora serán llamadas en este trabajo como variantes de significado clínico incierto o VUS.

De las 97 VUS recién descubiertas, 62 se situaron dentro del grupo de pacientes con cáncer de mama hereditario, mientras que las restantes 35 fueron encontradas en el grupo esporádico (Gráfica 2). Nuevamente, 5 VUS se ubicaron dentro de los dos grupos de pacientes manejados.



Gráfica 2. Se observa que el número de VUS encontradas en el grupo hereditario es mayor que en el esporádico; no obstante, el número de VUS encontradas en BRCA2 en ambos grupos es similar, no así con el número de VUS encontradas en BRCA1 en ambos grupos.

Con el fin de conocer las características de las nuevas VUS y de predecir el posible efecto de éstas en la función de las proteínas BRCA1 y BRCA2, se realizaron predicciones *in silico* con ayuda de los programas Polyphen-2 y SIFT.

ANÁLISIS *IN SILICO*.

El análisis *in silico* de las VUS no reportadas previamente, reflejó resultados diferentes de acuerdo al programa utilizado (Figura 9). Los datos completos se pueden observar en las tablas 5 y 6 para BRCA1, y 7 y 8 para BRCA2.

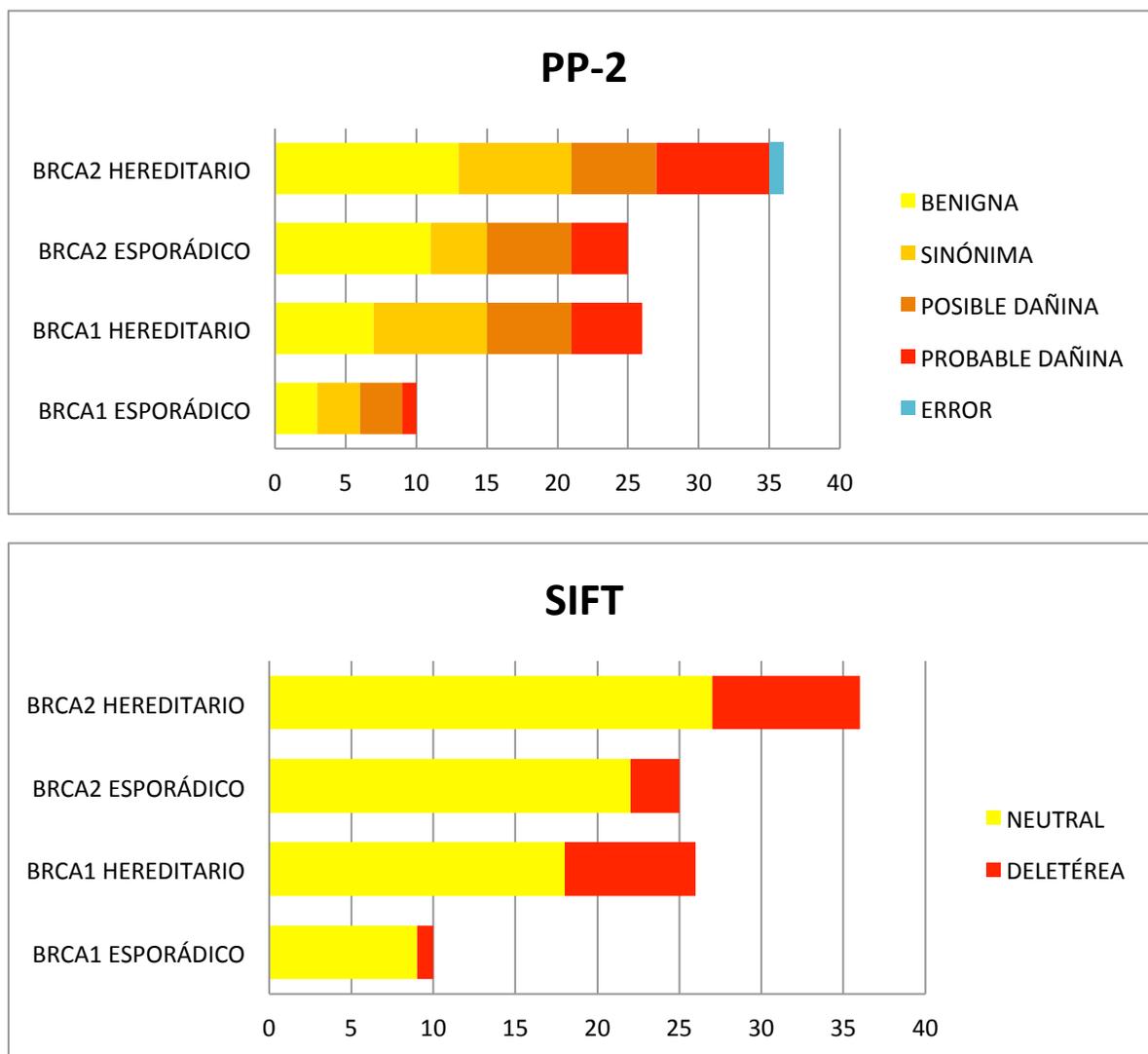


Figura 9. Resultados de análisis *in silico* graficados de acuerdo al programa computacional utilizado. Se observa que para ambos programas el número de VUS dañinas o deletéreas es mayor en el grupo hereditario, independientemente del gen en cuestión.

Tabla 5. VUS en *BRCA1* no reportadas previamente y su impacto funcional de acuerdo a resultados de análisis *in silico* en pacientes mexicanos con cáncer de mama (grupo esporádico).

GEN	EXON	MUTACIÓN EN DNA	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	FRECUENCIA % N=79	PolyPhen SCORE	Patogenicidad	PROVEAN SCORE (SIFT)	Patogenicidad
BRCA1	7	g.21250A>T	K110N	3.79	0.956	POSIBLE DAÑINA	-0.658	NEUTRAL
BRCA1	6	g.21253A>G	E111G	3.79	0.817	POSIBLE DAÑINA	-0.692	NEUTRAL
BRCA1	10	g.29636A>C	K223T	2.53	0.787	POSIBLE DAÑINA	-0.738	NEUTRAL
BRCA1	11	g.30940T>C	N329N	1.26	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA1	11	g.31914A>C	K654T	13.92	0.000	BENIGNA	-0.100	NEUTRAL
BRCA1	11	g.32142A>T	E730V	6.32	0.979	PROBABLE DAÑINA	-4.662	DELETÉREA
BRCA1	11	g.32455A>G	G834G	1.26	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA1	11	g.32513G>A	A854T	1.26	0.000	BENIGNA	3.606	NEUTRAL
BRCA1	16	g.54410C>T	S1587L	1.26	0.146	BENIGNA	-0.623	NEUTRAL
BRCA1	21	g.74417C>T	P1776P	1.26	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL

g.: secuencia genómica. SIN: sinónimo

De las 10 VUS de *BRCA1* que no habían sido previamente descritas y que se encontraron en los pacientes que se etiquetaron dentro del grupo de cáncer de mama esporádico (Tabla 5), sólo la E730V se clasificó como deletérea y probablemente dañina para ambos programas computacionales utilizados. El resto, fueron catalogadas como neutrales para SIFT mientras que para PP-2 tres fueron posiblemente dañinas y tres benignas; ya que 3 variantes dieron lugar a un cambio sinónimo (N329N, G834G y P1776P), éstas no tuvieron clasificación pues PP-2 no realiza el análisis en este tipo de mutaciones.

La VUS E730V se identificó en cinco pacientes de este grupo, y en la proteína se localiza en el dominio de unión a DNA, cuya funcionalidad recae en la reparación del DNA dañado al ayudar a la localización de éste, por lo que es una VUS que sobresale del remanente del grupo esporádico. La naturaleza de la cadena lateral del glutamato lo hace ser un aminoácido polar (al tener una carga parcial negativa

dada por el oxígeno y una positiva dada por el hidrógeno) con carga negativa a pH fisiológico; su intercambio por valina, aminoácido no polar, produce un cambio en sus propiedades químicas que puede conllevar a un arreglo en su estructura secundaria para disminuir su interacción con el agua debido a que ya no puede interactuar con ella ni con otras moléculas con átomos electronegativos, ni formar fuerzas electrostáticas.

El resto de las VUS se mencionan de acuerdo al orden seguido en la tabla 5:

K110N se clasificó como posiblemente dañina y neutral, no se localiza en ningún dominio funcional de la proteína, se encuentra entre el dominio RING y la NLS; el cambio de aminoácido deja a uno con distintas propiedades, siendo de uno polar con carga positiva a uno polar sin carga, la lisina es un aminoácido ligeramente más hidrofílico que la asparagina (Kyte and Doolittle 1982). Esta variante se encontró en tres pacientes de este grupo.

E111G se identificó en tres pacientes, no se encontró en ningún dominio funcional; sin embargo las propiedades del aminoácido original sí se vieron afectadas, ya que el glutamato, como ya se mencionó previamente es polar con carga negativa y la glicina es un aminoácido no polar; no obstante, debido a que la cadena lateral de la glicina está compuesta sólo por un hidrógeno, su índice de hidrofobicidad no es tan alto como el de otros aminoácidos (Kyte and Doolittle 1982). Los programas PP-2 y SIFT la clasificaron como posiblemente dañina y neutral.

K223T se encontró en dos pacientes. Debido al número de aminoácido en el que se presenta la mutación, no se halla en un dominio funcional, pero según la literatura se encuentra dentro de la región en donde está la NLS (200-300 aa), por lo que de mutarla, podría dificultar la translocación de la proteína al núcleo. Se catalogó como posiblemente dañina y neutral y pasa de ser un aminoácido polar con carga positiva a uno polar sin carga.

K654T es una de las VUS que se identificó en ambos grupos de pacientes (grupo esporádico y hereditario), aunque en una mayor proporción en este grupo que en el hereditario (11 vs 4 pacientes). Se clasifica como benigna y neutral a pesar de que sí cae en el dominio de unión a DNA y que sí se cambian las características

del aminoácido colocado en esta región, siendo la lisina uno polar con carga positiva y la treonina uno polar sin carga.

A854T sólo se encontró en un paciente. Se clasificó como benigna y neutral y, de la misma manera que la VUS anterior, cae en el dominio de unión a DNA y cambia las propiedades del aminoácido, esta vez de uno no polar a uno polar sin carga, lo que puede cambiar su conformación exponiendo al medio un aminoácido que antes se encontraba oculto.

S1587L dio un cambio de aminoácido de serina a leucina en el codón 1587, ésta no se localiza en ningún dominio funcional de la proteína, se encuentra entre los dominios SCDs y BRCT. La naturaleza de la cadena lateral de la serina la hace ser un aminoácido polar sin carga completa, capaz de interactuar con el agua y formar puentes de hidrógeno; su intercambio por leucina, aminoácido no polar, produce un cambio en sus propiedades químicas que puede conllevar a un arreglo en su estructura secundaria para disminuir su interacción con el agua así como de otras moléculas con átomos electronegativos.

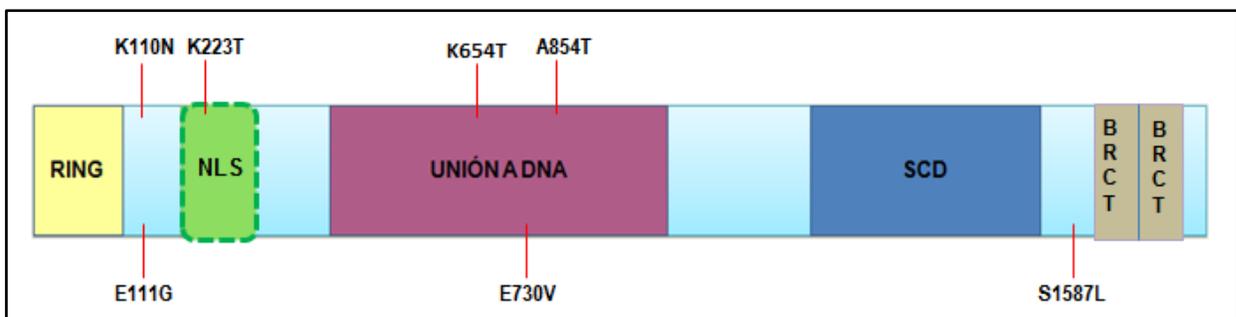


Figura 10. Localización de VUS de sentido erróneo encontradas en el grupo esporádico a nivel de la proteína BRCA1. Se identificaron cuatro VUS fuera de los dominios funcionales y tres VUS formando parte del dominio de unión a DNA. NLS: Señal de localización nuclear. SCD: Cluster de Serina-Treonina.

Tabla 6. VUS en *BRCA1* no reportadas previamente y su impacto funcional de acuerdo a resultados de análisis *in silico* en pacientes mexicanos con síndrome de cáncer de mama/ovario hereditario (grupo hereditario).

GEN	EXO N	MUTACIÓN EN DNA	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	FRECUENCIA % (N=81)	Poly Phen 2 SCORE	Patogenicidad	PROVEAN (SIFT) SCORE	Patogenicidad
BRCA1	7	g.21225G>A	A102T	1.23	0.985	PROBABLE DAÑINA	-0.371	NEUTRAL
BRCA1	7	g.21250A>T	K110M	1.23	0.999	PROBABLE DAÑINA	-0.748	NEUTRAL
BRCA1	7	g.21298A>G	Q126R	1.23	0.956	POSIBLE DAÑINA	-0.561	NEUTRAL
BRCA1	7	g.21343A>G	E141G	1.23	0.495	POSIBLE DAÑINA	-0.937	NEUTRAL
BRCA1	9	g.28202T>C	D185D	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA1	9	g.28220T>C	V191V	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA1	11	g.30913A>G	R320R	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA1	11	g.31040A>G	N363D	1.23	0.014	BENIGNA	-2.296	NEUTRAL
BRCA1	11	g.31236A>G	K428R	1.23	0.998	PROBABLE DAÑINA	-2.843	DELETEREA
BRCA1	11	g.31437A>G	E495G	1.23	0.707	POSIBLE DAÑINA	-5.962	DELETEREA
BRCA1	11	g.31914A>C	K654T	4.93	0.000	BENIGNA	-0.100	NEUTRAL
BRCA1	11	g.2237A>G	R762G	1.23	0.075	BENIGNA	-5.736	DELETEREA
BRCA1	11	g.32738T>C	F929L	1.23	0.078	BENIGNA	-3.248	DELETEREA
BRCA1	11	g.33353G>A	E1134K	1.23	0.947	POSIBLE DAÑINA	-3.290	DELETEREA
BRCA1	11	g.33446T>C	F1165L	1.23	0.975	PROBABLE DAÑINA	-5.099	DELETEREA
BRCA1	11	g.33484T>A	F1177L	1.23	1.000	PROBABLE DAÑINA	-4.922	DELETEREA
BRCA1	11	g.33485A>G	S1178G	1.23	0.039	BENIGNA	-2.689	DELETEREA
BRCA1	11	g.33619G>A	E1222E	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA1	11	g.33985T>A	D1344E	1.23	0.002	BENIGNA	-0.704	NEUTRAL
BRCA1	11	g.34048A>T	L1365F	1.23	0.947	POSIBLE DAÑINA	-0.611	NEUTRAL
BRCA1	16	g.54529G>T	V1653V	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA1	16	g.54538C>T	G1656G	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA1	20	g.68377T>C	V1741A	1.23	0.098	BENIGNA	-0.727	NEUTRAL
BRCA1	22	g.76349T>C	F1798L	1.23	0.60	POSIBLE	-0.456	NEUTRAL

A1					8	DAÑINA		
BRC	23	g.77804G>A	V1810	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
A1			V					
BRC	24	g.79788C>T	I1858I	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
A1								

g.: secuencia genómica. SIN: sinónima

A diferencia del grupo esporádico, el número de VUS de *BRCA1* encontradas dentro del grupo de cáncer de mama y ovario hereditario sin previo reporte fue mucho mayor (Tabla 6), encontrándose 26 variantes que el programa SIFT catalogó como: 18 neutrales y 8 deletéreas, mientras que PolyPhen-2 las dividió en 8 sinónimas, 7 benignas, 6 posiblemente dañinas y 5 probablemente dañinas. Cada una de las VUS de este grupo fue localizada en un sólo paciente diferente, a excepción de la K654T, que se encontró en 4.

La primera variante enlistada, A102T y clasificada por PP-2 como probablemente dañina y por SIFT como neutral, no se sitúa en un dominio funcional, pero se encuentra a 6 aminoácidos de distancia del inicio del dominio RING. Alanina es un aminoácido no polar, mientras que treonina es un aminoácido polar sin carga, por lo que cambiaría la conformación de la proteína al exhibir ahora este aminoácido capaz de formar interacciones electrostáticas e interactuar con el agua.

K110M se clasificó como probablemente dañina y neutral, no se localiza en un dominio funcional, aunque se encuentra a 14 aminoácidos de distancia del final del dominio RING. Se muta una lisina, aminoácido polar con carga positiva por una metionina, aminoácido no polar, esto tiene como consecuencia un cambio en la polaridad del residuo, por lo que se disminuiría su exposición al agua.

Q126R catalogada como posiblemente dañina y neutral, no cae en un dominio funcional de la proteína, y el cambio de aminoácido pasa de ser de un polar sin carga a un polar con carga positiva.

E141G clasificada como probablemente dañina y neutral, no se localiza en un dominio funcional, se encuentra entre RING y la NLS. El glutamato es un aminoácido polar con carga negativa mientras que la glicina es no polar, esta mutación también cambia la polaridad.

N363D no cae en un dominio funcional, pero sí cambia las características del aminoácido, pasa de ser un polar sin carga a un polar con carga negativa; sin

embargo el área de ambos es muy parecida, siendo un poco mayor la del aminoácido original(Ellington and Cherry 2001). Se clasifica como benigna y neutral.

K428R fue una de las VUS clasificada como probablemente dañina y deletérea para ambos programas a pesar de que no se encuentra en un dominio funcional, está a 24 aminoácidos de distancia del sitio de unión a DNA; y el cambio de aminoácido deja a uno con las mismas características químicas que el original, siendo ambos polares y con carga positiva; espacialmente, la arginina ocupa un área mayor que la lisina(Ellington and Cherry 2001).

E495G se clasifica como posiblemente dañina y deletérea; sin embargo, esta VUS sí forma parte del dominio de unión a DNA y las características de ambos aminoácidos sí difieren, siendo el original un aminoácido polar con carga negativa y la mutación, una glicina no polar. Debido a la sencillez de la cadena lateral de la glicina, éste aminoácido ocupa un área mucho menor a la del original(Ellington and Cherry 2001).

K654T, como se mencionó antes, se encontró también en el grupo esporádico, aunque con una menor frecuencia, encontrándose aquí en 4 pacientes. Se clasificó como benigna y neutral.

R762G resultó ser benigna para PP-2 y deletérea para SIFT, se localiza dentro del dominio de unión a DNA y cambia de un aminoácido polar cargado positivamente a un no polar.

F929L se etiquetó como deletérea y neutral. Se localiza dentro del dominio de unión a DNA y el cambio de aminoácido deja a otro con las mismas propiedades, ambos no son polares; sin embargo, el aminoácido original es aromático y el mutado no, y su área es un 20% menor a la fenilalanina (Ellington and Cherry 2001).

E1134K obtuvo una clasificación de posiblemente dañina y deletérea, aun cuando esta VUS no cae en ningún dominio, pero sí cambia de un aminoácido polar cargado negativamente a uno cargado positivamente. Espacialmente, su área es prácticamente igual(Ellington and Cherry 2001).

F1165L no se encuentra en un dominio y se sustituye un aminoácido aromático no polar por uno que tampoco lo es, no obstante se clasificó como probablemente dañina y deletérea.

F1177L es la única VUS de *BRCA1* que PP-2 clasificó como probablemente dañina con una puntuación de 1.000, además de ello, SIFT también la clasificó como deletérea; sin embargo, no se encuentra dentro de ningún dominio funcional sino que está entre el dominio de unión a DNA y el SCD. En cuanto al cambio de aminoácidos, ambos son no polares, aunque el primero es aromático y el segundo no.

S1178G es benigna para PP-2 y deletérea para SIFT, no se localiza en un dominio y la mutación hace que el aminoácido polar sin carga pase a ser un no polar.

D1344E se localiza dentro del dominio SCD, el cambio deja a un nuevo aminoácido con las mismas propiedades químicas que el original, ya que ambos son polares cargados negativamente. Se clasifica como benigna y neutral.

L1365F se cataloga como posiblemente dañina y neutral, cae en el dominio SCD y pasa de ser un aminoácido no polar a uno igual pero con un anillo aromático.

V1741A se localiza en el dominio BRCT, y ambos aminoácidos, tanto el original como el nuevo son no polares, diferenciándose en que el aminoácido original tiene como cadena lateral un isopropilo y el mutado un metilo. Se etiquetó como benigna y neutral.

F1798L se cataloga como posiblemente dañina y neutral, se localiza en el dominio BRCT y se deja a un aminoácido con las mismas propiedades que el original, ambos siendo no polares.

Las VUS sinónimas que se encontraron en este grupo son D185D, V191V, R320R, E1222E, V1653V, G1656G, V1810V e I1858I, las últimas 3 son las que se localizan en un dominio funcional, en el BRCT.

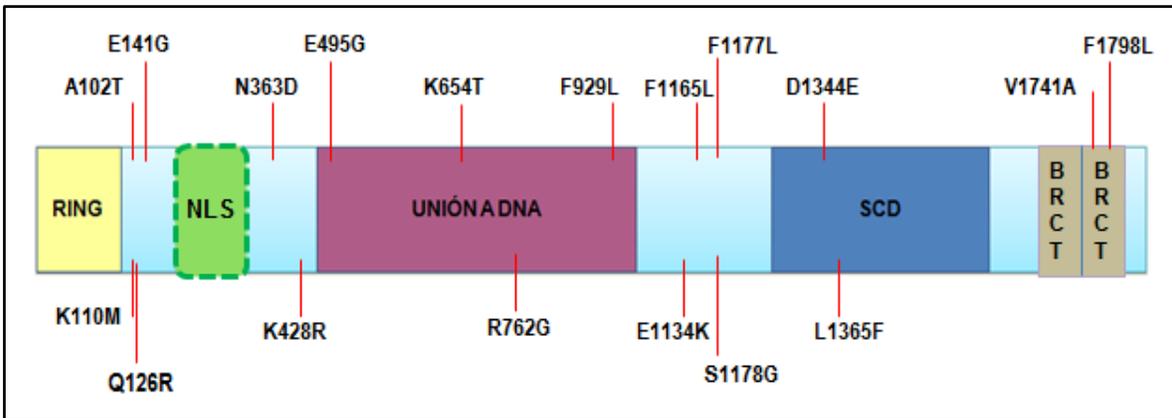


Figura 11. Localización de VUS de sentido erróneo encontradas en el grupo hereditario a nivel de la proteína BRCA1. Se identificaron diez VUS fuera de los dominios funcionales y ocho VUS formando parte de dominios de la proteína: cuatro en el dominio de unión a DNA, dos en el dominio SCD y dos en el dominio BRCT.

NLS: Señal de localización nuclear. SCD: Cluster de Serina-Treonina.

Tabla 7. VUS en BRCA2 no reportadas previamente y su impacto funcional de acuerdo a resultados de análisis *in silico* en pacientes mexicanos con cáncer de mama (grupo esporádico).

GEN	EX ON	MUTACIÓN EN DNA	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	FRECUENCIA % N=79	PolyPh en SCORE	Patogenicidad	PROVEAN SCORE (SIFT)	Patogenicidad
BRCA2	9	g.15541T>A	A261A	1.26	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA2	10	g.16993A>C	I332L	3.79	0.131	BENIGNA	-0.342	NEUTRAL
BRCA2	10	g.17113A>C	D381N	1.26	0.144	BENIGNA	-0.950	NEUTRAL
BRCA2	10	g.17805A>T	G602G	7.59	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA2	10	g.17812A>C	I605L	11.39	0.002	BENIGNA	-0.116	NEUTRAL
BRCA2	11	g.21711A>C	K945N	2.53	0.006	BENIGNA	-2.293	NEUTRAL
BRCA2	11	g.21833A>C	N986T	8.86	0.910	POSIBLE DAÑINA	-3.807	DELETERA
BRCA2	11	g.22736A>C	N1287T	3.79	0.728	POSIBLE DAÑINA	-3.344	DELETERA
BRCA2	11	g.23040T>G	T1388T	6.32	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA2	11	g.24459A>C	K1861N	2.53	0.223	BENIGNA	-3.549	DELETERA
BRCA2	11	g.25358A>G	D2161G	1.26	0.005	BENIGNA	-1.332	NEUTRAL
BRCA2	11	g.25450A>C	M2192L	1.26	0.007	BENIGNA	-0.462	NEUTRAL
BRCA2	11	g.25477T>A	S2201T	1.26	0.759	POSIBLE DAÑINA	-0.523	NEUTRAL
BRCA2	13	g.31360A>G	D2317G	1.26	1.000	PROBABLE DAÑINA	-1.868	NEUTRAL
BRCA2	14	g.39518T>C	F2382I	1.26	0.483	POSIBLE DAÑINA	-1.166	NEUTRAL
BRCA2	14	g.39551A>C	M2393L	3.79	0.031	BENIGNA	-0.563	NEUTRAL
BRCA2	14	g.39656T>G	L2428V	1.26	0.134	BENIGNA	-0.520	NEUTRAL
BRCA2	18	g.47953A>G	R2744G	1.26	0.996	PROBABLE DAÑINA	-1.875	NEUTRAL
BRCA2	22	g.64023A>C	K2980N	5.06	0.848	POSIBLE DAÑINA	-1.216	NEUTRAL
BRCA2	22	g.64029A>C	K2982N	13.92	0.990	PROBABLE DAÑINA	-1.012	NEUTRAL
BRCA2	23	g.64414A>C	T3033P	3.79	1.000	PROBABLE DAÑINA	-1.584	NEUTRAL
BRCA2	24	g.64656G>A	V3082V	2.53	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA2	25	g.79431A>G	N3160D	1.26	0.619	POSIBLE DAÑINA	-1.271	NEUTRAL

BRCA 2	25	g.79444A>C	N3164T	2.53	0.433	BENIGNA	-1.311	NEUTRAL
BRCA 2	27	g.83282A>C	K3416N	1.26	0.002	BENIGNA	0.101	NEUTRAL

g.: secuencia genómica. SIN: sinónima

En *BRCA2* se encontraron 25 VUS dentro del grupo de cáncer de mama esporádico (Tabla 7); la mayoría fueron agrupadas como benignas o neutrales de acuerdo al programa utilizado y sólo tres se etiquetaron como deletéreas y cuatro como probablemente dañinas, no obstante, las VUS que etiquetó SIFT como deletéreas, no fueron las que etiquetó PP-2 como probablemente dañinas, por lo que los programas no coincidieron en la “patogenicidad” de esas VUS.

De las 25 VUS identificadas, se encontraron cuatro sinónimas (A261A, G602G, T1388T y V3082V), y sólo una de ellas se localiza en un dominio, en la segunda región OB de dominio de unión a DNA. Cuatro de las VUS encontradas en este grupo, también se encontraron en el grupo hereditario.

Llevando el orden de la tabla 7 y excluyendo a las mutaciones sinónimas, la primer VUS identificada es I332L, que se encontró en tres pacientes y se catalogó como benigna y neutral por los programas computacionales utilizados. Esta VUS no se encuentra en un dominio funcional de la proteína, y el cambio de aminoácido deja a otro con las mismas características, siendo ambos no polares.

D381N también se clasificó como benigna y neutral, no se localiza en un dominio funcional, y el cambio de aspartato, un aminoácido polar con carga positiva, por una asparagina, aminoácido polar sin carga, podría disminuir las interacciones electrostáticas que pudiera tener con alguna proteína, pero aumentarían los puentes de hidrógeno que pueden formarse. Se identificó sólo en un paciente.

I605L es una de las VUS que se identificó en ambos grupos de pacientes, con una frecuencia mayor en éste que en el hereditario (9 vs 4). Se catalogó como benigna y neutral, no se encuentra formando parte de un dominio funcional y el cambio de aminoácido deja a otro con las mismas propiedades, ambos son no polares.

K945N se identificó en dos pacientes de este grupo y se clasificó como benigna y neutral. Aunque no se encuentra en un dominio funcional, tiene una cercanía de

57 aminoácidos con la primer copia BRC. El aminoácido original es una lisina polar cargada negativamente y la mutación deja a una asparagina polar sin carga.

N986T es otra de las VUS que se identificó en ambos grupos de pacientes, también manejando una frecuencia mayor en este grupo que en el otro (7 vs 3). Se catalogó como posiblemente dañina y deletérea, no se localiza en un dominio y hay un cambio de aminoácido por otro con las mismas propiedades que el aminoácido original, ambos siendo polares sin carga.

N1287T también se encontró en ambos grupos de pacientes y, de la misma manera, con una mayor frecuencia en este grupo (3 vs 1); también se clasificó como posiblemente dañina y deletérea, aunque tampoco se localiza en un dominio, sino que se encuentra entre la segunda y tercera copia BRC. Sobre las características de los aminoácidos, ambos son polares sin carga.

K1861N sólo se encontró en dos pacientes de este grupo, su clasificación fue la de benigna y deletérea, ésta se localiza en la sexta copia del dominio BRC y va de un aminoácido original que es polar con carga positiva a uno polar sin carga.

D2161G se identificó en un paciente y se clasificó como benigna y neutral, no se localizó en ningún dominio y el aminoácido pasa de ser originalmente uno polar con carga negativa a uno no polar.

M2192L también identificada en un paciente y catalogada como benigna y neutral, no se encontró en un dominio funcional y tanto el aminoácido original como el mutado son no polares.

S2201T se clasificó como posiblemente dañina y neutral, no se encontró en un dominio y ambos aminoácidos, el original y el mutado tienen las mismas propiedades, siendo polares sin carga. Esta VUS sólo se identificó en un paciente.

D2317G fue una de las dos VUS de *BRCA2* de este grupo que fueron clasificadas por el programa PP-2 como probablemente dañinas con una puntuación de 1.000, mientras que SIFT la catalogó como neutral. La mutación no se localizó dentro de un dominio funcional pero las propiedades del aminoácido mutado sí cambian, ya que el aminoácido original era un polar con carga negativa y el mutado es un no polar. Sólo se identificó en un paciente.

F2382I se clasificó como posiblemente dañina y neutral, no cae en dominio funcional y ambos aminoácidos tienen la propiedad de ser no polares; aunque tienen como diferencia que la fenilalanina tiene en su cadena lateral un anillo aromático y la isoleucina no tiene esa estructura. También se encontró sólo en un paciente.

M2393L se clasificó como benigna y neutral y se identificó en tres pacientes, no se localiza dentro de un dominio funcional y tanto el aminoácido original como el mutado comparten la propiedad de ser no polares.

L2428V se clasificó como benigna y neutral y se encuentra a 51 aminoácidos de distancia del inicio del dominio de unión a DNA en la región Helicoidal por lo que no se localiza en un dominio funcional, el cambio de aminoácido deja a otro con las mismas propiedades pues ambos aminoácidos son no polares. La mutación sólo se identificó en un paciente.

R2744G se catalogó como probablemente dañina y neutral y se identificó en un paciente. Esta VUS sí forma parte del dominio de unión a DNA en la región OB, y pasó de ser un aminoácido polar cargado positivamente a uno no polar.

K2980N se identificó en cuatro pacientes y se clasificó como posiblemente dañina y neutral, también forma parte del dominio de unión a DNA pero en la región TOB, y el cambio de aminoácido tiene como consecuencia un cambio en la carga del aminoácido, siendo el original un aminoácido polar con carga positiva y el mutado un aminoácido sin carga.

K2982N se identificó en 11 pacientes y forma parte de las VUS que se encontraron tanto en el grupo esporádico como en el hereditario. Se clasificó como probablemente dañina y neutral, y, al igual que la VUS anterior, forma parte del dominio de unión a DNA en la región TOB, y pasa de ser un aminoácido polar con carga positiva a uno polar sin carga.

T3033P fue la segunda VUS encontrada en este grupo que fue catalogada por PP-2 como probablemente dañina con un puntaje de 1.000 y neutral por SIFT, se identificó en tres personas y también se localiza en el dominio de unión a DNA en la región TOB; el cambio de aminoácido modifica las propiedades del original, ya que treonina es polar sin carga y prolina es no polar, además, debido a que la

cadena lateral de la prolina está formada por una estructura cerrada, se provoca una reducción en la flexibilidad estructural en esta región, que también pudiera ser un impedimento para unirse al DNA.

N3160D se identificó en un paciente y se clasificó como posiblemente dañina y neutral, también se localiza en el dominio de unión a DNA pero en la segunda región denominada OB; la mutación tiene como consecuencia un cambio de un aminoácido polar sin carga a uno polar con carga negativa.

N3164T se clasificó como benigna y neutral, y también forma parte del dominio de unión a DNA al localizarse en la segunda región OB, y el cambio de aminoácido deja a otro con las mismas propiedades que el original, ambos siendo polares sin carga. Esta VUS se encontró en dos pacientes.

K3416N se catalogó como benigna y neutral y sólo se encontró en un paciente. En cuanto a sus características, no forma parte de un dominio y el cambio de aminoácido tiene como consecuencia una modificación en las propiedades químicas, teniendo antes a un aminoácido polar con carga positiva y ahora a uno polar sin carga.

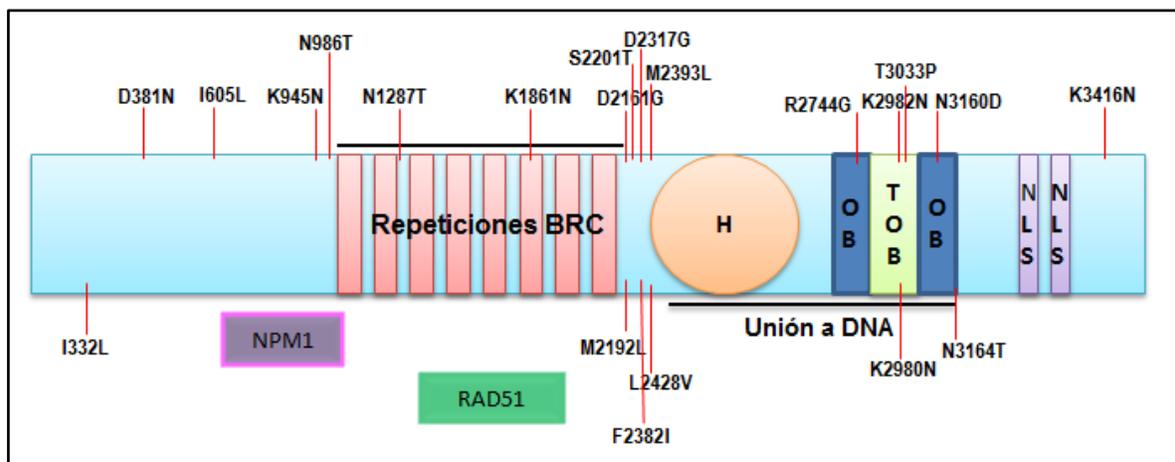


Figura 12. Localización de VUS de sentido erróneo encontradas en el grupo esporádico a nivel de la proteína BRCA2. Se encuentran 14 VUS fuera de los dominios funcionales, mientras que una se encontró en la sexta repetición BRC, y seis en el dominio de unión a DNA.

NLS: Señal de localización nuclear.

Tabla 8. VUS en BRCA2 no reportadas previamente y su impacto funcional de acuerdo a resultados de análisis *in silico* en pacientes mexicanos con síndrome de cáncer de mama/ovario hereditario (grupo hereditario).

GEN	EXON	MUTACIÓN EN DNA	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	FRECUENCIA % (N=81)	PolyPhen2 SCORE	Patogenicidad	PROVEAN (SIFT) SCORE	Patogenicidad
BRCA2	7	g.11108C>T	P202L	1.23	1.000	PROBABLE DAÑINA	-2.521	DELETEREA
BRCA2	9	g.15515A>G	S253G	1.23	0.118	BENIGNA	-0.658	NEUTRAL
BRCA2	9	g.15535A>G	R259R	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA2	10	g.16993A>C	I332L	1.23	0.131	BENIGNA	-0.342	NEUTRAL
BRCA2	10	g.17052A>C	K351N	4.93	0.651	POSIBLE DAÑINA	-0.643	NEUTRAL
BRCA2	10	g.17565T>C	G522G	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA2	10	g.17592A>C	K531N	1.23	0.118	BENIGNA	-0.433	NEUTRAL
BRCA2	10	g.17707A>G	N570D	1.23	0.023	BENIGNA	-0.472	NEUTRAL
BRCA2	10	g.17812A>C	I605L	4.93	0.002	BENIGNA	-0.116	NEUTRAL
BRCA2	11	g.21069A>G	E731E	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA2	11	g.21833A>C	N986T	3.70	0.910	POSIBLE DAÑINA	-3.807	DELETEREA
BRCA2	11	g.22371T>C	H1165H	1.23	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA2	11	g.22529G>C	G1218A	13.6	1.000	PROBABLE DAÑINA	-5.666	DELETEREA
BRCA2	11	g.22530C>G	G1218G	12.3	SIN	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA2	11	g.22736A>C	N1287T	1.23	0.728	POSIBLE DAÑINA	-3.344	DELETEREA
BRCA2	11	g.23099A>G	Q1408R	1.23	0.9333	POSIBLE DAÑINA	-2.966	DELETEREA
BRCA2	11	g.23823A>G	K1649K	1.23	0.000	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
BRCA2	11	g.23831C>T	A1652V	1.23	0.005	BENIGNA	-0.309	NEUTRAL
BRCA2	11	g.23867T>G	I1664S	1.23	0.010	BENIGNA	-3.212	DELETEREA
BRCA2	11	g.23984A>G	E1703G	1.23	0.016	BENIGNA	-4.056	DELETEREA
BRCA2	11	g.24073T>C	S1733P	1.23	0.159	BENIGNA	-3.287	DELETEREA
BRCA2	11	g.24818C>T	A1981V	1.23	1.000	PROBABLE DAÑINA	-3.927	DELETEREA
BRCA2	11	g.24934G>A	E2220K	1.23	0.647	POSIBLE DAÑINA	-1.073	NEUTRAL
BRCA2	16	g.42280T>C	V2545	1.23	0.000	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL

2			V					
BRCA	16	g.42285A>G	K2547	1.23	0.935	POSIBLE	-0.862	NEUTRAL
2			R			DAÑINA		
BRCA	18	g.47971A>C	K2750	1.23	1.000	PROBABL	-1.189	NEUTRAL
2			Q			E DAÑINA		
BRCA	20	g.55591A>G	K2868	1.23	0.998	PROBABL	-1.173	NEUTRAL
2			E			E DAÑINA		
BRCA	21	g.61193A>G	N2879	1.23	0.013	BENIGNA	-0.342	NEUTRAL
2			D					
BRCA	22	g.64016C>T	S2978	1.23	0.039	BENIGNA	-0.940	NEUTRAL
2			L					
BRCA	22	g.64029A>C	K2982	4.93	0.990	PROBABL	-1.012	NEUTRAL
2			N			E DAÑINA		
BRCA	23	g.64334A>G	Y3006	1.23	0.999	PROBABL	-2.376	NEUTRAL
2			C			E DAÑINA		
BRCA	23	g.64410A>G	K3031	1.23	0.000	SINÓNIMA	0.000	NEUTRAL
2			K					
BRCA	23	g.64432C>T	P3039	1.23	0.138	BENIGNA	-1.729	NEUTRAL
2			S					
BRCA	26	g.81458A>G	M3181	1.23	0.010	BENIGNA	-0.393	NEUTRAL
2			V					
BRCA	27	g.82911G>A	A3293	1.23	0.997	PROBABL	-1.161	NEUTRAL
2			T			E DAÑINA		
BRCA	27	g.83073A>G	I3347V	1.23	ERRO	ERROR	-0.290	NEUTRAL
2					R			

g.: secuencia genómica. SIN: sinónima

En cuanto a las 36 VUS de *BRCA2* identificadas en el grupo de pacientes con cáncer de mama/ovario hereditario, el programa SIFT catalogó a 27 de ellas como neutrales y a nueve como deletéreas, mientras que PP-2 las clasificó como 13 benignas, seis posiblemente dañinas, ocho probablemente dañinas, ocho sinónimas y un error.

Las VUS sinónimas fueron R259R, G522G, E731E, H1165H, G1218G, K1649K, V2545V y K3031K. G1218G segunda copia BRC, V2545V en dominio de unión a DNA en H, y K3031K en dominio de unión a DNA en TOB.

La primer variante en este grupo es P202L, que se identificó en un paciente y se clasificó como probablemente dañina y deletérea, es una de las cuatro VUS a las que PP-2 dio un puntaje de 1.000; aunque no forma parte de un dominio y tanto las características del aminoácido original como las del mutado son las mismas, ya que ambos tienen la propiedad de ser no polares.

S253G se identificó en una sola persona y se clasificó como benigna y neutral, no se localizó en un dominio y se cambió un aminoácido polar sin carga por uno no polar cuya cadena lateral sólo está constituida por un hidrógeno.

I332L también se identificó en un paciente y se clasificó como benigna y neutral, no se encontró en un dominio y tanto el aminoácido original como el ahora mutado tienen las mismas propiedades hidrofóbicas.

K351N se encontró en cuatro pacientes y se catalogó como posiblemente dañina y neutral, no forman parte de un dominio y las propiedades del aminoácido original cambian, pasando de una lisina que es polar con carga positiva a una asparagina polar sin carga.

N570D también se clasificó como benigna y neutral, no se localizó en un dominio y pasa de ser un aminoácido polar sin carga a uno polar con carga negativa. Sólo se encontró en un paciente.

I605L como se mencionó en el grupo esporádico, es una de las cuatro VUS de BRCA2 sin previo reporte que se identificaron en ambos grupos y se catalogó como benigna y neutral. En este grupo se identificó en cuatro pacientes.

N986T también forma parte de las VUS identificadas tanto en el grupo esporádico como en el hereditario, y se clasificó como posiblemente dañina y deletérea. Dentro del grupo hereditario se encontró en tres pacientes.

G1218A se clasificó como probablemente dañina con una puntuación de 1.000 y deletérea, esta VUS forma parte de la segunda copia BRC y tanto la glicina como la alanina comparten las mismas propiedades, ambos siendo no polares. Fue identificada en 11 pacientes.

N1287T es la tercera VUS que se encuentra en ambos grupos de pacientes, con sólo un paciente en el grupo hereditario. Se clasificó como posiblemente dañina y deletérea.

Q1408R se identificó en un paciente y se clasificó como posiblemente dañina y deletérea. Se localizó a 10 aminoácidos de distancia del inicio de la tercera copia BRC, y cambia de un aminoácido polar sin carga a uno polar con carga positiva, además aumenta la superficie del aminoácido nuevo en un 25%.

A1652V se clasificó como benigna y neutral y se encontró en un paciente. Se situó a 12 aminoácidos de distancia de la quinta repetición BRC y tanto alanina como valina se clasifican como no polares.

I1664S se identificó en un paciente y se clasificó como benigna y deletérea. Esta VUS forma parte de la quinta repetición BRC siendo el primer aminoácido de ésta, la mutación cambia las propiedades del aminoácido de uno no polar a uno polar sin carga.

E1703G se encontró en un paciente y también se clasificó como benigna y deletérea; en cuanto a su localización, no forma parte de un dominio y el cambio de aminoácido tiene como consecuencia una modificación en la polaridad, ya que glutamato es un aminoácido polar con carga negativa y glicina es no polar, además de esto, espacialmente disminuye su área (Ellington and Cherry 2001) a menos de la mitad debido a que glicina es el aminoácido más sencillo y su cadena lateral solo está formada por un hidrógeno.

S1733P se identificó en un paciente y se clasificó como benigna y deletérea. No se localiza en un dominio y el aminoácido original que era polar sin carga ahora es un no polar.

A1981V es la tercera VUS de *BRCA2* en este grupo que PP-2 clasificó como probablemente dañina con un puntaje de 1.000, además SIFT también la clasificó como deletérea. Se encuentra formando parte de la séptima repetición de BRC, y tanto el aminoácido original como el ahora mutado tienen la característica de ser no polares. Sólo fue identificada en un paciente.

E2220K se encontró en un paciente y se clasificó como posiblemente dañina y neutral. No se localiza en un dominio funcional y se da un cambio de aminoácido polar con carga negativa a uno polar con carga positiva.

K2547R se identificó en un paciente y se catalogó como posiblemente dañina y neutral. Forma parte del dominio de unión a DNA por localizarse en la región helicoidal o H y tanto la lisina como la arginina son aminoácidos polares con carga positiva.

K2750Q se encontró en un paciente y se clasificó como probablemente dañina y neutral. Se localiza en la región OB que forma parte del dominio de unión a DNA y la mutación hace que el aminoácido original pase de un polar con carga positiva a un polar sin carga.

K2868E se identificó en un paciente y se clasificó como probablemente dañina y neutral y se localiza en la región TOB que forma parte del dominio de unión a DNA; como consecuencia de la mutación se cambió de un aminoácido polar con carga positiva a uno polar con carga negativa.

N2879D se identificó en un paciente y se clasificó como benigna y neutral. Se localiza en la región TOB que forma parte del dominio de unión a DNA y la mutación tuvo como consecuencia un cambio de un aminoácido polar sin carga a uno polar con carga negativa.

S2978L se encontró en un paciente y se clasificó como benigna y neutral. Se ubicó en la región TOB que se encuentra dentro del dominio de unión a DNA; la mutación hace que la serina, que es un aminoácido polar sin carga, se transforme en leucina, que es un aminoácido no polar.

K2982N es la última VUS que se identificó tanto en el grupo esporádico como en el hereditario, en el cual se encontró en cuatro pacientes. Su clasificación fue la de probablemente dañina y neutral y se localizó en la región TOB que forma parte del dominio de unión a DNA, la mutación tuvo como consecuencia que un aminoácido pasara de ser polar con carga positiva a polar sin carga.

Y3006C se identificó en un paciente y se clasificó como probablemente dañina y neutral, no se localiza dentro de un dominio funcional y tanto la tirosina como la cisteína son aminoácidos polares sin carga; no obstante el segundo no es aromático y el original sí.

P3039S se identificó en un paciente y se clasificó como benigna y neutral, se localizó en la región TOB que forma parte del dominio de unión a DNA y el cambio de aminoácido deja a otro con una propiedad diferente, ya que la prolina es no polar y la serina es polar sin carga.

M3181V se identificó en un paciente y se clasificó como benigna y neutral, se localiza fuera de los dominios de la proteína y la mutación deja a un nuevo aminoácido que mantiene las propiedades químicas del original, siendo ambos no polares.

A3293T se identificó en un paciente y se clasificó como probablemente dañina y neutral. Sobre su localización, no se encuentra dentro de un dominio funcional y la

mutación deja a otro aminoácido con propiedades distintas al original, cambiando de uno no polar a uno polar sin carga.

I3347V se identificó en un paciente y por parte de SIFT obtuvo la clasificación de neutral y por PP-2 no obtuvo clasificación, ya que señaló un error. No se localizó dentro de un dominio funcional y tanto el aminoácido original como el nuevo tienen la propiedad de ser no polares.

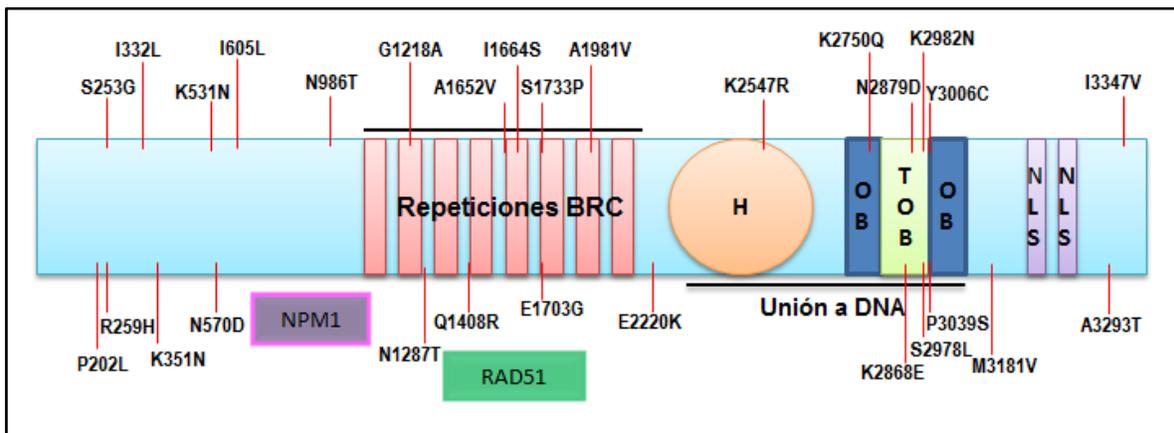


Figura 13. Localización de VUS de sentido erróneo encontradas en el grupo hereditario a nivel de la proteína BRCA2. Se identifican 16 VUS fuera de los dominios funcionales y cinco VUS en las repeticiones BRC y ocho en el dominio de unión a DNA.

Ninguna de las VUS, tanto del grupo esporádico como del grupo hereditario, se localizaron en aminoácidos que fueran fosforilados (Tram, Savas et al. 2013).

Después de conocer los resultados de los análisis *in silico*, las propiedades de los aminoácidos mutados y la localización de cada una de las VUS en la proteína, se seleccionó a las VUS que fueron catalogadas como probablemente dañinas y deletéreas por ambos programas computacionales, siendo siete (Tabla 9), seis del grupo de cáncer hereditario y una del esporádico.

Tabla 9. VUS dañinas de acuerdo a resultados de PP-2 y SIFT.

GEN	MUTACIÓN EN DNA	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	PROPIEDAD DE AMINOÁCIDOS	CONSERVACIÓN EN SECUENCIAS HOMÓLOGAS	LOCALIZACIÓN EN DOMINIO FUNCIONAL.	GRUPO AL QUE PERTENECE	# DE PACIENTES EN DONDE ESTÁ.
BRCA1	g.32142A>T	E730V	POLAR (-)/NO POLAR	POCO CONSERVADA	UNIÓN A DNA	E	5
BRCA1	g.31236A>G	K428R	POLAR (+)/POLAR (+)	CONSERVADA	NO	H	1
BRCA1	g.33446T>C	F1165L	NO POLAR/NO POLAR	CONSERVADA. SÍ HAY SECUENCIAS CON L.	NO	H	1
BRCA1	g.33484T>A	F1177L	NO POLAR/NO POLAR	MUY CONSERVADA	NO	H	1
BRCA2	g.11108C>T	P202L	NO POLAR/NO POLAR	MUY CONSERVADA	NO	H	1
BRCA2	g.22529G>C	G1218A	NO POLAR/NO POLAR	CONSERVADA	BRC	H	11
BRCA2	g.24818C>T	A1981V	NO POLAR/NO POLAR	MUY CONSERVADA	BRC	H	1

g.: secuencia genómica. E: Esporádico. H: Hereditario.

Si se pretendiera hacer análisis funcionales con las VUS encontradas en este trabajo, de acuerdo a lo observado, la VUS que parece tener mayores probabilidades de tener un efecto adverso en la función de la proteína, y por lo tanto para el desarrollo de cáncer de mama en un paciente sería A1981V de BRCA2 (identificada en un paciente del grupo hereditario), ya que aun cuando las características del aminoácido original y del mutado son las mismas, de acuerdo a los alineamientos realizados por los programas, la alanina en la posición 1981 de BRCA2 es un aminoácido muy conservado, tanto que no se encontró otro aminoácido en ninguno de los alineamientos realizados, por lo que se puede

considerar que este residuo es importante para realizar la función correcta de la proteína y por eso se ha conservado a través de la evolución (Miller and Kumar 2001; Ng and Henikoff 2001; Yang and Nielsen 2002), además, esta VUS se encuentra formando parte de la séptima copia del dominio funcional BRC, importante para el reconocimiento de RAD51, con la que forma un dímero y se une a la región dañada del DNA cuando ocurre un rompimiento de doble cadena (Davies, Masson et al. 2001).. Esta función, puede considerarse importante para el buen mantenimiento del genoma, debido a que está involucrada con los primeros pasos para el proceso de reparación de DNA por recombinación homóloga (Mizuta, LaSalle et al. 1997) y, de ser dañada, el proceso de reparación podría fallar, llevando a mantener mutaciones en el sistema que pudieran desregular el proceso de crecimiento normal de una célula, lo que eventualmente pudiera causar el desarrollo de un tumor.

Sin embargo, de acuerdo a las características observadas, se consideró importante seleccionar a otro grupo de VUS que aunque no fueron identificadas por ambos programas como dañinas o deletéreas, sí presentan motivos para creer que puedan serlo (Tabla 10). Las siete VUS de este grupo se localizan en un dominio funcional de la proteína en cuestión, se identificaron en pocos pacientes y el cambio de aminoácido cambia la polaridad del residuo; aunque la conservación a lo largo de la evolución es variable de acuerdo a la VUS.

Si se pretendieran iniciar estudios funcionales en base a estas características, la VUS con la que se iniciaría sería T3033P, encontrada en tres pacientes del grupo esporádico en *BRCA2*, ya que la mutación dio como resultado el cambio de un aminoácido polar a uno no polar, la secuencia se encuentra muy conservada, la mutación se localiza en el dominio de unión a DNA y se catalogó por PP-2 como probablemente dañina con un puntaje de 1.000. Esta mutación, al localizarse dentro del dominio de unión a DNA, que se sabe que sirve para la unión de *BRCA2* con DNA de cadena doble (Roy, Chun et al. 2012), podría tener como consecuencia un fallo tanto en la detección del DNA dañado, como en su subsecuente reparación, lo que pueda conllevar al incremento de mutaciones (al

no ser reparadas por medio de los mecanismos adecuados) que dañen los procesos de desarrollo y regulación celular.

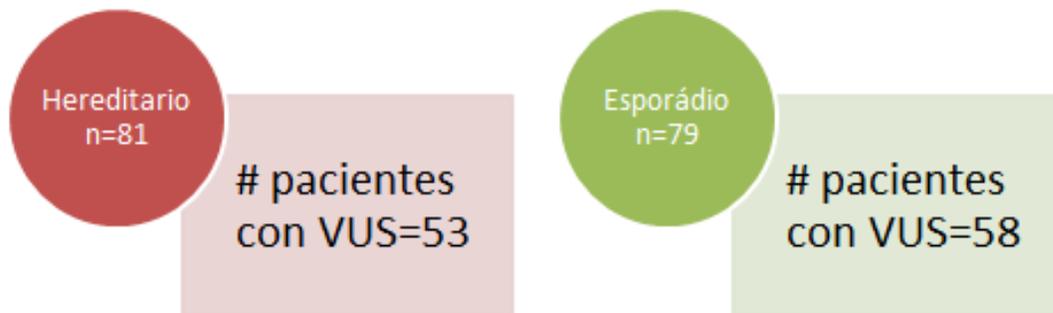
Tabla 10. VUS con características probablemente patogénicas aun cuando no fueron predichas de esta forma por ambos programas.

GEN	MUTACIÓN EN DNA	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	PROPIEDAD DE AMINOÁCIDOS	CONSERVACIÓN EN SECUENCIAS HOMÓLOGAS	LOCALIZACIÓN EN DOMINIO FUNCIONAL.	GRUPO AL QUE PERTENECE	# DE PACIENTES EN EL QUE ESTÁ
BRCA1	g.32513G>A	A854T	NO POLAR/ POLAR	MUY POCO CONSERVADA. MAYORÍA DE SECUENCIAS CON T.	UNIÓN A DNA	E	1
BRCA1	g.31437A>G	E495G	POLAR(+)/ NO POLAR	POCO CONSERVADA. SÍ HAY SECUENCIAS CON G.	UNIÓN A DNA	H	1
BRCA1	g.2237A>G	R762G	POLAR(+)/ NO POLAR	CONSERVADA. SÍ HAY SECUENCIAS CON G.	UNIÓN A DNA	H	1
BRCA2	g.47953A>G	R2744G	POLAR(+)/ NO POLAR	CONSERVADA.	UNIÓN A DNA	E	1
BRCA2	g.64414A>C	T3033P	POLAR/ NO POLAR	MUY CONSERVADA.	UNIÓN A DNA	E	3
BRCA2	g.23867T>G	I1664S	NO POLAR/ POLAR	CONSERVADA. SÍ HAY SECUENCIAS CON S.	BRC	H	1
BRCA2	g.64432C>T	P3039S	NO POLAR/ POLAR	CONSERVADA. SÍ HAY SECUENCIAS CON S.	UNIÓN A DNA	H	1

g: Secuencia genómica. E: Esporádico. H:Hereditario.

Finalmente, para conocer si existían diferencias estadísticamente significativas entre el número de pacientes de ambos grupos en los que se identificó una VUS (Anexo 1), se realizó una prueba de z; no obstante, los datos encontrados fueron muy similares, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Para BRCA1:



Grupo esporádico vs grupo hereditario.

A pesar de que la diferencia entre el tamaño de muestra manejado entre ambos grupos de pacientes sólo es de dos (H-81 vs E-79), a las personas pertenecientes al grupo de pacientes con cáncer de mama/ovario hereditario se les identificó en total un número mayor de VUS que al de las personas del grupo esporádico, con 105 VUS en el primer grupo y 69 en el segundo.

Recordando que el grupo hereditario está formado por pacientes con criterios clínicos que llevaron a pensar a los genetistas del INCan que podrían tener una mutación deletérea en algún gen de susceptibilidad para el desarrollo de este tipo de cáncer, y tomando en cuenta que en este grupo se encontraron mucho más VUS que en el esporádico, se sospecha que en el grupo hereditario hay una mayor probabilidad de que las VUS encontradas sean realmente patogénicas, sobre todo las que se encuentran en una frecuencia menor, y, las que se encuentran con una frecuencia más alta, pudieran tener un comportamiento neutral; esta última conducta se encuentra en la mayoría de las VUS identificadas en el grupo esporádico a diferencia del hereditario. Además, esta sospecha se ve reforzada tanto por los resultados de los análisis *in silico* (Figura 9) como por la localización de la mayoría de las mutaciones a nivel de la proteína (Figuras 11 y 13), en donde el grupo hereditario presenta un mayor número de VUS sin sentido que el grupo esporádico, teniendo 18 vs 7 VUS en la proteína BRCA1 y 29 vs 21 VUS en la proteína BRCA2; el grupo hereditario también tiene el número mayor de VUS que se encuentran dentro de dominios o lugares importantes para la función de las proteínas, con 8 vs 4 VUS en BRCA1 y 13 vs 7 VUS en BRCA2. No obstante, no se descarta la idea de que dentro del grupo esporádico también existan VUS que sean patogénicas.

Co-ocurrencia de VUS con mutaciones claramente deletéreas.

Si se toma en cuenta la hipótesis de que en *BRCA1* una VUS existente en co-ocurrencia con una variante claramente deletérea puede ser clasificada como neutral (Tavtigian, Samollow et al. 2006), la VUS no reportada P1776P, identificada en el DNA del paciente 113 -que forma parte del grupo esporádico- tendría un criterio más (además de ser sinónima) para clasificarse como no patogénica. El resto de las VUS encontradas en co-ocurrencia con una mutación claramente deletérea en *BRCA1*, ya fueron reportadas en el pasado y, de manera consistente con esta hipótesis, cuatro de ellas fueron interpretadas clínicamente como VUS no patogénicas (Variation Viewer), éstas se mencionan a continuación: P871L, E1038G, K1183R, y S1613G; las otras tres no han sido probadas: S694S, L771L, S1436S.

De la misma forma, con el argumento de co-ocurrencia usado esta vez para el gen *BRCA2*, en cuyo caso se hablaría de pacientes con Anemia de Fanconi (grupo de completación D1), las 24 VUS sin previo reporte S253G, E731E, N986T (identificada en ambos grupos de pacientes), G1218A, G1218G, N1287T (identificada en ambos grupos de pacientes), K1649K, I1664S, E1703G, A1981V, E2220K, S2978L, Y3006C, M3181V, A3293T y I3347V del grupo hereditario, y las T1388T, K1861N, D2161G, M2192L, S2201T, F2382I, R2744G y K3416N del grupo esporádico, serían clasificadas como neutrales, ya que no se tienen registros de que los pacientes que se incluyeron en este estudio fueran diagnosticados con este tipo de anemia. Sin embargo, este análisis debe tomarse con precaución, ya que algunas de estas variantes se localizan en dominios funcionales de la proteína, como G1218A, I1664S, A1981V, S2978L, Y3006C (todas del G.H.), K1861N y R2744G (G.E.) y, de éstas, G1218A y A1981V fueron catalogadas como probablemente dañinas y deletéreas por los 2 programas computacionales utilizados.

Variantes encontradas en ambos grupos.

Las 28 variantes que se identificaron en ambos grupos de pacientes (Tabla 11) se encontraron con una frecuencia mayor en el grupo esporádico, a pesar de que éste estuvo conformado por un número menor de pacientes.

De acuerdo a los análisis *in silico* realizados a las cinco variantes no reportadas previamente (VUS), dos se clasificaron como benigna y neutral (K654T e I605L), dos como posiblemente dañina y deletérea (N986T y N1287T), y una como probablemente dañina y neutral (K2982N); sin embargo, I605L, N986T y N1287T no se localizan dentro de un dominio funcional y el cambio de aminoácido deja a otro con las mismas propiedades que el original, mientras que K654T y K2982N sí forman parte de un dominio, ambas del dominio de unión a DNA de la proteína que conforman, y el cambio de aminoácido deja a otro con características diferentes a la del aminoácido original.

Tomando en cuenta a las 23 variantes compartidas en ambos grupos y que ya han sido reportadas previamente, la mayoría fueron clasificadas como No patogénicas (Variation Viewer) excepto I2490T cuyo resultado arrojado fue No probada, al igual que las variantes que son sinónimas.

Lo anterior da un indicio de que las VUS que se encuentran compartidas en ambos grupos, al igual que las ya reportadas, no producen patogenicidad; no obstante se necesitan ensayos funcionales para confirmarlo. Además, debido a la frecuencia con la que se encontraron, estas VUS podrían ser mutaciones candidatas para ser variantes o polimorfismos de la población mexicana, pero es necesario realizar estudios de casos control para ello.

Tabla 11. Variantes encontradas tanto en el grupo esporádico como en el grupo hereditario y su clasificación de acuerdo a Variation Viewer.

Variante de BRCA1	Clasificación por Variation Viewer	Variante de BRCA2	Clasificación por Variation Viewer
Q356R	No patogénica	N289H	No patogénica
K654T	NR	N372H	Other
D693N	No patogénica	S455S	No probada
S694S	No probada	I605L	NR
L771L	No probada	H743H	No probada
P871L	No patogénica	N986T	NR
E1038G	No patogénica	N991D	No patogénica
S1040N	Other	K1132K	No probada
K1183R	No patogénica	V1269V	No probada
S1436S	No probada	N1287T	NR
S1613G	No patogénica	L1521L	-
		V2171L	-
		S2414S	No probada
		I2490T	No probada
		A2951T	No patogénica
		K2982N	NR
		I3412V	No patogénica

- No se encuentra esta variante dentro de Variation Viewer

Roche 454 vs otras metodologías.

La plataforma de secuenciación masiva utilizada en este trabajo, determinó un amplio número de variantes en los 160 pacientes manejados, observándose que en *BRCA2* se identificó absolutamente en todos los pacientes cuando menos una variante (Anexo 1), mientras que en *BRCA1* a 49 pacientes no se les encontró ninguna (Anexo 1), esto nos puede hablar tanto de la mezcla genética por la que está compuesta la población mexicana (Guardado-Estrada, et al. 2008) como de la sensibilidad de la técnica manejada; no obstante, el número de variantes puede variar de acuerdo a los criterios utilizados, por ejemplo, De Leener *et al.* (2010) utilizaron distintos criterios para filtrar falsos positivos, utilizando una cobertura mínima en la secuenciación de 38x y considerando que las variantes deberían encontrarse como mínimo en 25% de las lecturas, mientras que en este trabajo se utilizó un 30%.

Si se compara la plataforma de Roche 454 contra la plataforma de Illumina, la segunda parece tener mayor sensibilidad (Luo, Tsementzi et al. 2012), por lo que de utilizarla probablemente se obtendría un número de variantes aún mayor que las encontradas aquí; sin embargo, contrastando teóricamente los resultados de la plataforma de Roche 454 contra los de la secuenciación de primera generación, la sensibilidad de Roche 454 es mucho mayor así como el número de lecturas que se pueden tomar, por lo que es una herramienta bastante útil y práctica.

Análisis *in silico* y ensayos funcionales.

A pesar de que los análisis *in silico* han sido una buena herramienta para intentar entender el comportamiento de las VUS, éstas no deben de ser el único criterio tomado en cuenta para la clasificación de las mismas, además, de acuerdo al algoritmo utilizado, el resultado puede variar, clasificando a la misma mutación de diferente manera (Figura 9),ejemplos claros de lo anterior se encontraron en las VUS que fueron clasificadas como probablemente dañinas con un puntaje de 1.000 mientras que en algunas ocasiones ni SIFT, ni el análisis posterior realizado concordaron con esta probabilidad . Es por esto que la mejor manera de identificar la patogenicidad de una variante es por medio de ensayos funcionales, los cuales se realizan de acuerdo a las funciones en las que participa la proteína en cuestión.

CONCLUSIONES

La secuenciación masiva de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en los grupos de pacientes hereditario y esporádico, dio como resultado la identificación de 174 variantes genéticas, las cuales se encuentran distribuidas de la siguiente manera:

En *BRCA1* se encontraron 69 variantes, siendo 23 pertenecientes al grupo de pacientes con cáncer de mama esporádico y 46 pertenecientes al grupo de pacientes con cáncer de mama/ovario hereditario. De éstas, 36 variantes no se han reportado previamente, por lo que se desconoce tanto su impacto funcional como clínico y se consideran VUS.

En *BRCA2* se encontraron 105 variantes, 46 formando parte del grupo de pacientes con cáncer de mama esporádico y 59 del grupo de pacientes con cáncer de mama/ovario hereditario. De las 105, se identificaron 61 variantes sin reporte previo (VUS).

Debido a que 28 variantes se encontraron en los dos grupos de pacientes manejados, el verdadero número total de variantes distintas identificadas es de 146.

De acuerdo a los análisis *in silico* realizados para las 97 VUS sin reporte previo, sólo siete se consideran probablemente patogénicas, sin embargo si se analizan las características sin tomar en cuenta el resultado arrojado por los programas, siete más se suma a la lista. De estas 14 VUS, se consideró como primordiales para realizar análisis funcional a dos, ambas encontradas en *BRCA2*: A1981V y T3033P.

A partir de la información encontrada, es posible conocer con mayor precisión la composición genética de los genes *BRCA1* y *BRCA2* de los pacientes mexicanos con cáncer de mama, lo que permita identificar en un futuro, mediante análisis funcionales, las variantes que se encuentran asociadas al desarrollo de esta enfermedad y con ello el seguimiento de las personas en las que se identifiquen, para así ofrecerles alternativas para la prevención del surgimiento del cáncer de mama y ovario, entre otros.

LITERATURA CITADA

- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, et al. (2010). "A method and server for predicting damaging missense mutations." *Nat Methods* **7**(4): 248-249.
- Alter, B. P., P. S. Rosenberg, et al. (2007). "Clinical and molecular features associated with biallelic mutations in FANCD1/BRCA2." *J Med Genet* **44**(1): 1-9.
- Aprelikova, O. N., B. S. Fang, et al. (1999). "BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(21): 11866-11871.
- Bertwistle, D. and A. Ashworth (1998). "Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes." *Curr Opin Genet Dev* **8**(1): 14-20.
- Bork, P., N. Blomberg, et al. (1996). "Internal repeats in the BRCA2 protein sequence." *Nat Genet* **13**(1): 22-23.
- Botuyan, M. V., Y. Nomine, et al. (2004). "Structural basis of BACH1 phosphopeptide recognition by BRCA1 tandem BRCT domains." *Structure* **12**(7): 1137-1146.
- Boyd, J., Y. Sonoda, et al. (2000). "Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer." *JAMA* **283**(17): 2260-2265.
- Bunyan, D. J., D. M. Eccles, et al. (2004). "Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification." *Br J Cancer* **91**(6): 1155-1159.
- Callebaut, I. and J. P. Mornon (1997). "From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair." *FEBS Lett* **400**(1): 25-30.
- Cantor, S. B., D. W. Bell, et al. (2001). "BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function." *Cell* **105**(1): 149-160.
- Carroll, J. C., C. Cremin, et al. (2008). "Hereditary breast and ovarian cancers." *Can Fam Physician* **54**(12): 1691-1692.
- Cortez, D., Y. Wang, et al. (1999). "Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks." *Science* **286**(5442): 1162-1166.
- Chen, C. F., S. Li, et al. (1996). "The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor." *J Biol Chem* **271**(51): 32863-32868.
- Chen, J., D. P. Silver, et al. (1998). "Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells." *Mol Cell* **2**(3): 317-328.
- Chen, J. J., D. Silver, et al. (1999). "BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway." *Cancer Res* **59**(7 Suppl): 1752s-1756s.
- Davies, A. A., J. Y. Masson, et al. (2001). "Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein." *Mol Cell* **7**(2): 273-282.
- De Leeneer, K., I. Coene, et al. (2008). "Rapid and sensitive detection of BRCA1/2 mutations in a diagnostic setting: comparison of two high-resolution melting platforms." *Clin Chem* **54**(6): 982-989.
- De Leeneer, K., J. Hellems, et al. (2011). "Massive parallel amplicon sequencing of the breast cancer genes BRCA1 and BRCA2: opportunities, challenges, and limitations." *Hum Mutat* **32**(3): 335-344.

- Ellington, A. and J. M. Cherry (2001). "Characteristics of amino acids." Curr Protoc Mol Biol **Appendix 1**: Appendix 1C.
- Fakhrai-Rad, H., N. Pourmand, et al. (2002). "Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms." Hum Mutat **19**(5): 479-485.
- Fodde, R. and M. Losekoot (1994). "Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)." Hum Mutat **3**(2): 83-94.
- Friend, S., A. L. Borresen, et al. (1995). "Breast cancer information on the web." Nat Genet **11**(3): 238-239.
- Gerhardus, A., H. Schleberger, et al. (2007). "Diagnostic accuracy of methods for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations: a systematic review." Eur J Hum Genet **15**(6): 619-627.
- Gronwald, J., T. Byrski, et al. (2008). "Hereditary breast and ovarian cancer." Hered Cancer Clin Pract **6**(2): 88-98.
- Hakansson, S., O. Johannsson, et al. (1997). "Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer." Am J Hum Genet **60**(5): 1068-1078.
- Hall, J. M., M. K. Lee, et al. (1990). "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21." Science **250**(4988): 1684-1689.
- Hofstra, R. M., A. B. Spurdle, et al. (2008). "Tumor characteristics as an analytic tool for classifying genetic variants of uncertain clinical significance." Hum Mutat **29**(11): 1292-1303.
- Jensen, D. E., M. Proctor, et al. (1998). "BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression." Oncogene **16**(9): 1097-1112.
- Johannsson, O., E. A. Ostermeyer, et al. (1996). "Founding BRCA1 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden." Am J Hum Genet **58**(3): 441-450.
- Judkins, T., B. C. Hendrickson, et al. (2005). "Single nucleotide polymorphisms in clinical genetic testing: the characterization of the clinical significance of genetic variants and their application in clinical research for BRCA1." Mutat Res **573**(1-2): 168-179.
- King, M. C., J. H. Marks, et al. (2003). "Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2." Science **302**(5645): 643-646.
- Knaul, F. M., G. Nigenda, et al. (2009). "[Breast cancer in Mexico: an urgent priority]." Salud Publica Mex **51 Suppl 2**: s335-344.
- Koonin, E. V., S. F. Altschul, et al. (1996). "BRCA1 protein products ... Functional motifs." Nat Genet **13**(3): 266-268.
- Krishnamurthy, S., R. Poornima, et al. (2012). "Triple negative breast cancer - our experience and review." Indian J Surg Oncol **3**(1): 12-16.
- Krum, S. A., G. A. Miranda, et al. (2003). "BRCA1 associates with processive RNA polymerase II." J Biol Chem **278**(52): 52012-52020.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." J Mol Biol **157**(1): 105-132.
- Lakhani, S. R. (1999). "The pathology of familial breast cancer: Morphological aspects." Breast Cancer Res **1**(1): 31-35.
- Liu, W., D. I. Smith, et al. (1998). "Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations." Nucleic Acids Res **26**(6): 1396-1400.

- Luo, C., D. Tsementzi, et al. (2012). "Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample." PLoS One **7**(2): e30087.
- Majewski, J., J. Schwartzentruber, et al. (2011). "What can exome sequencing do for you?" J Med Genet **48**(9): 580-589.
- Marcus, J. N., P. Watson, et al. (1996). "Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage." Cancer **77**(4): 697-709.
- Mardis, E. R. (2013). "Next-generation sequencing platforms." Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif) **6**: 287-303.
- Margulies, M., M. Egholm, et al. (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." Nature **437**(7057): 376-380.
- Martin, A. M., M. A. Blackwood, et al. (2001). "Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast-ovarian families from a breast cancer risk evaluation clinic." J Clin Oncol **19**(8): 2247-2253.
- Metzker, M. L. (2010). "Sequencing technologies - the next generation." Nat Rev Genet **11**(1): 31-46.
- Miki, Y., J. Swensen, et al. (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." Science **266**(5182): 66-71.
- Miller, M. P. and S. Kumar (2001). "Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation." Hum Mol Genet **10**(21): 2319-2328.
- Mizuta, R., J. M. LaSalle, et al. (1997). "RAB22 and RAB163/mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6927-6932.
- Monastiri, K., S. Ben Ahmed, et al. (2002). "[Rapid detection of BRCA-1 germline mutations by the protein truncation test in Tunisian families]." Tunis Med **80**(9): 515-518.
- Narod, S. A. and W. D. Foulkes (2004). "BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond." Nat Rev Cancer **4**(9): 665-676.
- Ng, P. C. and S. Henikoff (2001). "Predicting deleterious amino acid substitutions." Genome Res **11**(5): 863-874.
- Ng, P. C. and S. Henikoff (2003). "SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function." Nucleic Acids Res **31**(13): 3812-3814.
- Ng, P. C. and S. Henikoff (2006). "Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function." Annu Rev Genomics Hum Genet **7**: 61-80.
- Nishikawa, H., W. Wu, et al. (2009). "BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity." Cancer Res **69**(1): 111-119.
- Nyren, P. (1987). "Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity." Anal Biochem **167**(2): 235-238.
- Ozcelik, H., Y. J. Antebi, et al. (1996). "Heteroduplex and protein truncation analysis of the BRCA1 185delAG mutation." Hum Genet **98**(3): 310-312.
- Pao, G. M., R. Janknecht, et al. (2000). "CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1020-1025.
- Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406**(6797): 747-752.

- Perrin-Vidoz, L., O. M. Sinilnikova, et al. (2002). "The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons." *Hum Mol Genet* **11**(23): 2805-2814.
- Petrij-Bosch, A., T. Peelen, et al. (1997). "BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients." *Nat Genet* **17**(3): 341-345.
- Radice, P., S. De Summa, et al. (2011). "Unclassified variants in BRCA genes: guidelines for interpretation." *Ann Oncol* **22 Suppl 1**: i18-23.
- Robson, M. and K. Offit (2007). "Clinical practice. Management of an inherited predisposition to breast cancer." *N Engl J Med* **357**(2): 154-162.
- Rodriguez, M., X. Yu, et al. (2003). "Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains." *J Biol Chem* **278**(52): 52914-52918.
- Roy, R., J. Chun, et al. (2012). "BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection." *Nat Rev Cancer* **12**(1): 68-78.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Scully, R., S. F. Anderson, et al. (1997). "BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11): 5605-5610.
- Scully, R. and D. M. Livingston (2000). "In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2." *Nature* **408**(6811): 429-432.
- Schouten, J. P., C. J. McElgunn, et al. (2002). "Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification." *Nucleic Acids Res* **30**(12): e57.
- Simard, J., P. Tonin, et al. (1994). "Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families." *Nat Genet* **8**(4): 392-398.
- Smith, L. M., J. Z. Sanders, et al. (1986). "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis." *Nature* **321**(6071): 674-679.
- Suzuki, Y., M. Orita, et al. (1990). "Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products." *Oncogene* **5**(7): 1037-1043.
- Swift, M., P. J. Reitnauer, et al. (1987). "Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia." *N Engl J Med* **316**(21): 1289-1294.
- Tan, D. S., C. Marchio, et al. (2008). "Hereditary breast cancer: from molecular pathology to tailored therapies." *J Clin Pathol* **61**(10): 1073-1082.
- Tavtigian, S. V., P. B. Samollow, et al. (2006). "An analysis of unclassified missense substitutions in human BRCA1." *Fam Cancer* **5**(1): 77-88.
- Tram, E., S. Savas, et al. (2013). "Missense variants of uncertain significance (VUS) altering the phosphorylation patterns of BRCA1 and BRCA2." *PLoS One* **8**(5): e62468.
- Turkoz, F. P., M. Solak, et al. (2013). "Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients." *Breast* **22**(3): 344-350.
- van der Groep, P., A. Bouter, et al. (2006). "Distinction between hereditary and sporadic breast cancer on the basis of clinicopathological data." *J Clin Pathol* **59**(6): 611-617.
- van der Groep, P., E. van der Wall, et al. (2011). "Pathology of hereditary breast cancer." *Cell Oncol (Dordr)* **34**(2): 71-88.
- Wang, Q., H. Zhang, et al. (1998). "BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells." *Oncogene* **17**(15): 1939-1948.

- Wang, Y., D. Cortez, et al. (2000). "BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures." Genes Dev **14**(8): 927-939.
- Williams, R. S., R. Green, et al. (2001). "Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1." Nat Struct Biol **8**(10): 838-842.
- Wooster, R., S. L. Neuhausen, et al. (1994). "Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13." Science **265**(5181): 2088-2090.
- Wu-Baer, F., K. Lagazon, et al. (2003). "The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin." J Biol Chem **278**(37): 34743-34746.
- Wu, L. C., Z. W. Wang, et al. (1996). "Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product." Nat Genet **14**(4): 430-440.
- Yang, Z. and R. Nielsen (2002). "Codon-substitution models for detecting molecular adaptation at individual sites along specific lineages." Mol Biol Evol **19**(6): 908-917.
- Yarden, R. I. and L. C. Brody (1999). "BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4983-4988.
- Zhang, H., K. Somasundaram, et al. (1998). "BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity." Oncogene **16**(13): 1713-1721.

Proyecciones de la población de México, 2000 a 2050. México: INEGI-SSa-CONAPO; 2002. Disponible en http://www.emexico.gob.mx/wb2/eMex/eMex_Proyecciones_de_la_poblacion_de_Mexico_200020

GLOBOCAN, 2013.

VARIANT VIEWER, 2014 dbSNP

ANEXO.

No ID Sec	VUS BRCA1	VUS BRCA2	DELETÉREA
Patient 1	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N289H, N372H, S455S, H743H, N991D, L1521L, V2171V, A2951T	BRCA1 34018-34021:TCAA/----
Patient 2		K1132K, L1521L, V2171V, S2414S	
Patient 3		N372H, L1521L, V2171V	
Patient 4	D693N, S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	G522R, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S	
Patient 5		N289H, N372H, G522R, H743H, V2171V	
Patient 6		N372H, V2171V	BRCA2 23990-23993:TAAA/----
Patient 7	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	V2171V	BRCA2 21684-21687:ACAA/----
Patient 8	Q356R	V2171V	BRCA2 R3128STOP
Patient 9		N289H, K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S, I3412V	
Patient 10		N289H, N372H, S455S, H743H, N991D, L1521L, V2171V, A2951T	
Patient 11	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	K1132K, L1521L, V2171V, S2414S	BRCA1 33076-33085:DEL(10)
Patient 12	Q356R	V1269V, L1521L, V2171V	
Patient 13	Y105C	S455S, H743H, N991D, L1521L, H1561N, V2138F, V2171V	
Patient 14	S1040N	N289H, N372H, S455S, H743H, N991D, L1521L, V2171V	
Patient 15		L1521L, V2171V, S2414S	
Patient 16	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1613G	K1132K, L1521L, V2171V, S2414S	
Patient 17	A102T, S186S, S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G, V1741A, I1858I	K1132K, L1521L, A1652V, V2171V, S2414S	
Patient 18	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, V1269V, L1521L, V2171V	
Patient 19	D1344E	L1521L, V2171V, N2879D	

Patient 20	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	L1521L, V2171V	
Patient 21	E736E, S1436S, S1613G, V1653V	N289H, S455S, N991D, L1521L, V2171V	
Patient 22	E1134K, E1222E, L1365F	K1132K, L1521L, V2171V, S2414S	BRCA2 21534-21535:TG/--
Patient 23	V191V, S1040N, G1656G	P202L, G522G, N570D, T1915M, V2171V, S2414S, K2868E, S3366S	
Patient 24		N372H, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S	
Patient 25	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S	K1132K, L1521L, V2171V, S2414S	BRCA1 33078-33087:DEL(10)
Patient 26		N372H, K531N, V1269V, L1521L, V2171V, I2490T, K2982N	
Patient 27	P871L	N372H, I605L, L1521L, V2171V, I2490T, N1784T	BRCA1 30777.5:INS(AGC CATGTGG)
Patient 28	V1810V	N289H, N372H, S455S, I605L, H743H, N991D, L1521L, V2171V, I2490T, A2951T	
Patient 29		I332L, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, N1784T, K2982N	
Patient 30		N289H, S455S, H743H, N991D, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, I2490T, A2951T, N1784T, K2982N	
Patient 31		N372H, I605L, K1132K, N1287T, L1521L, V2171V, S2414S, I2490T	
Patient 32	E141G	I605L, K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S, I3412V	
Patient 33	Q356R, S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	V1269V, L1521L, V2171V, I3412V	
Patient 34	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, L1521L, V2171V, I2490T	
Patient 35	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, L1521L, V2171V, I2490T	
Patient 36		K1132K, H1165H, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S	
Patient 37	Q356R, S1436S, S1613G, V1804D	N372H, V1269V, L1521L, S1733S, V2171V, K2950N, I3412V	
Patient 38	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S,	N372H, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, I2490T	

	S1613G		
Patient 39		N289H, S455S, H743H, N991D, K1132K, G1218A, G1219G, L1521L, V2171V, S2414S	
Patient 40		K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S, I3412V	
Patient 41	R320R, N363D, K428R, E495G, S1436S, S1613G, S1651F	N372H, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, I2490T	
Patient 42	Q126R, D185D, F1165L, F1177L, S1178G, H1195H	E731E, L1521L, K1649K, I1664S, E1703G, A1981V, E2220K, V2171V, I2490T, S2978L, S2978S, M3181V, A3293T, I3347V	BRCA2 Y2977STOP
Patient 43		N372H, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, I2490T, V2545V	
Patient 44	F1798L	N289H, S455S, N991D, K1132K, L1521L, S1733P, V2171V, S2414S	
Patient 45	K110M, R762G	N372H, V1269V, L1521L, V2171V, I2490T, I3412V	
Patient 46		S253G, N372H, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, I2490T, Y3006C	BRCA2 64413-64414:AA/-- BRCA1 32759-32762:GATA/----
Patient 47	R71G, D693N, S694S, L771L, F929L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N289H, S455S, H743H, N991D, V1269V, L1521L, V2171V, I2490T	
Patient 48		R259R, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S, K3031K, P3039S, I3412V	
Patient 49	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	K1132K, G1218A, G1218G, L1521L, V2171V, S2414S,	
Patient 50	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, G1218A, G1218G, L1521L, V2171V,	
Patient 51		N372H, L1521L, V2171V,	
Patient 52		K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, K2547R,	
Patient 53	D693N, S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S, I3412V	
Patient 54		K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, I3412V	BRCA1 32759-32762:GATA/----
Patient 55	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S,	K1132K, G1218A, G1218G, V1269V, Q1408R, L1521L,	

	S1613G	V2171V, S2414S,	
Patient 56	P871L, S1140G,	V1269V, L1521L, V2171V, I3412V	
Patient 57	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	K351N, N372H, L1521L, V2171V,	
Patient 58	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	K351N, K1132K, G1218A, G1218G, L1521L, V2171V, I2672I,	
Patient 59	Q356R,	N986T, K1132K, G1218A, G1218G, L1521L, V2171V,	BRCA2 Q1056STOP
Patient 60	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	K351N, N986T, G1218A, G1218G, V1269V, L1521L, V2171V,	
Patient 61	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, G1218A, G1218G, L1521L, V2171V,	
Patient 62		K351N, N372H, N986T, G1218A, G1218G, L1521L, V2171V,	
Patient 63		N372H, G1218A, G1218G, L1521L, V2171V,	
Patient 64	K654T	N372H, G1218A, G1218G, L1521L, V2171V, I2672I,	BRCA2 E49STOP
Patient 65	K654T, S694S, E730V, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	N372H, L1521L, V2171V	
Patient 66	N329N, K654T, S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	N289H, S455S, G602G, H743H, N991D, V1269V, L1521L, V2171V, N1784T, I3412V	
Patient 67	K654T, S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	N372H, G602G, N986T, L1521L, V2171V, N1784T, K2982N, T3033P	
Patient 68	S694S, E730V, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	N372H, G602G, N986T, L1521L, V2171V, I2490T, N1784T, T3033P	
Patient 69	K110N, E111G, K654T, E730V,	N372H, G602G, N986T, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, N1784T, K2982N, N3164T	
Patient 70	E730V, P871L,	N372H, G602G, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, I2490T, N1784T, K2982N, T3033P, N3164T	
Patient 71	Q356R, K654T,	D381N, I605T, K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S, N1784T, K2982N, I3412V	

Patient 72	K654T, S694S, E730V, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1613G,	N289H, S455S, G602G, H743H, N986T, N991D, L1521L, V2171V, A2951T, N1784T, K2982N	
Patient 73	S1613G, P871L, E1038G,	N372H, V2171V,	
Patient 74		V1269V, L1521L, V2171V, I3412V,	
Patient 75	P871L, K110N, E111G,	N372H, L1521L, V2171V, S455S, N289H, N991D,	
Patient 76		N372H, L1521L, V2171V, K1132K, S2414S,	
Patient 77	K1183R, S1436S, S1613G, P871L, E1038G, L771L, S694S,	N372H, L1521L, V2171V,	
Patient 78	S1587L, P871L,	V1269V, L1521L, V2171V, I3412V,	
Patient 79	K1183R, S1436S, S1613G, P871L, E1038G, L771L, S694S,	N372H, L1521L, V2171V, K1132K, S2414S,	
Patient 80	K1183R, S1436S, S1613G, P871L, E1038G, L771L, S694S, K110N, E111G,	L1521L, V2171V, K1132K, S2414S,	
Patient 81	S694S, L771L, S1436S, S1613G, K1183R, P871L, E1038G,	K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S, N1784T,	
Patient 82	S694S, L771L, S1436S, S1613G, K1183R, P871L, E1038G,	N372H, L1521L, V2171V, I2490T, N1784T,	
Patient 83		N372H, L1521L, V2171V, I2490T, N1784T, K2982N,	
Patient 84	S694S, L771L, S1436S, S1613G, K1183R, P871L, E1038G,	N289H, S455S, I605L, H743H, N991D, L1521L, V2171V, N1784T, K2982N,	
Patient 85	S1040N, A1613G,	N372H, I605L, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, N1784T, K2982N,	
Patient 86		K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, N1784T, K2982N,	
Patient 87	S694S, L771L, S1436S, S1613G, K1183R, P871L, E1038G,	N372H, L1521L, V2171V, I2490T, N1784T,	
Patient 88		N372H, L1521L, V2171V, N1784T, K2982N,	
Patient 89	S694S, L771L, K1183R, S1613G, E1038G, S1436S, P871L,	N372H, L1521L, V2171V, I2490T,	BRCA1 1455- 1456:AG/--
Patient		L1521L, V2171V, V1269V, S2414S,	

90		K1132K,	
Patient 91		N372H, L1521L, V2171V, N289H, N991D, H743H, S455S,	
Patient 92	S1613G, S1436S, P871L, E1725E,	L1521L, V2171V, K1132K,	
Patient 93		L1521L, V2171V, V1269V, S2414S, K1132K,	
Patient 94		N372H, L1521L, V2171V,	BRCA2 Y 82733-82736:TATG/---- exon 27
Patient 95	S694S, L771L, K1183R, S1613G, E1038G, S1436S, P871L, K654T	N372H, L1521L, V2171V, V1269V, T3374I,	
Patient 96	S694S, L771L, K1183R, S1613G, E1038G, S1436S, P871L,	N372H, L1521L, V2171V, K1132K, N1784T, K2982N	
Patient 97	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	N372H, V1269V, L1521L, V2171V,	
Patient 98	K654T, S1040N,	N372H, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S,	
Patient 99	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	N372H, L1521L, V2171V,	
Patient 100	K654T, S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	N372H, L1521L, V2171V, I2490T,	
Patient 101	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	N289H, S455S, H743H, N991D, V1269V, L1521L, V2171V, I3412V,	
Patient 102	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	N372H, L1521L, V2171V, I2490T,	
Patient 103		K1132K, L1521L, V2171V, S2414S,	
Patient 104	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	N372H, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S,	
Patient 105	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, V1269V, L1521L, V2171V, I2490T, I3412V	
Patient 106		N289H, S455S, H743H, N991D, L1521L, V2171V, A2951T,	
Patient 107		K1132K, R1160K, L1521L, V2171V, S2414S,	
Patient 108	P871L,	L1521L, V2171V,	

Patient 109		N372H, L1521L, V2171V, I2490T,	
Patient 110		K1132K, L1521L, V2171V, S2414S,	
Patient 111	K654T,	N372H, K1132K, L1521L, V2171V, I2490T, A3246A,	
Patient 112	S1436S, S1613G	N372H, L1521L, V2171V, S2414S,	
Patient 113	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G, P1776P	N289H, S455S, H743H, N991D, L1521L,	BRCA1 STOP 1305 33811- 33814:TGAG/----
Patient 114		K1132K, L1521L, S2414S,	
Patient 115	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N289H, S455S, H743H, N991D, V1269V, L1521L, A2951T, I3412V,	
Patient 116		L1521L,	
Patient 117		N372H, L1521L, I2490T,	BRCA1 STOP998 32759- 32762:GATA/----
Patient 118		N372H, V1269V, L1521L, I2490T, I3412V,	BRCA2 STOP2162 25362- 25365:ACAA/----
Patient 119	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	V1269V, L1521L,	
Patient 120	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N289H, S455S, H743H, N991D, L1521L, A2951T,	
Patient 121	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	V1269V, L1521L, V2171V, I3412V	
Patient 122		K1132K, L1521L, V2171V, S2414S,	
Patient 123	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, I605L, L1521L, V2171V, I2490T,	
Patient 124		K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S, I3412V	BRCA1 R1443STOP
Patient 125	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, L1521L, V2171V,	
Patient 126		N289H, S455S, H743H, N991D, L1521L, V2171V,	
Patient 127	S1436S, S1613G	L1521L, V2171V, I2285V,	

Patient 128		L1521L, V2171V,	
Patient 129	S1613G	N372H, L1521L, V2171V,	
Patient 130	P871L, R1028H,	N372H, V1269V, L1521L, S1733S, V2171V, K2750Q, K2950N, I3412V	
Patient 131		N372H, K1132K, L1521L, V2171V, S2414S, I2490T,	
Patient 132	K654T,	V1269V, L1521L, V2171V, I3412V	
Patient 133	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, L1521L, V2171V,	
Patient 134	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, L1521L, V2171V, I2490T,	
Patient 135	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	V1269V, L1521L, V2171V, I3412V	
Patient 136	K654T,	K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S,	
Patient 145	Q356R, S1436S, S1512I, S1613G,	L1521L, V2171V,	
Patient 146		N372H, L1521L, V2171V, I2490T,	
Patient 147		N372H, L1521L, V2171V,	
Patient 148		N372H, I605L, L1521L, V2171V, I2490T,	
Patient 149		N289H, N372H, S455S, H743H, N991D, L1521L, V2171V, I2490T, A2951T, N1784T,	
Patient 150	P871L,	I605L, L1521L, V2171V, L2428V,	
Patient 151	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	K1132K, L1521L, V2171V, S2414S,	
Patient 152	Q356R, S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G,	V1269V, L1521L, V2171V, I3412V	
Patient 153	P871L,	I332L, K945N, N986T, V1269V, L1521L, V2171V, M2393L, K2980N, I3412V	
Patient 154	S694S, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	I332L, I605L, K945N, N986T, V1269V, L1521L, V2171V,	

Patient 155	K654T, S694S, L771L, A854T, P871L, E1038G, S1436S, S1613G	N372H, I605L, N986T, L1521L, V2171V, M2393L, K2980N, K2982N,	
Patient 156	K820E, P871L, S1613G	A261A, I605L, K1132K, L1521L, V2171V, E2183E, D2317G, M2393L, I2490T,	
Patient 157	S694S, P871L, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, S455S, L1521L, K1861N, R2341R, F2382I, R2744G, K3416N	BRCA2 17814.5:- /A
Patient 158	K223T, K654T, L771L, P871L, K1183R, S1613G	V1269V, L1521L, V2171V, K2980N,	
Patient 159	K223T, S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	K1132K, N1287T, L1521L, K1861N, V2171V, S2414S,	BRCA2 24544.5:- /A
Patient 160	S694S, P871L, E1038G, S1436S, S1613G	N319T, I332L, N1287T, L1521L, V2171V, K2980N, N3160D	
Patient 161	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	T1388T, L1521L, V2171V, N1784T, V3082V, K3083E,	
Patient 162	D693N, S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, T1388T, L1521L, V2171V, V3082V, K3083E,	
Patient 163	L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, K1132K, T1388T, L1521L, V2171V,	
Patient 164	Q356R,	N289H, S455S, H743H, N991D, T1388T, L1521L, V2171V, A2951T,	
Patient 165	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, I3412V	
Patient 166	G834G,	N372H, K1132K, T1388T, L1521L, D2161G, V2171V, M2192L, S2201T, S2414S,	BRCA2 23949.5:-- /AC
Patient 167	S694S, L771L, P871L, E1038G, K1183R, S1436S, S1613G	N372H, L1521L, V2171V, I2490T	
Patient 168		K1132K, V1269V, L1521L, V2171V, S2414S, I3412V	BRCA2 83015.5:-- /AC

Pacientes en color negro: Hereditario.
Pacientes en color rojo: Esporádico.