



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS
SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO
CENTRO MÉDICO NACIONAL
“20 DE NOVIEMBRE”**

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL
CÁNCER HEREDITARIO DE MAMA Y
OVARIO EN PACIENTES DEL CMN 20 DE
NOVIEMBRE ISSSTE**

TESIS DE POSGRADO

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

PRESENTA:

JOSUÉ RENDÓN MARTÍNEZ

TUTORA DE TESIS:

DRA. LILIANA GARCÍA ORTIZ

ASESORES CLÍNICO METODOLÓGICOS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN CHIMA GALÁN

DRA. MONICA FABIOLA MENDEZ CATALÁ

DR. JOSÉ GUTIÉRREZ SALINAS

CIUDAD DE MÉXICO, 26 DE AGOSTO, 2022

No. de Registro 129.22





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.

AUTORIZACIONES

DRA. DENISSE AÑORVE BAILÓN SUBDIRECTORA DE ENSEÑANZA,
CMN “20 DE NOVIEMBRE”, ISSSTE

DR. PAUL MONDRAGON TERAN COORDINADOR DE INVESTIGACIÓN,
CMN “20 DE NOVIEMBRE”, ISSSTE

DR. JOSÉ LUIS ACEVES CHIMAL
ENCARGADO DE LA COORDINACIÓN DE ENSEÑANZA
CMN “20 DE NOVIEMBRE”, ISSSTE

DRA. MARÍA DEL CARMEN CHIMA GALÁN
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DRA. LILIANA GARCÍA ORTIZ
TUTOR DE TESIS

DRA. MONICA FABIOLA MENDEZ CATALÁ
ASESOR DE TESIS

DR. JOSÉ GUTIÉRREZ SALINAS
ASESOR DE TESIS

ÍNDICE

RESUMEN	04
ABREVIATURAS	06
INTRODUCCIÓN	07
ANTECEDENTES	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	
DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO	15
POBLACIÓN DE ESTUDIO	15
UNIVERSO DE TRABAJO	15
ESQUEMA DE SELECCIÓN	15
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	15
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	16
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	16
TIPO DE MUESTREO	16
DESCRIPCIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES	17
TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS	18
PROCEDIMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	44

RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia más común en el mundo y es la primera causa de cáncer entre mujeres. En México no se cuenta con una estadística exacta; sin embargo, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía estimó en el año 2019 una tasa de 17.19 defunciones por cada 100 mil mujeres de 20 años o más a nivel nacional, siendo el 10% de estos cánceres hereditarios, dentro de los cuales se encuentra el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCHMO). El cáncer de mama y ovario hereditario se describe como una entidad autosómica dominante la cuál, se caracteriza por un riesgo aumentado de padecer cáncer de mama y ovario así como cáncer de próstata, pancreático y melanoma primario en una misma familia.

El SCHMO se sospecha en un paciente con historia familiar o personal con cualquiera de las siguientes características: cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años, cáncer ovario, cáncer múltiple primario de mama unilateral o bilateral, triple negativo, cáncer de próstata y/o pancreático + cáncer de mama y/o de ovario, 3 o más familiares con cáncer de mama a cualquier edad.

El SCHMO se relaciona con variantes patogénicas principalmente en los genes *BRCA 1* y *BRCA2*, pero también se encuentran otros genes asociados. *BRCA1* se asocia a un riesgo hasta del 80 % para cáncer de mama, este gen codifica para una fosfoproteína con múltiples funciones entre las cuales se encuentra la reparación de DNA, regulación de transcripción génica, regulación del ciclo celular, entre otras. *BRCA 2* se asocia en un riesgo de hasta 50% para cáncer de mama, este gen codifica para una fosfoproteína que se relaciona a procesos de mantenimiento de la integridad genómica, procesos relacionados con el remodelamiento de la cromatina, regulación del ciclo celular, entre otras.

El tratamiento y pronóstico dependen de las variantes detectadas y de los genes involucrados, por eso la importancia del estudio molecular. Una vez que se detecten las variantes se puede realizar un estudio dirigido para los familiares y asesorar el riesgo de desarrollar cáncer y el comportamiento a seguir. En la población latinoamericana con ancestría mexicana que viven en Estados Unidos, se detectó como variante fundadora, la delección del exón 9-12 en *BRCA1*. En México el equipo de la Dra. Vidal, determinó una frecuencia de presentación en su muestra

poblacional del 5% para pacientes con cáncer de mama asociado a SCHMO y 43% para pacientes con cáncer de ovario con SCHMO.

Existen datos insuficientes de la prevalencia de las variantes patogénicas asociadas al SCHMO, entre estas la variante fundadora 9-12delBRCA1 en la población Mexicana, por lo que el estudio molecular, permitirá la determinación de esta prevalencia y en dado caso que sea mayor a lo que anteriormente se conocía, se podría implementar el estudio dirigido a esta variante, en casos familiares y así dar un tratamiento temprano y determinar pronóstico y riesgo de los pacientes portadores de la misma.

ABREVIATURAS

SCMOH: Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario

NCCN: National Comprehensive Cancer Research

VUS: Variante de significado incierto

VP: Variante patogénica

CDI: Carcinoma ductal infiltrante

SNV: variante de nucleótido único

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más común en el mundo con una incidencia de una de cada 12 mujeres a nivel mundial y se considera la primera causa de cáncer entre mujeres. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se detectan alrededor 1.38 millones de nuevos casos y fallecen 458 mil personas por esta enfermedad; lo cual representa una problemática de salud a nivel mundial.

En México no se cuenta con una estadística exacta de incidencia y mortalidad asociada a cáncer de mama; sin embargo, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía estimó en el año 2019 una tasa de 17.19 defunciones por cada 100 mil mujeres de 20 años o más a nivel nacional. Del total de casos de cáncer de mama, el 10% de ellos presentan un componente hereditario, como es el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCHMO) (1).

El SCHMO es un síndrome genético de predisposición a cáncer en una o varias generaciones, que principalmente afecta a órganos como la mama y ovario, aunque también se pueden presentar en piel, próstata y páncreas. Se han identificado alrededor de 1800 variantes para el gen Breast Cancer 1 (*BRCA1*) y 2000 para el gen Breast Cancer 2 (*BRCA2*) de las cuales las deleciones representan la mayor parte de estas. (2)

Los genes *BRCA1* y *BRCA2* son genes supresores de tumores específicos para tejido mamario, de ovario, pancreático y prostático. *BRCA1* se mapeó en 1990 por ligamiento y se identificó por clonación posicional en 1994 en el cromosoma 17 en la región q12-21. Este gen consta de 24 exones, 22 de los cuales son codificantes, la región codificante inicia en el exón 2 y el exón 11 es el de mayor tamaño, abarcando aproximadamente el 60% de todo el gen. *BRCA1* está constituido por repetidos de Alu en el 41.5%. Cuenta con 3 regiones grupo para cáncer de mama (BCCR=Breast Cancer Cluster Regions) que se encuentran de c.179 a c.505 (BCCR), c.4328 a c.4945 (BCCR), c.5261 a c.5563 (BCCR) y una región grupo para cáncer de ovario (OCCR= Ovarian Cancer Cluster Region) abarcando de c.1380 a c.4062 (aproximadamente en exón 11).

BRCA1 codifica para una fosfoproteína nuclear de 220 KDa y 1863 aminoácidos. La proteína contiene una región amino terminal con un dominio rico en cisteína llamado RING, que consiste en

un dominio de unión a Zinc con la capacidad para interactuar físicamente con otras proteínas. La región ácida carboxilo terminal se caracteriza por contener dos dominios en tandem conocidos como BRCT, son dominios de co-activación transcripcional y es el lugar donde se ha demostrado que *BRCA1* es capaz de unirse a proteínas que forman parte de la maquinaria basal de transcripción como el RNA Pol II y Helicasa-A, *BRCA1* también interactúa con la proteína p53 en sitios múltiples estimulando así la actividad transcripcional de esta proteína. Cuando se une con BARD1 forma un complejo que funciona como ligasa de ubiquitina E3 potenciando su actividad supresora de tumor. La mayoría de las variantes patogénicas identificadas corresponden a deleciones, también se han reportado cambios de marco de lectura, mutaciones sin sentido y de sentido erróneo. Dependiendo del lugar donde suceden estas variantes es el tipo de afección que se va a traducir en la proteína: por ejemplo, aquellas que suceden en la región RING de *BRCA1* evita la unión con BARD1 y por tanto se pierde su función supresora de tumores. Las variantes sin sentido localizadas en BRCT se han asociado a cáncer de mama prematuro (3).

BRCA2 se identificó en 1995, localizado en el brazo largo del cromosoma 13 en la región q12.3, contiene 26 exones distribuidos en 70Kb de DNA genómico, al igual que *BRCA1* la región codificante inicia en el exón 2 y su exón 11 es igualmente largo. *BRCA2* codifica para una proteína de 3418 aminoácidos y contiene un marco de lectura de 10.3Kb. *BRCA2* cuenta con 8 repetidos de BRC que sirven para la unión con RAD51. Tanto *BRCA1* como *BRCA2* son capaces de unirse a la proteína RAD51 la cual es indispensable en los mecanismos de reparación asociados a daño sobre el rompimiento de la doble cadena de DNA a través del mecanismo de recombinación homóloga; es decir que ambas proteínas están involucradas en los procesos para el mantenimiento de la integridad genómica. La cinasa dependiente de ciclina de *BRCA2* se une a RAD51 al fosforilarse y así reparar el daño ocasionado en la doble cadena de DNA. Las variantes patogénicas que se encuentran en cualquiera de los 8 repetidos de BRC de *BRCA2* interfieren con su unión a RAD51 así ocasionando una alteración en la reparación de doble cadena; sin embargo los mecanismos de punto de control de la célula permanecen intactos así como la apoptosis que regularmente se realizaría al detectar el daño en el DNA resultando en una célula cancerígena. *BRCA2* se ha asociado también a procesos relacionados con el remodelamiento de la cromatina durante la formación del sinaptonema en la recombinación homóloga en situaciones de daño al DNA. Las mutaciones de *BRCA2* son las causantes del 35% de los casos de cáncer de mama familiar, el cual está asociado a cáncer de ovario, próstata, páncreas y cáncer de mama en varones.(5)

Se debe sospechar SCHMO en un paciente con historia personal o familiar en parientes de 1º, 2º o 3º grado que cumplan con los siguientes criterios de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN):

- Diagnóstico de cáncer a la edad menor a 50 años al momento del diagnóstico,
- ancestros judíos Ashkenazi,
- cáncer de ovario,
- múltiples tumores primario de mama,
- cáncer de mama en hombres,
- receptores hormonales con resultado triple negativo en particular antes de los 60 años,
- combinación de cáncer pancreático y/o prostático junto con cáncer de mama y/o ovario,
- uno o más parientes con cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años,
- tres o más parientes con cáncer de mama diagnosticado a cualquier edad,
- variante patogénica en genes *BRCA1* o *BRCA2* previamente diagnosticada en algún familiar

Se estima que los portadores de variantes en el gen *BRCA1* su riesgo acumulado para desarrollar cáncer de mama a la edad de 80 años es de 67-72%, y 66-69% para *BRCA2*. El pico de incidencia de cáncer de mama ocurre ligeramente más temprano en el gen *BRCA1* (41-50 años) que en el gen *BRCA2* (51-60 años) (2). Algunas variantes en *BRCA1* y *BRCA2* se han asociado a resistencia al tratamiento convencional con quimioterapia, por lo que es de suma importancia el estudio molecular en estos pacientes para poder realizar estudio dirigidos en los familiares y comenzar el tamizado de forma temprana en aquellos portadores; así como una terapéutica dirigida.

Por lo que, una historia personal y familiar de cáncer es elemental para determinar si se cuenta con criterios para realizar la prueba molecular. Se recomienda realizar árbol genealógico que incluya hasta la cuarta generación (National Society of Genetic Counselors.) (1)

ANTECEDENTES

El SCHMO es el síndrome de cáncer hereditario que más se ha estudiado desde el descubrimiento de los genes asociados al mismo en 1990. Genes conocidos por su rol como supresor de tumores y que son esenciales para regular la reparación de la ruptura de doble cadena del DNA (3).

En los genes *BRCA1/2* se han identificado alrededor de 3000 variantes asociadas a predisposición a cáncer hereditario (4). El 80% de las mutaciones en genes *BRCA1/2* son puntuales, el 10-15% se deben a rearrreglos geómicos largos como son las deleciones o duplicaciones en los exones (5). Sin embargo, la mayoría de las mutaciones fundadoras son deleciones grandes que se han encontrado en población caucásica (6–8). En la población holandesa se identificaron dos rearrreglos genómicos largos que son la deleción de 3.8kb en el exón 13 y la deleción de 510 bp del exón 22 que representan aproximadamente el 25% de las variantes identificadas en esta población para SCHMO (9).

A pesar de la heterogenicidad de la ancestría latinoamericana, se han detectado mutaciones fundadoras en Brazil (*BRCA1* 5382insC y *BRCA2* c.156_157insAlu) (10) y en Colombia (*BRCA1* 3450del4, A1708E, y *BRCA2* 3034del4). (11)

En un estudio realizado en Estados Unidos por Weitzel et al, se estudió población latinoamericana que padecía cáncer de mama, y que en su mayor parte contaba con ancestría mexicana; se identificó en el 30% de la población estudiada una variante fundadora, la cual consiste en la deleción de los exones 9-12 en el gen *BRCA1* (12) y que comúnmente esta variante es asociada a cáncer de ovario en la mayoría de estudios descritos internacionalmente. En 2007 se describió por el mismo grupo las características de esta variante (13) y en 2013 se estimó que se originó hace 74 generaciones. (14)

En estudios realizados en la Ciudad de México, la Dra. Vidal Millán y colaboradores identificaron esta variante en el 5% de las pacientes con cáncer de mama y con mayor prevalencia en pacientes que presentaban cáncer de mama triple negativo, así como en el 43% de las pacientes con cáncer de ovario (15).

Por lo que es de interés conocer si en la población de pacientes que acuden al ISSSTE, la cual es de un estrato socioeconómico medio, la prevalencia de las variantes se adiciona, permanecen sin cambio o se modifica a las anteriormente descritas para otras poblaciones nacionales e internacionales. Llevar a cabo estudios epidemiológicos moleculares en nuestra Institución nos permitirá tomar decisiones en la organización de recursos para el diagnóstico oportuno, seguimiento y tratamientos individualizados de los pacientes y sus familiares con síndromes de cáncer hereditario, específicamente SCHMO.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha descrito una variabilidad genética asociada al SCHMO, la cual se ha asociado a etnicidad, respuesta a tratamiento y aumento en el riesgo de aparición de un cáncer segundo primario, así como riesgo aumentado para el desarrollo de otro tipo de cáncer como pancreático, prostático o melanoma.

A pesar de que en la actualidad se cuenta con la posibilidad de realizar pruebas moleculares que puedan identificar variantes patogénicas; el acceso a las mismas se ha visto limitado por el presupuesto a instituciones de salud de tipo gubernamental como lo es el ISSSTE, por esta razón conocer la incidencia y prevalencia exacta de dichas variantes en nuestra Institución, la cual hasta ahora es desconocida, ayudaría al diagnóstico temprano, a conocer la incidencia de las variantes en nuestra población y el pronóstico, así como, contribuir al tratamiento preciso o individualizado de los pacientes con cáncer hereditario.

Por lo que nuestro planteamiento es el siguiente:

¿Cuáles son las variantes moleculares en los genes *BRCA1* y *BRCA2* que afectan a los pacientes con diagnóstico de SCHMO, que acuden al CMN “20 de Noviembre”, que podrían guiar los diagnósticos oportunos, pronósticos y tratamientos específicos o individualizados?

JUSTIFICACIÓN

Esta investigación servirá para conocer la distribución de las diferentes variantes de *BRCA1* y *BRCA2* asociadas al síndrome de cáncer hereditario de mama y ovario en familias mexicanas que no han sido estudiadas por técnicas moleculares.

El conocer las distintas variantes genéticas de una población permite ampliar el panorama de la frecuencia en la que estas se presentan y compararlas con la incidencia mundial, así mismo se podría encontrar variantes previamente no descritas y contribuir a la epidemiología molecular del SCMOH.

Además, la clasificación molecular de *BRCA1* Y *BRCA2*, es indispensable para seleccionar a los candidatos a recibir cierto tipo de intervenciones como son la mastectomía y ooforectomía profiláctica, así como la administración de quimioterapia adecuada en base a la variante patogénica involucrada y así reducir los casos refractarios a tratamiento.

En caso de un resultado positivo, el estudio de las variantes se puede extender a otros familiares afectados o en riesgo de haber heredado la variante. Conocer si una persona posee una variante genética, es de utilidad para la propia persona y su familia para la vigilancia estrecha y el tratamiento preventivo y oportuno del cáncer.

HIPOTESIS

Existe una mayor frecuencia de presentación de nuevas variantes patogénicas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes con diagnóstico de SCHMO, que acuden al CMN “20 de Noviembre” en comparación con las variantes patogénicas descrita a nivel internacional.

Hipótesis nula: No existen diferencias en la frecuencia de presentación de las variantes patogénicas descritas internacionalmente en los genes *BRCA1* Y *BRCA2* y las observadas en pacientes con diagnóstico de SCHMO, que acuden al CMN “20 de Noviembre”.

OBJETIVOS

Objetivo general: Determinar en pacientes con SCHMO mediante MLPA, las variantes patogénicas involucradas en los genes BRCA1 y BRCA2 y comparar la frecuencia con las reportadas a nivel mundial.

Objetivos específicos:

- Describir características sociodemográficas de pacientes con SCHMO.
- Describir características clínicas de pacientes con SCHMO.
- Determinar la presencia y frecuencia de otras variantes previamente reportadas a nivel global en nuestra muestra poblacional.

METODOLOGÍA

Diseño y tipo de estudio

Se realizó un estudio epidemiológico (Serie de Casos), con características: observacional, transversal, prospectivo y descriptivo.

Población de estudio

Pacientes de 18 años en adelante, de ambos sexos, que acudan a la consulta de Genética Médica.

Universo de trabajo

Personas con diagnóstico de cáncer hereditario de mama u ovario que cumplan con criterios de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) para SCHMO, a los cuales nunca se les haya realizado un estudio molecular para los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

Esquema de selección

Criterios de inclusión

- Pacientes que acudan a la consulta de genética con diagnóstico de cáncer de mama antes de los 50 años
- Pacientes con cáncer de mama triple negativo.
- Pacientes con cáncer de mama de receptores estrogénicos positivo, pero con historia familiar de cáncer de mama, ovario, páncreas, próstata o melanoma en uno o más familiares diagnosticados antes de los 50 años.
- Pacientes con cáncer de mama e historia familiar con tres o más familiares con cáncer de mama y/u ovario diagnosticado a cualquier edad.
- Pacientes masculinos con cáncer de mama.
- Pacientes que acepten la toma de una muestra de sangre periférica.
- Pacientes que acepten el análisis de DNA para la investigación de variantes patogénicas bajo consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Pacientes que acudan a la consulta de genética con diagnóstico de cáncer de mama sin antecedentes familiares y diagnosticado posterior a los 50 años.
- Pacientes con cáncer de mama triple positivo sin antecedentes familiares.
- Pacientes con estudio molecular para BRCA 1 y BRCA 2 previamente realizado.
- Pacientes que cumpla con criterios para SCHMO que no acepten firmar consentimiento informado o no acepten participar en la toma de muestra de sangre periférica.

Criterios de eliminación

- Pacientes cuya muestra o DNA no sea posible de estudiar por baja calidad de la muestra.
- Que el paciente decida ya no continuar con el estudio.
- Pacientes con pánal génico de cáncer previamente realizado positivo para otro tipo de síndrome de cáncer hereditario.

Tipo de muestreo

Muestreo no probabilístico por conveniencia.

Metodología para el cálculo del tamaño de la muestra y tamaño de la muestra: Se trabajará con la totalidad de pacientes que cumplan con las características.

Descripción operacional de las variables

Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Nivel de medición	Unidad de expresión
Edad al diagnóstico	Tiempo transcurrido desde el nacimiento al momento de diagnóstico	Se recabará de la consulta a pacientes mayores de 18 años y menores de 60 años al diagnóstico	Cuantitativa	Nominal	Años
Sexo	Sexo particular de una persona. Grupo taxonómico de especies que poseen uno o varios caracteres diferenciales	Masculino, Femenino	Cuantitativa	Nominal	Masculino, Femenino
Lugar de origen	Posición geográfica en donde nació el individuo	Se recabará del interrogatorio en consulta	Cuantitativa	Nominal	Estados de la república Mexicana
Variante del genoma	Tipo de mutación que presenta el paciente que condiciona o no enfermedad	Tipo de mutación que presenta el paciente que condiciona o no enfermedad	Cuantitativa	Ordinal	Patogénica Probablemente patogénica Benigna Probablemente benigna De significado incierto
Inmuno-histoquímica	Características del tumor	Se recabará del reporte de patología	Cuantitativa	Ordinal	Triple negativo RE +, RP +, HER2 +RE +, RP +, HER 2 -RE +, RP -, HER 2 RE -, RP +, HER 2
Etapa clínica al diagnóstico	Características del cáncer al momento del dx	Se recabara del expediente	Cuantitativa	Ordinal	IA IB IIA IIB IIIA IIIB IIIC IV
Familiares afectados	Personas dentro de la misma familia que padecen de cáncer asociados al gen BRCA 1 o 2	Se recabará al interrogatorio en la consulta	Cualitativa	Discreta	Número enteros
Grado de familiar afectado	Corresponde al orden en el que se relaciona una persona con otra dentro de la misma familia	Se recabará al interrogatorio en la consulta	Cuantitativa	Ordinal	1° 2° 3° 4°
Tipo de cáncer en familiares	Clasificación del cáncer presente en otras personas de la misma familia	Se recabará al interrogatorio en la consulta	Cuantitativa	Nominal	Ca de mama Ca de ovario Ca de páncreas Ca de próstata Melanoma

Técnicas y procedimientos empleados

Una vez que el paciente haya firmado el consentimiento informado, se procederá a la toma de muestra de sangre venosa periférica, en tubos Vacutainer® de 5 mL, contenido EDTA como anticoagulante. Posteriormente se realizarán 2 alícuotas, para la extracción de DNA, el cual se realizará por el método de expulsión salinas. Una vez obtenido el DNA se guardará a -5° C hasta su posterior utilización.

Se realizará una alícuota del DNA total de cada una de las muestras, las cuales estarán a una concentración total de 50 ng/uL y se iniciará con el procedimiento para la detección de variantes patogénicas en los genes BRCA1 y BRCA2 mediante MLPA.

Técnica de MLPA:

- 1) Extracción de DNA de muestra de sangre periférica de 5ml por medio de reacciones hiperosmolares.
- 2) Desnaturalización de DNA: etiquetar dos tubos de 0.2ml. Agregar a ambos tubos 5ul de DNA (50-100ug) se introducen al termociclador a 98°C por 5 minutos al término la temperatura baja automáticamente a 25°C.
- 3) Hibridación: mezclar 1.5 ul de buffer de MLPA + 1.5ul de probemix (ambos se incluyen en el kit de MLPA). Agregar 3ul de esta mezcla al DNA desnaturalizado mezclar con cuidado a forma de pipeteo y colocar en termociclador a 90°C por un minuto y posteriormente a 60°C de 15-20 horas.
- 4) Reacción de ligamiento: Se prepara una mezcla de ligasa-65 con 25ul de agua ultra pura + 3ul buffer de ligasa A + 3ul de buffer de ligasa B posteriormente agregar 1ul de enzima ligasa-65 (todos se incluyen en el kit para MLPA). Se mezcla pipeteando suavemente hacia arriba y abajo. Los tubos previamente colocados en el termociclador alcanzarán la temperatura de 54°C, en este momento se agregan 32ul de la mezcla de ligasa-65 que se acaba de realizar, estando los tubos aún dentro del termociclador. Continuar programa de termociclador con temperatura de 54°C por 15 minutos, al término se alcanza una temperatura de 98°C por 5 minutos y finalmente llega a 20° en donde se pausará.

5) Reacción de PCR: preparar la mezcla de polimerasa (se incluyen en el kit para MLPA) la cual necesita 7.5ul de agua ultra pura + 2ul SALSA PCR mezcla para primer, luego añadir 0.5ul de SALSA polimerasa y mezclar suavemente con la pipeta en movimientos de arriba hacia abajo. A temperatura ambiente agregar 10ul de mezcla de polimerasa que se acaba de hacer a cada reacción de MLPA mezclando suavemente de arriba hacia abajo con la pipeta. Introducir de inmediato los tubos al termociclador para realizar los siguientes pasos del programa: 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C; posterior a estos 35 ciclos llega a 72°C por 20 minutos acabando este tiempo se va a pausar al llegar a 15°C. Después de la reacción de PCR NO abrir los tubos en el mismo cuarto que el termociclador. Para evitar contaminantes usar diferentes micropipetas para realizar reacciones de MLPA y para el manejo de los productos de MLPA PCR. Los productos de PCR se pueden almacenar en un lugar sin luz a 4°C hasta por una semana, para periodos más alargados se recomienda su refrigeración entre -25°C y -15°C.

6) Separación de fragmentos por electroforesis capilar.

7) Análisis de resultados.

10.9 Procedimiento y análisis estadístico

Para el análisis descriptivo se utilizaron medidas de tendencia central como media, mediana y moda. Para el estudio de la relación de variables se realizará un análisis estadístico mediante distribución de frecuencias y medidas de variabilidad (Rango, desviación estándar, varianza). Los resultados serán integrados al programa Excel, y presentados en tablas y gráficas (Histogramas, diagramas de barras, de pastel) para su representación. Las variables cualitativas serán analizadas por Chi cuadrada y las variables cuantitativas serán analizadas por T de Student, haciendo las adecuaciones necesarias cuando corresponda.

RESULTADOS

Se incluyeron en el análisis 17 pacientes de la consulta externa de Genética Médica en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” que cumplían con los criterios para estudio genético orientado a SCMOH.

Comenzando con las características sociodemográficas de nuestra población de estudio, todos los casos fueron de sexo femenino. La edad promedio fue de 44.35 (rango de 30 a 49), mientras que la edad promedio al momento del diagnóstico fue de 42.58 (rango de 29 a 47). 35.29% pacientes son originarias de la Ciudad de México (6/17), 23.522% del Estado de México (4/17), 11.76% de Hidalgo (2/17), 11.76% de Guerrero (2/17), y 3 de otros estados (Chiapas, Sinaloa y Coahuila). 64.7% de las pacientes se refieren como católicas (11/17), 11.76% como cristianas (2/17) y 23.52% no refirieron alguna religión (4/17). En cuanto al grado máximo de estudios, 11.76% de las pacientes refieren carrera técnica (2/17), 58.82% licenciatura (10/17), 23.52% maestría (4/17) y 5.88% doctorado (1/17). La ocupación de 35.29% pacientes fue la docencia (6/17), 17.64% son enfermeras (3/17), 17.64% se dedican al hogar (3/17) y 5 (29.5%) a otras profesiones (estilista, comercio, medicina, contaduría y asesoría parlamentaria). Por último, en cuanto al hemotipo, 17.64% de las pacientes son O+ (6/17) y el resto lo desconocen. (Tabla 1).

Tabla 1. Características sociodemográficas de la muestra

Características sociodemográficas								
# de caso	Sexo	Edad	Edad al diagnóstico	Estado de origen	Religión	Escolaridad	Ocupación	Tipo de Sangre
1	MUJER	30	29	Guerrero	Católica	Licenciatura	Docente	Desconocido
2	MUJER	32	31	Edo Mex	Católica	Maestría	Docente	O+
3	MUJER	37	34	Edo Mex	Católica	Maestría	Docente	Desconocido
4	MUJER	37	36	Edo Mex	Católica	Licenciatura	Docente	Desconocido
5	MUJER	46	43	CDMX	Católica	Técnico	Estilista	O+
6	MUJER	34	32	Hidalgo	Ninguna	Maestría	Docente	Desconocido
7	MUJER	66	60	CDMX	Católica	Licenciatura	Comercio	Desconocido
8	MUJER	47	47	CDMX	Católica	Licenciatura	Enfermera	Desconocido
9	MUJER	37	36	Chiapas	Católica	Licenciatura	Médico	Desconocido
10	MUJER	34	33	CDMX	Cristiana	Licenciatura	Docente	O(+)
11	MUJER	39	39	CDMX	Ninguna	Licenciatura	Hogar	Desconocido
12	MUJER	66	61	Edo Mex	Ninguna	Técnico	Hogar	Desconocido
13	MUJER	60	58	CDMX	Católica	Licenciatura	Hogar	Desconocido
14	MUJER	67	66	Coahuila	Ninguna	Licenciatura	Contadora	Desconocido
15	MUJER	37	37	Hidalgo	Cristiana	Maestría	Enfermera	O(+)
16	MUJER	36	35	Sinaloa	Católica	Doctorado	Asesora Parlamentaria	O(+)
17	MUJER	49	47	Guerrero	Católica	Licenciatura	Enfermera	O(+)

En cuanto a los antecedentes heredofamiliares, 41.17% de las pacientes presentaron un familiar en primer grado con cáncer (7/17), para dar un total de 15 familiares. De ese total, 73.33% presentaron cáncer de mama (11/15) y el resto de otro tipo (hepático, colon, renal y linfoma). 76.47% de las pacientes presentaron un familiar en segundo o mayor grado con cáncer (13/17), para dar un total de 30 familiares en ese grupo. De ese total, 40% presentaron cáncer de mama (12/30), 16.66% cáncer de próstata (5/30), 10% de colon (3/30), 13.33% gástrico (4/30), 6.66% ovárico (2/30), 6.66% leucemia (2/30), 3.33% laríngeo (1/30) y 3.33% de cuello no especificado (1/30) (Tabla 2).

Tabla 2. Antecedentes heredofamiliares de cáncer

# de caso	Familiares de primer grado		Otros familiares	
	Parentesco	Cáncer	Parentesco	Cáncer
1	No presenta	No presenta	No presenta	No presenta
2	No presenta	No presenta	Tía paterna	Mama
3	Madre	Mama	No presenta	No presenta
4	Madre	Mama	Abuelo paterno Tía segunda paterna Tía materna	Próstata mama mama
5	Hermano Hermano Hermano Hermana	Linfoma Hepático mama colon	No presenta	No presenta
6	Madre	Mama	Tía materna	Ovario
7	dos hermanas	Mama	Abuela materna	Mama
8	No presenta	No presenta	No presenta	No presenta
9	No presenta	No presenta	Abuelo materno Tía materna	Próstata Mama
10	No presenta	No presenta	Abuela materna	Leucemia
11	No presenta	No presenta	Primo materno	Mama
12	Madre y hermana	Mama	Prima materna Primo materno Dos primas maternas Primo materno Tío materno	mama gástrico Ovario Gástrico laríngeo
13	No presenta	No presenta	Abuelo paterno Tía materna Tío materno Tía materna	De cuello no especificado Mama Próstata Colon
14	Padre Tres hermanas	Renal Mama	Abuelo paterno tres tíos paternos dos tíos paternos prima paterna primo paterno	Cáncer gástrico Cáncer gástrico De colon mama De colon

15	No presenta	No presenta	Abuelo materno Tía segunda materna	Próstata mama
16	No presenta	No presenta	Tía paterna tío materno tío materno	mama leucemia Próstata
17	No presenta	No presenta	Prima materna	Mama

En las siguientes figuras (Fig. 1 a 17) se muestran las genealogías de las pacientes que presentaron un resultado positivo en el estudio molecular.

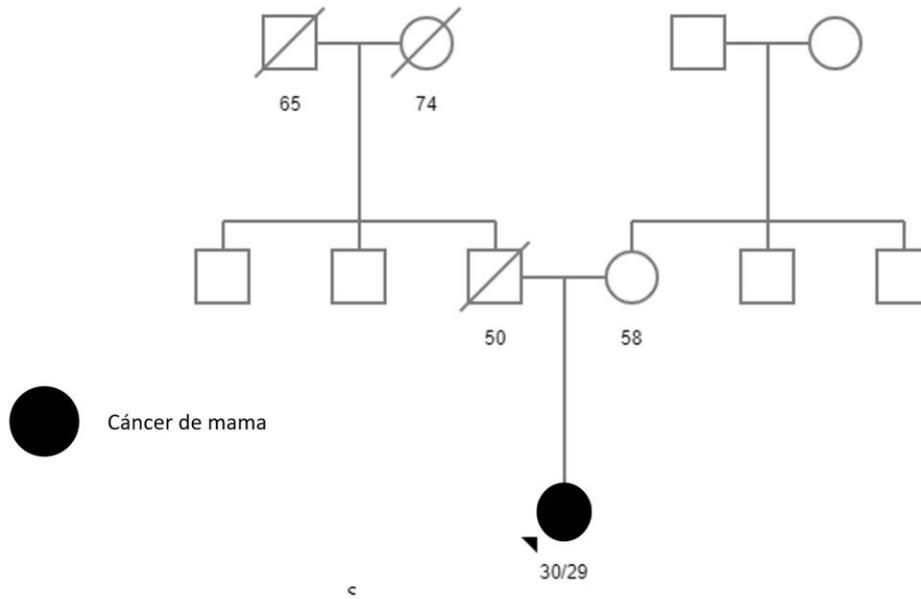


Fig 1. Árbol genealógico caso 1

■ Cáncer de mama unilateral

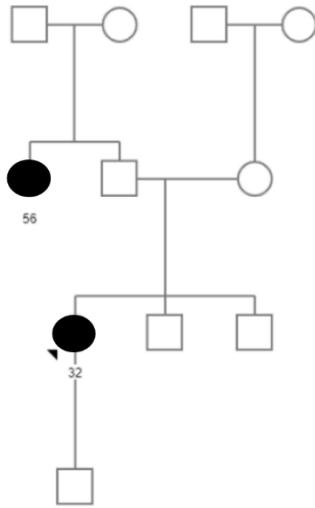


Fig 2. Árbol genealógico caso 2

■ Cáncer de mama

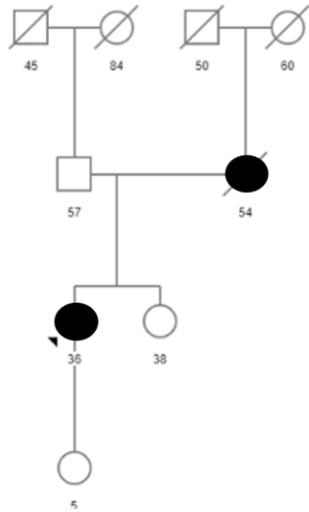


Fig 3. Árbol genealógico caso 3

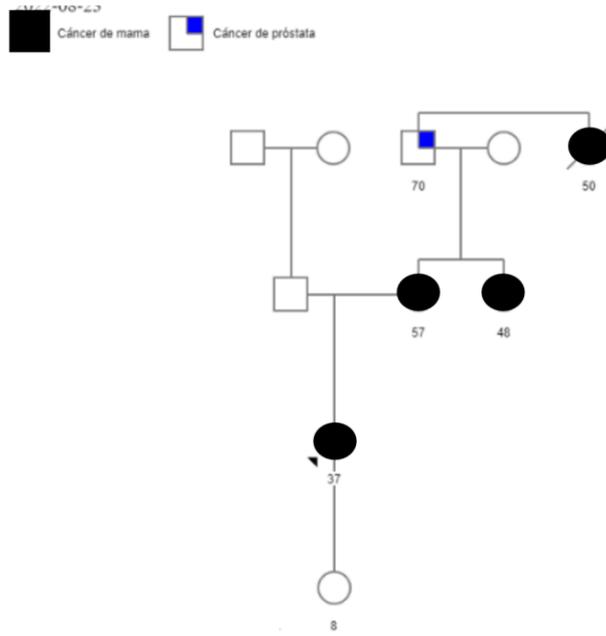


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

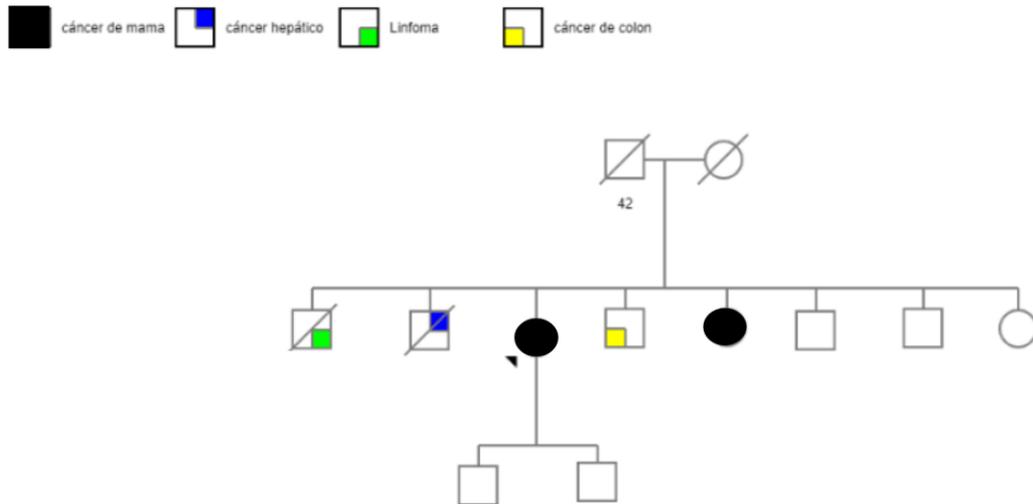


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

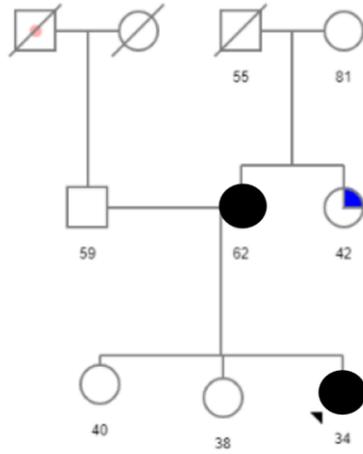


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

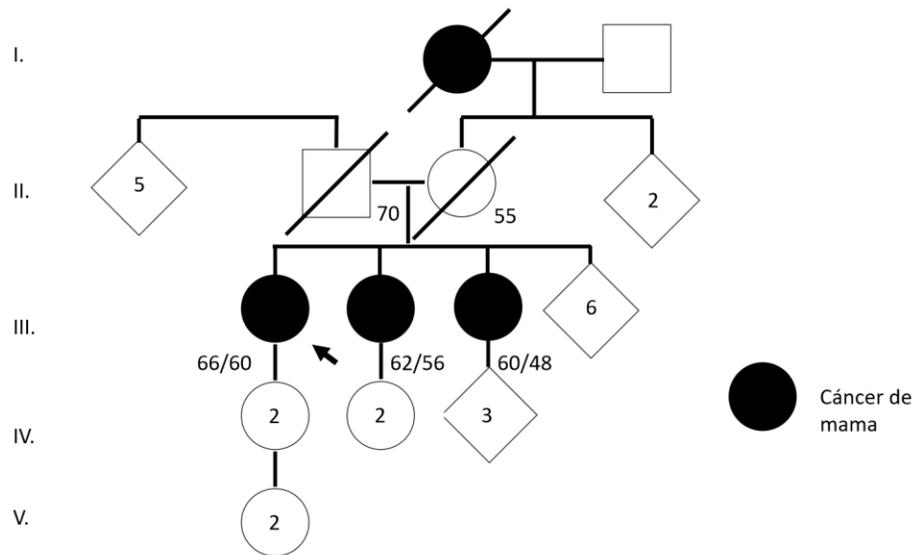


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

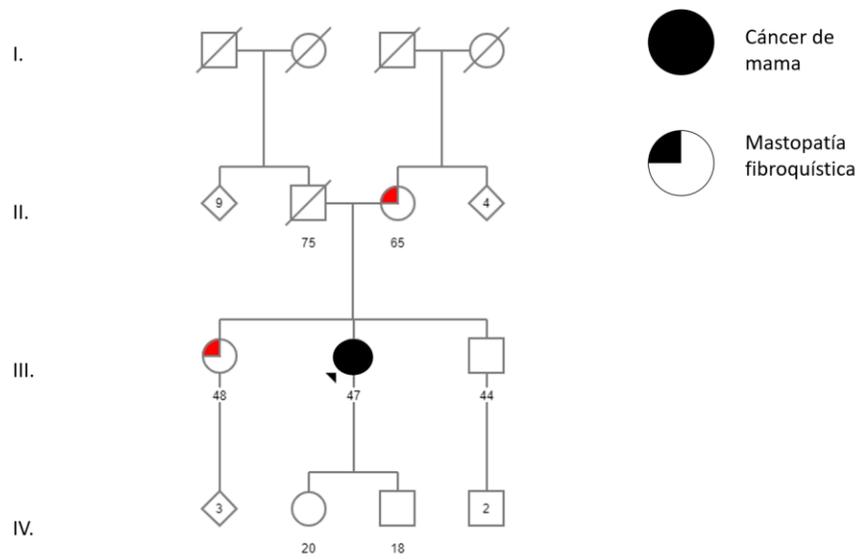


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

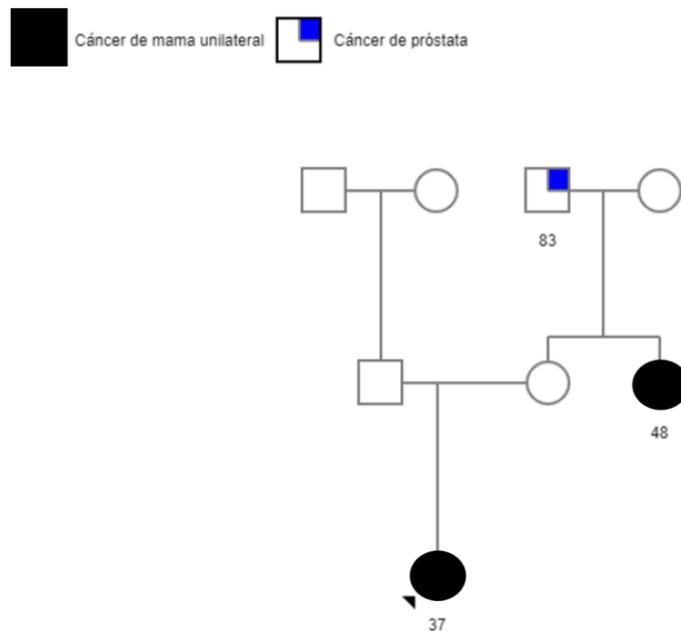


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

■ cáncer de mama □ leucemia

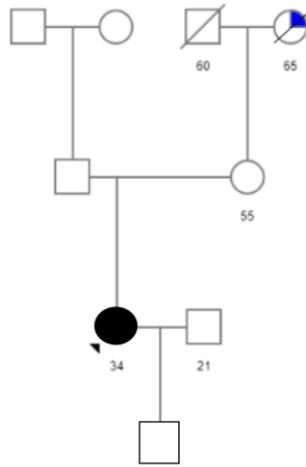


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

■ cáncer de mama □ leucemia

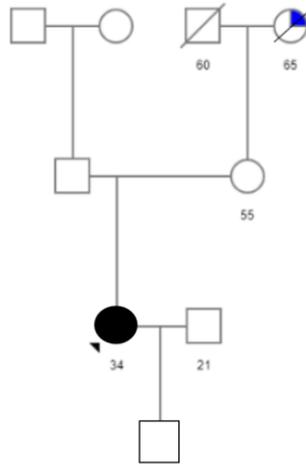


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

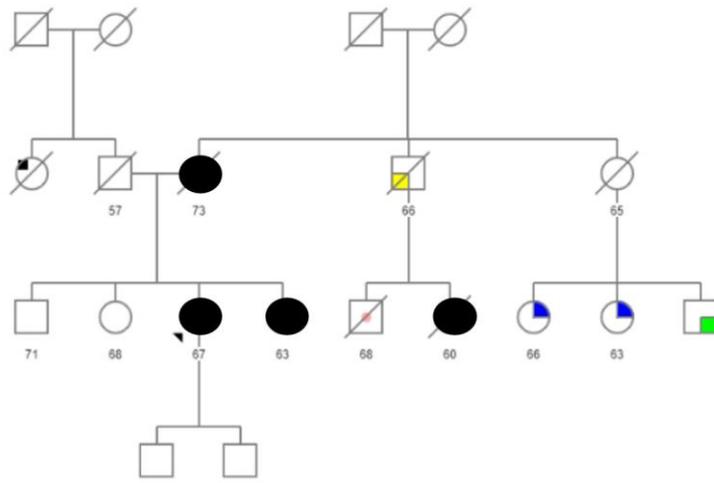


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

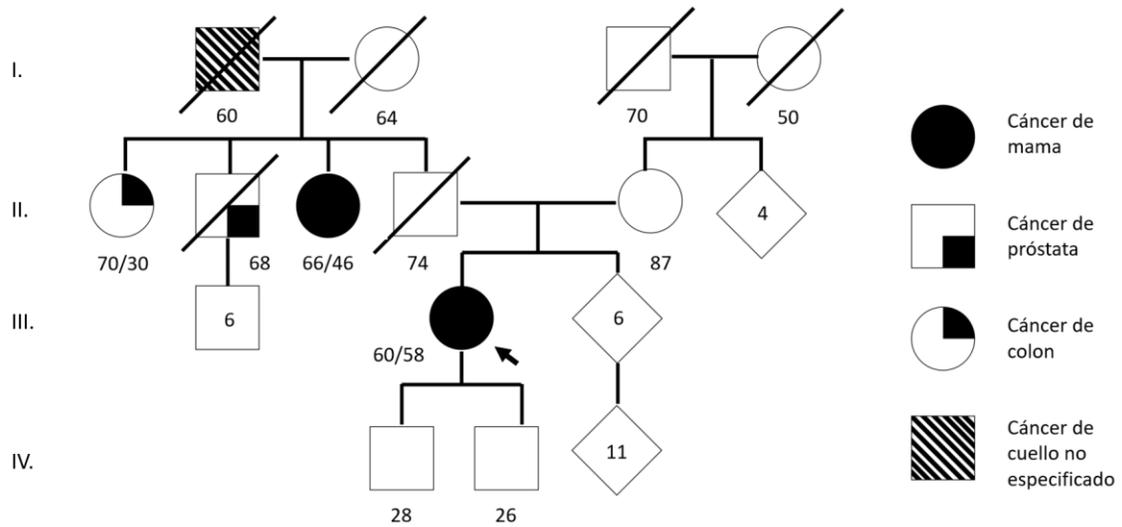


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

■ Cáncer de mama □ Cáncer gástrico □ Cáncer de colon □ Cáncer renal

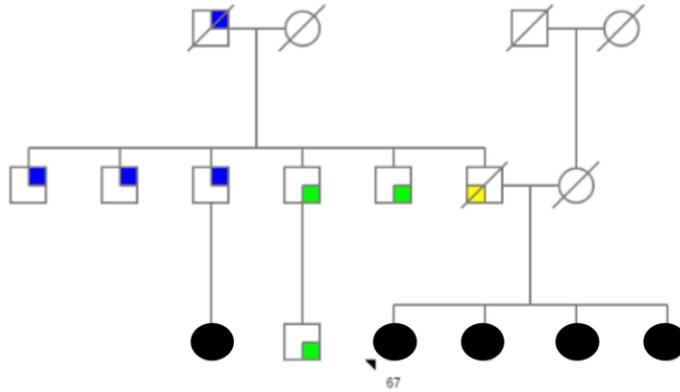


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

■ Cáncer de mama □ Cáncer gástrico □ Cáncer de colon □ Cáncer renal

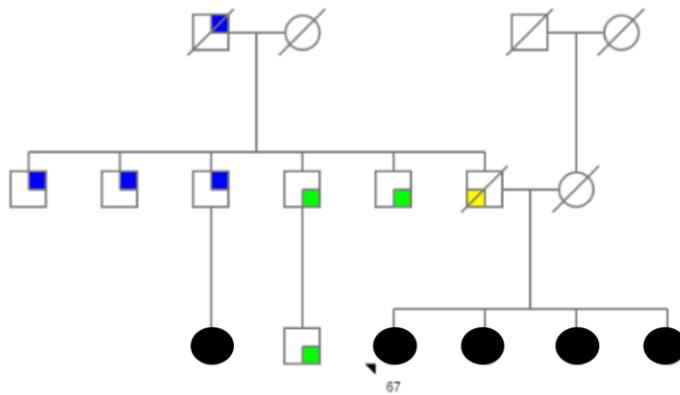


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

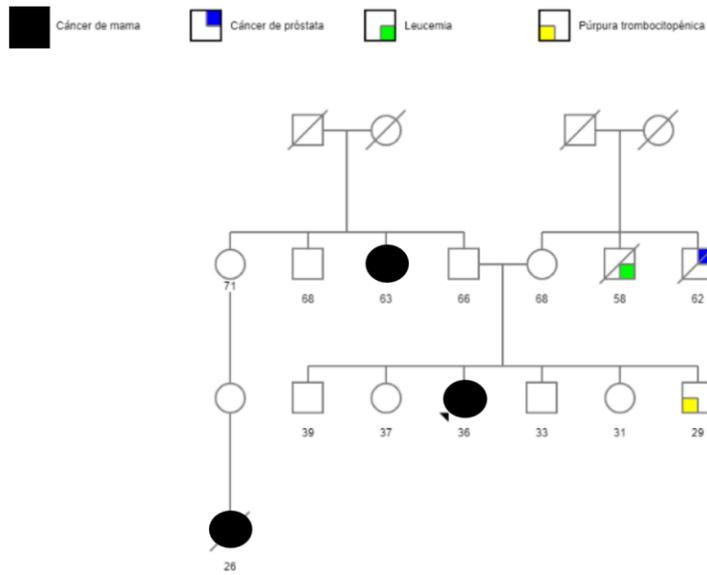


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

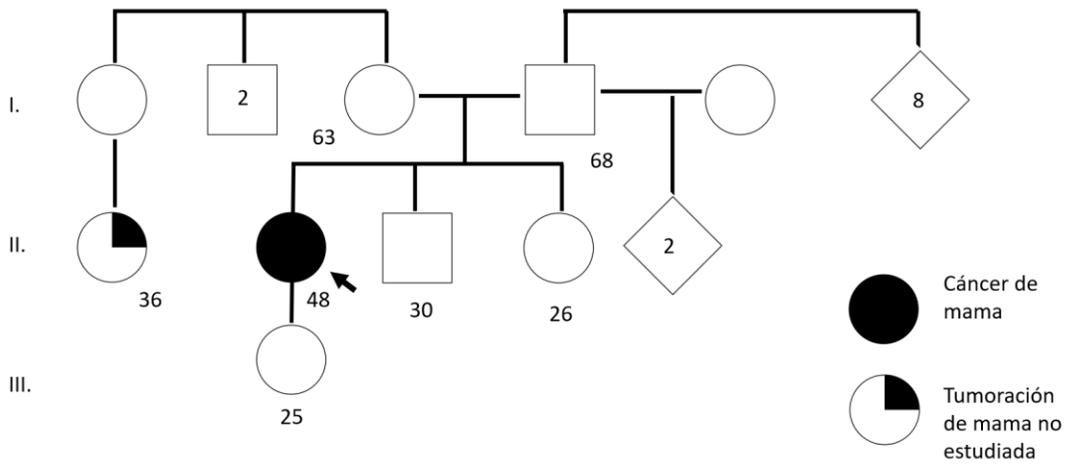


Fig 1.. Árbol genealógico caso 1

Antecedentes personales no patológicos:

Sólo 1 de las pacientes refirió alergias (5.88%). Con respecto a zoonosis, 17.64% de las pacientes refirieron convivencia con perros (3/17), 11.76% con aves domésticas (2/17) y el resto negó la convivencia con animales. 11.76% de las pacientes presentaban antecedente de tabaquismo (2/17), con una edad media de 22.5 años al momento de inicio del hábito, a razón de 1 cigarrillo por día en ambos casos. 29.41% de las pacientes refirieron un hábito de alcoholismo social (5/17), con un promedio de la edad de inicio del hábito a los 19.2 años. Todas las pacientes negaron la exposición a biomasa. (Tabla 3).

Tabla 3. Antecedentes personales no patológicos

Antecedentes no patológicos								
# de caso	Alergias	Zoonosis	Tabaquismo	Inicio	Cigarrillos / día	Alcoholismo	Inicio	Exposición a biomasa
1	Negado	2 aves	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado
2	Negado	Negado	Negado	NA	NA	Social	18 años	Negado
3	Negado	1 perro	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado
4	Negado	Negado	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado
5	Naproxeno	Negado	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado
6	Negado	Ave doméstica	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado
7	Negado	Negado	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado
8	Negado	Negado	Negado	NA	NA	Social	19 años	Negado
9	Negado	Negada	Positivo	25 años	1/día	Social	21 años	Negado
10	Negado	Negada	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado
11	Negado	Negada	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado
12	Negado	Negado	Positivo	20 años	1/día	Negado	NA	Negado
13	Negado	Negado	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado
14	Negado	Negado	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado
15	Negado	1 perro	Negado	NA	NA	Social	20 años	Negado
16	Negado	1 perro	Negado	NA	NA	Social	18 años	Negado
17	Negado	Negado	Negado	NA	NA	Negado	NA	Negado

Antecedentes personales patológicos:

Con respecto a las comorbilidades, se encontró que el 5.88% (1/17) presentaron epilepsia, 5.88% (1/17) hiperreactividad bronquial, 5.88% (1/17) hipoacusia bilateral, 5.88% (1/17) trastorno depresivo, 11.76% (2/17) hipertensión arterial sistémica y dislipidemia. Con respecto al tratamiento, 5.88% (1/17) fueron tratadas con lamotrigina, 5.88% (1/17) con amlodipino y bezafibrato, 5.88% (1/17) con Simbicort y Avamist, 5.88% (1/17) metoprolol y atorvastatina. Respecto a los antecedentes quirúrgicos, se encontró que el 88.23 % (15/17) fueron sometidas a mastectomía radical modificada, en tanto el 11.76% (2/17) no tuvo tratamiento quirúrgico. Respecto a las que fueron intervenidas quirúrgicamente, la media fue de 43.6 años y la mediana de 44 años. (Tabla 4).

Tabla 4. Crónico-degenerativos y cirugías

Crónico-degenerativos y cirugías				
# de caso	Enfermedad	Tratamiento	Cirugías	Edad en cirugía
1	Negados	No aplica	MRM	30
2	Epilepsia	Lamotrigina	MRM	32
3	Negados	No aplica	MRM	35
4	Negados	No aplica	Negadas	No aplica
5	Negados	No aplica	MRM	44
6	Negados	No aplica	MRM	33
7	Negados	No aplica	MRM	59
8	Negados	No aplica	MRM	47
9	Negados	No aplica	MRM	36
10	Negada	No aplica	MRM	34
11	Negados	No aplica	Negadas	No aplica
12	HAS, dislipidemia	Metoprolol, atorvastatina	MRM	60
13	Negado	No aplica	MRM	58
14	HAS, dislipidemia	Amlodipino, bezafibrato	MRM	67
15	Negados	No aplica	MRM	36
16	Hiperreactividad bronquial	Simbicort, Avamist	MRM	36
17	Hipoacusia bilateral	No aplica	MRM	47

Antecedentes gineco-obstétricos:

La edad de menarca promedio fue de 12.23 años, siendo la edad mínima 10 años y la máxima 15 años. La edad de la fecha de última menstruación en promedio fue de 40 años. La diferencia entre la fecha de última menstruación y de la menarca fue de 40 años en promedio. La edad promedio de inicio de vida sexual activa fue de 18.11 años, siendo la edad mínima 16 años, y la máxima 25 años. El promedio de número de parejas sexuales fue de 3.88, con el mínimo de 1 pareja y el máximo de 8. 58.82% de las pacientes se han realizado Papanicolaou (10/17), de las cuales todos los reportes refirieron negatividad a malignidad.

23.52% de las pacientes refieren haber usado anticonceptivos orales como método de planificación familiar (4/17) durante 4.125 años en promedio; 5.88% anticonceptivos inyectables (1/17) durante 18 meses, 5.88% implante subdérmico (1/17) 6 durante 6 años, 5.88% DIU de cobre (1/17), 11.76% oclusión tubárica bilateral (2/17) y 47.05% refirieron no haber usado MPF alguno (8/17).

29.41% de las pacientes nunca han estado embarazadas (5/17), 11.76% lo han estado 1 vez (2/17), 41.17% 2 veces (7/17), 11.76% 3 veces (2/17) y una paciente 4 veces (5.88%). Entre las pacientes que han estado embarazadas se tienen en total 9 partos, 9 cesáreas y 8 abortos. 70.58% de las pacientes lactaron en algún momento de la vida (12/17). El promedio de tiempo de lactancia acumulada para esas pacientes fue de 11 meses. (Tabla 5).

Tabla 5. Antecedentes gineco - obstétricos

AGO										
#	Menarca	FUM	IVSA	NPS	MPF	Tiempo de uso	PAAP	Resultado PAAP	Lactancia acumulada	GPCA
1	11 AÑOS	29 años	18	7	Ninguno	NA	julio 2021	Negativo a malignidad	NA	G0
2	11 AÑOS	31 años	17	2	Inyectable	18 meses	diciembre 2021	Negativo a malignidad	8 MESES	G2P1A1
3	12 AÑOS	37 años	19	1	Ninguno	NA	No realizado	No aplica	6 MESES	G1C1
4	12 AÑOS	36 años	18	3	Negado	NA	No realizado	No aplica	6 MESES	G2C1A1
5	11 AÑOS	44 años	16	5	ACO	3 años	marzo 2018	Negativo a malignidad	18 MESES	G3C0P2A1
6	14 AÑOS	32 años	17	5	Implante	6 años	marzo 2021	Negativo a malignidad	Negado	G0
7	12 AÑOS	50 años	17	1	OTB	NA	No realizado	No aplica	12 MESES	G2P2C0A0
8	13 AÑOS	45 años	18	2	OTB	NA	noviembre 2019	Negativo a malignidad	18 meses	G4P1C2A1

9	13 años	36 años	25	1	Ninguno	NA	No realizado	No realizado	Negado	G0
10	15 años	33 años	17	8	Ninguno	NA	abril 2021	Negativo a malignidad	12 meses	G2P0A1C1
11	13 años	39 años	18	4	Ninguno	NA	No realizado	No aplica	NA	G0
12	10 años	47 años	17	6	ACO	7 años	diciembre2020	Negativo a malignidad	18 meses	G2P0C2A0
13	13 años	53 años	19	7	Ninguno	NA	No realizado	No aplica	6 meses	G2P2C0A0
14	12 años	50 años	17	4	Ninguno	NA	No realizado	No aplica	8 meses	G2P0C1A1
15	11 años	36 años	18	4	ACO	4 años	marzo 2020	Negativo a malignidad	8 meses	G1P0C1A0
16	12 años	35 años	19	3	ACO	2 años 6 meses	febrero 2021	Negativo a malignidad	NA	G0
17	13 AÑOS	47 años	18	3	DIU cobre	NA	enero 2020	Negativo a malignidad	12 meses	G3P1C0A2

Características clínicas del tumor

Con respecto a las características clínicas del tumor, casi la totalidad de las pacientes, tuvieron una presentación unilateral (94.12%, 16/17), mientras sólo una tuvo una presentación bilateral metacrónico. De los 16 casos unilaterales, 43.75% fueron en mama derecha (7/16) y 56.25% en mama izquierda (9/16). El 88.23% de las pacientes presentaron la neoplasia en el cuadrante superior externo (15/17), sin embargo, la paciente con cáncer de mama bilateral presentó en ambas mamas la neoplasia en el cuadrante inferior interno, y otra paciente la presentó en el cuadrante inferior externo. (Tabla 6).

Tabla 6. Características clínicas

Características clínicas				
Unilateral/bilateral	Lado	Cuadrante	Si/no	Tipo
Unilateral	Izquierdo	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Izquierdo	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Izquierdo	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Izquierdo	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Derecho	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Izquierdo	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Izquierdo	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Derecho	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Izquierdo	Cuadrante inferior	No	No aplica
Unilateral	Derecho	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Derecho	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Izquierdo	Cuadrante superior externo	No	No aplica

Unilateral	Derecho	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Bilateral	Bilateral	Cuadrante inferior interno	Si	Mama metacrónico
Unilateral	Derecho	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Izquierdo	Cuadrante superior externo	No	No aplica
Unilateral	Derecho	Cuadrante superior externo	No	No aplica

Características inmuno-histoquímicas

Con respecto a las características del tumor, 15/17 pacientes presentaron carcinoma ductal infiltrante. 2 pacientes presentaron carcinoma lobulillar infiltrante. Se consideró en ambas estadísticas a la paciente con cáncer de mama bilateral, la cual presentó CDI en una mama y CLI en la otra. En el estudio inmunohistoquímico de los receptores de estrógeno, progesterona y HER2, de las 18 neoplasias revisadas 11.11% fueron positivas para los 3 marcadores (2/18), 5.55% sólo para el receptor de estrógenos (1/18), 5.55% sólo para el receptor de progesterona (1/18), 5.55% sólo para HER2 (1/18), 27.77% para ambos hormonales positivos y HER2 negativo (5/18), 5.55% para receptor de progesterona y HER2 positivos con receptor de estrógenos negativo (1/18) y por último 38.88% fueron triple negativos (7/18).

De acuerdo con el grado histológico de Scarff – Bloom - Richardson, se reportó desde una mínima de 3 puntos en el 5.5% de las neoplasias (1/18) a una máxima de 8 en el 16.66% (3/18). Se reportaron 7 puntos en 22.22% de las neoplasias (4/18), 6 puntos en el 16.66% (3/18), 5 puntos en el 22.22% (4/18) y 4 puntos en el 16.66% (3/18).

En cuanto al estadio, 38.88% de las neoplasias (7/18) se encontraban en un estadio III, 55.55% en un estadio II (10/18) y 5.55% en un estadio IA (1/18). De las que estaban en EC II, 50% presentaban una subclasificación IIA (5/10) y 50% IIB (5/10). De las que estaban en EC III, 42.85% presentaban una subclasificación IIIA (3/7), 28.57% IIIB (2/7) y 28.57% IIIC (2/7). (Tabla 7).

Tabla 7. Características inmuno-histoquímicas.

# de caso	Histología (ej. CDI)	Inmunohistoquímica	SCR	EC	TNM
1	CDI	TRIPLE NEGATIVO	7	IIIA	T3N1M0
2	CDI	TRIPLE NEGATIVO	6	IIA	T2N0M0
3	CDI	RE 60% RP 30% HER2+	3	IIA	T1N1M0
4	CDI	RE 80% / RP 70% / HER 2 -	7	IIIC	T3N3M0
5	CDI	RH + Y HER 2 NEG	4	IIA	T2N0MX
6	CDI	RE(-), RP40%, HER2 NEG	5	IIA	T2N0M0
7	CDI	RE(-), RH(+), HER2(+)	8	IIIB	T3N1M0
8	CDI	TRIPLE NEGATIVO	4	IIB	T3N0M0
9	CDI	TRIPLE NEGATIVO		IIB	T2N1M0
10	CDI	TRIPLE NEGATIVO	3	IIB	T3N0M0
11	CDI	TRIPLE NEGATIVO	5	IIB	T3N0M0
12	CDI	RE 50%, RP 50%, HER2 NEGATIVO	6	IA	T1BN0M0
13	CLI	TRIPLE NEGATIVO	6	IIIA	T2N0M0
14	MD CDI, MI CLI	MD RE90%, RP70%, HER2-, KI67 20%; MI RE 80%, RP-, HER2-, KI67 5%	8	MD IIB, MI IIA	MD T4AN1M0 / MI T2N0M0
15	CDI	RH-. HER2+	8	IIIA	T2N2M0
16	CDI	RE70%, RP 5%, HER2-, KI67 10 %	6	IIIC	T2N1M0
17	CDI	RE 80% Y RP 60% / HER 2 +	6	IIIB	T1N0M0

Variantes en *BRCA1* y *BRCA2*

Se encontraron variantes en los genes BRCA en 23.52% de las pacientes (4/17), de las cuales 50% fueron de significado incierto (2/4), 25% probablemente benignas (1/17) y 25% patogénicas (1/17). 2 de esas variantes fueron por mutaciones puntuales de cambios de nucleótido en regiones codificantes de los genes; 1 variante fue secundaria a una delección que provocó un corrimiento del marco de lectura, y 1 variante encontrada fue la delección clásica de los exones 9-12 considerada de efecto fundador mexicano. El 75% de las variantes correspondieron a BRCA1 (3/4), mientras que el 25% a BRCA2 (1/4). (Tabla 8)

Tabla 8. Variantes en *BRCA1* y *BRCA2*

Variantes en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>			
Caso	¿Se encontró variante?	Variante	Patogenicidad
1	No	No aplica	NA
2	No	No aplica	NA
3	No	No aplica	NA
4	No	No aplica	NA
5	No	No aplica	NA
6	Sí	BRCA1 (del9-12)	VP
7	Sí	BRCA1 c.4796A>G (p.D1599G)	VUS
8	Sí	BRCA1 c.3024G>A (p.M1008I)	VPB
9	No	No aplica	NA
10	No	No aplica	NA
11	No	No aplica	NA
12	Sí	BRCA2 c.6458delC (p.P2153fs)	VP
13	No	No aplica	NA
14	No	No aplica	NA
15	No	No aplica	NA
16	No	No aplica	NA
17	No	No aplica	NA

DISCUSION

Teniendo en cuenta lo anterior en el presente trabajo se revisaron los resultados de 17 pacientes con antecedentes heredofamiliares, características clínicas, histopatológicas o inmunohistoquímicas que sugieren un síndrome de cáncer hereditario. La tasa de positividad para portadoras de variantes en los genes BRCA fue de 23.52%.

En un estudio de cohortes retrospectivo²⁶ se encontró que de 21,124 mujeres con cáncer de mama el 14.3% presentó otro cáncer, a diferencia de su grupo control donde el hallazgo se observó en el 10% de la muestra, concluyendo que las pacientes con cáncer de mama tienen una mayor incidencia de aparición de otro cáncer. En el presente trabajo se encontró que el 5.88% de la muestra (1/17) presentó otra neoplasia posterior al diagnóstico inicial de cáncer de mama. Como se observa, la incidencia de una nueva neoplasia en nuestra muestra fue reportada en un tercio de los casos que se esperaría encontrar de acuerdo con la revisión citada. Una de las posibles causas de tal diferencia es la edad, pues en la revisión la edad media fue de 63.1 años, mientras que en nuestra muestra fue de 44.35 años. Otro argumento como una probable causa para esta incidencia menor son los años de seguimiento a partir del diagnóstico de cáncer de mama. En el estudio se consideraron 10 años de seguimiento, mientras que, en nuestra muestra la diferencia de edad al diagnóstico con respecto a la edad actual de las pacientes fue de 1.76 años, con sólo 5.88% de las pacientes con 6 años desde el diagnóstico hasta 17.64% de las pacientes con menos de 1 año (el periodo máximo y mínimo respectivamente), por lo que si se amplía el tiempo de seguimiento de las pacientes es probable que esta incidencia aumente.

La frecuencia de la delección de los exones 9-12 de *BRCA1* que encontramos en esta revisión (5.88%) concuerda con la reportada por Fragoso y Vidal en 2019 (5%). Sin embargo, debido a las opciones de estudio a las que pueden acceder los pacientes de forma general, otra forma del abordaje molecular es mediante estudios secuenciación de nueva generación (paneles genéticos por ejemplo) para otros alelos de genes de alta y moderada penetrancia, por lo que desde el estudio inicial también debe considerarse una opción a presentar al paciente al momento de la consulta. Cabe mencionar que, siempre que haya posibilidad, en los estudios moleculares se deberían incluir genes aún diferentes de los relacionados a SCMOH, pues el cáncer de mama se puede presentar como parte de otros síndromes de cáncer hereditario.

El carcinoma ductal infiltrante es el tipo más frecuentemente encontrado en SCMOH¹⁶, lo cual concuerda con los hallazgos de esta revisión (100% de las pacientes con estudio genético positivo presentaron CDI). Con respecto a la inmunohistoquímica, un estudio del 2015 en población mexicana reportó que en 23% de los pacientes con cáncer de mama triple negativo se encontró una mutación en los genes *BRCA*²³. En esta revisión, 7 pacientes presentaron cáncer triple negativo, pero sólo paciente con esta inmunohistoquímica fue portadora de una mutación puntual en *BRCAl* (es decir, 33.3% de las pacientes con cáncer TN y alelos de riesgo o 25% del total de las pacientes con cáncer TN). Sin embargo, actualmente la variante se considera probablemente benigna, lo cual debe interpretarse de forma cuidadosa, ya que esta clasificación puede cambiar con futuros hallazgos. Nuevamente esto resalta la necesidad de atención de este grupo de pacientes por un especialista en Genética Médica.

CONCLUSIONES

Las variantes moleculares que afectan a los genes *BRCA1* y *BRCA2* en la población del CMN “20 de Noviembre” siguen una distribución similar a la reportada en otras literaturas a nivel nacional e internacional, siendo la predominante *BRCA1*.

El diagnóstico de SCHMO se sospecha con base en criterios bien establecidos que aumentan la probabilidad de encontrar genes de alta y moderada penetrancia de riesgo pacientes con cáncer de mama.

Es importante la búsqueda de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en el modelo de medicina basada en evidencias para guiar las recomendaciones para la vigilancia estrecha y las intervenciones terapéuticas en las pacientes con cáncer de mama.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J. et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 5, 66 (2019).
- 2.- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021, 18 de octubre). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama [Comunicado de prensa]. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_LUCHACANCER2021.pdf
- 3.- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752.
- 4.- Kondov, B., Milenković, Z., Kondov, G., Petrushevska, G., Basheska, N., Bogdanovska-Todorovska, M., Tolevska, N., & Ivković, L. (2018). Presentation of the Molecular Subtypes of Breast Cancer Detected By Immunohistochemistry in Surgically Treated Patients. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 6(6), 961–967.
- 5.- Filippini, S. E., & Vega, A. (2013). Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 18(4), 1358–1372.
- 6.- Eisinger, F., Sobol, H., Serin, D., & Whorton, J. C. (1998). Hereditary breast cancer, circa 1750. *Lancet (London, England)*, 351(9112), 1366.
- 7.- Arshad, S., Ishaque, I., Mumtaz, S., Rashid, M. U., & Malkani, N. (2021). In-Silico Analyses of Nonsynonymous Variants in the BRCA1 Gene. *Biochemical genetics*, 59(6), 1506–1526.
- 8.- Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M (2013) Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes. *Oncol Rep* 30:1019–1029.
- 9.- Sheikh, A., Hussain, S. A., Ghori, Q., Naeem, N., Fazil, A., Giri, S., Sathian, B., Mainali, P., & Al Tamimi, D. M. (2015). The spectrum of genetic mutations in breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 16(6), 2177–2185.
- 10.- Ellsworth, D. L., Turner, C. E., & Ellsworth, R. E. (2019). A Review of the Hereditary Component of Triple Negative Breast Cancer: High- and Moderate-Penetrance Breast Cancer Genes, Low-Penetrance Loci, and the Role of Nontraditional Genetic Elements. *Journal of oncology*, 2019, 4382606.

- 11.- M Weischer, SE Bojesen, C Ellervik, A Tybjaerg-Hansen and BG Nordestgaard: CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 26, 542-548 (2008).
- 12.- LL Paglia, A Lauge, J Weber, J Champ, E Cavaciuti, A Russo, JL Viovy and D Stoppa-Lyonnet: ATM germline mutations in women with familial breast cancer and a relative with haematological malignancy. *Breast Cancer Res Treat* 119, 443-452 (2010)
- 13.- A Renwick, D Thompson, S Seal, P Kelly, T Chagtai, M Ahmed, B North, H Jayatilake, R Barfoot, K Spanova, L McGuffog, DG Evans, D Eccles, Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), DF Easton, MR Stratton and N Rahman: ATM mutations that cause ataxiatelangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 38, 873-875 (2006)
- 14.- Knerr, S., Guo, B., Mittendorf, K. F., Feigelson, H. S., Gilmore, M. J., Jarvik, G. P., Kauffman, T. L., Keast, E., Lynch, F. L., Muessig, K. R., Okuyama, S., Veenstra, D. L., Zepp, J. M., Goddard, K., & Devine, B. (2022). Risk-reducing surgery in unaffected individuals receiving cancer genetic testing in an integrated health care system. *Cancer*, 128(16), 3090–3098.
- 15.- Chai X, Friebel TM, Singer CF, et al. Use of risk-reducing surgeries in a prospective cohort of 1,499 BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;148(2):397–406.
- 16.- Fragoso-Ontiveros, V., Velázquez-Aragón, J. A., Nuñez-Martínez, P. M., de la Luz Mejía-Aguayo, M., Vidal-Millán, S., Pedroza-Torres, A., Sánchez-Contreras, Y., Ramírez-Otero, M. A., Muñiz-Mendoza, R., Domínguez-Ortíz, J., Wegman-Ostrosky, T., Bargalló-Rocha, J. E., Gallardo-Rincón, D., Reynoso-Noveron, N., Arriaga-Canon, C., Meneses-García, A., Herrera-Montalvo, L. A., & Alvarez-Gomez, R. M. (2019). Mexican BRCA1 founder mutation: Shortening the gap in genetic assessment for hereditary breast and ovarian cancer patients. *PloS one*, 14(9), e0222709.
- 17.- Vaca-Paniagua, F., Alvarez-Gomez, R. M., Fragoso-Ontiveros, V., Vidal-Millan, S., Herrera, L. A., Cantú, D., Bargallo-Rocha, E., Mohar, A., López-Camarillo, C., & Pérez-Plasencia, C. (2012). Full-exon pyrosequencing screening of BRCA germline mutations in Mexican women with inherited breast and ovarian cancer. *PloS one*, 7(5), e37432.
- 18.- Fragoso-Ontiveros, V., Velázquez-Aragón, J. A., Nuñez-Martínez, P. M., de la Luz Mejía-Aguayo, M., Vidal-Millán, S., Pedroza-Torres, A., Sánchez-Contreras, Y., Ramírez-Otero, M. A., Muñiz-Mendoza, R., Domínguez-Ortíz, J., Wegman-Ostrosky, T., Bargalló-Rocha, J. E., Gallardo-Rincón, D., Reynoso-Noveron, N., Arriaga-Canon, C., Meneses-García, A., Herrera-Montalvo, L. A., & Alvarez-Gomez, R. M. (2019). Mexican BRCA1 founder mutation: Shortening

the gap in genetic assessment for hereditary breast and ovarian cancer patients. *PloS one*, 14(9), e0222709.

19.- Weitzel JN, Lagos V, Blazer KR, Nelson R, Ricker C, Herzog J, et al. Prevalence of BRCA mutations and founder effect in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005; 14: 1666 – 1671.

20.- Weitzel JN, Clague J, Martir-Negron A, Ogaz R, Herzog J, Ricker C, et al. Prevalence and type of BRCA mutations in Hispanics undergoing genetic cancer risk assessment in the southwestern United States: a report from the Clinical Cancer Genetics Community Research Network. *J Clin Oncol*. 2013; 31: 210–6.

21.- Villarreal-Garza C, Alvarez-Gómez RM, Pérez-Plasencia C, Herrera LA, Herzog J, Castillo D, et al. Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. *Cancer*. 2015; 121: 372 – 8.

22.- Torres-Mejía G, Royer R, Llacuachaqui M, Akbari MR, Giuliano AR, Martí'nez-Matsushita L, et al. Recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexican women with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015; 24: 498–505.

23.- Villarreal-Garza C, Weitzel JN, Llacuachaqui M, Sifuentes E, Magallanes-Hoyos MC, Gallardo L, et al. The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among young Mexican women with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015; 150: 389–94.

24.- Torres D, Rashid MU, Colombian Breast Cancer Study Group (COLBCS), Seidel-Renkert A, Weitzel JN, Briceno I, et al. Absence of the BRCA1 del (exons 9–12) mutation in breast/ovarian cancer families outside of Mexican Hispanics. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 117: 679–81.

25.- Fanale, D., Incorvaia, L., Filorizzo, C., Bono, M., Fiorino, A., Calò, V., Brando, C., Corsini, L. R., Barraco, N., Badalamenti, G., Russo, A., & Bazan, V. (2020). Detection of Germline Mutations in a Cohort of 139 Patients with Bilateral Breast Cancer by Multi-Gene Panel Testing: Impact of Pathogenic Variants in Other Genes beyond BRCA1/2. *Cancers*, 12(9), 2415

26.- Nikolov, I., Kostev, K., & Kalder, M. (2022). Incidence of other cancer diagnoses in women with breast cancer: a retrospective cohort study with 42,248 women. *Breast cancer research and treatment*, 195(1), 75–82.

ANEXO 1



GOBIERNO DE
MÉXICO



ISSSTE
INSTITUTO DE SEGURIDAD
Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO

CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

Dirección

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

COMBIOÉTICA 03-017-09-11052016

CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD.

NOMBRE DEL ESTUDIO:

Epidemiología molecular de cáncer hereditario de mama y ovario en pacientes del CMN 20 de Noviembre, ISSSTE.

Lugar y fecha: _____

Por favor tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga, para decidir si participa o no deberá tener el conocimiento suficiente acerca de los beneficios y riesgos del presente estudio de investigación.

Estimado Señor/a: _____, se le invita a participar en el estudio arriba mencionado, que se desarrollará en el CMN "20 de Noviembre", cuyo objetivo será el determinar variantes en los genes de BRCA 1 y BRCA 2 en pacientes con sospecha de Síndrome Hereditario de Cáncer de Mama y Ovario (SCHMO). Lo anterior con la finalidad de: obtener un diagnóstico molecular de SCHMO, caracterizar las variantes que se encuentran en la población mexicana, otorgar asesoramiento genético y si fuera el caso, una terapéutica dirigida.

Su participación en el estudio consiste en: brindar datos personales, familiares y clínicos, estos últimos podrían tomarse de su expediente médico; además permitir la toma de una muestra sanguínea de 5 ml, de la cual de obtendrá DNA para el estudio de variantes en genes BRCA 1 y BRCA 2.

BENEFICIOS: Usted podrá tener acceso a la información global sobre este estudio en caso de solicitarlo. Se le proporcionará el resultado del estudio molecular, si el proceso técnico es exitoso, ya que puede haber contratiempos si no se consigue la extracción del DNA o existen problemas técnicos que imposibiliten la emisión de un resultado completo. Aunado a lo anterior, le informamos que las técnicas que serán utilizadas en este protocolo no permiten la detección del 100% de las variantes. Recibirá asesoramiento genético independientemente de que se obtenga o no un resultado molecular.

RIESGOS: Su participación no conlleva riesgo alguno para su salud. Sin embargo, los pacientes podrían presentar ligero dolor y/o equimosis en el sitio de punción venosa.

DISPONIBILIDAD DE TRATAMIENTO MEDICO Y/O INDEMINIZACIÓN: Este estudio no presenta riesgos por intervenciones médicas o procedimientos quirúrgicos.

PARTICIPACIÓN

Su participación es VOLUNTARIA, usted puede decidir libremente participar o no, esto no afectará su derecho para recibir atención médica en el CMN "20 de Noviembre", si participa, puede retirarse del estudio en el momento en que lo desee sin que esto influya sobre el tratamiento habitual que le ofrece el hospital para su enfermedad de base.

1/3

Presidente del Comité de Ética en Investigación: Dr. Ricardo Ortega Pineda
Av. Felix Cuevas 540 Col. Del Valle, C.P. 03100 Alcaldía Benito Juárez, Ciudad de México
Tel.: (55) 52005003 www.gob.mx/issste





INFORMACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS ALTERNATIVOS O TRATAMIENTOS EXISTENTES: No aplica

MANEJO DE LA INFORMACION.

En la recolección de datos personales se siguen todos los principios que marca la ley: Licitud, calidad, consentimiento, información, finalidad, lealtad, proporcionalidad y responsabilidad. Se han implementado las medidas de seguridad, técnicas, administrativas y físicas necesarias para proteger sus datos personales y evitar daño, pérdida, alteración, acceso o tratamiento no autorizado.

Su nombre será resguardado en el estudio, y en la base de datos sólo existirá un código alfa- numérico; las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y se codificarán con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Los códigos que identifican su muestra o información estarán solo disponibles a los investigadores titulares quienes están obligados por ley a no divulgar su identidad. La duración del protocolo será de 6 meses, por lo que la muestra biológica de sangre y DNA será almacenada por ese tiempo en refrigerador de -4°C y congelador de -20°C, respectivamente o hasta el término de su participación y entrega de resultados. Su seguimiento estará encaminado a brindarle un diagnóstico correcto, así como asesoramiento genético para usted y su familia, posterior a lo cual, su muestra de sangre será desechada según marcan las directrices de las Normas Oficiales Mexicanas en relación al manejo, conservación y eliminación de muestras biológicas; usted será dado de alta del Servicio de Genética y su participación en el proyecto estará concluida.

Usted tendrá acceso a la información sobre este estudio en caso de solicitarlo.

PARTICIPANTE.

Confirmando que se lleva a cabo el proceso de consentimiento informado y haber recibido información suficiente y clara sobre el estudio propuesto, doy mi autorización para ser incluido en este proyecto de investigación, reservándome el derecho de abandonarlo en cualquier momento si así lo decido.

Firma

Nombre y firma del Participante o Representante legal.

Parentesco: _____

Domicilio: _____





TESTIGOS:

(1) Nombre y firma

Parentesco: _____

Domicilio: _____

(2) Nombre y firma

Parentesco: _____

Domicilio: _____

INVESTIGADOR O MÉDICO QUE INFORMA: _____

Le he explicado al Sr/(a) _____, la naturaleza y los propósitos de la investigación, así como los riesgos y beneficios que implica su participación. He dado respuesta a todas sus dudas, y le he preguntado si ha comprendido la información proporcionada, con la finalidad de que pueda decidir libremente participar o no en este estudio. Acepto que he leído, conozco y me apego a la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos, que pondré el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación, por encima de cualquier otro objetivo.

INVESTIGADOR RESPONSABLE.

Dra. María del Carmen Chima Galán.	_____
Nombre	firma

Teléfono de contacto: 55 5200-5003 ext 14645.

El documento se expide por duplicado, entregando una copia al participante.





**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DEL DEL
ANÁLISIS GENÉTICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME
HEREDITARIO DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO (ADULTO)**

No. de Folio: _____

Nombre:	
Edad:	Fecha:
Género: F M	Hora:
Domicilio:	
Teléfono:	
Correo electrónico:	
Investigador responsable: Dra. Claudia Fabiola Méndez Catalá Teléfono de contacto: 5527515842 Correo electrónico: mendezcatalacf@iztacala.unam.mx División de Investigación y Posgrado Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM	
Presidenta de la Comisión de Ética: M. C. Esp. Federico Sandoval Olvera Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM	

Yo, _____,
(nombre del paciente)

acepto libre y voluntariamente participar en el proyecto de investigación titulado "Identificación y análisis de mutaciones en los genes involucrados con el desarrollo del síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario en México". Se me aclara que el estudio tiene una duración mínima de seis meses y máxima de un año.

Se me ha informado que la invitación a participar es de carácter estrictamente personal e individual y que el objetivo del proyecto es estudiar las alteraciones genéticas de personas con la enfermedad que yo padezco, denominada síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario. Mi participación consistirá en proporcionar los datos necesarios para elaborar un expediente clínico, mediante entrevista y examen físico completo. Además, se me tomará, en una sola ocasión, una muestra de sangre venosa de una de mis extremidades superiores (mano, antebrazo o brazo) no mayor de 10 mililitros. La obtención de datos y de muestras se llevará a cabo en una sola ocasión y no se requiere ningún tipo de preparación previa, no es necesario acudir en ayunas. Los riesgos y molestias derivados de la entrevista, el examen físico y la toma de muestras se consideran mínimos, solo se espera dolor o moretón en el sitio del piquete, que pueden durar uno o dos días. Toda mi información personal y la referente a mi enfermedad es confidencial, es decir, que ninguna persona, además de los investigadores o los médicos tratantes que yo decida, tendrá acceso a ella. Se me ha informado que los datos se almacenarán en un lugar seguro de acceso restringido. Entiendo que conservo el derecho de retirarme de la investigación en el momento en que yo lo decida, sin dar explicaciones y que mis decisiones no afectarán la atención médica que recibo.

Los beneficios personales esperados de mi participación en esta investigación serían la identificación de la alteración genética que tengo yo y tal vez algunos de mis familiares, lo que permitirá tener un diagnóstico más preciso de la enfermedad. Si lo solicito, los investigadores me orientarán y referirán a sitios en donde puedan proporcionarme la atención médica que requiera.

Si tengo alguna duda con respecto a los derechos que tengo como participante de este proyecto de investigación, se me proporcionó el correo electrónico del Comité de Ética de la institución: etica.iztacala@gmail.com y que es ajena al investigador.

Declaro que se me ha informado, se me han aclarado dudas y he comprendido en que consiste mi participación en este estudio y las posibles consecuencias o riesgos. Además, se me brinda una copia de esta carta después que la haya firmado.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del médico

Nombre y firma testigo

Nombre y firma testigo