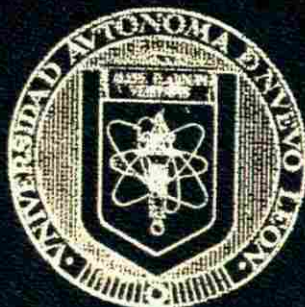


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**BUSQUEDA DE LAS MUTACIONES MAS
FRECUENTES DEL GEN BRCA1 EN PACIENTES CON
CANCER DE MAMA, EN EL NORESTE DE MEXICO**

POR

ANA LAURA CALDERON GARCIDUEÑAS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Marzo de 1998

TM

RC280

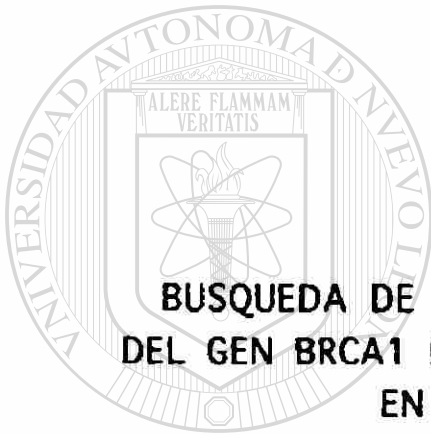
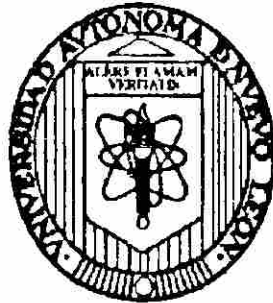
.B8

C3

C.1

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**BUSQUEDA DE LAS MUTACIONES MAS FRECUENTES
DEL GEN BRCA1 EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA,
EN EL NORESTE DE MEXICO**

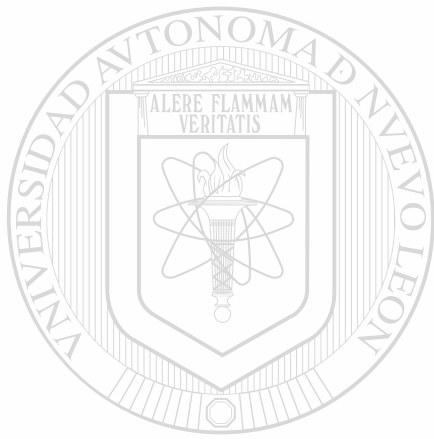
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
ANA LAURA CALDERON GARCIDUEÑAS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRIA EN CIENCIAS con
Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Marzo de 1998



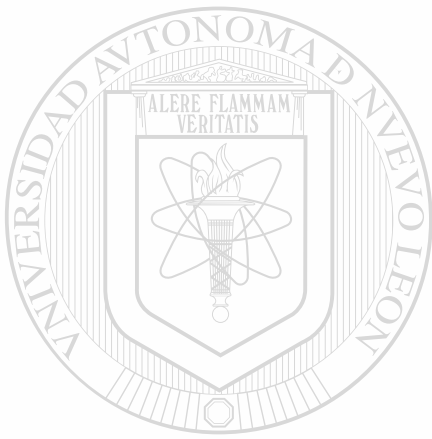
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TM
RC280
.B8
C3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

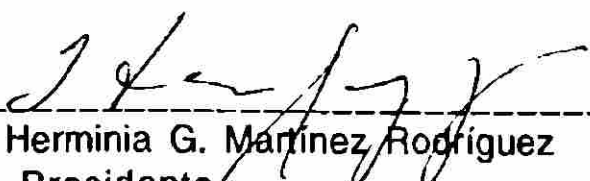
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

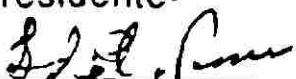


**BUSQUEDA DE LAS MUTACIONES MAS FRECUENTES
DEL GEN BRCA1 EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA,
EN EL NORESTE DE MEXICO**

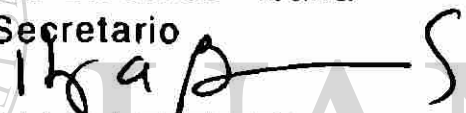
Aprobación de la Tesis:



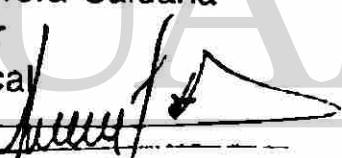
Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Presidente



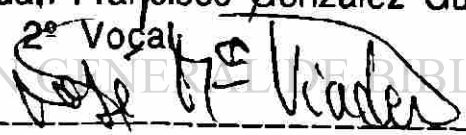
Dra. Lilia Cárdenas Ibarra
Secretario



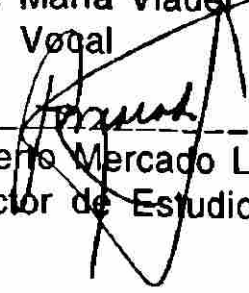
Dr. Hugo Barrera Saldaña
Asesor
1º Vocal



Dr. Juan Francisco González Guerrero
2º Vocal



Dr. José María Viader Salvadó
3º Vocal



Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Estudios de Postgrado

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Medicina Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A todas los pacientes con carcinoma de mama que contribuyeron generosamente con su sangre, su tiempo y su esperanza.

A las personas que colaboraron con mi asesor y una servidora, para hacer posible este proyecto; en orden alfabético:

Dr. Mike Badzioch

Dr. Larry Brody

Dra. Lilia Cárdenas Ibarra

Dr. Juan Francisco González Guerrero

Dr. Franklin Uriel Parás Barrientos

Dr. Tofic Saleh

Dr. Grady Saunders

M.C. Ana María Sifuentes

Tamara Staines Bone

Dra. Tina Stellrecht

Dr. Enrique Villarreal Ríos

A todos los integrantes de los Servicios de Oncología del Hospital de Especialidades No. 25 del Centro Médico del Noreste Siglo XXI del IMSS y del Hospital Universitario de la UANL.

Al personal de la U.L.I.E.G. y al comité de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo al proyecto y por la beca que me otorgó.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Cáncer mamario: un grave problema de salud	1
1.2. Factores predisponentes de cáncer mamario.....	2
1.3. Herencia y cáncer mamario.....	3
1.4. Marcadores genéticos de cáncer mamario.....	4
1.5. Oncogenes y genes supresores de tumor.....	6
1.6.El gen BRCA1.....	7
1.7. Estudios epidemiológicos en relación al gen BRCA1.....	8
1.8. Mutaciones en el gen BRCA1.....	10
1.9. Métodos de detección de mutaciones en el gen BRCA1.....	11
1.10. Cáncer de mama y Genética en México: interrogantes a responder.....	14
1.11.Objetivos.....	16
1.11.1. Objetivo general.....	16
1.11.2. Objetivos específicos.....	16
2. MATERIAL Y METODOS.....	17
2.1. Materiales.....	17
2.1.1.Reactivos.....	17
2.1.2.Muestras de sangre.....	17

2.1.3. Muestras de tejido neoplásico.....	18
2.2. Métodos.....	18
2.2.1. Diseño y estrategia general.....	18
2.2.2. Investigación epidemiológica.....	21
2.2.2.1. Características de la muestra.....	21
2.2.2.2. Cuestionario.....	22
2.2.2.3. Tratamiento estadístico.....	23
2.2.3. Método de análisis molecular para detección de mutaciones.....	24
2.2.3.1. Diagrama de flujo.....	24
2.2.3.2. Aislamiento de DNA de sangre periférica y/o de biopsias del tejido de los pacientes: conformación del banco de DNAs.....	25
2.2.3.2.1. Aislamiento y purificación del DNA de sangre..	25
2.2.3.2.2. Aislamiento del DNA de tejido neoplásico.....	26
2.2.3.2.3. Verificación de la calidad y concentración del DNA.....	27
2.2.3.2.3.1. Análisis espectrofotométrico.....	27
2.2.3.2.3.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	28
2.2.3.3. Implementación de un método rápido de rastreo de las mutaciones más frecuentes del gen BRCA1 basado en el análisis de heterodúplex.....	29
2.2.3.3.1. Descripción general.....	30

2.2.3.3.2. Descripción por etapas.....	31
2.2.3.3.2.1.PCR.....	31
2.2.3.3.2.2. Verificación de la amplificación.....	35
2.2.3.3.2.3. Desnaturalización de los productos de la amplificación.....	36
2.2.3.3.2.4. Incubación para favorecer la formación deheteroduplex.....	36
2.2.3.3.2.5. Preparación del gel de poliacrilamida de alta resolución (MDE).....	37
2.2.3.3.2.6. Electroforesis.....	38
2.2.3.3.2.7. Tinción con plata.....	39
2.2.3.3.2.8. Interpretación del patrón de bandas.....	40
2.2.3.3.2.9. Comparación de los resultados obtenidos en el análisis de heteroduplex utilizando tinción con plata y marcaje radioactivo.....	41
2.2.3.4.Secuenciación.....	42
2.2.3.4.1. Preparación de la muestra.....	42
2.2.3.4.2 Reacción de secuenciación.....	43
2.2.3.5. Prueba de proteína truncada.....	44
3. RESULTADOS.....	47
3.1. Información Clínico- epidemiológica.....	47
3.2. Resultados de la búsqueda de mutaciones.....	57
3.2.1. Integración del banco de DNA	57

3.2.2. PCR: su optimización.....	57
3.2.3. Búsqueda de heterodúplex.....	59
3.2.4. Secuenciación.....	65
3.2.5. Perfil de la paciente con la mutación detectada.....	67
3.2.6. Integración de los resultados epidemiológicos y del análisis de mutaciones.....	68
3.2.7. La alternativa de la prueba de proteína truncada.....	70
4. DISCUSION.....	73
4.1 Epidemiología.....	73
4.2 Genética molecular.....	77
5. CONCLUSIONES.....	83
6. PERSPECTIVAS.....	85
7. REFERENCIAS.....	86
ANEXO.....	94

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Diagrama de flujo para la búsqueda de mutaciones en las muestras.....	24
II. Secuencia de los iniciadores empleados para las PCRs.....	32
III. Mezcla de reacción para la amplificación simultánea de cuatro regiones del gen BRCA1	33
IV. Temperaturas y tiempos de los pasos de la PCR.....	35
V. Distribución por edades en la muestra.....	48
VI. Factores no genéticos predisponentes a cáncer mamario.....	50
VII. Forma de detección y tamaño del tumor.....	52
VIII. Diagnóstico histopatológico del cáncer de mama.....	53
IX. Antecedentes familiares neoplásicos.....	53
X. Distribución de las pacientes según edad al diagnóstico y antecedentes heredofamiliares.....	55
XI. Mutaciones en el gen BRCA1 de acuerdo a antecedentes familiares neoplásicos.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mutaciones en el gen BRCA1.....	5
2. Estrategia general.....	19
3. Amplificación de los exones 2, 11 (dos regiones) y 20 del gen BRCA1.....	58
4. Análisis de heterodúplex del gen BRCA1 en pacientes sinmutaciones.....	60
5. Análisis de heterodúplex en un caso con banda variante en el exón 20.....	62
6. Análisis de heterodúplex empleando radioactividad.....	64
7. Secuenciación en el intrón 20 del gen BRCA1.....	66
8. Prueba de Proteína Truncada para el exón 11 del gen BRCA2.	71

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

aa	Aminoácido
AMPc	Adenosin-monofosfato-cíclico
BRCA	Breast carcinoma associated
BRL	Bethesda Research Laboratories
Ca	Carcinoma
cols	Colaboradores
CMNE	Centro Médico del Noreste
°	Grados
°C	Grados centígrados
Da	Daltones
DNA	Acido Desoxirribonucleico
dNTP's	Trifosfato de Desoxinucleósidos
<hr/>	
DO	Densidad óptica
Dx	Diagnóstico
EDTA	Acido Etilendiaminotetraacético
g	Gramos
h	Horas
HE	Hospital de Especialidades
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
M	Concentración Molar
mA	Miliamper
mg	Miligramos
min	Minutos

ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Concentración Milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración Micromolar

n Número de Muestra

NaCl Cloruro de sodio

ng Nanogramos

nm Nanómetros

p Probabilidad

Pac Paciente

pb Pares de bases

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

pH $-\log[H^+]$

RNA Acido Ribonucleico

SDS Sodio duodecil sulfato

Taq DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*

UANL Universidad Autónoma de Nuevo León

UV Ultravioleta

V Voltios

X Veces la concentración

RESUMEN

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Nuevo León

Ana Laura Calderón Garcidueñas

Título del Estudio: BUSQUEDA DE LAS MUTACIONES MAS FRECUENTES EN EL GEN BRCA, EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA, EN EL NORESTE DE MEXICO

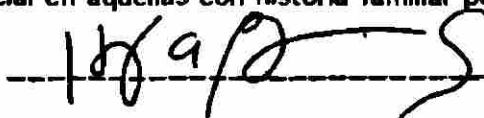
Candidata al grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Area de Estudio: Medicina Molecular

Número de páginas: 102

Objetivo y Método de Estudio: El cáncer de mama ocupa el segundo lugar en frecuencia de neoplasias malignas de la mujer en México. En Estados Unidos, una de cada 8 mujeres desarrollarán este cáncer y se reportan anualmente 180, 000 casos nuevos. Un 5% del carcinoma mamario tiene herencia autosómica dominante. Las mutaciones en el gen supresor de tumores, BRCA1 son responsables de la mitad de esos casos. La mayoría de los estudios en relación a BRCA1 se han hecho en familias de alto riesgo y en poblaciones sajonas. En nuestro país existían muchas interrogantes en relación a factores hereditarios y cáncer mamario. El objetivo de este trabajo fué realizar un trabajo epidemiológico con bases en genética molecular y buscar mutaciones en el gen BRCA1 en pacientes mexicanas con cáncer de mama. Para ubicar el análisis molecular en un contexto integral, nos propusimos obtener información sobre presencia de factores de riesgo y el número de pacientes que tenían antecedentes familiares y que pudieran además catalogarse como pertenecientes a familias de alto riesgo. Realizamos un estudio prospectivo, transversal y observacional. La investigación incluyó un aspecto epidemiológico y uno experimental. En el primero se analizó una muestra de 152 pacientes y 235 controles sanas a las que se les realizó una entrevista y aplicó un cuestionario. Los datos fueron analizados con la pruebas de T-student y ANOVA para medias y de X^2 para proporciones, así como razones de momios ($p < 0.05$). La parte experimental incluyó: a) formar un banco de DNA a partir de las muestras de sangre (ó tejido) de las 152 pacientes referidas; b) implementar una técnica de análisis de heterodúplex para el rastreo de las mutaciones; c) optimar la tinción con plata y realizar, en caso necesario, la secuenciación de regiones génicas sospechosas de contener mutaciones. **Contribuciones y conclusiones:** 1. En nuestra población, un 10% de las pacientes tuvieron antecedentes familiares de primer grado para esta neoplasia. Al incluir a las mujeres con carcinoma bilateral y a aquellas con antecedentes familiares de carcinoma ovárico, se encontró que un 15% ($n=23$) del total de pacientes constituyen el grupo de alto riesgo para presentar mutaciones en el gen BRCA1. 2. Además del antecedente familiar de 1er grado para cáncer mamario, el tener una historia familiar de carcinoma gástrico ó pancreático constituyó también un factor de riesgo para carcinoma mamario ($p < 0.001$). 3. El presentar antecedentes familiares de carcinoma ovárico elevó, en 8 veces, la probabilidad de un diagnóstico de carcinoma de aparición temprana en las pacientes. 4. A pesar de que en nuestra población la frecuencia de herencia familiar es similar que en los grupos sajones, no se encontraron las mutaciones que en ellos se reportan más frecuentemente. La probabilidad de que nuestras pacientes las presenten con la misma frecuencia reportada en esos grupos, es muy baja. 5. La frecuencia de mutaciones en el gen BRCA1 fué de 0.7% en la muestra de 152 pacientes, lo cual es muy baja ($p < 0.001$), sugiriendo que probablemente los sitios comprometidos por mutaciones sean diferentes en nuestra población. 6. El método PCR-heterodúplex para detectar mutaciones en el gen BRCA1, pudo practicarse simultáneamente para las 4 regiones descritas como más proclives a mutar del gen BRCA1. Además, el gel de los heterodúplex pudo revelarse por la tinción de plata, siendo con el multiplex, innovaciones convenientes para laboratorios con infraestructura básica. 7. Una vez identificadas en nuestra población las regiones del gen BRCA1 más proclives a mutaciones, será recomendable utilizar este método para rastreo en todas las pacientes con carcinoma mamario y en especial en aquellas con historia familiar positiva.

FIRMA DEL ASESOR:



CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Cáncer Mamario: un Grave Problema de Salud.

El cáncer mamario es un grave problema de salud pública. En nuestro país ocupa el segundo lugar en neoplasias malignas en la mujer y es solo superado por el carcinoma cervicouterino (Ca-cu) (1). El registro histopatológico de Neoplasias en México está realizando grandes esfuerzos para obtener una estadística confiable de la incidencia del cáncer, pero por diversas circunstancias, los reportes son aún incompletos. Esto puede observarse en el informe de 1993, en el cual en contraste con los 2528 casos notificados de cáncer mamario en el Distrito Federal, los estados de Quintana Roo, Campeche, Tabasco, Nayarit y Baja California Sur, notificaron entre 0 y 11 casos cada uno de ellos. Definitivamente la incidencia real del cáncer de mama en México está subestimada, pero aún así, en 1993 se diagnosticaron y confirmaron histológicamente como enfermos de neoplasia maligna mamaria a 5739 pacientes. Aunque el cáncer cervicouterino supera en número al de mama, los métodos de diagnóstico temprano han abatido la mortalidad secundaria, de modo que en muchos casos la muerte debida a cáncer mamario supera a la asociada a carcinoma cervicouterino, como ocurre en Nuevo León, donde en 1995 hubo 151 defunciones de mujeres con cáncer mamario contra 101 por Ca-cu.(2).

En Estados Unidos cada año se registran 30,000 defunciones y 180,000 casos nuevos de carcinoma mamario. En ese país, una de cada 8 mujeres desarrollarán esta neoplasia en el curso de sus vidas(3).

1.2 Factores Predisponentes de Cáncer Mamario

Para el desarrollo de esta neoplasia predisponen múltiples factores. Los endócrinos están relacionados con una exposición prolongada a estrógenos. Estos normalmente regulan la actividad genética y actúan sobre órganos blanco con receptores estrogénicos. El complejo receptor-hormona actúa como la llave que activa la síntesis de DNA y produce actividad replicativa en el tejido blanco mediante la activación de AMPc; las hormonas en este contexto sirven como promotoras del proceso carcinogénico (4). Se han implicado otros factores como una dieta alta en grasas, exposición a radiaciones, ingesta de alcohol y obesidad. Los factores genéticos tienen un lugar importante en la fisiopatogenia del cáncer mamario (5). Algunos investigadores han encontrado que un 5% del cáncer mamario es autosómico dominante, un 13% tiene herencia poligénica y un 82% es esporádico. En población sajona, de un 5-20% de mujeres tienen una historia familiar de carcinoma mamario(6). Esta

información se desconoce en México.

1.3 Herencia y Cáncer Mamario

Las familias de alto riesgo para cáncer de mama, han sido el punto de partida para la investigación y descubrimiento de los genes de susceptibilidad a cáncer mamario. Una familia de alto riesgo es aquella en la cual un 50% ó más de las mujeres tienen historia de cáncer mamario (generalmente, la madre y una ó dos hermanas están afectadas), la neoplasia se presenta antes de la menopausia, es frecuentemente bilateral y puede asociarse con carcinoma de ovario. Estas familias presentan mutaciones en genes dominantes de susceptibilidad a cáncer mamario, misma que puede transmitirse[®] por cualquiera de los padres. La frecuencia de estas mutaciones en algunas poblaciones americanas y europeas es de un 0.33% y es responsable de un 5% de los cánceres de la población (7). La mayor parte de los estudios de cáncer familiar enfatizan el subgrupo de mujeres premenopáusicas, aunque algunos autores han mostrado que la agregación ocurre tanto en las formas pre como postmenopáusicas (8).

1.4 Marcadores Genéticos de Cáncer Mamario

Dada la importancia epidemiológica del cáncer mamario, la búsqueda de marcadores genéticos se intensificó en las últimas dos décadas y en septiembre de 1994 se aisló un gen de susceptibilidad al cáncer mamario denominado BRCA1, localizado en el brazo largo del cromosoma 17(9) (fig. 1). Dado lo reciente del aislamiento del gen, no se ha determinado aún la frecuencia real de mutaciones en la población general, pero es posible que en Estados Unidos, una de cada 400 mujeres presenten mutaciones de este gen con el consiguiente riesgo de desarrollar la enfermedad (10). Se han hecho estimaciones de incidencia de cáncer de mama y ovario en portadoras de mutaciones del gen BRCA1 de acuerdo al modelo de Easton y se ha determinado un riesgo de un 76% y otro de 42 % de desarrollar cáncer de mama y ovario, respectivamente, a los 70 años (11). Otros genes y condiciones también pueden conferir susceptibilidad al cáncer mamario: mutaciones en el gen p53 situado en el brazo corto del cromosoma 17, algunas anomalías del receptor de andrógenos, heterocigocidad para el gen de la ataxia-telangectasia (cromosoma 11q), mutaciones en el gen BRCA2 (descubierto en 1995) (12, 13) y en el gen supresor MMAC1 (14).

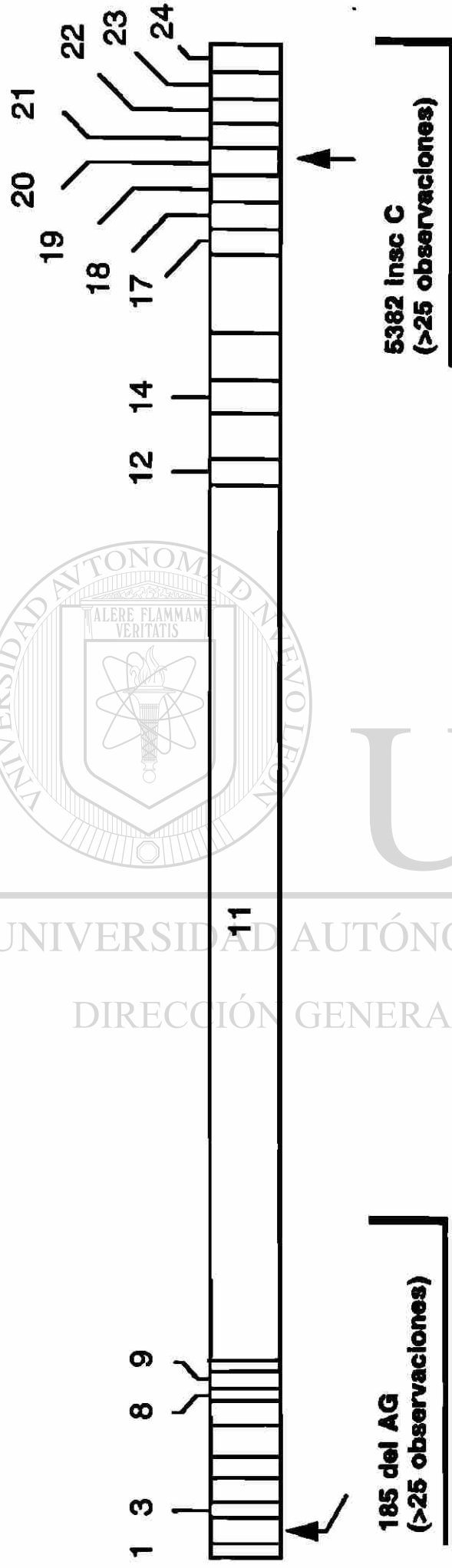


Fig 1. Mutaciones en el gen BRCA1.

El esquema muestra los 24 exones del gen BRCA1. Los exones 2, 11 y 20 que corresponden al 24 % de la región codificante, albergan el 50% de las mutaciones reportadas. De las mutaciones descritas, cuatro se repiten frecuentemente: 185 del AG en el exón 2, 1294 del 40 y 4184 del 4 en el exón 11 y la 5383Insc en el exón 20. (Colline & Friend, 1996)

1.5 Oncogenes y Genes Supresores de Tumores

Los genes son segmentos cromosómicos que codifican para una cadena polipeptídica funcional ó una molécula de RNA. Un gen cifra para una secuencia de aminoácidos que deben ensamblarse en un orden particular para producir una proteína determinada; la proteína es el efector de la función del gen. Cuando un gen se enciende, la célula responde con la síntesis de la proteína codificada por él. Las mutaciones en un gen perturban la célula debido a que cambian las cantidades y/o las actividades del producto proteico. Existen dos clases de genes, que aunque constituyen solo una pequeña porción del material genético total, tienen un papel clave en el desarrollo neoplásico. Su función normal es la de permitir los unos e impedir los otros, la secuencia de eventos que conllevan a la célula a dividirse. Los que promueven la división celular son los proto-oncogenes, mientras que los que la inhiben son los genes supresores. Cuando mutan, los primeros se transforman en oncogenes carcinogénicos que estimulan una multiplicación excesiva. Los oncogenes producen cantidades aumentadas de su proteína estimuladora del crecimiento ó bien proteínas biológicamente más activas que las normales. En contraste, los genes supresores de tumor contribuyen al cáncer solo cuando son inactivados por mutaciones. La pérdida de una proteína funcional supresora priva a la

célula del freno natural para el crecimiento inapropiado (15). La mayoría de las neoplasias se presentan cuando 2 ó más mutaciones se acumulan en dichos genes (16).

1.6 El gen BRCA1

El gen de interés en este estudio es un gen supresor de tumores constituido por 5592 nucleótidos distribuidos en una región genómica de 100 kb. Sus 22 exones codifican para una proteína de 1863 aminoácidos (17). La proteína tiene un dominio de dedos de zinc cerca del extremo amino terminal que sugiere que BRCA1 puede regular la transcripción de genes. Esta proteína tiene además una similitud de secuencia con proteínas miembros de la familia de las graninas y como ellas se localiza en vesículas secretorias, se secreta en respuesta a hormonas y experimenta glicosilación postraducciona. Se ha probado que el RNAm de BRCA1 se induce durante el embarazo en el ratón y que BRCA1 es un inhibidor selectivo del crecimiento de células epiteliales mamarias y ováricas, por lo que es posible que las bases moleculares del efecto protector del embarazo y lactancia contra cáncer de mama, demostrado epidemiológicamente, descansen en este gen y su producto proteico (18).

1.7 Estudios epidemiológicos en relación al gen BRCA1

La mayoría de los estudios en relación a BRCA1 se han hecho en familias de alto riesgo. Para determinar con mayor seguridad si el cáncer mamario en una familia puede ser debido a mutaciones en el gen BRCA1, se buscan 4 características básicas : 1. El número de familiares afectados, 2. La presencia de cáncer ovárico en la familia, 3. La edad al momento del diagnóstico de cada uno de los afectados por cáncer y 4. El parentesco entre los diferentes individuos afectados. El 26% de las familias con hasta 3 individuos afectados y el 60% de aquellas con 4 ó más pacientes diagnosticadas antes de los 60 años muestran asociación con BRCA1.

No todas las mujeres necesitan ser familiares de primer grado pero deben estar relacionadas a lo largo de una misma línea de herencia (solamente la familia de la madre ó solo la del padre, ó varias de ambos lados). La presencia de un solo caso de cáncer ovárico en la familia incrementa la posibilidad de una mutación de BRCA1 dado que el 87% de las familias con esta asociación están ligadas genéticamente a BRCA1. La edad media de inicio para cáncer de mama en portadoras de mutaciones en el gen BRCA1 es de 45 años, de modo que la presencia de casos de inicio temprano incrementa la probabilidad de que exista una mutación en dicho gen (6). Claus predijo que un 36% de mujeres con cáncer de mama diagnosticadas

entre los 20 y 29 años son portadoras de una mutación en un gen de susceptibilidad comparado con un 1 % en mujeres diagnosticadas a los 80 años (19).

Serova y cols. analizaron 20 familias con carcinoma de mama y ovario y encontraron mutaciones en el gen BRCA1 en 16 de ellas. La mayoría de las mutaciones generaron un codón prematuro de terminación con proteína reducida en tamaño entre el 2 y el 88% de lo normal (20). Friedman en una serie de familias de alto riesgo encontró mutaciones en 27 de 36 y algo interesante fué que de las familias con mutaciones, 16 tenían una evidencia clara de ligamiento genético al BRCA1 aunque el resto no (21).

Además de estos estudios en familias de riesgo alto para cáncer mamario, existen otros enfocados a poblaciones muy específicas, como el de Brody y colaboradores en el que se estableció que la mutación 185delAG está presente en el 0.9 % de las mujeres de origen Ashkenazim (22).

Dado que este gen se descubrió estudiando familias de alto riesgo, solo existen reportes aislados en los cuales se muestra evidencia de mutaciones en el gen BRCA1 en cáncer de mama esporádico. Algunos autores han utilizado marcadores polimórficos asociados al gen BRCA1 y han encontrado delección de uno de sus alelos, lo que se conoce como pérdida de heterocigocidad, en estas pacientes (23).

1.8 Mutaciones en el gen BRCA1

Hasta la fecha se han descrito alrededor de 80 mutaciones diferentes en la secuencia del gen y algunas regiones agrupan un buen porcentaje de éstas, lo que facilita el implementar técnicas de detección de mutaciones (24) (ver fig. 1). Las alteraciones en el producto del gen BRCA1 son el resultado de diferentes tipos de mutaciones en éste. Unas son substituciones que cambian un aminoácido por otro sin afectar al resto de la proteína (mutación de sentido erróneo), otras crean un codón de terminación prematuro (TGA, TAA ó TAG) que interrumpe la traducción proteica en este punto (mutaciones sin sentido) y otras más afectan el marco de lectura, pues insertan ó deletan nucleótidos en un número que no sea tres ó sus múltiplos, lo que generalmente resulta también en la aparición de un codón de terminación prematuro. Existen mutaciones en las señales para la remoción de intrones que afectan ó anulan la producción de la proteína en cuestión. Un último tipo de alteración ocurre cuando hay mutaciones en regiones regulatorias del gen y que interfieren con su expresión. De las mutaciones reportadas hasta la fecha, el 14% son mutaciones de sentido erróneo y el 86% se traducen en una proteína truncada. De éstas últimas, el 71% son del tipo de cambio en el marco de lectura debido a inserción ó delección de 1 a 59 pb. De las mutaciones descritas para el gen BRCA1 en un

estudio mundial cooperativo, 5 se repiten frecuentemente: 185delAG, 5382insC, 1294 del40, 4184del4 y Cys61Gly (24).

1.9 Métodos de detección de mutaciones en el gen BRCA1

Prácticamente todas las técnicas aplicadas a la detección de mutaciones en otros genes pueden aplicarse al gen BRCA1.

Definitivamente el estándar de oro es la secuenciación, que permite el análisis de toda la secuencia nucleotídica; sin embargo para fines de escrutinio de poblaciones, es poco práctica ya que requiere de una gran infraestructura y es costosa. Existen métodos rápidos de rastreo de mutaciones.

La prueba de proteína truncada (PTT por sus siglas en inglés) detecta mutaciones que interrumpen el marco de lectura génica y resultan en una proteína más corta que lo normal. Se basa en una transcripción y traducción *in vitro* de una PCR modificada por un promotor T7. El templado para la PTT se genera por PCR usando un DNA complementario sintetizado por transcripción reversa de RNA (RT-PCR). Otra vía alternativa para exones largos con un marco de lectura abierto largo (como el exón 15 del gen APC y el exón 11 del BRCA1) es usar directamente el DNA genómico para la PCR. Durante

la PCR se añade al extremo 5' del producto de PCR, una extensión de 36 pb que incluye la secuencia promotora del bacteriófago T7 y una señal eucariótica de inicio de traducción. La transcripción y traducción simultánea de los productos de amplificación se realizan en un sistema de lisado de reticulocitos de conejo y se utilizan aminoácidos radiactivos. Los productos de la traducción se resuelven posteriormente en SDS-PAGE y se detectan por autorradiografía. Por lo general, en un análisis de PTT, en muestras normales de control obtenidas a partir de DNA genómico, se observa una banda intensa que corresponde al producto silvestre y algunas bandas en escalera, de menor intensidad. Cuando la banda más intensa se observa de menor tamaño que el esperado, se habla de una proteína truncada (29). En BRCA1 el 75 % de las mutaciones reportadas son del tipo de cambio en el marco de lectura y sin sentido, las cuales resultan en una proteína truncada; sin embargo, al poseer el gen BRCA1[®] múltiples exones pequeños, limita esta técnica a la búsqueda de codones de terminación en el exon 11 del mismo. La limitación de la PTT está determinada por el gel de resolución de proteínas. Un gel de poliacrilamida del 12-15% puede separar fácilmente proteínas en el rango de 10-60 kD. El límite inferior de productos de PCR está determinado por el deseo de rastrear lo más posible del gen, en un solo experimento. De aquí que el rango óptimo de tamaño de productos de PCR es de 1.2-1.7 kb.

El análisis con oligonucleótidos alelo-específicos (ASO) es una técnica rápida para detectar mutaciones específicas mediante la hibridización de oligonucleótidos mutantes a fragmentos generados por PCR de una muestra inmovilizada en filtros de membrana de nylon. Esta técnica puede ser muy útil una vez que se identifican en una población las mutaciones específicas que se repiten frecuentemente.

El análisis de heteroduplex detecta cadenas bicatenarias constituidas por una cadena sencilla procedente de un alelo normal, apareada con la cadena opuesta del otro alelo, el mutado, por lo que su arreglo de puentes de hidrógeno es imperfecto. Estas moléculas de doble hebra de heterodúplex, muestran una migración anormal en geles nativos cuando se comparan con los homoduplexs. Técnicamente es un procedimiento sencillo en el cual los productos amplificados obtenidos por PCR se desnaturalizan a 95°C para separar las cadenas del DNA; esto va seguido de un paso de enfriamiento lento hasta alcanzar la temperatura ambiente, con lo que se induce la formación de heteroduplex (apareamiento de una cadena de uno de los alelos sin mutación con otra del otro alelo portador de la mutación). El fragmento del producto amplificado se resuelve por electroforesis en un gel no desnaturizante de poliacrilamida. Finalmente la detección del DNA se puede efectuar por tinción con plata (25). En 1996 se reportó el uso de esta técnica en el rastreo de mutaciones en 3 exones (2, 11 y 20) del gen BRCA1.

En dicho estudio los exones se amplificaron por separado utilizando 4 juegos de primers diferentes (el exón 11, dado su tamaño se dividió en dos regiones). Los productos de amplificación eran : regiones exónicas 11A de 643 pb y 11B de 482 pb; exón 2 de 305 pb y exón 20 de 231 bp. (25).

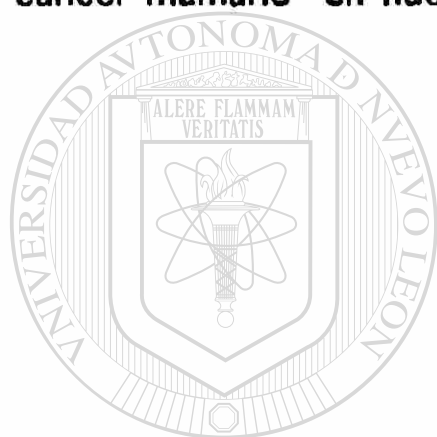
1.10 Cáncer de mama y Genética en México : interrogantes a responder

El carcinoma de mama es un reto tanto desde el punto de vista preventivo como terapéutico y de rehabilitación. Con este trabajo nos propusimos realizar un estudio piloto pluri-institucional en pacientes con carcinoma mamario que llegan para atención inicial a tres diferentes hospitales de concentración en el curso de un año. Este estudio nos permitió contestar varias interrogantes claves para el ataque efectivo de este serio problema de salud, a saber :

1. De los pacientes con cáncer de mama ¿cuántos tienen antecedentes familiares para esta neoplasia?
2. De los pacientes con antecedentes familiares' ¿cuántos pertenecen a familias de alto riesgo?
3. De los pacientes con y sin antecedentes de cáncer mamario familiar ¿cuántos tienen las mutaciones más frecuentemente

reportadas en la literatura para BRCA1?

4. ¿Existen mutaciones del gen BRCA1 propias de nuestra población?
5. ¿Justifica la frecuencia de mutaciones en este gen en pacientes con cáncer mamario, su búsqueda en población sana? :
6. ¿Podría ser la búsqueda de mutaciones en el gen BRCA1 una prueba valiosa para identificar mujeres en riesgo alto de desarrollo de cáncer mamario en nuestro país?



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



1. 11 OBJETIVOS

1.11.1 Objetivo General.

Buscar las mutaciones más frecuentes en el gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en el noreste de México.

1.11.2 Objetivos específicos.

1. Obtener información epidemiológica y clinico-patológica del cáncer mamario en la muestra de estudio.
2. Formar un banco de DNA de pacientes con carcinoma mamario.
3. Implementar un ensayo basado en la técnica de análisis de heteroduplex para el rastreo rápido de las mutaciones más frecuentes reportadas en la literatura, en todas las muestras de sangre y tejido neoplásico de los pacientes, independientemente de su historia familiar neoplásica.
4. Analizar las mutaciones y polimorfismos que se detecten en la población y compararlas con lo reportado en la literatura.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Reactivos

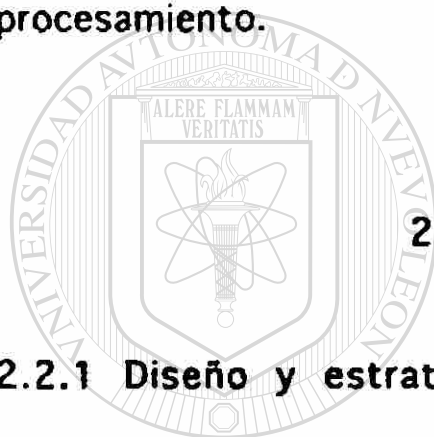
Para evitar repeticiones innecesarias, los reactivos utilizados en la extracción y purificación del DNA, la reacción de PCR, el análisis de heteroduplex, la secuenciación y la prueba de proteína truncada se describen en los apartados correspondientes en la sección de metodología.

2.1.2. Muestras de sangre

De cada paciente estudiada se obtuvieron por punción venosa 5 ml de sangre. Dicha punción se realizó, previa asepsia de la región, con material estéril y desechable. La sangre se depositó en un tubo de vidrio con EDTA y se mezcló suavemente con el anticoagulante. Las muestras se mantuvieron en un refrigerador a 4 °C hasta su procesamiento, que por lo general se realizó dentro de las siguientes 6 horas posterior a su obtención.

2.1.3 Muestras de tejido neoplásico

El tejido en fresco se obtuvo de muestras enviadas al servicio de Anatomía Patológica para su estudio diagnóstico transoperatorio. Posterior a la confirmación del diagnóstico histológico, se tomó una muestra de al menos 0.5 x 0.5 x 0.5 cm de tejido neoplásico. El tejido se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a - 70°C hasta su procesamiento.



2.2 METODOS

2.2.1 Diseño y estrategia general

La investigación fue de tipo prospectivo, transversal y observacional y constó de dos aspectos. Uno, de tipo epidemiológico y otro experimental, con optimización y aplicación de técnicas para búsqueda de mutaciones en sangre y tejido mamario (ver fig. 2). Los datos epidemiológicos obtenidos en las pacientes se contrastaron con los obtenidos en un grupo control.

El grupo control estuvo formado por una muestra probabilística de 235 mujeres sanas participantes en un estudio de densidad mineral ósea, reclutadas en 1997 en el área metropolitana de Monterrey y en quienes se indagaron los antecedentes gineco-

152 pacientes

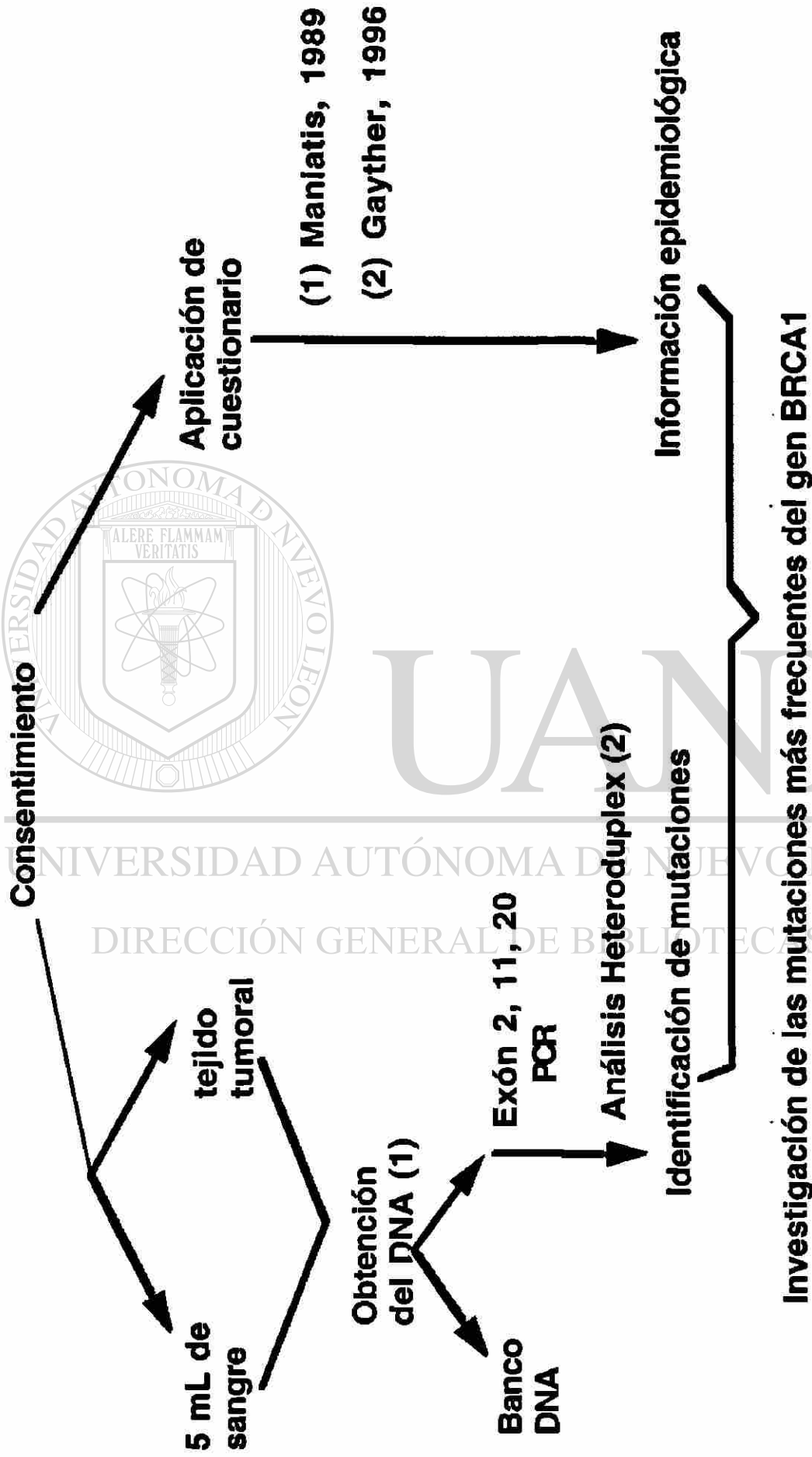


Fig 2 . Estrategia general.

Se estudiaron 152 pacientes con cáncer mamario. El diseño incluyó la obtención de información epidemiológica que permitió ubicar el análisis molecular de las mutaciones del gen BRCA1, en un contexto integral. En el aspecto de laboratorio se creó un banco de DNA, se amplificaron las regiones de interés con PCR y se analizaron mediante la técnica de heterodúplex. Las bandas variantes se secuenciaron. Se analizaron los datos estadísticamente.

obstétricos personales y los patológicos tanto en ellas como en sus familiares de primer grado.

En la investigación epidemiológica, se diseñó un cuestionario que incluía no solamente datos clínico-patológicos, sino un estudio cuidadoso de la historia familiar neoplásica. Todas las pacientes fueron informadas del estudio, que incluía contestar un cuestionario y donar 5 ml de sangre venosa. El trabajo de campo consistió en una entrevista personal con cada paciente durante la cual se aplicó el cuestionario referido y se tomó la muestra de sangre. La investigación epidemiológica nos permitió caracterizar la muestra y detectar en ella la presencia de factores de riesgo para cáncer mamario. También estableció el porcentaje de pacientes con antecedentes familiares para carcinoma mamario y que tienen por tanto mayor riesgo de ser portadores de una mutación en un gen como BRCA1.

Los datos epidemiológicos permitieron realizar una comparación con lo reportado en la Literatura y ubicar en nuestra realidad, la investigación a nivel molecular.

La parte experimental estuvo enfocada a la búsqueda de las mutaciones más frecuentes en el gen BRCA1. El primer paso consistió en la obtención del DNA a partir de muestras de sangre y tejido. Esto permitió integrar un banco de DNA. Posteriormente, mediante la PCR, se amplificaron los exones 2,11 y 20 del gen BRCA1. Los productos amplificados se sometieron al análisis de

heterodúplex para la identificación de bandas variantes que pudieran corresponder a mutaciones. Las muestras con bandas variantes se analizaron por secuenciación en la región afectada. Posteriormente, se conjuntaron los datos epidemiológicos y moleculares para obtener las conclusiones finales del estudio.

2.2.2. Investigación epidemiológica

2.2.2.1. Características de la muestra.

Se definió en base al número de casos esperados de acuerdo a la estadística hospitalaria de los 3 años previos en el principal Hospital sede HE CMNE (220 casos nuevos anuales) y en relación a la estimación de las frecuencias de genes autosómicos, cuando el heterocigoto no es reconocible. Como se mencionó anteriormente, se calcula que la presencia de mutaciones en el gen BRCA1 es responsable de 2 a 3 de cada 100 casos de carcinoma mamario, pero en las pacientes de familias de alto riesgo esta cifra se eleva hasta un 26% con 3 individuos afectados, un 60% con 4 ó más y un 87% si además existe al menos, un caso de carcinoma de ovario (6, 10). Así, en una muestra de 150 pacientes existe la probabilidad de encontrar mutaciones en el gen BRCA1 en al menos 5 pacientes.

Las pacientes participantes acudieron a la consulta de oncología de los siguientes hospitales: Hospital de Especialidades (HE CMN) No. 25 del IMSS, Hospital de Gineco-Obstetricia No. 23 del IMSS y Hospital Universitario de la U.A.N.L., entre los meses de Enero a Marzo de 1997. El criterio de selección fué que tuvieran un diagnóstico confirmado de carcinoma mamario y que aceptaran participar en el estudio, contestando el cuestionario y aportando el material biológico referido.

2.2.2.2. Cuestionario.

Se diseñó un cuestionario (anexo 1) que además de la historia clínica recabó información específica sobre edad de menarquia y de la menopausia, así como sobre el tiempo de exposición a estrógenos, historia de autoexamen mamario, tiempo de dilación en acudir al médico, historia neoplásica detallada y factores de riesgo para cáncer mamario. El antecedente de autoexamen mamario se consideró regular si la paciente lo realizaba intencionadamente, al menos 1 vez cada 3 meses. La información recabada permitió responder a los interrogantes sobre historia familiar y familias de riesgo alto. Los pacientes se clasificaron en dos grupos: con y sin antecedentes familiares de cáncer mamario. Dentro de las pacientes con antecedentes familiares se distinguieron 2 subgrupos: i) pacientes

de riesgo alto (con dos ó más familiares de primer grado afectadas con carcinoma mamario ó un familiar de primer grado y uno o más familiares de segundo ó tercer grado afectados sobre una misma línea de herencia, con ó sin bilateralidad y aparición temprana del carcinoma) y, ii) Pacientes de riesgo moderado (con uno ó más familiares afectados de segundo ó tercer grado sobre una misma línea de herencia).

2.2.2.3 Tratamiento estadístico.

Se utilizó estadística descriptiva para determinar rangos, promedios y porcentajes en las edades de presentación de la menarquia, menopausia y en el tiempo de exposición a estrógenos. Estos datos fueron comparados mediante la prueba de chi cuadrada y de diferencia de medias (la significancia estadística se fijó en una $p < 0.005$) (26), con los obtenidos del grupo control. Se utilizaron además, razón de momios para detectar riesgo en el diagnóstico temprano de cáncer mamario, de acuerdo a antecedentes familiares neoplásicos. La distribución binomial se utilizó para calcular la probabilidad de encontrar la frecuencia esperada de mutaciones según población sajona y la observada en las pacientes estudiadas. Para estas dos pruebas se corrigió la significancia según el número de comparaciones.

2.2.3 Método de análisis molecular para detección de mutaciones

2.2.3.1 Diagrama de flujo.

La ejecución de la parte experimental requirió de seguir nueve secuencias de procedimientos (tabla I).

Tabla I
Diagrama de flujo para la búsqueda de mutaciones en las muestras.

PASO	Tiempo
a. Extracción de DNA por la técnica de TSNT	1:00
b. PCR: amplificación de exones 2, 11 (A y B) y 20	3:00
c. Gel de agarosa al 2% para verificar la PCR	1:00
d. Desnaturalización de los productos de PCR	0:10
e. Incubación a 37°C	2:00
f. Preparación y montaje del gel	0:40
g. Electroforesis en gel MDE a 120°C (250 V)	12:00
h. Tinción con plata	1:10
i. Secado del gel (opcional)	2:00

2.2.3.2 Aislamiento de DNA de Sangre Periférica y/o Biopsias del Tejido de los Pacientes: Conformación del Banco de DNAs.

2.2.3.2.1 Aislamiento y purificación del DNA de sangre.

De la muestra obtenida de 5 ml de sangre venosa, se separó el suero, mismo que se congeló a -20°C para realizar protocolos de investigación futuros. Del paquete celular se obtuvo el DNA por la técnica de TSNT (27), que se describe a continuación.

Se colocaron 5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA, en un tubo de propileno de 50 ml. Se centrifugó a 2000 rpm para separar el paquete celular. El plasma se recuperó con pipeta, y se almacenaron 2 ml en un tubo eppendorf; éste se congeló a -10°C para su posible utilización posterior.

Se añadieron al paquete celular, 2 ml de buffer de lisis TSNT (2% tritón 100X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA disódico) y se agitó manualmente, hasta que la solución sin grumos, presentó un color rojo brillante.

Se agregaron 5 ml de fenol saturado. Se agitó por 5-10 seg en el vortex, hasta que se obtuvo un color chocolate, uniforme.

Se añadió 1 ml de Sevag (48 partes de cloroformo y 2 partes de alcohol isoamílico). Se agitó por 3 min en el vortex, hasta lograr una homogenización completa.

Se añadieron 2 ml de TE 1X, pH 8. Se mezcló manualmente.

Se centrifugó durante 20 min a 10,000 rpm.

Se transfirió la fase acuosa a un tubo de propileno de 15 ml.

Se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol al 100%. Se mezcló con delicadeza, por inversión, hasta observar la precipitación del DNA en forma de una hebra blanca.

Se transfirió la hebra de DNA mediante aspiración con micropipeta y puntilla de 1 ml, a un tubo eppendorf de 2 ml. Se centrifugó a 14,000 rpm, por 10 min, en una microcentrífuga eppendorf modelo 5402.

Se decantó ó se aspiró el sobrenadante, con cuidado y se desechó.

Se añadió al tubo con la pastilla, 1 ml de etanol al 70% y se mezcló. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 min, y se decantó.

Se dejó sacar la pastilla durante 30 min a 1 h, con el tubo abierto, en una campana Labconco, en el radio de acción de un mechero Bunsen encendido a fuego medio.

Se resuspendió en amortiguador TE 1X, pH 8, en un volumen necesario para resuspender la pastilla (250 μ l-1 ml). Se almacenó, debidamente identificado, a 4 °C.

2.2.3.2.2 Aislamiento del DNA de tejido neoplásico.

Cuando fue posible, se extrajo también DNA de una muestra de

tejido neoplásico. Para ello, el tejido se congeló en nitrógeno líquido y un fragmento fresco de 25-35 mg se pulverizó en mortero estéril y frío. La muestra pulverizada se resuspendió en 1.2 ml de buffer de digestión (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH8, 0.5% dodecil sulfato de sodio, 0.1 mg/ml de proteinasa K), a lo que siguió una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y finalmente precipitación con etanol (ver técnica de TSNT) (28).

2.2.3.2.3 Verificación de la calidad y concentración del DNA.

La calidad del DNA se valoró por electroforesis en gel de agarosa al 1% y la concentración y pureza se midieron en un espectrofotómetro a 260/280 nm y/o por la comparación con estándares de DNA de concentración conocida.

2.2.3.2.3.1 Análisis espectrofotométrico.

En el análisis espectrofotométrico se midió la cantidad de radiación UV absorbida por las bases a 260 nm. Para ello, se colocó 1 ml de TE en una celda de cuarzo para UV; se calibró el espectrofotómetro a cero de absorbancia y se añadió 1 μ l de la muestra, se mezcló bien por inversión y se tomaron lecturas a 260 y

280 nm. La concentración de DNA se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA ng}/\mu\text{l}] = (50) (\text{factor de dilución}) (\text{lectura a 260 nm})$$

en donde el factor de dilución se obtuvo de la división del volumen total después de la dilución, entre el volumen tomado de la muestra.

Una unidad de densidad óptica corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de doble cadena. La calidad del DNA se obtuvo mediante la relación entre las lecturas a 260 y 280 nm, la cual nos da una estimación de la pureza del ácido nucleico. Una preparación de alta pureza de DNA tiene una relación $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ entre 1.8 y 2.

2.2.3.2.3.2. Electroforesis en gel de agarosa.

La estimación de la cantidad de DNA en la muestra de interés,[®] se efectuó al someter la misma, a un campo electroforético, en un gel de agarosa. Al concluir el corrimiento, la muestra se tiñó con bromuro de etidio. Esta substancia, que se intercala entre las bases del DNA, permitió visualizar el DNA, al emitir fluorescencia inducida por luz UV, y de esta manera, fué posible compararla con la fluorescencia de una serie de estándares. También se evaluó la integridad del DNA en base a su perfil electroforético; la degradación del DNA se evidenció por la presencia de un barrido hacia abajo del gel, y con inicio en la porción inferior de la banda de

DNA. Se efectuó el procedimiento siguiente.

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris-borato al 0.089 M, ácido bórico al 0.089 M), el cual una vez polimerizado, se depositó en una cámara horizontal de electroforesis y se cubrió con buffer. Se mezcló 1 μ l de la muestra a cuantificar, con 1 μ l de jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol al 0.25% y glicerol al 30%). De la misma manera, se preparó una serie de estándares con diferentes concentraciones. Las muestras y los estándares se colocaron en los carriles del gel y se realizó electroforesis, en un inicio, a 60 V, mientras se internó el colorante en el gel, y posteriormente, a 100 V por 1 h. Concluida la electroforesis, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 2 μ g/ml por 5 ó 10 min, y luego se lavó varias veces para quitar el exceso de bromuro. Se procedió a su observación en un transiluminador de luz UV. Con las diferentes muestras de DNA purificado y cuantificado se integró el banco de DNA.

2.2.3.3 Implementación de un Método Rápido de Rastreo de las Mutaciones más Frecuentes del gen BRCA1 Basado en el Análisis de Heteroduplex.

Fue necesario amplificar aquellas regiones que con los datos actuales, se sabe, concentran el mayor número de mutaciones. Nos

enfocamos básicamente a los exones 2,11A,11B y 20 (25). Como ya mencionamos, existen varias estrategias para búsqueda de mutaciones específicas, como la secuenciación, el análisis de hibridación con sondas alelo-específicas, el análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla, prueba de proteína truncada y análisis de heterodúplex.

Por la sencillez y grado de sensibilidad de un 80% de la última técnica decidimos implementarla para el análisis rápido de mutaciones.

2.2.3.3.1 Descripción general.

A partir del DNA obtenido de sangre y/o tejido, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés), en la cual se amplificaron los exones 2,11 y 20 del gen BRCA1 (multiplex).

Gayther y cols. describieron un método de rastreo por análisis de heterodúplex, de mutaciones en los exones 2, 11 (dividido en las dos regiones) y 20 del gen BRCA1 en el cual nos basamos (25).

Posterior a la amplificación, se desnaturalizaron los productos de PCR con el fin de separar las dos cadenas de DNA de cada alelo.

Las muestras desnaturalizadas se dejaron enfriar lentamente

para propiciar la formación de los heteroduplex. Estos productos se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida de alta resolución (Mutation Detection Enhancement ó MDE).

Finalmente, el gel se tiñó con una solución de plata y mediante la detección de bandas anormales (heteroduplex) se infirió la presencia de polimorfismos ó de mutaciones. Las bandas anormales se analizaron por secuenciación.

2.2.3.3.2 Descripción por etapas.

2.2.3.3.2.1 PCR.

Se optimó la reacción para las cuatro regiones de 3 exones de dicho gen: exón 2, región A y región B del exón11 y finalmente el exón 20.

Todas las muestras se sometieron a amplificación. Los iniciadores utilizados ya habían sido reportados anteriormente en la Literatura (29) y poseen las secuencias nucleotídicas indicadas en la tabla II.

Tabla II
Secuencia de los iniciadores usados para las PCRs

Exon	Secuencia
2	5'- aaaccttccaaatcttcaaa-3'
	5'- gtcttttcttcctagtagt-3'
11A	5'- cttgtgaattttctgagacgg-3'
	5'- gcctcatgaggatcactgg-3'
11B	5'- aggggccaagaattagagtc-3'
	5'- aagtttgaatccatgctttgctct-3'
20	5'- atatgacgtgtctgctccac-3'
	5'- tgcaaaggggagtggaatac-3'

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Aunque el protocolo utilizado se basó en lo publicado por Gayther y colaboradores (25), se realizó una optimización y mejora de la PCR. Esto incluyó la amplificación de las 4 regiones génicas de interés en un mismo paso, con sus respectivos juegos de iniciadores (cuadriplex). Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla III.

Tabla III

Mezcla de reacción para la amplificación simultánea de cuatro regiones del gen BRCA1.

Reactivo	cantidad (ml) [final]	
Buffer 10X	5.0	1X
MgCl ₂ 25mM	4.0	2.0 mM
dNTPs 10 mM	1.0	0.2 mM
Iniciadores 5' a 5 μ M*	4.0	0.1 μ M
Iniciadores 3' a 5 μ M*	4.0	0.1 μ M
DNA pol Taq a 5 U/ μ l	0.5	2.5/50 μ l
Agua ultrapura	26.5	
Vol. total de la mezcla	45.0	
Templado, 100- 200 ng de DNA	5.0	
Vol. final	50.0	

* Se utilizaron 4 juegos de iniciadores: E2 5' y 3', E11a 5' y 3', E11b 5' y 3' y E20 5' y 3' (Biosynthesis).

Para lograr la optimización se utilizó la estrategia de un factor a la vez, y se procedió a realizar una titulación de la concentración de magnesio de los 4 diferentes juegos de iniciadores, primero por separado y posteriormente en conjunto.

Las concentraciones de magnesio que se emplearon fueron de

1, 1.5 y 2 mM. La concentración óptima final de magnesio para el ensayo multiplex fue de 2 mM. Para los iniciadores se probaron concentraciones finales de 0.1 y 0.2 μ M. Se obtuvieron resultados adecuados con una concentración de DNA de entre 100- 200 ng por reacción de 50 μ l.

Las muestras se procesaron en series de 20, para lo cual se preparó un cóctel con todos los ingredientes (en cantidad suficiente para ese número), excepto la enzima, que se agregó al final.

Los reactivos empleados se mantuvieron en un depósito con hielo. Para descongelar los reactivos se frotó el tubo con las manos.

La enzima, dado que no estaba descongelada, permanecía todo el tiempo en hielo. Los reactivos se centrifugaron antes de usarse.

Una vez preparada la mezcla de reacción, se centrifugó y se agregó al templado; se realizó una última centrifugación (un pulso).[®]

Se colocó una gota de aceite mineral a cada tubo, se cerró y se depositó en el pozo correspondientes del termociclador (PT- 150, MJ Research).

El programa de PCR empleado fué descrito en la tabla IV.

Tabla IV
Temperaturas y tiempos de los pasos de la PCR.

Pasos	Temperatura °C	Tiempo
Etapa Inicial	94	1 min
Desnaturalización*	94	1 min
Apareamiento*	55	45 seg
Extensión	72	1 min
Etapa final	72	5 min

* 30 ciclos

Se utilizó un termociclador automatizado modelo PT- 150.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2.2.3.3.2.2. Verificación de la amplificación

Se efectuó con el siguiente procedimiento:

Se preparó un minigel de agarosa al 1.5% en TBE 1X.

Se tomaron 5 μ l de la reacción (evitando el aceite mineral). Se mezclaron con 1 μ l de jugo azul 6 X.

Se colocaron las muestras en el minigel de agarosa y se realizó la electroforesis; primero por un min a 60 V para facilitar la penetración de las muestras en el gel y después a 100 V durante 45-50 min. Se incluyó también en un carril, un marcador de peso

molecular adecuado que sirvió como patrón de comparación de concentración.

El minigel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (2 µg/ml) durante 5 min. Se enjuagó brevemente con agua corriente.

Se observaron las bandas amplificadas en un transiluminador de luz ultravioleta. Se tomó una fotografía para su registro y análisis posterior.

2.2.3.3.2.3 Desnaturalización de los productos de amplificación.

Se desnaturalizaron 150- 250 ng de DNA a 95⁰ C por 10 min en el termociclador. Una alternativa que ocasionalmente se utilizó fue introducir el tubo eppendorf con el producto amplificado, en agua en ebullición por 5 min.

2.2.3.3.2.4 Incubación para favorecer la formación de heterodúplex.

Inmediatamente después de la desnaturalización, se incubó el producto de PCR a 37⁰ C por 2 h como mínimo. Otra opción fue dejarlos a temperatura ambiente, ó a 37⁰ C toda la noche.

2.2.3.3.2.5 Preparación del gel de poliacrilamida de alta resolución (MDE).

Para esta técnica se utilizó una cámara de electroforesis vertical Protean II, vidrios de 20 x 20 cm y una fuente de poder BRL modelo 250. Se realizó el siguiente procedimiento:

Los vidrios se lavaron perfectamente con agua y jabón. Se quitó el exceso de agua con toallitas absorbentes. Se limpiaron las superficies en contacto con el gel con alcohol etílico al 70 %.

Se ensamblaron los vidrios con los separadores, ayudándose con pinzas. Se sellaron los bordes laterales e inferior con cinta adhesiva. Este último lado se selló al final, pues se retiró al iniciar la electroforesis. Con el molde listo se procedió a preparar la mezcla para el gel.

La mezcla de acrilamida se preparó con 15 ml de solución MDE[®] 2X, 15 ml de TBE 10X y 600 μ l de persulfato de amonio al 10 %. Estos reactivos se mezclaron manualmente y por último se agregó el TEMED (60 μ l) y se mezcló rápidamente.

Inmediatamente se vació la solución manteniendo los vidrios con una inclinación de unos 20°. Se evitó la formación de burbujas; cuando sucedió, se colocó el molde en posición vertical y se golpearon los vidrios ligeramente, hasta eliminarlas. Una vez hecho esto, el molde se regresó a la posición inicial.

En seguida se introdujo en la superficie de la solución, un peine de 20 carriles, hasta su contacto con el vidrio. Se dejó polimerizar el gel por 30 min.

Posteriormente se retiró el peine, se quitó el exceso de poliacrilamida y se lavaron los pozos con agua.

Se retiró la cinta de la parte inferior.

Se montó el gel en la cámara de electroforesis y se agregó amortiguador TBE 1 X, primero a la cámara superior. Se revisó que no hubiera fugas durante 10 min. Entonces se colocó el buffer en la cámara inferior.

2.2.3.3.2.6. Electroforesis.

En cada carril se colocó para su corrimiento, un mínimo de 150 y un máximo de 250 ng de cada producto amplificado por exón, y se trató de no exceder un volumen máximo de 20 μ l por pozo. El producto a analizar se mezcló con 2 μ l de jugo azul 6X.

La electroforesis se corrió a 250 V, durante 12 h a una temperatura de 12°C. Para lograr esta temperatura, se acondicionó el cuarto frío a dicha temperatura; se ajustó el termostato con una variación máxima de un grado.

2.2.3.3.2.7. Tinción con plata.

Después de correr la electroforesis, se apagó la fuente de poder, se desconectaron los cables y se retiró de la cámara, el molde con el gel. Se quitaron las cintas y los separadores del gel.

Se despegó suavemente el vidrio más largo, haciendo palanca con una espátula entre los vidrios. El vidrio en el que quedó adherido el gel, se llevó a la charola de tinción. Para la detección de DNA se utilizó la siguiente técnica recomendada por Gayther (25):

Se fijó el gel, con incubación durante 10 min con mezclado suave, en 250 ml de una solución de etanol al 10% y ácido acético al 0.5 %. Se depositó un poco del líquido de fijación en el fondo del depósito. Se vertió el resto sobre el gel y en la parte superior del mismo para despegarlo. Una vez listo, se tomó con cuidado de los extremos superiores y se depositó extendido en la charola. Al finalizar el proceso se decantó con cuidado el líquido de fijación. Este se pudo reutilizar, una vez más.

Se tiñó el gel, con incubación durante 30 min en 250 ml de una solución al 0.1% de nitrato de plata, seguida de decantación.

Se retiró el exceso de nitrato de plata, mediante dos lavados rápidos con agua destilada.

Se reveló, con incubación durante 30 min en 250 ml de una solución de hidróxido de sodio al 1.5%, borohidruro de sodio al 0.004% y formaldehído al 0.045%. Se vertió esta solución y se agitó manualmente durante unos seg hasta que el color se distribuyó en forma homogénea. Posteriormente se incubó con mezclado suave, en un mezclador recíproco Lab-Line. Se revisó el proceso y se evaluó la aparición de las bandas. De ser necesario, se prolongó la exposición por otros 30 min hasta detectar la presencia de todas ellas. Al alcanzar este objetivo, se decantó la solución.

Se fijó la tinción con incubación durante 10 min con una solución de carbonato de sodio al 0.75 %, seguida de decantación.

Se lubricó el gel con una incubación por 10 min en una solución de glicerol al 10 %.

Se montó el gel, y se colocó con cuidado entre dos acetatos.

Se secó el gel al vacío, durante 2 h, a 80^o C.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2.3.3.2.8 Interpretación del patrón de bandas.

Se analizaron las diferentes muestras y el patrón de bandas presentadas. En las muestras con bandas variantes (heteroduplex) se repitió todo el procedimiento y el producto de PCR se corrió paralelamente con otras muestras.

Si el patrón de bandas se reproducía, se realizaba secuenciación del exón que presentó el heterodúplex.

2.2.3.3.2.9 Comparación de los resultados obtenidos en el análisis de heterodúplex utilizando tinción con plata y marcaje radioactivo.

El análisis de heterodúplex se repitió en 80 muestras analizadas previamente con tinción de plata, utilizando marcaje radioactivo por la incorporación de desoxirribonucleótido radiactivo (^{32}P - α -dCTP) en el producto de amplificación.

A la reacción descrita de amplificación (2.2.3.3.2.1) se añadieron 0.0625 μl de radionucleótido a cada reacción de 50 μl . Se preparó un cóctel de reactivos para cada serie de 20 muestras; en el mismo se incluyeron todos los reactivos, excepto la enzima, que se añadió al final después del radionucleótido.

El gel se preparó de la manera previamente referida pero utilizando el molde y vidrios de secuenciación con separadores de 1 mm (BRL). La electroforesis se realizó a 1700 volts, a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 6 h. El gel colocado sobre papel filtro, se secó al vacío durante una h a 80 $^{\circ}\text{C}$.

El gel seco se colocó en un chasis metálico, con una película Kodak, y se expuso durante la noche a 4 ° C. La película se reveló en un revelador automático Kodak. Se analizaron los patrones de bandas.

2.2.3.4. Secuenciación.

2.2.3.4.1. Preparación de la muestra.

Se realizó amplificación del exón que presentó una banda variante. Como control de secuenciación se incluyó un paciente sin banda variante en el mismo exón que el problema.

Los productos amplificados del problema y del control se sometieron a electroforesis a 100 V en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5 %.

La banda de interés se cortó con un bisturí estéril y se pesó en una balanza de precisión.

El DNA se extrajo y purificó con el estuche de extracción QIAEX II (Quiagen). Se siguieron las instrucciones del fabricante: se añadieron 3 volúmenes del buffer QX1 a cada volumen del gel, y se mezclaron suavemente. Se resuspendió el QIAEX II con agitación en el vórtex por 30 seg. Se añadieron 10 µl de QIAEX II y se incubó a 50° C durante 10 min, con mezclado suave cada 2 min para mantener el

QIAEX II en suspensión. Se centrifugó la mezcla por 30 seg y se removió el sobrenadante con una pipeta. Se lavó la pastilla con 500 μ l del buffer QX1 para remover la agarosa residual. Se lavó la pastilla dos veces con 500 μ l del buffer PE para remover las sales residuales. Se secó la pastilla durante 1 min al vacío utilizando una máquina Speed Vac. La pastilla se resuspendió en 20 μ l de agua y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 30 seg y el sobrenadante que contenía el DNA purificado se recuperó con la ayuda de la pipeta.

2.2.3.4.2 Reacción de secuenciación.

El DNA purificado del control y del problema se sometieron a secuenciación automática, utilizando el mismo juego de iniciadores empleado para la PCR (25).

Los productos de PCR se secuenciaron bidireccionalmente con el estuche de secuenciación cíclica *Taq DyeDeoxy Terminators*® de Applied Biosystems, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron con un secuenciador fluorescente modelo 373A de Applied Biosystems.

2.2.3.5 Prueba de proteína truncada.

Debido a la importancia del rastreo de mutaciones en los genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2, y a que en un futuro próximo se tiene contemplado el análisis de este último gen en las pacientes incluidas en este estudio, se decidió implementar otra técnica de detección de mutaciones, que pudiera ser utilizada paralelamente a la técnica de heterodúplex, para aumentar la detección de mutaciones en ambos genes.

En este piloto se analizaron 25 pacientes, con el primer juego de primers para el exón 11 del gen BRCA2. Los pacientes fueron escogidos al azar.

Los iniciadores utilizados por nosotros para la reacción de PCR habían sido descritos previamente en la Literatura (40). Se utilizó el estuche *TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems* de Promega.®

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 2.5 μ l de buffer 10X; 0.6 μ l de iniciador 5' a 5 mM; 0.6 μ l de iniciador 3' a 5 mM; 1.5 μ l de MgCl₂ a 25 mM; 0.2 μ l de dNTPs a 25 mM; 0.25 μ l de Taq Pol. a 5 U/ml; 14.35 μ l de agua ultrapura y 5 μ l de templado de DNA genómico 100 ng/ μ l.

El programa de PCR incluyó una etapa inicial a 94°C durante 5 min, 40 ciclos con pasos de desnaturalización a 94°C durante un min, apareamiento a 55°C un min. y extensión a 72°C por tres min.

Finalmente, se incluyó una etapa final de extensión a 72^o C durante 5 min. El resultado de la amplificación se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % que se tñó con bromuro de etidio.

Posteriormente se realizó la transcripción y traducción de los productos de amplificación en el sistema de lisado de reticulocitos TnT[®] con metionina-³⁵S en un volumen final de 10.75 μ l: 0.5 μ l de Buffer TnT[®], 0.25 μ l de TnT RNA polimerasa, 0.25 μ l de la mezcla de aa sin metionina 1mM, 1 μ l de metionina ³⁵S (1,000 Ci/mmol) a 10mCi/ml, 0.25 μ l de inhibidor RNasin[®] Ribonucleasa a 40 U/ μ l, 2.25 μ l de templado de producto de PCR 50 ng/ μ l.

Una vez hecha esta mezcla, se añadió el lisado de reticulocitos (6.25 μ l), mezclando suavemente. Inmediatamente se incubó a 30^o C por 2 h.

Después de la incubación, se tomaron 5 μ l y se añadieron a 20 μ l de buffer TnT[®] en un tubo de propileno. El tubo se cerró y se calentó en agua hirviendo durante 2 min para desnaturalizar las proteínas.

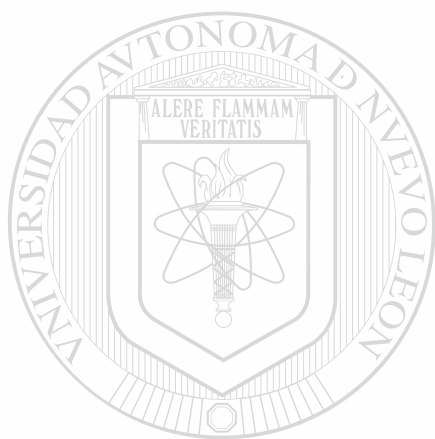
Una vez completa la desnaturalización proteica, se tomaron 5 μ l para depositarlos en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% (39).

La electroforesis se efectuó en un sistema de minigel (MiniProtean II, de la compañía Bio-Rad) a 15mA para el gel concentrador y a 30mA para el separador.

Las muestras se corrieron paralelamente con un marcador de peso molecular (estándares para SDS-PAGE de la compañía Bio-Rad).

La electroforesis se suspendió inmediatamente después de la salida del azul de bromofenol. El gel se secó al vacío a 80^o C durante 1 h.

Posteriormente se expuso durante la noche a temperatura ambiente. La placa de rayos X se reveló en forma automatizada y se analizó el patrón de bandas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3. RESULTADOS.

3.1 Información Clínico-Epidemiológica

Se estudiaron 152 pacientes, 151 de las cuales fueron mujeres. El rango de edad de las pacientes fue de 24 a 85 años.

Para determinar si la muestra era representativa del resto de la población atendida en los hospitales participantes (universo) durante el mismo lapso, se compararon en ambas la distribución de edades al momento del diagnóstico, la distribución por sexo y el tamaño y tipo histológico de los carcinomas.

La muestra resultó semejante al universo en su distribución de edades (prueba de X^2), distribución por sexo y tamaño y tipo de tumores.

Los datos de distribución por edades se muestra en la tabla V.

Tabla V
Distribución por edades en la muestra

Rango (años)	Muestra Número (%)	Universo %
20-29	10 (6.6)	4.4
30-39	30 (19.8)	20.2
40-49	33 (21.8)	29.8
50-59	55 (36.0)	30.7
60-69	14 (9.2)	9.6
70-79	10 (6.5)	5.2

Prueba de Chi ² = 4.6, con 5 grados de libertad. La p no fue significativa (> 0.05).

El 16.4% (#= 25) de los pacientes tuvieron 35 años ó menos al momento del diagnóstico, por lo que se les consideraron como pacientes con inicio temprano de cáncer mamario.

Los pacientes provenían de clases socioeconómicas media y baja. El 70% (#= 106) de los pacientes reportó una escolaridad máxima de primaria.

Todos los pacientes participantes fueron residentes del noreste de México; la distribución de procedencia fué como sigue: 84

(55.3%) del área metropolitana de Monterrey, 21 (13.8%) del resto de estado de Nuevo León y 47 (30.9%) de estados aleda como Coahuila, Tamaulipas, Zacatecas y San Luis Potosí. Tres cuartas partes de todos los pacientes eran derechohabientes del IMSS.

La tabla VI muestra la caracterización de las pacientes en relación a los factores de riesgo no genéticos, para cáncer mamario.

Para determinar el tiempo de exposición a estrógenos endógenos, las pacientes se agruparon según si el diagnóstico se realizó antes ó después de la menopausia; así, en las primeras, el cálculo se realizó substrayendo la menarquía a la edad al diagnóstico y en las últimas a la edad de la menopausia. En el caso de las controles postmenopáusicas, el procedimiento fué similar que en las pacientes; para aquellas mujeres premenopáusicas el cálculo se hizo substrayendo la edad de la menarquía de la edad a la entrevista. Al grupo con ciclos menstruales pertenecieron 54 pacientes de las cuales 20 (37%) dejaron de menstruar en el primer año de quimioterapia. No se observó diferencia con los controles correspondientes.

Se detectó que el número de mujeres que presentó algún aborto en su vida fué mayor en las pacientes ($p < 0.05$), aunque ésto no se reflejó en alguna diferencia en el número de abortos por mujer, ni en el número de embarazos. En el mismo sentido, el porcentaje de mujeres con hijos y el número de hijos fué semejante en ambos grupos. En forma más específica, el porcentaje de mujeres con el

primer hijo antes de los 25 años de edad tendió a ser más grande en el grupo control; cuando además se incluyó que se hubiera lactado a ese primer hijo, se notó un mayor porcentaje entre los controles ($p < 0.002$). Alrededor del 60% de las mujeres en el grupo de pacientes y en el control tuvieron sobrepeso, no habiendo diferencia significativa entre ambos.

Tabla VI

Factores no genéticos predisponentes a cáncer mamario

Factores	Pacientes	Controles	RM	P
n	151	235	- -	
Menarquia (años)	12.9 ± 1.4	12.7 ± 1.4	- -	n.s.
Estrógenos endógenos (años)				
Menstruaba al Dx. de CA	24.7 ± 7	24.5 ± 6	- -	n.s.
Menopausia antes del Dx	33.6 ± 5	32.9 ± 4	- -	n.s.
Antecedente de Aborto	59 (39%)	68 (29%)	1.7	$p < 0.05$
Promedio de Abortos	1.9	1.7	- -	n.s.
Tiene hijos	128 (84.8%)	206 (87.3 %)	- -	n.s.
Promedio de hijos	4 ± 2	4 ± 2	- -	n.s.
Edad < 25 años al 1 ^{er} hijo	96 (63%)	171 (72%)	1.5	$p = 0.054$
< 25 años a la 1 ^{er} lactancia	79 (52%)	161 (69%)	1.9	$p < 0.002$
Sobrepeso (IMC ≥ 27 k/m ²)	81 (62.3%)	140 (59.5%)		n.s.

RM = razón de momios. n.s. = no significativo. La comparación de medias se realizó por la prueba de t- student y de proporciones por χ^2 . El IMC (Índice de masa corporal) se obtuvo con la fórmula Kg/talla (m²).

En forma más desglosada, se encontró una historia de lactación en el 73% de las pacientes de la muestra. De estas 110 pacientes, 79 (72%) alimentó a su primer hijo antes de los 25 años de edad, con un promedio de duración de la lactancia de 10.25 ± 9.3 y un rango de 1-48 meses. De las 41 mujeres que no lactaron, 23 fueron nulíparas (15.2% del total).

Las pacientes tuvieron un promedio de 4.17 hijos ± 2.38 y un rango de 1-12. El 63% tuvo a su primer hijo antes de los 25 años.

Hubo una historia de abortos en el 39% de las pacientes, con una media de 1.9 ± 1.1 y rango de 1-6; solo dos de estas pacientes fueron nulíparas.

Aunque no relacionado directamente con el enfoque molecular de este trabajo, pero sí muy importante para efectos de detección temprana y por tanto de abatimiento de la morbi-mortalidad asociada a cáncer mamario, se investigó el hábito del autoexamen mamario en las pacientes. Los resultados se muestran en la tabla VII.

Tabla VII
Forma de detección y tamaño del tumor

Detectó por	n (%)	*Atendió < 1 sem	** Tumor (cm)
Autoexamen	50 (32.9)	66%	5.5 ± 3
Dolor	19 (12.5)	90%	6.3 ± 3
Casual	83 (54.6)	32.5%	5.6 ± 4

* $\chi^2 = 8.6$; grados de libertad =2; $p < 0.05$. **ANOVA en un solo sentido, no significativo.

Alrededor de un tercio de las pacientes reportó autoexaminarse y dos terceras partes de éstas buscaron atención en la misma semana, proporción que fue significativamente mayor que en las que no seguían esta conducta. Lamentablemente 17 pacientes (11.3%) tardaron más de un año en acudir a consulta. El dolor fué el factor más efectivo para que las pacientes se movilaran para buscar ayuda.

Desafortunadamente, la ventaja relativa de las pacientes que se autoexaminaron no se reflejó en una detección de tumores más pequeños, lo que se como se evidenció en la similitud de las medias de éstos, en los tres grupos de la tabla VII.

También fué importante determinar el tipo histológico de carcinoma que presentaron las pacientes (tabla VIII).

Tabla VIII
Diagnóstico histopatológico del cáncer de mama

Tipo	n (%)
Lobulillar	11 (7.2)
Ductal coloide	2 (1.3)
Ductal Medular	5 (3.3)
Ductal sin patrón específico	134 (88.2)
TOTAL	152 (100.0)

El antecedente de cáncer en familiares de primer grado fué investigado tanto en pacientes como en controles y se describe en la tabla IX.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Tabla IX
Antecedentes familiares neoplásicos

Familiares 1 ^{er} grado	Pacientes	Controles	RM	p
Con cáncer de mama	13 (8.61%)	2 (0.85%)	11	p<0.001
Con cáncer gástrico ó pancreático	12 (7.94%)	1 (0.42%)	20	p<0.001
Con carcinoma cervicouterino	3 (1.99%)	5 (2.12%)	0.93	n.s.

Los familiares (de primer grado en esta tabla, solo incluyen madres y hermanas. Significancia corregida para tres comparaciones p< 0.017. n.s. = no significativo

En la tabla IX se observa que los pacientes tuvieron significativamente mayor porcentaje de familiares de primer grado con cáncer de mama, que el grupo control. Interesantemente el carcinoma gástrico y el pancreático, considerados juntos, afectaron más familiares de primer grado de los pacientes, que de los controles. Por otro lado, el carcinoma cervicouterino, la neoplasia maligna más frecuente en la mujer mexicana, se presentó en igual proporción en ambos grupos.

Para profundizar en los antecedentes familiares se investigaron los antecedentes neoplásicos en los familiares de segundo grado de las pacientes. La proporción encontrada fué de 10% (n=15) para carcinoma de mama, de 4 % (n=6) para carcinoma de ovario y de 9.3% (n=14) para carcinoma gástrico ó pancreático.

En esta muestra, desde el punto de vista clínico, el 80% de los cánceres fueron esporádicos, es decir, que en 122 pacientes no se encontraron antecedentes familiares para esta neoplasia.

Por otro lado, el inicio temprano del carcinoma mamario (35 años ó menos) se presentó en 25 mujeres (16.4%). Dado que el inicio temprano es uno de los rasgos asociados a mutaciones en el gen de predisposición BRCA1, se analizaron con detalle los antecedentes familiares de estas mujeres y se compararon con los de mujeres de edad superior a los 35 años. Este análisis se efectuó mediante la razón de momios para determinar si en dos subgrupos (mayores vs

menores de 35 años al momento del diagnóstico) el tener antecedentes familiares de primer grado de carcinoma mamario, historia de carcinoma de ovario, antecedentes de segundo grado para carcinoma mamario y por último de carcinoma gástrico y pancreático, se asociaban a una presentación temprana del carcinoma mamario en las pacientes. Los resultados se muestran en la tabla X.

Tabla X

Distribución de las pacientes según edad al diagnóstico y factores heredofamiliares

Condición	Edad al Dx		Análisis		
	< 35 a	> 35 a	Total	RM	p
De cáncer mamario en 1 ^{er} grado*	2	13	15	0.6	n.s.
De carcinoma ovárico *	4	3	7	7.8	0.001
De cáncer mamario en 2 ^{do} grado	1	14	15	0.3	n.s.
De carcinoma gástrico o pancreático	3	13	16	1.2	n.s.
Sin antecedentes	15	83	98	1	n.s.
Total	25	126	151	--	- -

* Pacientes con familias de alto riesgo hereditario. RM= razón de momios. Significancia corregida para cuatro comparaciones $p = 0.0125$.

En relación a la tabla X, cabe aclarar que en el grupo de

pacientes con familiares de primer grado con cáncer mamario, se incluyeron dos pacientes que tuvieron hijos con carcinoma mamario y que no se contemplaron en la tabla IX, pues no se investigó en los controles dicho antecedente en hijos. También en relación a los familiares con carcinoma gástrico y pancreático, se incluyeron en esta tabla, aquellos de primero y segundo grado. En esa misma tabla, se observó que el tener un familiar de primer y segundo grado para cáncer mamario, o familiares con carcinoma gástrico ó pancreático, no se asoció con presentación temprana del carcinoma; sin embargo, el tener antecedente familiar de carcinoma ovárico confirió a las pacientes una probabilidad ocho veces mayor de tener un cáncer mamario de presentación temprana. Como se mencionó, el tener familiares con carcinoma gástrico ó pancreático no fué diferente en los dos grupos, sin embargo, cuando se consideraron 3 pacientes diagnosticadas entre los 36 y los 40 años de edad, en las cuales se tomó en cuenta el tamaño de sus tumores (lo que incluso sugirió que podían haberse iniciado antes de los 35 años), la razón de momios aumentó a 3.7 con una $p < 0.05$; este valor denotó una tendencia a la asociación, ya que con la corrección por número de comparaciones, quedó por arriba del punto de corte.

Vale la pena mencionar que el único paciente varón en nuestra muestra, refirió historia de carcinoma gástrico en su madre y abuela materna y de tumor cerebral en un tío materno. Además, una paciente de 75 años tuvo un hijo de 58 años con cáncer mamario y una hija

(de 51 años) y un hermano murieron por carcinoma gástrico.

3.2 Resultados de la búsqueda de mutaciones

3.2.1. Integración del banco de DNA genómico

A partir de 152 muestras de sangre y 13 muestras de tejido se integró un banco de DNA genómico, con una calidad referida por el cociente de la absorbancia a 260 nm entre la de 280 nm, de entre 1.8 y 2. La concentración de DNA en las muestras fue de alrededor de 100 ng/ μ l con volúmenes finales de entre 500 y 1000 μ l y buena integridad del mismo.

3.2.2 PCR: su optimización

Se mejoró el método de Gayther y cols. (25). Esto incluyó la amplificación de las 4 regiones génicas de interés del gen BRCA1 en un mismo paso y con sus respectivos juegos de iniciadores (cuadriplex).

En la fig. 3, se muestra la amplificación de los exones 2,11 y 20 del gen BRCA1, de tres pacientes diferentes (carriles del 1-3). Se depositaron 5 μ l del producto amplificado en cada carril. Se observaron bandas de 643 y 482 pb para las dos regiones el exón 11, de 305 para el exón 2 y de 231 pb para el exón 20.

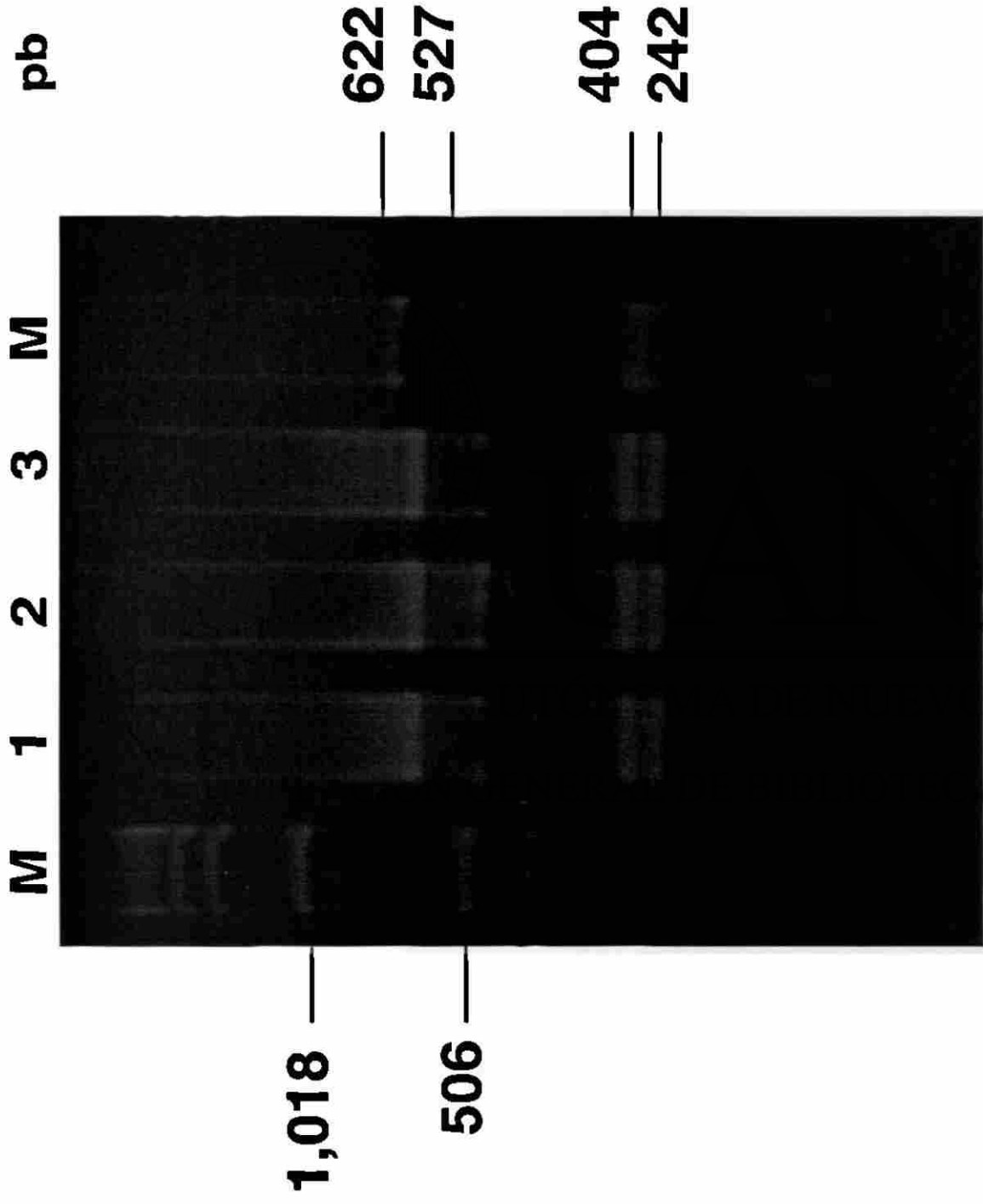


Fig 3. Amplificación de los exones 2, 11 (dos regiones) y 20 del gen BRCA1.

Se muestra el ensayo cuádruplex de amplificación de tres pacientes (carriles 1 al 3). Los productos amplificados tienen bandas de 643 y 482 pb para el exón 11, de 305 pb para el exón 2 y de 231 pb para el exón 20. El gel corresponde a uno de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. M= marcadores de DNA, de 1kb y pBRMsp1.

La amplificación de estas cuatro regiones se efectuó en una sola reacción de PCR optimada en este trabajo, de acuerdo a lo referido en metodología (sección 2.2.3.3.2.1). Se utilizó un gel de agarosa al 1.5% que se tiñó, después de la electroforesis, con bromuro de etidio.

3.2.3 Búsqueda de heteroduplex

Con el procedimiento descrito en el apartado 2.2.3.3., se visualizó en un gel de poliacrilamida de alta resolución (MDE), cuatro bandas diferentes correspondientes a los exones 11A (643 pb), 11B (482 pb), 2 (305 pb) y al 20 (231 pb).

En cada gel MDE se analizaron 20 muestras y se incluyeron en paralelo, controles de mutaciones. Estos controles correspondieron a pacientes previamente caracterizadas en los laboratorios de los Drs. G. Saunders (MD Anderson Hospital, Houston, Texas) y L. Brody[®] (National Center for Human Genome Research, Bethesda, Maryland), como portadoras de las mutaciones 185 del AG (exón 2), 1294 del 40 (exón 11 A), y 5382 insC (exón 20). En la fig. 4 se muestra un ensayo para búsqueda de heterodúplex en tres pacientes. De cada paciente se analizaron productos amplificados obtenidos a partir de DNA de sangre periférica (s) y de tejido neoplásico (t).

En todas estas muestras solo se observó una banda (homodúplex) del tamaño esperado para el exón correspondiente, y que coincidió con la del control negativo para mutación (C). En

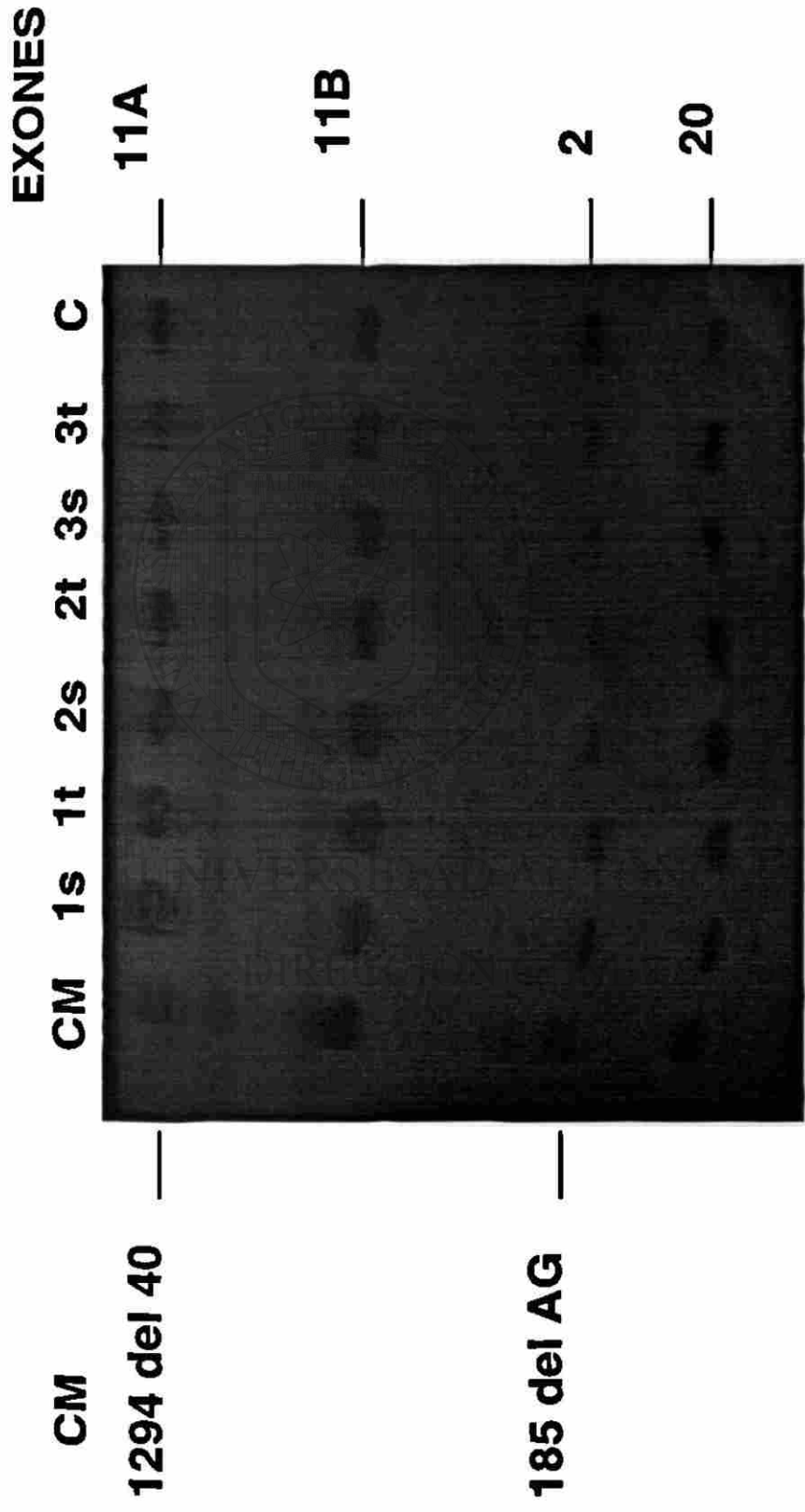


Fig 4. Análisis de heterodúplex del gen BRCA1 en pacientes sin mutaciones.

Se muestra un ensayo de heterodúplex de tres pacientes (1al 3), a partir de producto amplificado obtenido de DNA de sangre (s) y de tejido (t). No se observan bandas variantes (heterodúplex) en estas pacientes. El control de mutación (CM) ostenta heterodúplex en el exón 11A (1294del40) y en el exón 2 (185del AG). Dependiendo de la mutación, el heterodúplex se apreció como una o varias bandas, por arriba o por debajo de las bandas del homodúplex del control negativo de mutación (C). Gel de poliacrilamida (MDE) teñido con plata. La electroforesis se practicó a 250 V por 12 hs.

cambio, en el carril del control positivo de mutaciones (CM), se observaron bandas variantes en los exones 11A y 2. Estas bandas correspondieron a las mutaciones 1294 del 40 (exón 11A) y 185 del AG (exón 2). Como se comentó, para el análisis de heterodúplex se utilizaron geles de poliacrilamida de alta resolución (MDE) que se tiñeron con plata.

De las 152 muestras analizadas se detectó una paciente con una banda anormal en el exón 20. En la fig. 5 se muestra el ensayo de heterodúplex correspondiente a las pacientes 80-84. El control negativo para mutación y las muestras de las pacientes 80, 82, 83 y 84, no ostentaron bandas variantes. La paciente 81 presentó una banda variante (heterodúplex) que se observó por arriba de la banda del homodúplex. Se observó también la positividad para heterodúplex, en el control con la mutación 1294 del 40.

Se comparó el resultado de los geles revelados por la tinción con plata, con la de aquellos en los que se utilizó autoradiografía con ^{32}P . Para el estudio se incluyó la muestra con banda anormal detectada con tinción argéntica y 80 muestras de pacientes en las que no se detectó heterodúplex con esa tinción. Con autorradiografía, los casos que no mostraron heterodúplex con la tinción de plata, fueron también negativos para bandas variantes. La muestra con heterodúplex mostró una intensidad de banda variante muy semejante con ambas técnicas.

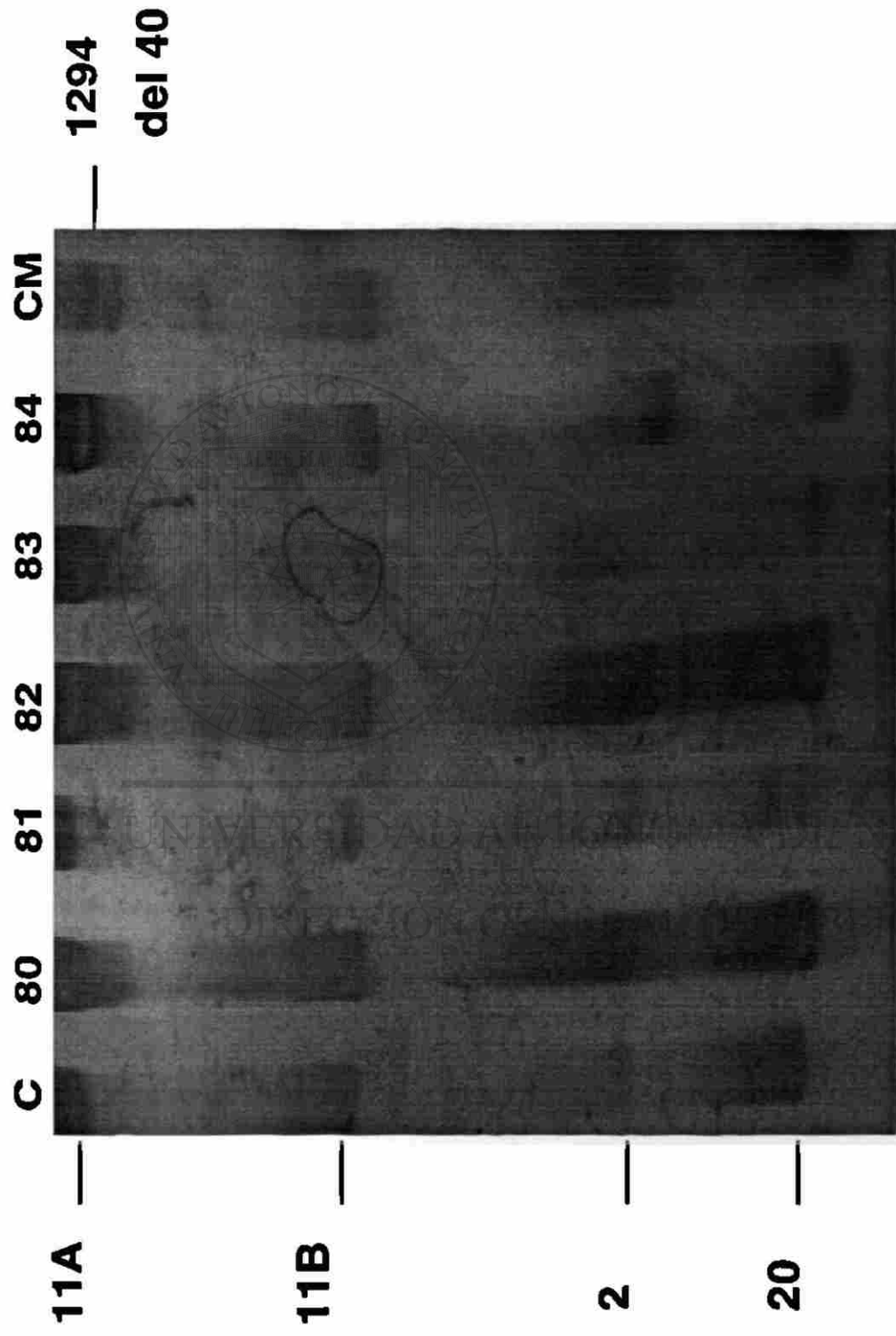


Fig 5. Análisis de heterodúplex en un caso con banda variante en el exón 20.

Se muestra un ensayo de heterodúplex de 5 pacientes (80-84). Se observan las bandas correspondientes a los exones 11 (A y B), 2 y 20. Las pacientes 80, 82, 83 y 84, al igual que el control negativo (C) no mostraron bandas variantes; la paciente 81 ostentó un heterodúplex en la banda del exón 20. CM= Control de mutación (1294 del 40). Gel de poliacrilamida MDE.

En la fig. 6 se muestra un ensayo de autorradiografía para el exón 20 del gen BRCA1, en el que se incluyeron la paciente 81 y otras 9 pacientes. En todos los carriles se depositaron 2 μ l de producto amplificado, excepto en el tercer carril de izquierda a derecha, en el que la muestra 81 presentó una mayor intensidad debido a que se aplicaron 4 μ l.

Como se puede observar, a igualdad de concentraciones de producto amplificado, la banda de heterodúplex en la paciente fue de intensidad débil, comparado con el homodúplex de las otras pacientes. Para que la banda se apreciara con nitidez, se aumentó la concentración y en este caso el volúmen, de la muestra depositada; las otras muestras, incluida el control de mutación (CM), se observaron sobre-expuestas.

3.2.4. Secuenciación

La secuenciación del producto amplificado del exón 20 en el caso de la paciente 81, mostró una inserción de 12 pares de bases en el intrón 20. Esta inserción representa una duplicación en tandem de la secuencia 5' GTATTCCACTCC 3' que comienza a 48 pb más allá de los límites 3' del exón 20 (por ello queda dentro del intrón 20).

En la fig. 7, correspondiente al perfil de secuenciación fluorescente del intrón 20 del gen BRCA1 de la paciente 81, se observa un doble perfil de picos a partir del punto de inserción de los 12 pares de bases; también se observa la distorsión del perfil de picos a partir de ese punto en el resto de la secuencia, lo que dificulta la lectura automatizada de la misma, con la consiguiente aparición de Ns (cualquier base), como puede observarse en el lugar correspondiente a la base 177, en la paciente 81.

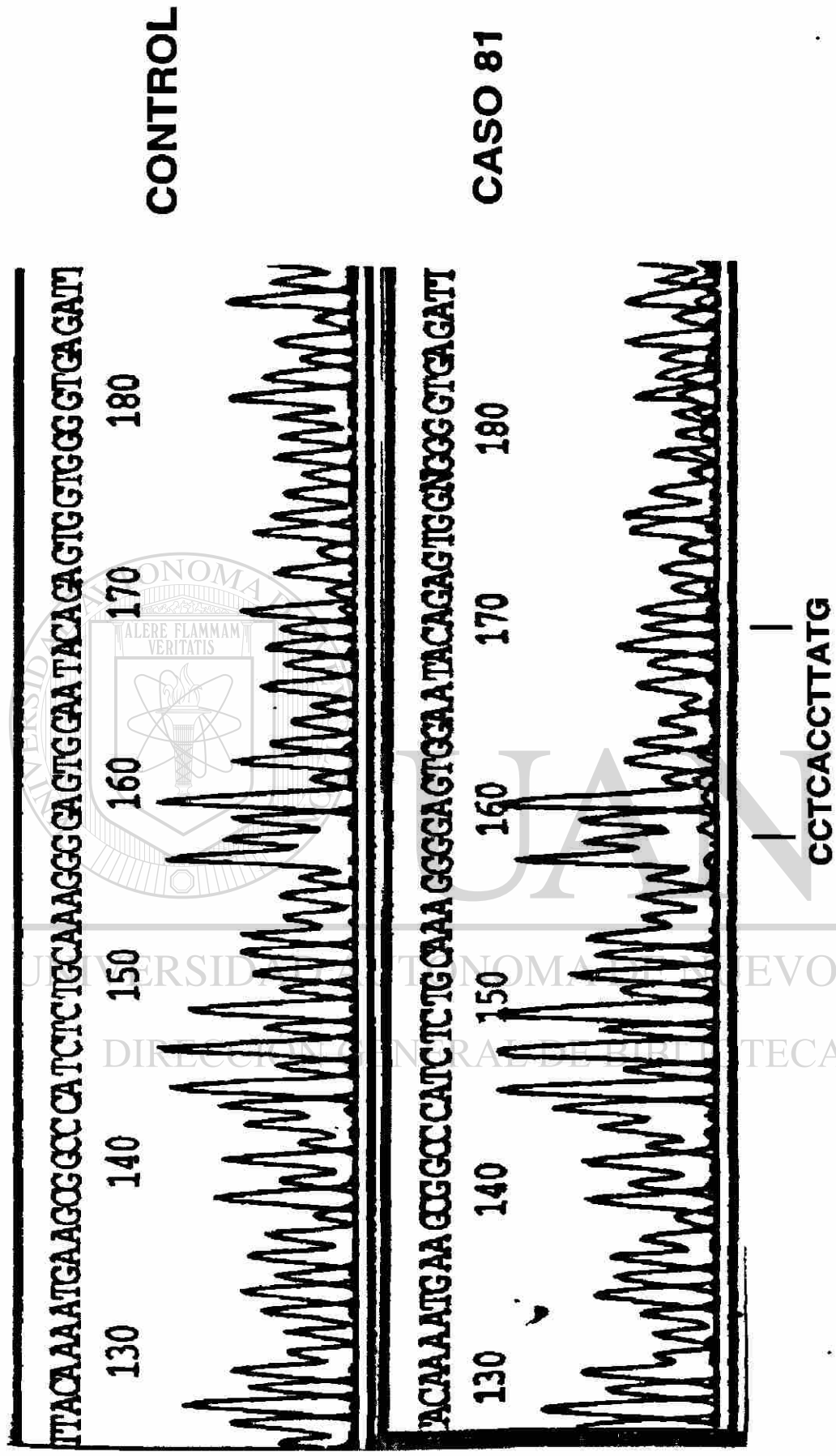


Fig 7. Secuenciación en el intrón 20 del gen BRCA1.

Se muestra el perfil de secuenciación automática en la paciente del caso 81 y en un control sin banda variante. Se observa en la paciente un doble perfil a partir de la base 158, que corresponde al sitio de inserción de 12 pb en el intrón 20.

3.2.5. Perfil de la paciente con mutación.

La paciente es una mujer de 55 años con un carcinoma ductal de reciente aparición.

Tuvo su menarquía a los 13 años, su primera gesta a los 23 y el último parto a los 27 años. Presentó una historia de 5 gestas, 2 abortos y tres partos. Su menopausia se presentó a los 44 años en forma natural, con un tiempo de exposición a estrógenos de 31 años.

Tuvo historia de lactancia durante 3 meses a cada uno de sus 3 hijos. Utilizó anticonceptivos orales combinados de baja dosis (Eugynon) durante 5 años y es hipertensa con 10 años de evolución. No practicaba el autoexamen mamario y el descubrimiento del tumor fué casual.

La neoplasia, un carcinoma canalicular infiltrante sin patrón específico y de grado nuclear II de Black, midió 5 cm en su diámetro[®] máximo y estaba localizada en la mama derecha en el cuadrante supero-externo.

La paciente se sometió a cuadrantectomía y a quimioterapia.

Su historia familiar incluye, madre muerta por hemorragia cerebral hipertensiva, dos hermanas y un hermano hipertensos.

Tiene dos hijos varones sanos de 31 y 28 años y una hija de 30 años con historia de esterilidad de 5 años de evolución. Su único antecedente neoplásico es un tío paterno muerto a los 70 años con carcinoma de laringe.

3.2.6. Integración de los resultados epidemiológicos y del análisis de mutaciones

Una vez completada la búsqueda de mutaciones en las cuatro regiones del gen BRCA1 en la muestra de los 152 pacientes, se realizó un análisis estadístico para determinar si el número esperado de las 4 mutaciones más frecuentemente reportadas en el gen BRCA1 en poblaciones norteamericana y europea (24) coincidió con lo observado en las pacientes. ®

Los resultados se muestran en la tabla XI.

Tabla XI
Mutaciones en el gen BRCA1 de acuerdo a antecedentes familiares neoplásicos

Antecedente familiar	n	Obv	FER	NE	p
1. 1er grado con CA mama*	15	0	0.22	3	0.024
2. Con carcinoma ovárico*	7	0	0.4	3	0.028
3. 2º grado con CA mamario	15	0	0.07	1	n.s.
4. CA gástrico ó pancreático	16	0	0.04	0	n.s.
5. Ninguno, Dx del CA < 40 años	20	0	0.07	1	n.s.
6. Ninguno, Dx del CA > 40 años	78	1	0.015	1	n.s.
Total	151	1	0.06	9	<0.004
Filas 1 y 2	22	0	0.3	6	<0.001

* Pacientes con familias de alto riesgo hereditario. Obv= número de mutaciones observadas, FER= frecuencia esperada de mutaciones en la región estudiada del BRCA1 según grupo de riesgo, NE= número esperado de pacientes con mutación. p= probabilidad binomial de observados vs esperados, significancia corregida para seis subgrupos. p= 0.008.

En la tabla anterior se mostró la frecuencia (ajustada) esperada de mutaciones (FER) para población sajona de acuerdo a edad al diagnóstico y los antecedentes familiares, según las estimaciones de Easton y de Shattuck-Eidens; el ajuste se realizó considerando que las regiones estudiadas en este trabajo presentan el 50% de las mutaciones reportadas en el gen.

La única mutación observada correspondió al subgrupo de esporádicos, lo que coincidió con lo esperado para ese subgrupo. La probabilidad de no encontrar mutaciones en los otros subgrupos siguiendo el principio de Bernoulli (26), denotó una tendencia a estar por debajo de lo esperado en los grupos con alto riesgo familiar ($p < 0.05$). Tampoco se alcanzó la significancia al corregir de acuerdo al número de comparaciones. Sin embargo, cuando se evaluaron los diferentes subgrupos en conjunto, el encontrar una sola mutación en la muestra fue menor a lo esperado; lo mismo se obtuvo al combinar los subgrupos de alto riesgo heredofamiliar, en los cuales la baja frecuencia observada alcanzó la significancia estadística.

3.2.7 Prueba de proteína truncada.

En el piloto se analizaron muestras de 25 pacientes diferentes. En dos pacientes se analizaron sangre y tejido neoplásico, en otra solo tejido y en el resto sangre.

En una de las muestras identificada como 121t (t = DNA procedente del tejido neoplásico), se detectó una proteína de tamaño menor al esperado. En la fig. 8 se presenta una autorradiografía que corresponde al ensayo de proteína BRCA2 truncada en 6 pacientes.

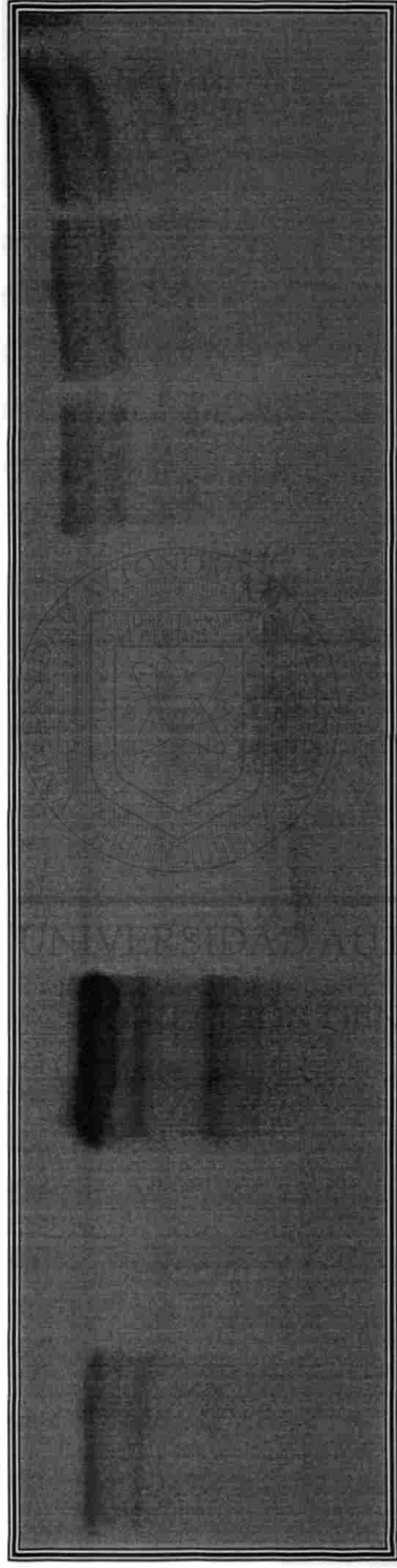


Fig 8. Prueba de la Proteína Truncada para el exón 11 del gen BRCA2.

Autorradiografía con ^{35}S , de los productos de traducción del exón 11 del gen BRCA2, en diferentes pacientes. Se partió de DNA de linfocitos (muestras 55, 127, 94 y 9) y de tejido neoplásico mamario (muestras 121t y 14t). El volúmen depositado por carril fue de 5 μl . Para la muestra 121t se depositaron de izquierda a derecha, 5, 7 y 10 μl respectivamente. La banda superior de mayor intensidad (muy evidente en la muestra 127) correspondió al tamaño esperado del producto proteico (42,000 Da); sin embargo, en el caso 121t, la banda de mayor intensidad presente es de aproximadamente 18,000 Da, por lo que la prueba se consideró positiva para esta paciente.

En las pacientes 55,127 94 y 9 se partió de DNA obtenido de sangre periférica y en las pacientes 14 y 121, el DNA se obtuvo de tejido neoplásico. Se depositaron 5 μ l por carril, en un gel de poliacrilamida-SDS al 12%. Se observó que en todas las pacientes, la banda más fuerte correspondió al tamaño esperado del producto proteico de alrededor de 42,000 Da; sin embargo en la paciente 121t, a pesar de emplear volúmenes crecientes (5,7 y 10 μ l), no fué posible visualizar la banda esperada y en cambio se observó una banda prominente de aproximadamente 18,000 Da.

Con estos hallazgos fué posible deducir que en esta paciente con PTT positiva, existe una mutación en el exón 11 del gen BRCA2 que repercutió en una proteína truncada, y aunque ya no se investigó -para efectos de este trabajo- el tipo exacto de mutación, es interesante comentar acerca del perfil de esta paciente.

Se trató de una mujer de 40 años, con carcinoma ductal® bilateral, el primero del cual se presentó a los 35 años; su padre y un hermano murieron de carcinoma gástrico y leucemia, respectivamente. Tuvo cinco embarazos, 4 hijos y un aborto. Amamantó a su primer hijo antes de los 25 años de edad, durante 12 meses y en total lactó durante 48 meses de su vida. Ella presentó varios factores que se han visto asociados con mutaciones en genes de susceptibilidad para cáncer mamario; entre estos factores destacan, la edad temprana de presentación, la bilateralidad y el tener antecedentes familiares de otras neoplasias.

4. DISCUSION

4.1 EPIDEMIOLOGIA

El número creciente de mujeres afectadas por cáncer de mama justifica todo esfuerzo por disminuir la morbimortalidad asociada. Desgraciadamente, en nuestro país la información epidemiológica es incompleta y no se conoce con precisión el número de casos nuevos por año, ni los factores de riesgo de las mujeres afectadas. Consideramos que tener esta información es un requisito básico para ubicar en la realidad la utilidad de un procedimiento de detección. Es por ello que esta investigación se desarrolló en paralelo tanto en el área de la genética molecular, como en la clínico- epidemiológica.

La incidencia de cáncer varía tanto en relación a etnicidad como a localización geográfica. La variación en la incidencia de cáncer entre diversos grupos étnicos se había relacionado con diferencias en el aspecto social, cultural, económico y ambiental. Sin embargo hoy se piensa que la susceptibilidad heredada para el cáncer puede ser un fuerte determinante de las diferencias étnicas observadas en la incidencia de neoplasias (30).

Existen algunos estudios con muestras pequeñas (<50), realizados en mujeres de origen hispánico radicadas en Estados Unidos de América, en las que solo un 2 % de las mujeres con

cáncer mamario tenían un familiar de primer grado con cáncer de la mama (31). Otros autores reportan un bajo riesgo para cáncer en población mexico-americana (32).

En nuestro estudio, el 20 % de las pacientes tenían antecedentes familiares de neoplasia mamaria y un 10.5% tenían familiares de primer grado afectados. La evidente diferencia en estos resultados probablemente tiene que ver con las fuentes de información. Los estudios mencionados son retrospectivos con información obtenida de expedientes, actas de defunción etc.. En nuestro trabajo, se realizó una entrevista dirigida por una encuesta en donde se enfatizaban los antecedentes heredofamiliares y se inquiría en forma particular sobre los diferentes tipos de familiares. Estos datos son de suma importancia dado el tipo de investigación genética que se propuso. Definitivamente, las personas más beneficiadas con cualquier intento por diagnosticar oportunamente el cáncer mamario, serán aquellas con una carga familiar obvia, sin que esto signifique que una persona sin historia familiar no pueda ser portador de una mutación en el gen BRCA1, como lo comprobamos en este estudio.

De inicio, nuestra investigación aportó el saber que al menos es posible incidir en ese 10% de mujeres con más posibilidades de tener una herencia de susceptibilidad a cáncer mamario. Este dato concuerda con investigaciones hechas en diferentes series

realizadas en población sajona, en las que se estima que entre un 5 y un 10 % de todos los carcinomas mamarios tienen un factor hereditario predominante (6) .

La investigación de los antecedentes familiares neoplásicos en los pacientes, evidenció que el tener un familiar con carcinoma de ovario, aumentó en 8 veces el diagnóstico de carcinoma mamario antes de los 35 años de edad. Ahondando en esto, solo una de las 7 pacientes con familiar con carcinoma ovárico fué diagnosticada después de los 40 años; esto coincide con lo reportado en la literatura acerca de que la combinación de carcinoma mamario y ovárico sugieren la participación del gen BRCA1, y que uno de los rasgos de pacientes portadoras de mutaciones en este gen, es la presentación temprana del carcinoma (10).

Se sabe que existen una serie de factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de neoplasia maligna mamaria. De acuerdo a la literatura, la exposición acumulativa a estrógenos es el factor de riesgo no genético más importante, exceptuando quizá a la radiación ionizante. Es conocido que la menarquía temprana, la menopausia tardía, el uso temprano y prolongado de anticonceptivos, nulo ó escaso número de hijos ó tenerlos después de los 30 años, así como la terapia de reemplazo estrogénica, incrementan la exposición a estrógenos y aumentan el riesgo de carcinoma mamario (33).

En nuestras pacientes no hubo diferencia estadísticamente significativa con el grupo control de mujeres sanas en relación a edad de menarquía, menopausia y tiempo de exposición a estrógenos. Al menos en nuestra población, las mujeres con cáncer mamario no tienen un tiempo de exposición a estrógenos endógenos significativamente diferente que las mujeres sin carcinoma, por lo que podría pensarse que este factor de riesgo no tiene una participación importante en nuestro contexto. Sin embargo, sería interesante comparar si existen diferencias entre ambos grupos en relación a exposición a xenoestrógenos que algunos consideran nocivos (DDT y su principal metabolito DDE, derivados plásticos, humo de cigarro y colorantes alimenticios como el rojo No. 3) y protectores (ligninas presentes en la fibra de semillas y granos, genisteína derivada de la soya y dioxina y otros fitoestrógenos) (33).

Otros datos interesantes de comentar son la paridad y la lactancia. Si bien el promedio de hijos fue muy semejante en el grupo control y en las pacientes, cuando se analizó el tener el primer hijo antes de los 25 años, se observó una tendencia a ser más frecuente en el grupo control; esta tendencia aumentó y alcanzó significancia cuando además estas mujeres amamantaron a ese primer hijo. Con esto se puso en evidencia que la lactación del primer hijo antes de los 25 años, tuvo un efecto protector contra el cáncer mamario en nuestra muestra. Aún así, muchas mujeres con esta conducta protectora presentaron carcinoma de mama, por lo que

debemos sospechar que existen otros factores participando en el desarrollo del carcinoma mamario y es aquí donde los factores genéticos y ambientales toman mayor peso (34).

También fué llamativo que significativamente más mujeres con carcinoma mamario presentaron algún aborto en su vida, aunque esto no se reflejó en diferencia en el número de abortos por mujer ni en el número de embarazos. Tanto el carcinoma mamario como los abortos están relacionados a los estrógenos (33), y se conoce el efecto protector del embarazo, por lo que resulta congruente el hallazgo en relación a abortos en la muestra; sin embargo la explicación de este fenómeno queda fuera de los alcances de este trabajo.

4.2 GENETICA MOLECULAR

Dado que el gen BRCA1 es responsable de cerca del 50 % de los casos hereditarios DE cáncer mamario, consideramos que enfocar el estudio hacia este gen era un buen punto de partida, para la comprensión de la genética molecular en esta neoplasia.

La gran mayoría de los estudios sobre BRCA1 se han realizado en familias seleccionadas por un alto riesgo para cáncer mamario (35, 36), y en las cuales se ha rastreado el gen completo con secuenciación automática. Nosotros estábamos interesados en optimar un método que fuera rápido, confiable y relativamente

sencillo de realizar. Después del análisis de las diferentes técnicas disponibles optamos por la técnica de heterodúplex.

Esta técnica detecta cadenas bicatenarias híbridas constituidas por una cadena sencilla proveniente de un alelo normal, apareada con la cadena opuesta del otro alelo, el mutado; la disposición de los puentes de hidrógeno en dichos híbridos es imperfecta y altera su comportamiento electrofóretico. Esta técnica obviamente no está exenta de debilidades: no todos los cambios en la secuencia resultan en heterodúplex fáciles de detectar y la sensibilidad de la técnica disminuye con fragmentos mayores de 900 pb, además de que no provee información sobre la naturaleza y localización de la mutación (37). Sin embargo, aún con estas desventajas, consideramos que podría implementarse esta técnica en nuestro laboratorio para el rastreo rápido de las mutaciones.

Con el conocimiento de que el 50 % de las mutaciones en el gen BRCA1 se localizan en el 24 % de la región codificante que incluye los exones 2, 11 y 20, decidimos implementar y de ser posible mejorar la técnica de heterodúplex propuesta por Gayther (25). Además se quería determinar en pacientes con cáncer mamario -no seleccionadas por su historia familiar- la presencia de mutaciones en esos tres exones. Este escrutinio nos permitiría por un lado, validar y probar el método y por el otro representaría una aproximación más real de la prevalencia de mutaciones en nuestra población.

En el campo experimental se mejoró la técnica de Gayther; se lograron amplificar en un solo paso las cuatro regiones de los tres exones (con 4 juegos de iniciadores, refiriéndose a la técnica como cuádruplex), lo que representó un ahorro, no solo de tiempo, sino también de reactivos; ésto sin detrimento en los resultados y en su calidad.

En las 4 regiones génicas rastreadas en las 152 pacientes, el método detectó una muestra con una banda anormal en el intrón 20.

Como ya se mencionó, todas las muestras con 'bandas anormales deben someterse a secuenciación, a menos que se traten de familiares de un caso en el que la mutación ya ha sido caracterizada, en cuyo caso, si los parientes presentan el mismo patrón de bandas que el caso problema, se puede inferir que se trata de la misma mutación.

En nuestra paciente se realizó secuenciación automatizada del exón 20 y de porciones de sus regiones intrónicas flanqueantes comprobando que el perfil observado corresponde a una mutación conocida como IVS 20+ 60 ins12 ó dup 5396 + 48 a 59 localizada 48 pb más allá (3') del término del exón 20 (se ubica en el intrón 20).

Esta mutación se describió inicialmente en pacientes polacas con cáncer de mama sin historia familiar y también en el 2 % de una muestra de polacas, sin cáncer mamario (38). Recientemente se reportó en una mujer española con cáncer mamario y en 1 de 93 controles sanos analizados. Es interesante que la población descrita

con esta mutación tenga en común un origen latino.

Aunque inicialmente se consideró un polimorfismo sin repercusiones en la función protéica, se han realizado algunos estudios, aún incompletos, que sugieren que esta mutación puede ser una mutación regulatoria y tener un efecto real en la expresión del gen BRCA1, creando un transcrito inestable que se traduce en una proteína disfuncional. Se especula que el hecho de encontrarla en controles sanos, pudiera significar que es una mutación con baja penetrancia y que se necesitan otros eventos genéticos para el desarrollo de la enfermedad (39).

De cualquier manera, estos resultados aportaron mucha información relevante. En estos pacientes mexicanos con cáncer mamario, no seleccionados por su historia familiar, un 0.7% presentan mutaciones en el gen BRCA1 en las regiones estudiadas.

A pesar de que las familias de alto riesgo se presentaron con la misma frecuencia, en las pacientes de este estudio y en la población sajona, la probabilidad de que las 5 mutaciones más frecuentemente reportadas en esta última población, se presentaran con la misma frecuencia, en las mujeres mexicanas estudiadas con familias de alto riesgo, fué muy baja ($p < 0.005$). Es más, la mutación encontrada no corresponde a ninguna de las mutaciones referidas como más comunes, y encontramos definitivamente, pacientes con familias en donde la combinación de carcinoma mamario y ovárico, e incluso la presentación temprana del carcinoma, apoyan fuertemente

el involucramiento del gen BRCA1.

Estos hechos indican que definitivamente la frecuencia de mutaciones observadas en nuestras pacientes es inferior a la esperada, si es que el comportamiento a nivel molecular fuera el mismo que para la población reportada en la literatura. Por tanto, esto pudiera sugerir que eventualmente los exones 2, 11 y 20 del gen BRCA1, no sean los más frecuentemente afectados por mutaciones en población mexicana. En base a esto, se justifica un rastreo completo del gen en estas pacientes de alto riesgo familiar. Es más, el haber encontrado una paciente con mutación en el estudio piloto para BRCA2, en donde solo se analizaron 25 pacientes, y el encontrar una diferencia significativa entre grupo control y problema, en relación a antecedentes familiares de carcinoma gástrico y pancreático, apoya que esta búsqueda se haga extensiva también para este gen, ya que se ha reportado asociación entre mutaciones en BRCA2 e historia familiar de carcinoma gástrico y pancreático (41).

En relación a la mutación detectada en el gen BRCA1, controversial aún en cuanto a sus efectos reales sobre la expresión del gen, es importante enfatizar que se dió en una mujer sin antecedentes familiares; con esto se refuerza lo dicho en párrafos anteriores en relación a que el no tener un historial familiar, no descarta el hecho de ser un portador de mutaciones en el gen BRCA1.

El continuar con esta línea de investigación para identificar

en nuestra población, las zonas más proclives a presentar mutaciones en este gen, permitirá decidir en que exones realizar el rastreo inicial.

El análisis de heterodúplex probó ser de utilidad como método de rastreo, ya que es fácil y accesible a laboratorios con poca infraestructura. Si la paciente no tiene historia familiar, un rastreo inicial probablemente será suficiente. Si la paciente posee un historial familiar de carcinoma mamario, entonces será conveniente rastrear todo el gen BRCA, utilizando la misma técnica.

En nuestro laboratorio estamos implementando este rastreo no solo para el gen BRCA1, sino también para BRCA2, con lo que se cubrirá el 90 % de la etiología hereditaria.

Finalmente, dado que solo buscamos las mutaciones en los exones 2, 11 y 20, no podemos concluir sobre la frecuencia general de mutaciones en este gen, pues es posible que alguna de estas mujeres (sobre todo aquellas con antecedentes familiares) porten una mutación en algún otro sitio del gen, que quizá sea propio de nuestra población.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Se sabe que el cáncer mamario es un problema grave y creciente de salud pública. Nuestro estudio aportó los siguientes datos relevantes:

1. En nuestra población, un 10% de las pacientes tuvieron antecedentes familiares de primer grado para esta neoplasia. Al incluir a las mujeres con carcinoma bilateral y a aquellas con antecedentes familiares de carcinoma ovárico, se encontró que un 15% del total de pacientes constituyen el grupo de alto riesgo para presentar mutaciones en un gen de susceptibilidad.

2. Además del antecedente familiar de primer grado de cáncer mamario, el tener una historia familiar de carcinoma gástrico ó pancreático, constituyó también un factor de riesgo para carcinoma mamario.

3. El presentar antecedentes familiares de carcinoma ovárico elevó, en 8 veces, la probabilidad de un diagnóstico de carcinoma de aparición temprana en las pacientes.

4. A pesar de que en nuestra población la frecuencia de herencia familiar es similar que en la sajona, no se encontraron las mutaciones que en ella se reportan más frecuentemente. La probabilidad de que las pacientes del noreste de México las presenten con la misma frecuencia reportada en esos grupos, es muy baja.

5. La frecuencia de mutaciones en el gen BRCA1 fué de 0.7 % en la muestra de 152 pacientes; en el estudio piloto (25 pacientes) realizado para BRCA2, fué de 4%.

6. El método PCR- heterodúplex, para detectar mutaciones en el gen BRCA1, pudo practicarse simultáneamente (multiplex), para las cuatro regiones descritas como más proclives a mutar del gen BRCA1. Además, el gel pudo revelarse por la tinción de plata, siendo con el multiplex, innovaciones convenientes para laboratorios con infraestructura básica.

7. Una vez identificadas en nuestra población, las regiones del gen BRCA1 más proclives a mutar, será recomendable utilizar este método para rastreo en todas las pacientes con carcinoma mamario y en especial en aquellas con historia familiar positiva.

CAPITULO 6

PERSPECTIVAS

Con este estudio se inició una línea de investigación en cáncer mamario a nivel genético molecular en pacientes no seleccionadas por su historia familiar neoplásica.

La formación de un banco de DNA genómico permitirá ampliar el estudio a otros genes involucrados en la etiología y expresión de neoplasias mamarias.

Los resultados obtenidos en este estudio validaron la búsqueda amplia de mutaciones en el gen BRCA1 en todas las pacientes de alto riesgo con historia familiar positiva, proyecto que ya está contemplado.

Este trabajo ha aportado información que nos conducirá a una mejor comprensión del problema que representa el cáncer mamario. También ha demostrado la necesidad de un abordaje interdisciplinario que permita atacar el problema desde diferentes ángulos. El diseño operativo del trabajo permitirá continuar con la investigación y ampliar la muestra de pacientes, coleccionar familias de alto riesgo y en ellas, buscar mutaciones que puedan ser propias de nuestro contexto étnico. Así mismo, permitirá la inclusión de enfoques de estudio, no solo a nivel molecular, sino también en otras áreas de investigación, como la toxicológica, la psicológica y la sociológica.

REFERENCIAS

1. Registro histopatológico de Neoplasias en México. DGE/SSA,1993.
2. Reporte de Mortalidad por neoplasia según sitio anatómico. Subsecretaría Estatal de Salud, Nuevo León,1995.
3. Hellman S., Harris J., Canellos G, Fisher B. Cáncer de mama. En: De Vita V.(eds). Cáncer, principios y práctica en Oncología. Barcelona, Salvat editores,1990: 843.
4. Dickson RB, Lippman ME: Growth regulation of normal and malignant breast epithelium. In Bland KI, Copeland EM (eds): The Breast. Philadelphia, WB Saunders Company, 1991: 363-394.
5. Lynch HT, Albano WA, Heieck JJ. Genetics, biomarkers and control of breast cancer: a review. Cancer Genet Cytogenet 1984;13: 43-92.
6. Hoskins K, Stopfer J, Calzone K, Merajver S, Rebbeck T, Garber J, Weber B. Assessment and counseling for women with a family history of breast cancer. A guide for clinicians. JAMA,1995; 273(7): 577-585.

7. Bishop DT, Skolnick MH. Genetic Epidemiology of cancer in Utah genealogies: a prelude to the molecular genetics of common cancers. *Cell Physiol (suppl)* 1984: 63-77.
8. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP and the Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancers, results from 214 families. *AM J Hum Genet* 1993, 52: 678-701.
9. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the 17q linked breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994, 266: 66-71.
10. Easton DF, Narod SA, Ford D, Steel M. The genetic epidemiology of BRCA1. *Lancet* 1994, 344: 761.
11. Ford D, Easton DF, Peto J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J. Hum. Genet* 1995; 57: 1457-1462.
12. Wooster R, Neuhausen S, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to Chromosome 13 q 12-13. *Science* 1994, 265: 2088-2090.

13. Tavtigian S.V, Simard J, Rommens F, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature genetics* 1996, 12: 333-337.
14. Haber D, Harlow E. Tumor suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nature genetics* 1997; 16: 320- 322.
15. Weinberg R. How cancer arises. *Scientific American*, 1996; 32-40.
16. Friend S. Oncogenes and tumor suppressing genes. *N. England J Med.* 1988; 318: 618-20.
-
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
17. Futreal A, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 1994; 266: 120-122.
18. Jensen R, Thompson M, Jetton T, Szabo C, et al. BRCA1 is secreted and exhibits properties of a granin. *Nature genetics*, 1996; 12: 303-308.
19. Claus EB, Risch N, Thompson. WD. Genetic analysis of breast

cancer in the Cancer and Steroid Hormone study. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 232- 242.

20. Serova O, Montagna M, Torchard D, Narod S, Tonin P, Sylla B et al. A high incidence of BRCA1 Mutations in 120 Breast- Ovarian Cancer Families. *A. J Hum. Genet.* 1996, 58 : 42- 51.

21. Friedman L, Szabo C, Ostermeyer E, Dowd P, Butler L, Park T, Lee M et al. . Novel Inherited Mutations and Variable Expressivity of BRCA1 Alleles, Including the Founder Mutation 185 del AG in Ashkenazi Jewish Families. *Am J Hum Genet* 1995; 57 : 1284 - 1297.

22. Struewing J, Abeliovich D, Peretz T, Avishai N, Kabac M, Collins F & Brody L. The carrier frequency of the BRCA1 185del AG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nature Genetics* 1995; 11: 198- 200.

23. Craig C, Nevanlinna H, Pyrhönen S, Stenman U, et al. Evidence for involvement of BRCA1 in sporadic breast carcinomas. *Cancer research* 1994; 54: 2548-2551.

24. Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, Labrie F, Narod S et al. A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and

ovarian cancer susceptibility gene. JAMA 1995; 273: 535-541.

25. Gayther S, Harrington P, Russell P, Kharkevich G, Garkavtseva R, Ponder B, and the UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group. Rapid detection of regionally clustered germ-line BRCA1 mutations by multiplex heteroduplex analysis. Am J Hum Genet 1996; 58 : 451- 456.

26. Dawson-Saunders B, Trapp R. Bioestadística Médica. Manual Moderno, México, 1995.

27. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual . Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a. edición, 1989.

28. Ausbel F, Brent R, Kingston R, Moore D. Short Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience.

29. Van Der Luijt R. Protein Truncation Test. in Laboratory Protocols for Mutation Detection. Editor Landergren U. HUGO & Oxford University Press, 1996.

30. Gilliland FD. Ethnic differences in cancer incidence: a marker for inherited susceptibility? Environ Health Perspect 1997; 105 suppl

(4) : 897- 90.

31. Bondy ML, Spitz MR, Halabi S, Fueger JJ, Vogel VG. Low incidence of familial breast cancer among Hispanic women. Cancer Causes Control 1992; 3 (4): 377- 382.

32. Weiss KM, Chakraborty R, Smouse PE, Buchanan AV, Strong LC. Familial aggregation of cancer in Laredo, Texas : a generally low-risk mexican-american population. Genet Epidemiol 1986; 3 (2) : 121-143.

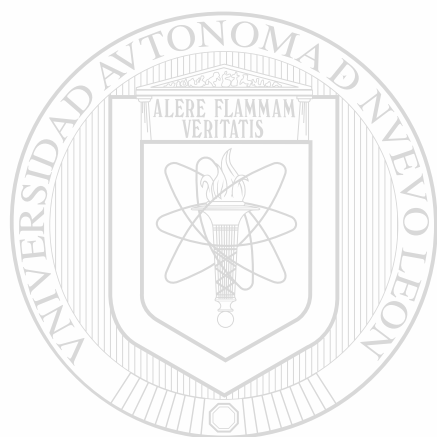
33. Lee Davis D, Axelrod D, Osborne M, Talang N. Environmental Influences on Breast Cancer Risk. Science & Medicine 1997; May-June : 56- 63.

34. Sellers TA. Genetic factors in the pathogenesis of breast factors : their role and relative importance. J Nutr 1997; 127 (5): 929 S- 932 S.

35. Gayther SA. Frequently occurring germ-line mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia. Am J Hum Genet 1997; 60 (5) : 1239- 1242.

36. Ramus SJ. Analysis of BRCA1 and BRCA 2 mutations in Hungarian families with breast or breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 1997; 60 (5) : 1242-1246.
37. Mashal R, Koontz J, Sklar J. Detection of mutation by cleavage of DNA heteroduplex with bacteriophage resolvases. *Nature Genetics* 1995; 9 : 177-183.
38. Krzyzosiaka WJ. Breast information core. <http://wwtw.nchgr.nih.gov/dir/transfer/bic>.
39. Robledo M, Osorio A, Senties C, Alberros J, Estevez L, Benitez J. The 12 base pair duplication/insertion alteration could be a regulatory mutation. *J med Genet* 1997; 34 (7): 592-593.
40. Schubert E, Lee M, Mefford H, Argonza R, Morrow J, Hull J, Dann J, King MC. BRCA2 in American Families with Four or More Cases of Breast or Ovarian Cancer: Recurrent and Novel Mutations, Variable Expression, Penetrance, and the Possibility of Families Whose Cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60: 1031-1040.

41. Couch F, Farid L, DeShano M, Tavgigian S, Calzone K, Campeau L, Peng Y, Bogden B, Chen Q, Neuhausen S, Shattuck-Eidens D, Godwin A, Daly M, Radford D, Sedlacek S, Rommens J, Simard J, Garber J, Merajver S, Weber B. BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nature genetics*, 1996; 13: 123-125.

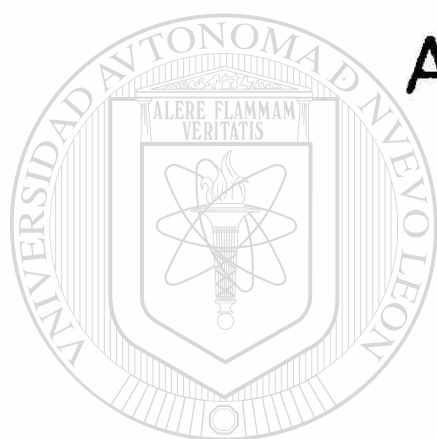


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



A N E X O

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PROTOCOLO: Búsqueda de las mutaciones más frecuentes en el gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama, en el noreste de México.

No. de paciente _____

Elaboró: _____

DATOS GENERALES :

HOSPITAL: _____ 1. IMSS 25. 2. IMSS 23. 3. H.U. 4. H. Metrop. 5. Priv.

Cédula ó No. de expediente: _____

Nombre: _____

Fecha nacimiento: _____ Edad: _____

Edo. civil: _____ 1. soltera 2. casada 3. viuda 4. unión libre

Ocupación: _____ 1. ama de casa 2. empleada de oficina. 3. obrera

4. profesionista 5. comerciante 6. otras _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

ANTECEDENTES PERSONALES

HABITOS

Tabaquismo: No. de años _____

No. de cigarrillos por día _____

Alcoholismo: No. de años _____

No. de copas por semana _____

GINECO-OBSTETRICOS

Menarca _____ Edad de IVSA _____ Edad de primera gesta _____

Número de: gestas _____ abortos _____ partos _____ cesáreas _____

Menopausia: edad _____ causa _____ 1. natural 2. quirúrgica

Meses de lactancia por niño: 1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____ 6. _____ 7. _____

8. _____

Métodos anticonceptivos: _____ 1. si 2. no.

Mecánicos: Tipo _____ 1. condón 2. diafragma 3. D.I.U.

Tiempo de uso en años _____

A. orales: Nombre comercial _____

Tiempo de uso en años _____

A. inyecc. Nombre comercial _____

Tiempo de uso en años _____

Otros _____

Anticonceptivo de uso actual: tipo _____ tiempo de uso en años _____

MORFOMETRIA

Talla (cm.) _____ Peso (kg) _____

PATOLOGIA CRONICA NO NEOPLASICA.

Tipo ____ 1. Diabetes M. 2. Hipertensión arterial 3. Obesidad
4. Artritis reumatoide 5. cardiopatía Isquémica 6. Infecciones
(especificar) _____ 7. Otras (especificar) _____

PATOLOGIA PREVIA NEOPLASICA, BENIGNA Y MALIGNA.

Sitio _____ Diagnóstico _____

Sitio _____ Diagnóstico _____

Sitio _____ Diagnóstico _____

PATOLOGIA PREVIA MAMARIA

Tipo ____ 1. Fibroadenoma 2. Mastopatía fibroquística 3. mastitis aguda (con ó sin absceso) 4. mastitis crónica 5. adenomas 6. papiloma 7. otros (especificar) _____

Si la paciente tuvo más de 2 patologías, los siguientes datos irán precedidos del número correspondiente al tipo.

Lado de presentación _____ 1. mama derecha 2. m. izquierda

Edad de presentación _____

NEOPLASIA MAMARIA ACTUAL

Tiempo de haberse detectado el tumor _____

Lado ____ 1. m.d. 2. m.l. Cuadrante(s) ____ 1. c.se 2. c.si. 3. cie 4. cil

Diam. Max en cm. ____ Paget ____ 1. si 2. no

Piel ____ 1. ulceración 2. retracción 3. de naranja 4. inflamación

Ganglios positivos: _____

localización _____ 1. axila ipsilateral 2. axila contralateral 3. otros (especificar) _____

diámetro máximo en cm. _____ Número _____

Secreción por pezón _____

cantidad ____ 0= no 1= escasas gotas por presión 2= goteo abundante a la presión 3= chorro a la presión

tipo ____ 1. blanquecino 2. sanguinolento 3. transparente.

Estado de mama contralateral: ____ 1. normal 2. patológica

Si patológica, describir alteraciones _____

Metástasis detectables clínicamente

sitio _____

Etapa clínica: T ____ N ____ M ____

LABORATORIO (de consulta inicial) :

Hb _____	DHL _____	proteínas totales _____
Hto _____	B. dir. _____	globulinas _____
Luecocitos _____	B. total _____	fosfatasa alcalina _____
glob. rojos _____	TGO _____	glucosa _____
	TGP _____	urea _____

LABORATORIO DE PATOLOGIA :

Citología:

No. de estudio _____ diagnóstico _____

No. de estudio _____ diagnóstico _____

Biopsia:

No. de estudio _____ diagnóstico _____

No. de estudio _____ diagnóstico _____

Pieza quirúrgica:

tipo: _____ 1. cuadrantectomía 2. mastectomía simple 3. mastectomía radical modificada 4. Otra (especificar) _____

No. de estudio _____

Tipo celular _____ 1. ductal (canalicular) 2. lobulillar.

Variedad (especificar) _____

Grado de diferenciación _____ 1. buena 2. moderada 3. pobre 4. indiferenciada.

Grado nuclear de Black : _____ 1, 2, 3.

CIRUGIA MAMARIA INICIAL

Fecha _____

Indicación _____ 1. terapéutica 2. Limpieza

TRATAMIENTO NO QUIRURGICO

Preoperatorio ___ 0. no 1. quimioterapia 2. radiación 3. Inmunoterapia

Quimioterapia: droga _____ dosis/m2 ; _____ ciclos

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Radioterapia: sitio _____
 dosis total _____ No. sesiones _____

Inmunoterapia: tipo _____
 dosis _____ sesiones _____

TRATAMIENTO NO QUIRURGICO

Postoperatorio

Tipo ___ 1. Quimioterapia 2. Radioterapia 3. Inmunoterapia

Quimioterapia: droga _____ dosis _____ ciclos _____

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Mes y año : de inicio _____ de terminación _____

Radioterapia: dosis total _____ sesiones _____

mes/año de: inicio _____ terminación _____

Inmunoterapia: Tipo _____ dosis _____

EVOLUCION

Fecha	sitio de actividad neoplásica	edo. clínico
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

OTROS FAMILIARES

Nomb.	Relac. & línea	Edad	sexo	tipo tumor	sitio	edad al dx.	edad al morir

Tipo de tumor:

1. Carcinoma

2. Sarcoma

3. Linfoma

4. Leucemia

5. Neoplasia epitelial benigna (adenoma)

6. Neoplasia mesenquimatosa benigna.

Sitio de tumor: en caso de 1, 2, 5 y 6, especificar el órgano afectado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

