

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



RASTREO DE MUTACIONES PARA LA DETECCIÓN DEL
CÁNCER DE OVARIO

POR

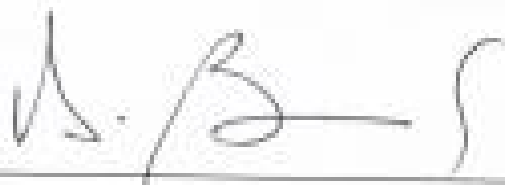
QFB JESÚS ROLANDO DELGADO BALDERAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

JULIO 2015

RASTREO DE MUTACIONES PARA LA DETECCIÓN DEL CÁNCER DE OVARIO.

Aprobación de Tesis:



Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña

Director de Tesis



Dr. C. María de Lourdes Garza Rodríguez

Co - Directora de Tesis

Dr. C. Lezmes Dionisio Valpéz Chapa

Miembro de Tesis

Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado

Subdirector de Estudios de Posgrado

Lugar de realización del presente trabajo y colaboraciones concretadas

El estudio aquí mostrado fue realizado en la Unidad de Biotecnología Médica perteneciente al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como también en el Laboratory of Cancer and Inflammation Program perteneciente al National Cancer Institute en la ciudad de Frederick, Maryland en Estados Unidos de América.

Este trabajo concretó la colaboración con el equipo de investigación del PhD. Michael Dean en el laboratorio mencionado previamente. Colaboraron muy activamente los Departamentos de Patología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” mediante la participación de la Dra. Gabriela Sofía Gómez Macías; Hospital San José Tec de Monterrey mediante el Dr. Álvaro Barboza Quintana y el Hospital Clínica Oca con la colaboración de la Dra. Ivett Miranda. Además, participó el Dr. Mauro Antonio Macedo de la Consulta de Ginecología del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y el Dr. Hugo Vázquez García del Hospital Regional de Alta Especialidad Materno Infantil.

DEDICATORIA

A mis padres, Rolando y Leticia, quienes han hecho un esfuerzo grande a lo largo del tiempo para dejarme hacer lo que quiero y apoyarme.

A mi hermano Alexis, quien espero sea de los mejores LBG a futuro, para ser buenos colegas.

A la memoria de mi abuelo David, quien fue un hombre sabio y cuyos recuerdos y enseñanzas perduraran por siempre en mi mente. También a la memoria del Dr. Benito David Mata Cárdenas, quien hace algunos años confió en mí y me ayudó a empezar a comprender y trabajar en la genética, de él tendré siempre presente sus consejos y buenos momentos.

A los pacientes con cáncer, qué son verdaderos héroes al enfrentar diariamente a uno de los enemigos más terribles de la salud humana.

“La vida es un aprendizaje continuo y está llena de caminos muertos y de pisotones, pero las viejas causas que nos empujaron están presentes en el mundo en el que nos toca vivir...” José Mújica, Presidente de la República Oriental del Uruguay

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por permitirme terminar esta etapa, ayudarme y cuidarme en todos los momentos que pase por aquí.

A mi familia, por tenerme paciencia y comprender mis inquietudes, apoyarme y tener siempre aliento en los momentos difíciles que pasaron a lo largo de este tiempo.

Al Dr. Hugo Barrera, por permitirme aprender de él, por mostrarme que la ciencia no sólo está remitida al laboratorio, sino a un conjunto de entornos que deben funcionar a manera de engranaje para que las cosas fluyan lo mejor posible.

A la Dra. Lourdes Garza, por dejarme trabajar en su laboratorio, por todos y cada uno de los consejos dados, por su amistad, confianza y ayuda que en su momento pudo ofrecerme para salir adelante.

Al Dr. Lezmes Váldez, por siempre ser atinado en los consejos que me dio y por adentrarme al mundo de la ginecología y atender siempre las necesidades surgidas durante el proyecto.

A las Dras. Herminia Martínez y Gloria González, por siempre tener las puertas abiertas para atenderme y brindarme su apoyo y consejos durante este proyecto.

Al Dr. Hugo Vázquez, quien se convirtió en parte fundamental de éste trabajo y quien desinteresadamente me ofreció su ayuda y amistad para la realización del mismo.

A la Dra. Gabriela Gómez, por toda la ayuda y colaboración para la realización de éste proyecto y por ser amable y brindarme su ayuda siempre que se lo pedí.

Al Dr. Álvaro Barbosa del Hospital San José Tec de Monterrey y la Dra. Ivett Miranda del Hospital Clínica Oca por su invaluable ayuda para este proyecto, ya que fueron pieza fundamental en la recta final del mismo.

Al PhD Michael Dean, quien muy amablemente contribuyó con el apoyo en los experimentos de secuenciación en el Laboratory of Cancer and Inflammation Program del National Cancer Institute, en los Estados Unidos.

Al Dr. Héctor Menchaca Solís que ha confiado siempre en mí y quien me ha brindado siempre su apoyo y sabios consejos, además de que es un gran ejemplo para mí por ser un hombre visionario, sabio y bondadoso.

A mis grandes amigos Victoria, Patricia, Zyanya, Laura, Enrique y Adriana por sus consejos, apoyo e interminables momentos que compartí con ustedes a lo largo de este tiempo.

Al Dr. Benito Mata, quien desde que decidí elegir este programa de posgrado, me brindo consejos y me ayudó en distintas ocasiones.

A mis compañeros y ahora amigos de la UBM Mariel, Daniela, Mauricio, Diana, Guillermo e Iram, quienes siempre estuvieron a la disposición de brindarme un consejo y ayuda a lo largo de este tiempo, tanto para aspectos experimentales como personales. Un placer trabajar y aprender de ustedes y compartir tantos momentos.

A Ariana, Nancy, Belinda y Víctor, quiénes recientemente se integraron de manera entusiasta al proyecto y están comprometidos con la realización del mismo.

Al Dr. Mauro Antonio Macedo por su colaboración en la consulta de Ginecología.

Al personal de trabajo del laboratorio de Vitágenesis S. A. de C. V. quienes contribuyeron en este trabajo.

A todo el personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular: las secretarias, Juany Hinojos y Ariadna López quienes constantemente estuvieron atentas a los pendientes del posgrado y fueron de gran ayuda en este camino.

A Normita, por su paciencia, consejos y ayuda a lo largo de este tiempo y que siempre nos tiene localizados y bien coordinados para que los pendientes fluyan correctamente.

Al Sr. Eduardo “Don Lalo”, a quien considero un buen amigo y que me ofreció su ayuda y consejos en esta etapa.

A todos los chicos de Servicio Social de la UBM con quienes trabajé y me ayudaron cuando así lo necesité.

Al CONACYT por la beca de maestría y apoyos otorgados durante este proyecto.

Durante este tiempo terminé por comprender que la vida y el tiempo son tan relativas que por lo tanto deben disfrutarse tanto como sea posible pues desconocemos que tanto se puedas hacer mañana. A todos infinitas gracias.

*You can't always get what you want, but if you try sometime
You just might find you get what you need!*

-Mick Jagger y Keith Richards.

Índice de contenido

Capítulo 1. Introducción.....	1
1. 1 Impacto de los cánceres ginecológicos.....	1
1. 2 Clasificación de los cánceres de endometrio y ovario.....	2
1.3 Métodos de diagnóstico.....	2
1.3.1 Valor diagnóstico del antígeno CA – 125.....	4
1.3.2 Rol del ultrasonido transvaginal en la detección de CO y CE.....	5
1.3.3 La necesidad del diagnóstico temprano.....	5
1.4 Nuevas tecnologías genómicas como plataforma para el estudio del cáncer.....	6
1.5. Antecedentes.....	8
1.5.1 CO y Papanicolaou.....	9
1.5.2 Genómica de los cánceres de endometrio y ovario.....	11
1.5.2.1. Análisis genómico del CO epitelial.....	12
1.5.2.2. Análisis genómico del CE.....	13
1.5.3. Fusión de la técnica clásica de Papanicolaou con las secuenciación de nueva generación.....	14
1.6. Importancia de los genes <i>BRCA1</i> <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> en el desarrollo del cáncer de ovario.....	17
1.6.1 Descripción molecular de los genes <i>BRCA1/2</i>	18
1.6.2 Función de los genes <i>BRCA1/2</i> en la recombinación homóloga.....	18
1.7 Nuevos tratamientos contra el CE.....	21
1.8 Búsqueda de otros biomarcadores en muestras menos invasivas: ADN tumoral circulante.....	22
Capítulo 2. Justificación.....	23
Capítulo 3. Objetivos general y específicos.....	24
Capítulo 4. Materiales y métodos.....	25
4.1 Grupo de pacientes.....	25
4.2 Extracción de ADN.....	25
4.2.1 Extracción de ADN de sangre.....	26
4.2.2 Extracción de ADN y ARN del tumor embebido en parafina.....	27
4.3 Cuantificación y determinación de la calidad del ADN.....	28
4.3.1 Prueba de calidad: amplificación del gen β – globina.....	29
4.4 Detección de mutaciones.....	29
Capítulo 5. Resultados.....	31
5.1 Sujetos de estudio.....	31
5.1.2 Clasificación histológica y edad de las muestras obtenidas a partir de los FFPE de los CO y CE.....	32
5.1.3 Características clínicas de las pacientes reclutadas para la segunda parte del proyecto.....	35
5.2 DNAs aportados al Biobanco.....	37
5.2.2 Prueba de calidad: amplificación del gen β – globina.....	43
5.3 Detección de mutaciones por medio de NGS.....	43
Capítulo 6. Discusión.....	47
Capítulo 7. Conclusión.....	52
Referencias.....	53

Índice de figuras

Objeto	Nombre	Página
Figura 1	Biomoléculas celulares blanco de las ciencias ómicas.	6
Figura 2	Genes asociados a los cánceres de ovario y endometrio.	8
Figura 3	Utilidad del Papanicolaou para detectar CO y CE.	10
Figura 4	Proceso que sigue la NGS de la plataforma Illumina.	16
Figura 5	Reparación del ADN vía recombinación homóloga.	19
Figura 6	Cualificación del ADN.	42
Figura 7	Prueba de calidad.	43

Índice de cuadros

Objeto	Nombre	Página
Cuadro 1	Clasificación y distribución de cánceres de endometrio y ovario en EUA.	3
Cuadro 2	Clasificación histológica y edades de las 50 muestras provenientes de FFPE de pacientes con CO.	32
Cuadro 3	Clasificación histológica y edades de las 60 muestras provenientes de FFPE de pacientes con CE	34
Cuadro 4	Datos clínicos relevantes de los pacientes reclutadas para la segunda fase del proyecto.	36
Cuadro 5	Cuantificación del ADN de tejido FFPE de las muestras de pacientes con CO.	37
Cuadro 6	Cuantificación del ADN de tejido FFPE de las muestras de pacientes con CE.	39
Cuadro 7	Cuantificación del ADN de las muestras de pacientes con CO.	41
Cuadro 8	Cuantificación del ADN de las muestras de pacientes con CE.	41
Cuadro 9	Variantes patogénicas identificadas en los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .	44
Cuadro 10	Variantes encontradas dentro de los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> en las muestras analizadas.	45

Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
µg	Microgramos
Ng	Nanogramos
Mg	Miligramos
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
<i>BRCA</i>	<i>Breast Cancer Gene</i>
CE	Cáncer de endometrio
CO	Cáncer de ovario
CaCU	Cáncer cervicouterino
CM	Cáncer de mama
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social

Rastreo de mutaciones para la detección del cáncer de ovario

Resumen

Introducción. La Secretaría de Salud enfoca sus campañas de prevención y diagnóstico oportuno de cánceres ginecológicos a los tumores de mama y cervicouterino, dejando un poco en el olvido a los de endometrio y ovario. Estos dos últimos comienzan a reclamar atención debido a la falta de métodos certeros de diagnóstico. Es por ello que el presente trabajo pretende sentar las bases para el desarrollo de una futura prueba de diagnóstico molecular utilizando el Papanicolaou en base líquida; este ambicioso enfoque toma como punto de partida la descripción de las variantes genéticas presentes en población mexicana, pues a la fecha no existe un estudio que muestre este conocimiento genético. Los genes *BRCA1/2* son genes cuyas mutaciones emblemáticas están presentes en el desarrollo del cáncer de ovario y que se toma como un punto de partida para los siguientes análisis de secuenciación de nueva generación.

Materiales y Métodos. Al ser un primer aporte de esta nueva línea de investigación, el proyecto contempló la recolección de tumores en muestras de tejido embebido en parafina, tanto provenientes del ovario como del endometrio. Además, inició con el reclutamiento de pacientes con alguna de éstas dos neoplasias a las cuales se les solicitó una muestra de sangre, Papanicolaou en base líquida y biopsia de tejido tumoral. A todas las muestras se les realizó la extracción de su ADN para su ingreso al Biobanco Piloto Institucional y posteriormente se realizaron estudios de secuenciación de nueva generación utilizando la plataforma Illumina y teniendo como blanco de estudio a los genes *BRCA1/2*. Únicamente se secuenció el ADN proveniente de los tumores de ovario.

Resultados. Se aportaron 50 muestras de tumores de ovario y 60 muestras de tumores de endometrio, así como cinco pacientes con cáncer de ovario y seis con cáncer de endometrio de los que, además del tumor, se obtuvo una muestra de su sangre y una más de Papanicolaou en base líquida. El análisis bioinformático de la secuenciación arrojó la presencia de 174 variantes distribuidas en 48 de las 50 muestras analizadas; 70 variantes habían sido reportadas previamente y el resto fue reportado por vez primera. Destacaron ocho variantes patogénicas (rs80356862, rs80358027, rs80358981, rs80357219 y rs80357260 en *BRCA1*, y rs80358557 y rs80359775 en *BRCA2*) y una muestra portadora de 70 variantes (tres de ellas patogénicas) las cuales comprometen la función de las proteínas producidas.

Conclusión: El presente trabajo aportó una colección debidamente resguardada de tumores de ovario y otra de endometrio. En la colección de aquellos tumores de ovario se logró describir las variantes polimórficas presentes en los genes *BRCA1/2*, siendo el primer estudio de este tipo en la República Mexicana. El conocimiento aquí generado coloca las bases para la búsqueda de aquellas averías genéticas emblemáticas de estos tumores, en pro del futuro desarrollo de una prueba de diagnóstico molecular para su detección oportuna.

Rastreo de mutaciones para la detección del cáncer de ovario

Capítulo 1

1. Introducción.

1. 1 Impacto de los cánceres ginecológicos.

Los cánceres ginecológicos se encuentran entre las principales causas de muerte de las mujeres. De acuerdo a las estadísticas presentadas por el GLOBOCAN (1), los más frecuentes (en orden de incidencia) son el de mama (CM), seguido por el cérvico-uterino (CaCU), luego por el del endometrio (CE) y finalmente, por el de ovario (CO).

La distribución mundial en 2012 de la incidencia de estos tumores fue la siguiente: CM con 1,676,633 casos y mortalidad de 521,817; CaCU sumó 527,624 casos y ocasionó 265,653 defunciones; CE se presentó en 319,605 pacientes y resultó en 76,155 defunciones; CO fue diagnosticado en 238,719 mujeres y exhibió una mortalidad de 151,905 pacientes. La situación en México de estas neoplasias ginecológicas en ese año fue la siguiente: CM 20,444 casos y 5,680 decesos; CaCU, 13,960 casos y 4,769 defunciones; CO, 3,277 casos y una mortalidad de 2,105 mujeres; y CE, 2,733 casos y 550 bajas (2).

En nuestro Estado de Nuevo León, la Secretaría de Salud Estatal ha venido haciendo grandes esfuerzos por llevar a la población campañas para la prevención y el diagnóstico oportuno del CM y CaCU; sin embargo, tras importantes logros abatiendo la incidencia del segundo y reforzando campañas con equipamiento

(como el mamógrafo) para el primero, los de endometrio y ovario están reclamando ahora la atención por carecer en cada caso de un método efectivo de detección oportuna y resultar, por ende, en alta mortalidad

1. 2 Clasificación de los cánceres de endometrio y ovario.

El CE se divide en el tipo I (endometriode) y II (seroso y células claras). El cuadro 1 resume la clasificación y distribución de los cánceres mencionados previamente, en los Estados Unidos de América para el año 2012 (3).

Por otro lado, el CO puede ser clasificado en tres grandes grupos: germinal, estromal y epitelial, siendo este último el que tiene mayor frecuencia en las mujeres. El CO epitelial tiene una compleja clasificación en dos diferentes tipos (I o de bajo grado y II o de alto grado) de los cuales se desprenden varios subtipos histológicos que son: mucinoso, endometriode, células claras y tumor maligno de Brenner para los del tipo I; carcinoma seroso de alto grado, carcinoma no diferenciado y carcinosarcomas para los del tipo II (4, 5)

1.3 Métodos de diagnóstico.

El método diagnóstico ideal es aquel cuya sensibilidad y especificidad son tales que permite la prevención y detección oportuna de cualquier enfermedad.

La práctica médica señala algunos métodos para la detección de los CO y CE. La detección del primero se sugiere hacer mediante pruebas de ultrasonido transvaginal (USTV) y análisis del antígeno CA – 125, dejando a la biopsia como prueba confirmatoria (6, 7).

Cuadro 1. Clasificación y distribución de cánceres de endometrio y ovario en EUA.

Cáncer	Tipo	Subtipo	Distribución
Endometrio	Endometrioide	Endometrioide	85%
		Papilar seroso	10%
		Células claras	5%
Ovario	Epitelial	Alto grado seroso	60%
		Endometrioide	15%
		Células claras	10%
		Bajo grado seroso	8%
		Mucinoso	2%
		Células transicionales	2%
		Otro	3%

Desafortunadamente, estas pruebas logran detectar el tumor cuando ya está en estadios avanzados, comprometiendo gravemente la salud de las pacientes (7).

En el caso del CE, también es recomendado realizar las pruebas de USTV, CA – 125 (indicada sólo en los Estados Unidos) y tomografía computarizada; sin embargo y a diferencia de la biopsia, estas pruebas tampoco son específicas y por lo general sólo logran la detección del tumor en etapas avanzadas (3).

1.3.1 Valor diagnóstico del antígeno CA – 125.

El antígeno CA – 125 es una glicoproteína de alto peso molecular que es codificada por el gen *MUC16* y es señalado como biomarcador para el diagnóstico de las tumoraciones malignas del endometrio y ovario (8, 9).

Atractivo por la practicidad y rapidez de la prueba (ELISA), el antígeno CA – 125 podría representar una prueba diagnóstica eficaz; sin embargo, este antígeno es un marcador epitelial que aparece alterado en otras condiciones, tanto patológicas (tumores de pulmón, hígado, páncreas y colón), como benignas (endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica y embarazo) de la mujer (10, 11).

La prueba del CA - 125 arroja resultados elevados en aproximadamente el 80% de las pacientes con los CO en estadios avanzados; sin embargo, en etapas tempranas refleja un valor positivo en un 50% a un 60% de las pacientes (7).

Aunque la práctica médica en EUA sugiere el apoyo en esta prueba para el diagnóstico del CE, su uso resulta igual de cuestionable que en el caso del CO, pues un estudio retrospectivo realizado por la Universidad de Chicago señala que únicamente en el 10% de 254 pacientes con esta enfermedad hubo resultados alterados de este antígeno (12).

1.3.2 Rol del ultrasonido transvaginal en la detección de los cánceres de endometrio y ovario.

El USTV es una prueba de imagen que permite la observación detallada de los ovarios y del cuerpo del útero, lo cual auxilia en el hallazgo de quistes ováricos y proyecciones papilares. Debido a la complejidad del tejido ovárico, se ha visto que la prueba genera para el caso del CO resultados falsos positivos de consideración (7, 13). Por otro lado, se han estimado los valores de sensibilidad y especificidad en un 96% y 61%, respectivamente, para la detección del CE mediante esta prueba (14).

1.3.3 La necesidad del diagnóstico temprano.

De lo anterior se desprende que una razón por la cual los casos de CO y CE son diagnosticados en estadios avanzados, es debido a la falta de pruebas diagnósticas sensibles y específicas. Además, la ausencia de síntomas característicos de ambas neoplasias, es otra de las razones por las que se diagnostican en etapas avanzadas, cuando los sangrados postmenopáusicos son la única evidencia de una tumoración del endometrio (15).

1.4 Nuevas tecnologías genómicas como plataforma para el estudio del cáncer.

La ola de información y avances tecnológicos generada por el Proyecto del Genoma Humano (PGH), trajo consigo un cúmulo de esperanzas y expectativas sobre el descubrimiento de las bases genéticas de las principales enfermedades

que aún causan grandes impactos en la salud (16). Esta información ha de potenciar el desarrollo de nuevos y mejores tratamientos.

El avance en el desarrollo de un conjunto de disciplinas derivadas del PGH y conocidas como “ómicas”, ha venido a permitir el análisis masivo y en paralelo de patrones de cambios cuali y cuantitativos de biomoléculas informativas de una condición o estadio celular en particular, a lo que se le refiere como biomarcadores (17). Entre estas biomoléculas figuran alteraciones en estructura o cantidades del ADN (análisis genómicos), el ARN (análisis transcriptómicos), proteínas (análisis proteómicos) y metabolitos (análisis metabolómicos) (figura 1).

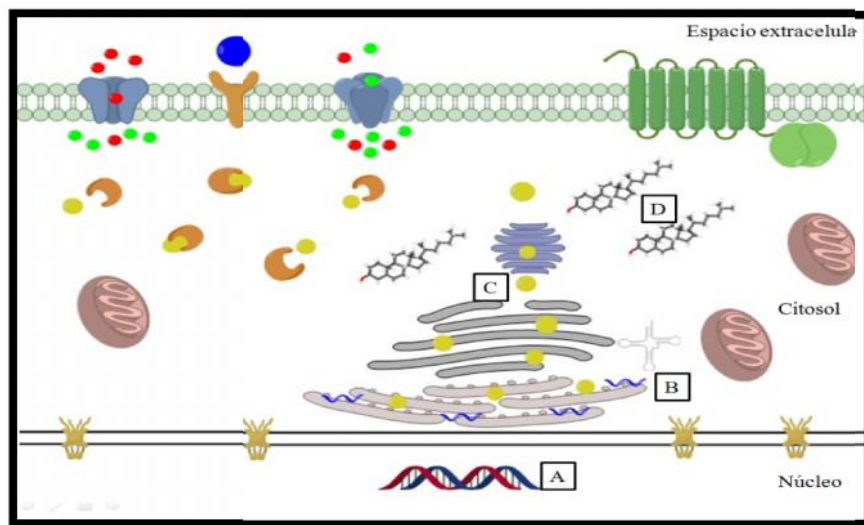


Figura 1. Biomoléculas celulares blanco de las ciencias ómicas. A: ADN nuclear en el caso de la genómica. B: ARN mensajeros en el de la transcriptómica. C: Proteínas en el de la proteómica. D: Metabolitos en el de la metabolómica.

Observando la evolución de los métodos de secuenciación del ADN, se puede constatar la enorme cantidad de información arrojada al aplicarlos al estudio de los

perfiles de alteraciones genómicas que caracterizan a los distintos tipos de tumores, a lo que se le ha llamado como “paisaje” genómico.

A continuación se presentan algunos de los resultados más relevantes sobre los genes y mutaciones más frecuentemente encontradas en los estudios genómicos de los cánceres ginecológicos.

- CM: mutaciones en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *MLL3* y *TP53* (18).
- CaCU: mutaciones en los genes *TP53*, *PIK3CA*, *PTEN*, *FBXW7* y *EP300* (19).
- CO: mutaciones en los genes *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA* y *PTEN* (20).
- CE: mutaciones en los genes *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PIK3CA* y *PTEN* (21).

La figura 2 relaciona los genes cuyas mutaciones han sido involucradas en ambos tumores, de endometrio y ovario, así como cuáles de ellos tienen su rol de manera particular en cada uno de ellos. El que existan genes alterados en común para estos tipos tumorales, representa de inicio una enorme ventaja para el planteamiento del desarrollo de pruebas diagnósticas eficaces y oportunas para su prevención conjunta.

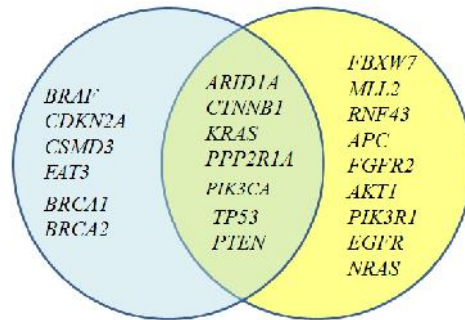


Figura 2. Genes asociados a los cánceres de ovario (blanco) y endometrio (negro). Una media docena de genes son compartidos por ambos tipos tumorales.

1.5. Antecedentes.

Uno de los máximos retos para el combate de los CO y CE, e incluso del CaCU es, sin duda, concebir una prueba diagnóstica basada en el análisis genético del ADN obtenido de las células colectables a través del cuello del útero mediante una toma de Papanicolaou, para sumar estos temibles tumores a la batalla que así se libra cada día mejor contra el CaCU.

Es universalmente reconocida la utilidad de la citología de Papanicolaou para el diagnóstico del CaCU, el cual puede alcanzar una sensibilidad de entre el 30% y el 97% y una especificidad mayor al 86% (22).

La concepción de esta prueba está en virtud de conjuntar la herramienta clásica de diagnóstico (Papanicolaou) y las nuevas técnicas de secuenciación del ADN, así como el conocimiento que de los “paisajes” genómicos de estas neoplasias se tiene ahora.

1.5.1 CO y Papanicolaou.

Georgios Papanicolaou publicó en 1943 su artículo titulado “*Cancer of the uterus: the vaginal smear in the diagnosis*”, en el que menciona que mediante la citología pueden ser observadas distintas células del canal uterino, e incluso, aquellas que presenten cambios morfológicos que están posiblemente asociados a una patología. Sus estudios proponen que la prueba es de alto valor para la detección temprana del carcinoma de cérvix y del canal uterino (23).

La pregunta que se antoja plantear es: ¿podría la prueba de Papanicolaou ser útil en la detección de los casos de CO?

Basado en la propiedad de la pérdida de adhesión de las células tumorales, en principio cualquier célula de algún tumor del aparato reproductor femenino pudiera desprenderse de los tejidos donde estuviera esté desarrollándose y migrar a través del canal uterino hasta alojarse a nivel del cérvix. Por lo que encontrar células tumorales del ovario, la trompa de Falopio o el endometrio en un cepillado vaginal, resulta aunque poco probable, posible, como lo refieren Kinde y colaboradores (ver la figura 3). Trabajos posteriores al descrito por Papanicolaou, vinieron a demostrar el hallazgo de células tumorales del ovario en cepillados vaginales. Tal es el caso de Frech quien en 1948 describió la presencia de células cancerosas de ovario en diferentes citologías vaginales (24).

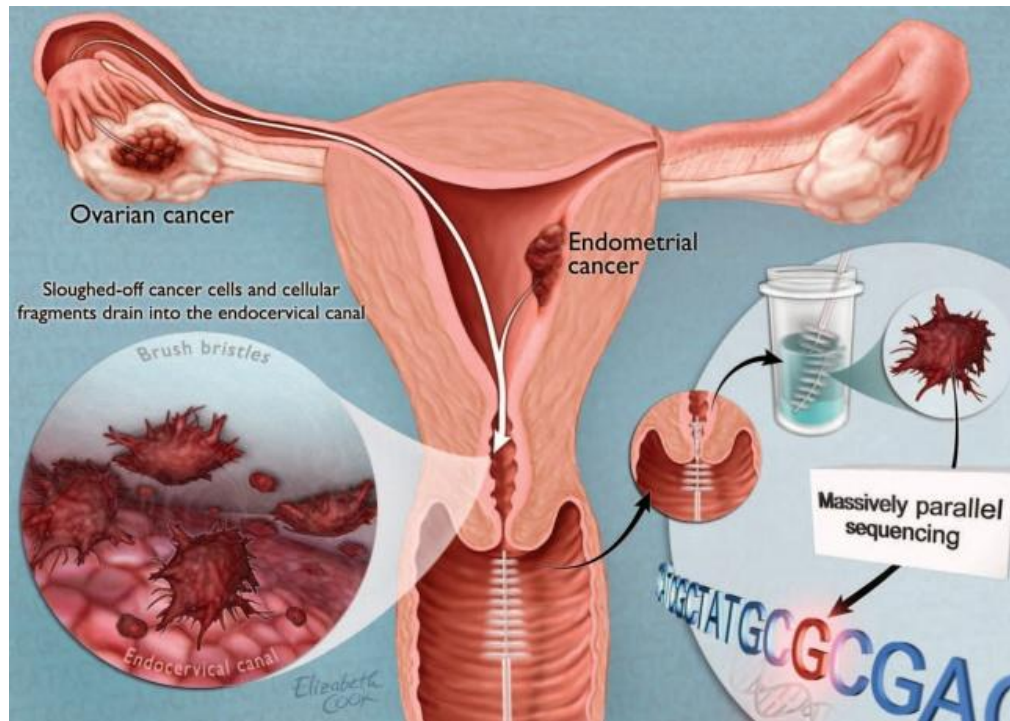


Figura 3. Utilidad del Papanicolaou para detectar CO y CE. Representación de como las células tumorales se desprenden del epitelio al cual se encuentran adheridas y migran a través del canal uterino para depositarse en el cérvix (3).

Años más tarde, en 1969, Graham y colaboradores sugirieron que hasta en un 40% de las pacientes que padecen CO, sus células podían ser encontradas en citologías de Papanicolaou (25). Posteriormente, en 1988, Takashima y colaboradores hicieron pruebas de Papanicolaou a 114 pacientes diagnosticadas con esta neoplasia y encontraron que 22 de 114 casos resultaron positivos; además, realizaron 31 aspirados endometriales, dando resultados positivos en 13 casos de CO (41.9%) (26).

Más recientemente (2001), Huijssoon y colaboradores (27) reportaron el caso de una paciente de 55 años cuya citología de Papanicolaou arrojó la

observación de células malignas consistentes con metástasis de un adenocarcinoma papilar de ovario. El análisis patológico de la biopsia demostró efectivamente la presencia de adenocarcinoma papilar en el ovario izquierdo de la paciente.

Se ha estimado que hay hasta un 62% de probabilidad de que una paciente con CO presente una citología de Papanicolaou anormal. De hecho, es aceptado que la aparición de células malignas, de cuerpos de psammoma o de células glandulares atípicas, son evidencias indicativas de la presencia de una malignidad ginecológica (28).

En 2012, se reportó el hallazgo en una citología de Papanicolaou de células glandulares atípicas formando estructuras papilares, cuyo origen no fue cervical, siendo estos resultados consistentes con el diagnóstico de CO *borderline* seroso (29).

1.5.2 Genómica de los cánceres de ovario y endometrio.

La puesta en marcha de *The Cancer Genome Atlas Research* (TCGA) con una fuerte inversión económica (\$100 millones de dólares), además del uso de tecnología de punta, por parte del Departamento de Salud de Estados Unidos, mediante el *National Cancer Institute* y el *National Human Genome Research Institute*, ha permitido generar una gigantesca cantidad de información del estado que guardan las células provenientes de diferentes tumores, a nivel del genoma, epigenoma, transcriptoma y proteoma (30).

Algunos de los subtipos de los CO y CE, han sido estudiados extensamente gracias a este proyecto, por lo que en conjunto con trabajos previos, ha ido construyéndose una fuerte base de conocimientos que permitirá ser el punto de partida para la búsqueda de nuevas herramientas diagnósticas y estrategias terapéuticas.

1.5.2.1. Análisis genómico del CO epitelial.

Como anteriormente se mencionó arriba, el subtipo más agresivo y común de CO es el de alto grado. Es por esto que se realizó un trabajo muy completo en este tumor en particular por parte del TCGA. Por un lado, a nivel genómico se ha develado que este subtipo tumoral presenta la mayor frecuencia de mutaciones somáticas en tres genes: *TP53* (96%), *BRCA1* y *BRCA2* (ambos con 3%) (20).

Los resultados de expresión a nivel transcriptómico, permitieron al TCGA clasificar el CO epitelial en cuatro diferentes grupos, como se muestra a continuación:

- **Inmunorreactivo:** Sobreexpresión de los genes *CXCL10*, *CXCL11* y *CXCR3*.
- **Proliferativo:** Sobreexpresión de los genes *HMGA2*, *SOX11*, *MCA DE MAMA2* y *PCNA*, así como subexpresión de los genes *MUC1* y *MUC16*.
- **Diferenciado:** Sobreexpresión de los genes *MUC1*, *MUC16* y *SLP1*.
- **Mesenquimal:** Sobreexpresión de los genes *HOX*, *FAP* y *ANGPTL2*.

Basados en algoritmos complejos, los científicos ejecutores de este proyecto predijeron cuáles vías de señalización se encuentran afectadas, revelando que la

vía de RB estaba alterada en un 67% de los casos, la vía PI3K/RAS en un 45%, la vía BRCA en un 33% y la vía NOTCH en un 22%. Los efectos de las alteraciones de estas vías de señalización se traducen en la progresión del ciclo celular y consecuente proliferación, supervivencia y la capacidad de la célula para reparar daños al ADN vía recombinación homóloga (20).

Uno de los resultados más sobresalientes de las alteraciones señaladas es, sin duda, la incapacidad de reparación del ADN vía recombinación homóloga; esto como resultado de averías genéticas y procesos epigenéticos silenciadores de la expresión génica que recaen en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (31, 32).

5.2.2. Análisis genómico del CE.

El TCGA ya ha enfocado su atención hacia el CE subtipo endometriode. Los resultados de sus estudios son sumamente interesantes, ya que después de realizar el análisis genómico y de analizar los datos bajo el uso de algoritmos, pudieron clasificar a este subtipo tumoral del endometrio en dos grupos:

- **Ultramutado:** Frecuentemente mutados los genes *POLE*, *PIK3CA*, *PIK3R1* y *PTEN*.
- **Hipermutado:** Tumores con alta inestabilidad microsatelital y mutaciones no sinónimas en el gen *KRAS*.

Algunos otros genes recurrentemente mutados en CE fueron *TP53*, *ARID1A*, *CTCF*, *FBXW7*, *PPP2R1A* y *RPL22*.

Ahora bien, el TCGA pudo clasificar al CE en tres grandes grupos:

- **Grupo I o mitótico:** La mayoría de los tumores fueron del subtipo seroso con mutaciones en el gen *TP53*.
- **Grupo II u hormonal:** Tumores del subtipo endometriode con una sobreexpresión de los genes *ESR1* y *PGR*, además de mutaciones en *PTEN*.
- **Grupo III o inmunorreactivo:** Al igual que el grupo hormonal, fueron tumores pertenecientes al subtipo endometriode, con una alta expresión de genes relacionados al sistema inmune (*CD14*, *CD74*, *TNFRSF1B* y *CEBPD*).

La predicción de vías de señalización afectadas mostró que la vía RTK/RAS/ β -catenina y la vía PI3K, se encuentran alteradas debido a mutaciones que tienen efectos tanto activadores como inactivadores de genes como *FGFR2*, *ERBB2*, *KRAS*, *CTNNB1*, *PIK3CA*, *PTEN* y *PIK3R1*. Finalmente, estos efectos impactan la proliferación y supervivencia celular (21).

1.5.3. Fusión de la técnica clásica de Papanicolaou con las secuenciación de nueva generación.

Tuvieron que transcurrir 70 años desde que el Dr. G. Papanicolaou publicó que es posible encontrar en una citología cervical células diferentes a las del cuello del útero con anormalidades morfológicas, para ver un primer esfuerzo por buscar una prueba de diagnóstico molecular para los CO y CE, partiendo de las células colectadas en un Papanicolaou de base líquida (23).

La apuesta realizada por Kinde y colaboradores (3) en la Escuela de Medicina Universidad Johns Hopkins, parte de que las células tumorales de los CO y CE se desprenden de sus tejidos de origen. Una vez ocurrido ello, migran a través de todo el canal uterino y se alojan en el cuello del útero, siendo entonces “fáciles” de recolectar mediante un simple cepillado cervical y depósito de esta muestra en una base líquida para su transporte y preservación (tal y como se describió en la figura 3).

A las células colectadas por el cepillado cervical se les extrae el ADN y es aquí donde entra en juego todo el poderío tecnológico que posee la secuenciación de nueva generación o NGS (del inglés, *Next Generation Sequencing*). El ADN es sometido a rondas de PCR para asignarle “etiquetas” para las diferentes regiones génicas a analizar. Posteriormente, estos productos amplificados son depositados en una “*flow cell*”, que es donde se llevarán a cabo rondas de PCR para que los blancos se amplifiquen y formen clusters. Terminado este proceso, se inicia la secuenciación, en donde se agregan nucleótidos marcados fluorescentemente que son detectados por un sistema de imagen para conocer las diferentes secuencias del analito en cuestión (33, 34). Este proceso aparece en la figura 4.

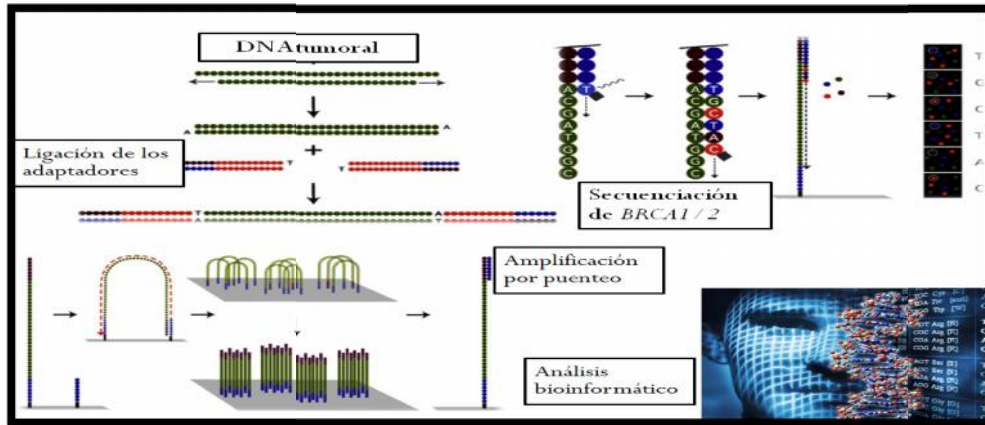


Figura 4. Proceso que sigue la NGS de la plataforma Illumina. Inicia con la obtención del DNA tumoral al que le es ligado “etiquetas o adaptadores” que son llevados a rondas de PCR por puenteo en la que a cada nucleótido se le asigna un color que posteriormente es detectado por un sistema de imagen para el análisis bioinformático (3)

El afamado grupo de investigación de la referida Universidad de Johns Hopkins, liderado por los doctores Bert Vogelstein y Luis Diaz, examinó 24 muestras de CE (tejido tumoral y Papanicolaou) y 22 de CO (tejido tumoral y Papanicolaou), obteniendo resultados muy alentadores. En el 100% de las muestras correspondientes a pacientes con diagnóstico del primero (CE) fue posible encontrar al menos una mutación en el ADN obtenido de las muestras de Papanicolaou; mientras que en el 41% de las muestras donadas por pacientes afectados por el segundo (CO), les fue posible encontrar al menos una mutación en el Papanicolaou. Los genes sobre los que proponen hacer el rastreo de mutaciones son *APC*, *AKT1*, *BRAF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *FBXW7*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PPP2R1A*, *PTEN* y *TP53* (3).

Estos resultados son prometedores, ya que los métodos de secuenciación de nueva generación siguen evolucionando y volviéndose más accesibles día con día, por lo que la sensibilidad para la detección de alguna mutación proveniente de una célula tumoral aumenta, aunado a que podría mejorarse la técnica de recolección de las células cervicales como bien podría ser la utilización de una “pipeta” o cánula que se introdujera en el canal uterino y tomar una muestra en una región superior del endometrio, en donde teóricamente las posibilidades de captar alguna célula tumoral del ovario aumentarían.

1.6. Importancia de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en el desarrollo del CO.

Es bien conocido el enlace que existe entre una mujer portadora de mutaciones en línea germinal en los genes *BRCA1/2*, con el padecimiento de CM. También se ha descrito el que las mutaciones en línea germinal en estos elevan el riesgo de una mujer de padecer CO. Este conocimiento se ha venido develando desde la década de 1990, cuando se identificaron a los genes *BRCA1/2* como agentes causales del CM hereditario (35, 36).

Se ha estimado que las mujeres portadoras de mutaciones en el gen *BRCA1* tienen probabilidades de riesgo del 71% y de entre el 47 y el 63% para los CM y CO, respectivamente; por otro lado, las probabilidades de riesgo para aquellas mujeres con mutaciones en *BRCA2* son de 84% y 27% para CM y CO, respectivamente (37).

1.6.1. Descripción molecular de los genes *BRCA1/2*.

Tan sólo la secuencia codificante del gen *BRCA1* ronda los 5,592 nucleótidos que están distribuidos a lo largo de 24 exones (siendo el exón 11 el de mayor tamaño) extendidos en aproximadamente 100 kpb de ADN genómico y cuya traducción a aminoácidos da como resultado una proteína de gran tamaño consistiendo de 1,863 residuos aminoacídicos. Por su parte, el gen *BRCA2* posee una secuencia codificante que supera los 10,257 nucleótidos distribuidos en 28 exones que abarcan alrededor de 70 kpb y cuya proteína codificada consta de 3,418 aminoácidos (38).

1.6.2. Función de los genes *BRCA1/2* en la recombinación homóloga.

BRCA1/2 pertenecen al grupo de genes denominados como supresores de tumores, mediante el mantenimiento de la integridad genómica. Estos genes contribuyen a la reparación de las roturas de doble cadena del ADN mediante la vía de la recombinación homóloga.

¿Cómo actúa normalmente la reparación del ADN vía recombinación homóloga? Los genes *ATM* y *ATR* funcionan como sensores de daño del ADN. Al encenderse, activan al gen *BRCA1* y también a los genes supresores de tumores del complejo de Anemia Fanconi (*FA*). *BRCA1* tiene efectos activadores sobre *BRCA2* y éste inicia la reparación del ADN mediante dicha vía. El problema principal de esta vía se origina porque *BRCA1* puede inactivarse, tanto por mutaciones como por hipermetilación de su región promotora y con ello perder la

función activadora que ejerce sobre *BRCA2*, tal y como se ilustra en la figura 5 (20).

Ahora bien, el que una paciente tenga mutaciones en *BRCA1* enciende una luz de esperanza para sus opciones de tratamiento, debido a la posibilidad de utilizar inhibidores de la enzima PoliADP – ribosa polimerasa (PARP) como estrategia de tratamiento (32).

El mecanismo por el cual los inhibidores PARP prometen ser una eficaz estrategia de tratamiento radica en el bloqueo de la PARP, la cual cataliza la reparación de roturas del ADN pero de cadena sencilla.

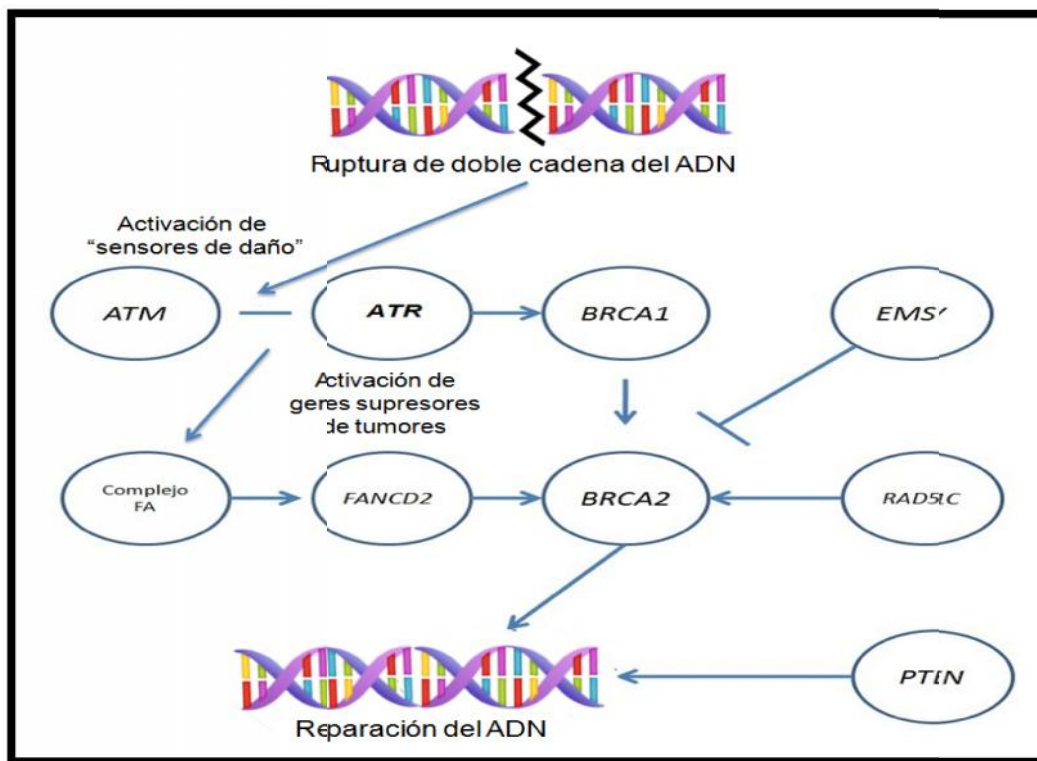


Figura 5. Reparación del ADN vía recombinación homóloga. El gen *BRCA1* puede perder la capacidad de activar a *BRCA2* mediante dos diferentes procesos:

mutaciones o silenciamiento epigenético debido a la hipermetilación de su región promotora.

Este mecanismo de acción de los inhibidores PARP supone que, en las células tumorales en las que *BRCA1/2* se encuentran mutados, la reparación del DNA vía recombinación homóloga se encuentra comprometido, por lo que la célula hace uso de la PARP para continuar con su supervivencia y división celular; sin embargo, al utilizar el inhibidor PARP y sumar la incapacidad de reparación vía recombinación homóloga, la célula pierde toda posibilidad de replicación y reparación de roturas de ADN, por lo que se ve comprometida su replicación y por ende, finalmente, entra en apoptosis. Esta terapia confiere una ventaja más, ya que las células normales no se ven afectadas; en ellas, a pesar de perder la capacidad de reparar el ADN mediante la PARP, aún poseen intactos los mecanismos de reparación de la recombinación homóloga mediada por *BRCA2*, lo que permite que sigan sus procesos celulares normales (39).

Dentro de las estrategias de tratamiento, se busca combinar los inhibidores PARP con algunos otros medicamentos quimioterapéuticos; sin embargo, solamente empresas como Pfizer® y AstraZeneca® están llevando a cabo estudios clínicos donde a los pacientes con mutaciones en línea germinal de *BRCA1/2* se les administra solamente inhibidores PARP (39). La cita mencionada previamente, hace referencia a estudios clínicos iniciados por AstraZeneca® en 2011 y ahora, cuatro años más tarde, la *Food and Drug Administration* (FDA) ha autorizado el uso de la molécula olaparib (Lynparza; AstraZeneca) en la batalla frente al CO; sin embargo es importante señalar que este medicamento sólo

puede utilizarse en pacientes que cuentan con mutaciones *BRCA1/2*, donde el efecto de estas mutaciones es la producción de proteínas defectuosas que comprometen la función de la reparación de roturas de ADN de doble cadena mediante la recombinación homóloga. Recordando que el olaparib es un inhibidor de la PARP (cuyo efecto es la reparación de roturas de cadena sencilla del ADN, el cual es un mecanismo de supervivencia de células tumorales), aquellas pacientes cuyos genes *BRCA1/2* sean normales o estén afectados por silenciamiento epigenético, no son candidatas a este tratamiento quimioterapéutico, ya que las células tumorales aún podrían reparar las roturas de doble cadena mediante otros genes de la vía de la recombinación homóloga (2, 32).

1.7 Nuevos tratamientos contra el CE

En el caso del CE, farmacéuticos y expertos en medicina genómica han volcado esfuerzos por ofrecer novedosas alternativas farmacéuticas al tratamiento convencional de los diferentes tipos de CE, entre las cuales destacan el uso de doxorrubicina, paclitaxel, carboplatino y cisplatino; sin embargo, recientemente ésta lucha se ha enfocado a moléculas como el Brivanib (BMS – 582664, Bristol – Mayers Squibb), la cual es un inhibidor múltiple de tirosina quinasa cuya acción tiene como blancos a las proteínas expresadas por los genes *VEGF* y *FGFR*. Esta molécula se encuentra en un estudio clínico de fase II y los datos publicados al momento sugieren que ha sido bien tolerado por las pacientes en las que ha sido probado y además es visto como un candidato digno de continuar su estudio para el tratamiento de CE. Estas pacientes que forman parte de este protocolo de

investigación, presentan mutaciones activadores en los genes *VEGF* y *FGFR*, lo cual es una evidencia que pone de manifiesto la importancia de conocer aquellas mutaciones presentes en nuestra población, con el objetivo de saber la viabilidad que tendría el uso de esta molécula en población mexicana (40)

1.8 Búsqueda de otros biomarcadores en muestras menos invasivas: ADN tumoral circulante.

Constantemente se está en búsqueda de métodos menos invasivos que provean de un diagnóstico certero y fiable de las diferentes enfermedades que afectan la salud del ser humano. Una muestra de sangre ha sido siempre el lugar idóneo para buscar moléculas biomarcadoras de un sinfín de enfermedades. En el plasma sanguíneo, es posible encontrar ADN tumoral circulante (ctDNA, por sus siglas en inglés) el cual proviene de células tumorales que han logrado infiltrarse a la circulación y que en el transcurso del tiempo han entrado en un proceso de apoptosis (41).

EL ctDNA oferta una propuesta atractiva para el diagnóstico y seguimiento al tratamiento quimioterapéutico de diferentes tipos tumorales (ovario, colón, pulmón, endometrio, mama y estómago), ya que una vez obtenido este bioespecímen es posible rastrear mutaciones emblemáticas de los tumores mencionados (42).

Capítulo 2

2. Justificación.

La falta de pruebas sensibles y específicas, así como de una sintomatología evidente, hacen que los CO y CE sean diagnosticados tardíamente, lo que provoca que los pronósticos de tratamiento y recuperación se vean disminuidos considerablemente. Estos cánceres ocupan el tercero y cuarto lugar, respectivamente, en incidencia entre los cánceres ginecológicos en México.

Un primer paso para el desarrollo de un método de diagnóstico molecular de estos cánceres, es el estudiar las principales mutaciones que les propician en nuestra población. Para ello, el presente estudio se enfocó en el rastreo de mutaciones en los genes *BRCA1/2*, con lo que perseguimos contribuir a la descripción de las averías genéticas presentes en estos dos genes, lo cual es para conocer dicha epidemiología molecular. Ello como el punto de partida para justificar luego el rastreo de dichas mutaciones emblemáticas de ambos genes a los casos de CO que pudieran diagnosticarse oportunamente con opciones como el aplicar NGS al Papanicolaou en base líquida o, incluso, en ADN tumoral circulante.

Capítulo 3

3. Objetivos.

3.1 Objetivo General.

Determinar la frecuencia y tipo de mutaciones en los genes *BRCA1/2* presentes en tumores de ovario en mujeres mexicanas.

3.2 Objetivos específicos.

1. Obtener biopsias de tumores de pacientes con cáncer de ovario.
2. Extraer, cuantificar y realizar pruebas de amplificabilidad de su ADN genómico e ingresar éste al Biobanco Institucional.
3. Identificar en el ADN reguardado en el Biobanco mutaciones en los *BRCA1/2*.

Capítulo 4

4. Materiales y métodos.

4.1 Grupo de pacientes.

El presente proyecto fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina y el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, bajo el número de registro B113-005. Se contempla la ejecución del mismo en dos fases: la primera, una fase retrospectiva en la cual se rastrearán las mutaciones más frecuentes presentes únicamente en tumores de ovario y de endometrio provenientes de tejidos embebidos en parafina; la segunda, una fase prospectiva en la cual se buscarán aquellas mutaciones emblemáticas con mayor frecuencia en la fase retrospectiva. Es sumamente importante resaltar que el presente trabajo muestra resultados solamente de los tumores de ovario provenientes de tejidos en parafina, aunque durante la realización del mismo se hayan recolectado muestras de tumores de endometrio: estas se analizarán en una etapa futura del proyecto.

Para la primera fase de este trabajo, se recolectaron tumores de ovario provenientes del HU “Dr. José Eleuterio González”, el Hospital San José Tec de Monterrey, el Hospital Regional de Alta Especialidad Materno Infantil y Hospital Clínica Oca. Para la segunda fase del proyecto se invitó a participar en este estudio de investigación a pacientes que acudieron a la consulta de Ginecología y Obstetricia del HU y que tuvieran un diagnóstico presuntivo de cáncer de ovario; también se reclutaron pacientes de la consulta de Oncología del Hospital Regional

de Alta Especialidad Materno Infantil y se extendieron esfuerzos de reclutamiento al INCan, ISSSTE e IMSS. Para cada paciente se obtuvo el consentimiento informado y se colectó una muestra de sangre, una de tejido tumoral y una de Papanicolaou en base líquida. Además de las muestras, también se obtuvo una hoja de recolección de datos clínicos, que incluyó antecedentes oncológicos y clínicos, mismos que fueron ingresados a una base de datos confidencial.

4.2 Extracción de ADN.

4.2.1 Extracción de ADN de sangre.

Se obtuvieron aproximadamente 3mL de sangre por paciente y la extracción de ADN se realizó en alícuotas de 500 μ L mediante la técnica que utiliza el buffer de lisis de TSNT (1%Tritón, 1%SDS, 100mM NaCl, 10 Mm Tris – HCl pH 8.0 y 1 Mm EDTA), seguido de una extracción con fenol – SEVAG (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 v/v). Una vez realizada la extracción fenol – SEVAG, se separó la fase acuosa (la cual contiene suspendida a las moléculas de ADN) y se realizó una segunda extracción utilizando fenol – SEVAG para obtener una fase acuosa con una pureza mayor y evitar posibles interferencias en estudios posteriores. La fase acuosa se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol 100% v/v, esto con el objetivo de lograr la precipitación del ADN, y se expuso a una temperatura de -80°C durante 1 hora. Al cabo de este proceso, se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min y la pastilla de ADN se lavó con 500 μ L de etanol al 70% v/v, se repitió la centrifugación a la misma velocidad recién mencionada y finalmente se dejó secar la pastilla de ADN durante aproximadamente 20 minutos. El ADN fue

resuspendido en 100 μL de buffer TE 1X (10mM Tris pH 8.0 y 1 mM EDTA), se cuantificó y se almacenó una alícuota de 50 μL a una concentración de 50 ng/ μL , el resto del ADN obtenido se almacenó en el Biobanco piloto de nuestro laboratorio a -80°C .

4.2.2 Extracción de ADN y ARN del tumor embebido en parafina.

Esta extracción fue realizada con el kit AllPrep DNA/RNA FFPE de la casa comercial Qiagen (Hilden, Alemania). El procedimiento inicia tomando y seccionado con un bisturí aproximadamente 10 mg de tejido fijado en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés), que fue sometido a un proceso de desparafinización con 640 μL del reactivo Paraffin dissolve (MACHEREY – NAGEL, Düren, Alemania) y posteriormente sometido a una primera digestión con 10 μL proteinasa K y 150 μL del buffer PKD.

Acorde al protocolo recomendado por el fabricante, los tejidos FFPE seccionados fueron incubados bajo condiciones optimizadas en un buffer de lisis que contiene proteinasa K. Bajo estas condiciones, el RNA quedó resuspendido en la solución, mientras que el ADN genómico quedó precipitado junto con el resto del material insoluble. La muestra fue centrifugada y el sobrenadante se utilizó para la extracción de ARN y el precipitado para la de ADN.

El sobrenadante se incubó a 80°C por 15 minutos y una vez transcurrido este tiempo se le agregaron 320 μL el buffer RLT y 1120 μL de etanol al 70% v/v. Esto con el fin de generar las condiciones adecuadas para el enlace del ARN con la columna de extracción RNeasy MinElute spin column. La columna fue tratada

con DNAsa para digerir los restos de ADN genómico contaminante, lavada con buffer FRN y buffer RPE para remover contaminantes; finalmente el ARN es eluído con 20 μ L de agua ultra pura y libre de RNAsas y almacenado a -80°C .

El ADN contenido en la pastilla fue lisado en presencia de 40 μ L proteinasa K y 180 μ L del buffer ATL e incubado a 56°C por 60 minutos, para luego ser llevado a una segunda incubación a 90°C por 120 minutos. La muestra fue mezclada con 200 μ L buffer AL y 200 μ L de etanol al 70% v/v para optimizar las condiciones de enlace con la columna QIAamp MinElute spin column. Una vez transferido el lisado a la columna, fue lavado con 700 μ L de los buffers AW1 y AW2, respectivamente, más un lavado con 700 μ L etanol al 70% v/v para remover contaminantes. El DNA fue eluído con 50 μ L de buffer ATE.

4.3 Cuantificación y determinación de la calidad del ADN.

La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría de luz ultravioleta, midiendo la absorbancia a 260 nm en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se consideró una buena calidad de ADN cuando la relación de la absorbancia a 260 nm / 280 nm se situó dentro del rango de 1.8 a 2.0 y las de la relación 260 nm / 230 nm fueron mayores a 2.0.

La integridad del ADN extraído fue puesta de manifiesto mediante su examinación por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Una vez terminada la electroforesis se realizó una tinción con bromuro de etidio cuya concentración fue de 0.5 mg/mL esperando ver una banda bien definida de ADN de alto peso

molecular. Cabe señalar que este procedimiento se realizó únicamente para las muestras de ADN de sangre.

4.3.1 Prueba de calidad: amplificación del gen β – globina.

Se realizó una PCR para el gen β – globina para verificar la amplificabilidad de los ADN extraídos, tanto de sangre, como de tejido FFPE. El ensayo consistió en una PCR punto final utilizando los oligos 5'-ccacttcacccacgttcacc - 3' y 5'- gaagagccaaggacaggtac - 3'. La reacción consistió de 5 μ L de GoTaq® colorless Master Mix 2X (PROMEGA, Wisconsin, USA), 0.2 μ L de ambos oligos a una concentración cada uno de 10 mM, 1 μ L de ADN a una concentración de 100 ng/ μ L y 3.6 μ L de agua. El programa de PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti® de 96 pozos de la marca Applied Biosystems, bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C/5min, seguido por 35 ciclos consistiendo cada uno de una desnaturalización a 94°C/1min, alineamiento a 53°C/1min y extensión a 72°C/1min; finalmente, una última extensión a 72°C/6min. El producto amplificado fue de 268 pb y se visualizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, el cual fue teñido con bromuro de etidio a 0.5 mg/mL.

4.4 Detección de mutaciones.

La secuenciación de nueva generación se llevó a cabo gracias a la valiosa y generosa participación del Laboratory of Experimental Cancer Immunology and Inflammation Program perteneciente al Center for Cancer Research del National Cancer Institute en los Estados Unidos de América.

Se realizó secuenciación de nueva generación para evaluar la presencia de mutaciones en los genes *BRCA1/2*. Es importante remarcar que se secuenciaron ambos genes completos y el análisis bioinformático se realizó utilizando el software Cassandra y las bases de datos del NCBI.

Capítulo 5.

5. Resultados.

5.1 Sujetos de estudio.

En la fase uno del estudio se recolectaron 50 tumores de ovario provenientes de tejidos embebidos en parafina obtenidos en las áreas de Patología del Hospital Universitario, el Hospital San José y el Hospital Oca. Por su parte, se ingresaron al Biobanco 60 tumores endometriales provenientes de tejidos FFPE, estos obtenidos del archivo de Patología del Hospital Universitario. Estos tumores fueron ingresados al Biobanco Piloto Institucional ubicado en la UBM, en donde se les realizó la extracción de los ácidos nucleicos y además se resguardó una sección de tejido para futuros estudios. Debe señalarse que de estas pacientes se cuenta únicamente con el ADN obtenido a partir de tejido tumoral.

Para la segunda fase del proyecto, a la fecha se han reclutado cinco pacientes con CO, de las cuáles se obtuvieron las muestras de sangre, tejido tumoral y Papanicolaou. Una paciente fue reclutada en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario, el resto en la consulta de Oncología del Hospital Regional de Alta Especialidad Materno Infantil.

Por otro lado, para cáncer de endometrio se reclutaron seis pacientes de las cuáles una había acudido a la consulta de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario y resto a la consulta de oncología del Hospital Regional de Alta Especialidad Materno Infantil.

5.1.2 Clasificación histológica y edad de las muestras obtenidas a partir de los FFPE de los CO y CE.

A continuación aparece el cuadro 2, el cual presenta las distintas clasificaciones histológicas encontradas en las 50 muestras recolectadas de FFPE de CO, así como las respectivas edades de las pacientes, las cuales abarcan desde los 33 a los 86 años y teniendo como media de edad los 51 años. El período de recolección de muestras abarcó los años 2011 – 2015.

Cuadro 2. Clasificación histológica y edades de las 50 muestras provenientes de FFPE de pacientes con CO.

Muestra	Tipo histológico	Edad (años)
1	Carcinoma seroso de alto grado	35
2	Carcinoma seroso de alto grado (90%)/células claras (10%)	55
3	Cistadenocarcinoma mucinoso	45
4	Cistadenocarcinoma seroso papilar	41
5	Carcinoma de células claras	64
6	Carcinoma endometrioide	41
7	Cistadenocarcinoma de células claras	70
8	Cistadenocarcinoma mucinoso	51
9	Cistadenocarcinoma seroso papilar	48
10	Cistadenocarcinoma seroso papilar	38
11	Carcinoma seroso de alto grado	38
12	Carcinoma seroso de alto grado	49
13	Carcinoma seroso de bajo grado	33
14	Carcinoma seroso de alto grado	59
15	Carcinoma seroso de alto grado	49
16	Carcinoma endometrioide	41
17	Carcinoma endometrioide	41
18	Carcinoma seroso papilar	48
19	Carcinoma de células claras	49
20	Carcinoma de células transicionales	62
21	Carcinoma seroso de alto grado	83

22	Carcinoma de células claras	43
23	Carcinoma endometrioide	33
24	Carcinoma seroso micropapilar	68
25	Cistadenocarcinoma mucinoso	86
26	Carcinoma mucinoso	35
27	Carcinoma endometrioide	44
28	Carcinoma seroso	79
29	Carcinoma seroso	60
30	Carcinoma seroso papilar	42
31	Carcinoma seroso de alto grado	51
32	Carcinoma endometrioide	35
33	Adenocarcinoma endometrioide	40
34	Carcinoma de células claras	45
35	Carcinoma endometrioide	74
36	Adenocarcinoma endometrioide	68
37	Adenocarcinoma de células claras	61
38	Disgerminoma	42
39	Carcinoma de células claras	48
40	Adenocarcinoma endometrioide	70
41	Cistadenocarcinoma de células claras	59
42	Adenocarcinoma endometrioide	48
43	Carcinoma de células claras	45
44	Adenocarcinoma mucinoso	44
45	Cistadenocarcinoma mucinoso	50
46	Cistadenocarcinoma seroso papilar	36
47	Adenocarcinoma de células claras	46
48	Adenocarcinoma endometrioide	45
49	Adenocarcinoma endometrioide	46
50	Borderline seroso	50

Por otro lado, en el cuadro 3 se concentra el listado de la clasificación histológica del CE encontrado en las 60 muestras recolectadas de FFPE, así como las respectivas edades de las pacientes, las cuales abarcan desde los 36 hasta los 85 años, teniendo una media de edad de 56 años. El periodo de recolección de muestras oscilo entre los años 2009 al 2013.

Cuadro 3. Clasificación histológica y edades de las 60 muestras provenientes de FFPE de pacientes con CE.

Muestra	Tipo histológico	Edad (años)
1	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	48
2	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	64
3	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	72
4	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	74
5	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	49
6	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	66
7	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	58
8	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	70
9	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	55
10	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	56
11	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	77
12	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	80
13	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	37
14	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	53
15	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	57
16	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	38
17	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	64
18	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	64
19	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	50
20	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	75
21	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	45
22	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	60
23	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	52
24	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	82
25	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	70
26	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	42
27	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	36
28	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	41
29	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	61
30	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	38
31	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	56
32	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	39
33	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	46
34	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	58

35	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	75
36	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	65
37	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	59
38	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	62
39	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	38
40	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	50
41	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	41
42	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	85
43	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	56
44	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	58
45	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	38
46	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	37
47	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	57
48	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	66
49	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	44
50	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	55
51	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	55
52	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	57
53	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	67
54	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	56
55	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	63
56	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	37
57	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	42
58	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	59
59	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	45
60	Adenocarcinoma endometriode subtipo endometriode	55

5.1.3 Características clínicas de las pacientes reclutadas para la segunda parte del proyecto.

Además de las muestras recolectadas, también se obtuvieron los datos clínicos más relevantes de las pacientes, con el objetivo de conocer cuáles de los factores de riesgo asociados a los CE y CO estaban presentes (ver cuadro 4).

Cuadro 4. Datos clínicos relevantes de los pacientes reclutadas para la segunda fase del proyecto.

Característica	Pacientes con CO	Pacientes con CE
Edad	27 – 55 años	29 – 57 años
Estado nutricional	4 con peso normal y una con obesidad tipo I	2 pacientes con sobrepeso, 1 pacientes con obesidad I 2 pacientes con obesidad II
Menarquia	12 años	4 pacientes a los 12 años 1 pacientes a los 13 años 1 paciente a los 15 años
Menopausia	1 paciente a los 35 años	1 paciente a los 32 años 1 paciente a los 36 años
Anticonceptivos	2 pacientes	4 pacientes
Antecedentes familiares de cáncer	Paciente 4 (padre en estómago y madre linfoma)	Paciente 1 (madre en CaCU, hermano en próstata y páncreas y hermana en mama) Paciente 3 (padre en próstata)
Adicciones	Ninguna	1 paciente con consumo regular de alcohol y tabaco
Actividad física	Ninguna	Ninguna

5.2 DNAs aportados al Biobanco de cáncer

La extracción de ADN de las 50 muestras provenientes de tejidos embebidos en parafina de pacientes con CO dio como resultado rendimientos que oscilaron entre los 25.3 y los 576.6 μg por cada 10 mg de tejido utilizados, los cuales se encuentran disueltos en un volumen de 50 μL del buffer de elución utilizado en el kit de extracción.

La generación del Biobanco de CE se constituyó con 60 muestras del tipo endometrioides. Los rendimientos de ADN obtenidos de estas muestras estuvieron en un rango entre los 16.4 μg y los 281.5 μg , disueltos en el mismo volumen que los de CO. Los resultados de las cuantificaciones del Biobanco de CO y CE se muestran de manera detallada en los cuadros 5 y 6, respectivamente.

Cuadro 5. Cuantificación del ADN de tejido FFPE de las muestras de pacientes con CO.

Muestra	[DNA] ng/ μL en 50 μL	Rendimiento μg	A 260/280	A 260/230
1	782.2	391.1	2.0	2.2
2	607.6	303.8	2.0	2.1
3	51.6	25.8	1.9	1.5
4	53.4	26.7	1.9	2.2
5	50.6	25.3	1.8	2.2
6	69.5	34.8	1.8	1.6
7	157.8	78.9	2.0	0.7
8	173.7	86.9	1.9	2.3
9	100.7	50.4	1.8	0.8
10	280	140.0	1.9	2.3
11	87.9	44.0	1.9	1.4
12	132.8	66.4	1.7	0.8
13	101	50.5	1.8	2.3
14	77.7	38.9	1.8	1.1

15	1153.1	576.6	2.0	2.2
16	775.8	387.9	2.0	2.0
17	142.2	71.1	1.8	2.0
18	515	257.5	2.0	2.7
19	1050.2	525.1	2.0	2.4
20	155.5	77.8	1.9	5.8
21	242.4	121.2	1.9	3.9
22	406.5	203.3	1.9	3.0
23	328.6	164.3	2.0	3.1
24	128.6	64.3	2.0	8.5
25	320.2	160.1	2.0	3.1
26	368.5	184.3	2.0	3.1
27	97.9	49.0	2.0	2.0
28	765.3	382.7	2.0	2.6
29	1020	510.0	2.0	2.5
30	170.5	85.3	1.9	5.7
31	154.5	77.3	1.8	2.0
32	64.6	32.3	1.9	2.3
33	495.9	248.0	1.9	2.4
34	196.7	98.4	1.9	2.3
35	570.8	285.4	1.9	2.1
36	475.7	237.9	1.9	2.3
37	411.5	205.8	1.9	2.5
38	486.6	243.3	1.9	2.1
39	287.7	143.9	1.9	2.4
40	656.2	328.1	1.9	2.3
41	492.6	246.3	1.9	2.2
42	507.6	253.8	1.9	2.4
43	612.2	306.1	1.9	2.2
44	444.5	222.3	1.8	2.5
45	293.9	147.0	1.9	2.7
46	298.1	149.1	1.9	2.7
47	106.2	53.1	2.0	2.8
48	902.1	451.1	2.0	2.3
49	396.1	198.1	1.9	2.5
50	356.2	178.1	1.9	2.6

Cuadro 6. Cuantificación del ADN de tejido FFPE de las muestras de pacientes con CE.

Muestra	[DNA] ng/μl en 50 μL	Rendimiento μg	A 260/2802
1	773.2	38.7	1.88
2	938.7	46.9	2.03
3	328.7	16.4	1.88
4	1047.8	52.4	2.06
5	1005.7	50.3	1.97
6	1747.8	87.4	1.92
7	1628.6	81.4	1.95
8	1989.1	99.5	1.94
9	901.3	45.1	1.90
10	918.5	45.9	1.99
11	632.2	31.6	1.95
12	660.2	33.0	1.88
13	662.0	33.1	1.94
14	1183.0	59.2	2.02
15	1051.8	52.6	1.92
16	966.1	48.3	1.97
17	1175.6	58.8	2.03
18	1981.2	99.1	1.92
19	870.4	43.5	2.01
20	919.1	46.0	2.00
21	1628.7	81.4	1.98
22	3315.2	165.8	1.98
23	1098.8	54.9	1.97
24	906.1	45.3	2.04
25	774.9	38.7	1.92
26	1161.6	58.1	2.03
27	1046.6	52.3	2.09
28	1443.5	72.2	2.03
29	606.1	30.3	2.03
30	775.4	38.8	1.98
31	1099.0	55.0	1.98
32	645.5	32.3	1.89
33	829.2	41.5	2.05

34	744.1	37.2	2.00
35	1602.5	80.1	2.03
36	1793.3	89.7	2.00
37	2618.4	130.9	1.90
38	1606.0	80.3	1.99
39	2418.1	120.9	1.92
40	1294.8	64.7	1.99
41	1384.4	69.2	1.98
42	654.6	32.7	1.87
43	2178.4	108.9	1.88
44	1497.3	74.9	1.99
45	2299.8	115.0	1.97
46	2668.3	133.4	1.83
47	3085.2	154.3	1.95
48	3383.0	169.2	1.92
49	2632.0	131.6	1.93
50	3414.5	170.7	2.02
51	3988.0	199.4	1.96
52	5074.2	253.7	1.85
53	2240.0	112.0	2
54	4351.1	217.6	1.79
55	5630.6	281.5	1.88
56	1483.3	74.2	1.99
57	1552.6	77.6	1.98
58	2102.1	105.1	1.98
59	1657.4	82.9	1.98
60	1833.6	91.7	1.97

La extracción de ADN de sangre muestras de pacientes con CO dio como resultado rendimientos que oscilaron entre los 5.63 y los 45.82 μg de ADN por cada 500 μL utilizados. Las muestras correspondientes de FFPE dieron rendimientos entre los 2.9 y los 56.9 μg , los cuáles fueron extraídos de aproximadamente 10 mg de tejido. Los ADN extraídos fueron almacenadas hasta

su uso a 4°C y los tejidos que fueron resguardados en el Biobanco se almacenaron a -80°C.

Por su parte, de las muestras de sangre (500 µL) provenientes de pacientes con CE se obtuvieron en rangos de ADN de entre los 0.44 - 45.88 µg, mientras que 16.99 – 81.72 µg de ADN de los tejidos FFPE (10 mg) correspondientes. Los resultados tanto de las muestras de sangre como de tejido están detallados en los cuadros 7 y 8.

Cuadro 7. Cuantificación del ADN de las muestras de pacientes con CO.

Muestra	Rendimiento µg		A 260/280		A 260/230	
	Sangre	Tumor	Sangre	Tumor	Sangre	Tumor
1	9.89	5.5	1.7	1.7	1.93	1.9
2	45.82	14.5	1.9	1.9	2.01	2.2
3	5.63	2.1	1.84	1.3	1.83	1.3
4	22.52	56.9	1.85	2	2.02	2.2
5	99.4	17.2	2.25	1.9	3.25	2.3

Cuadro 8. Cuantificación del ADN de las muestras de pacientes con CE.

Muestra	Rendimiento µg		A 260/280		A 260/230	
	Sangre	Tumor	Sangre	Tumor	Sangre	Tumor
1	19.38	13.68	1.85	1.91	1.91	2.26
2	0.44	29.93	1.65	1.89	1.9	1.95
3	17.76	16.99	1.96	1.9	2.1	2.15
4	9.33	38.76	1.94	1.92	1.9	2
5	32.4	81.72	1.37	2.03	2	2.2
6	45.88	43.87	1.52	1.91	2.1	2.1

Tanto las muestras de sangre como las de tejido fueron diluidas a una concentración de aproximadamente 50 ng/ μ L para realizar los estudios posteriores.

Para la evaluación de la integridad del ADN extraído, se realizaron geles de agarosa al 0.8%, siendo las muestras comparadas con un marcador de peso molecular tipo “escalera” de 1 kb. Los resultados de las extracciones de las muestras, así como de sus valores de calidad reflejados mediante las absorbancias a 260 nm/280 nm y de 260 nm/230 nm, aparecen en el cuadro 5 (50 tumores de ovario), cuadro 6 (60 tumores de endometrio) y en los cuadros 7 y 8, para los pacientes reclutados hasta el momento de CO y CE, respectivamente.

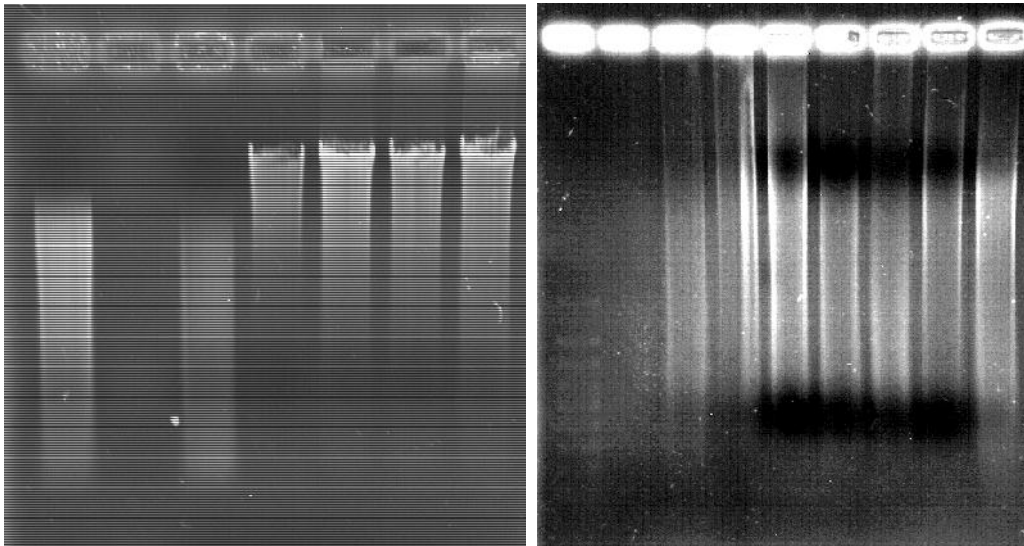


Figura 6. Cualificación del ADN. Geles de agarosa al 0.8% para la evaluación del grado de degradación del ADN obtenido de las muestras de sangre extraídas con la técnica de TSNT (izquierda) y las muestras de tejidos FFPE (derecha). Se utilizaron 600ng de ADN en cada carril.

5.2.2 Prueba de calidad: amplificación del gen β – globina.

La figura 7 muestra los geles representativos de las pruebas de calidad realizada mediante PCR de punto final de la amplificación del gen β - globina, en donde las bandas que se observan corresponden al producto esperado de PCR de 268 pb.

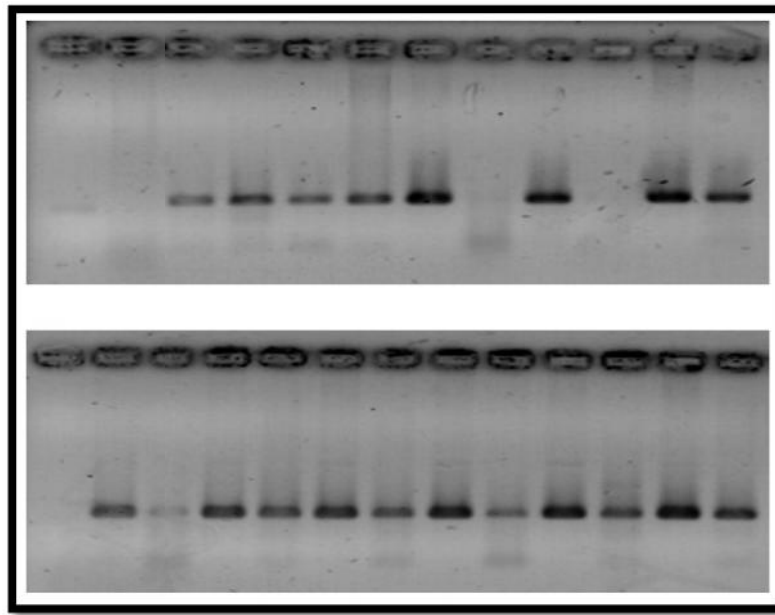


Figura 7. Prueba de calidad. Geles representativos de la prueba de calidad realizada.

5.3 Detección de mutaciones por medio de NGS.

En adelante, se muestran los resultados de la secuenciación de nueva generación pertenecientes a la fase del estudio retrospectivo. Se tuvieron los resultados de las 50 muestras analizadas por medio de la NGS, en la que se tuvo como diana de estudio a los genes *BRCA1/2*.

El análisis bioinformático arrojó que fueron halladas 174 variantes de las cuales 70 han sido reportadas previamente y las 104 fueron halladas por primera vez, todas ellas distribuidas entre 48 de 50 muestras analizadas. Es importante resaltar que tras la búsqueda realizada en la base de datos dbSNP del NCBI, se encontraron dos mutaciones del tipo germinal, una (rs144848 en *BRCA2*) presente en el 32% de las muestras analizadas (16/50), ocho variantes patogénicas (rs80356862, rs80358027, rs80358981, rs80357219 y rs80357260 en *BRCA1*, y rs80358557 y rs80359775 en *BRCA2*) y una más probablemente patogénica (rs80359082 en *BRCA2*). Estos resultados se concentran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Variantes patogénicas identificadas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

Muestra	Gen	IDS	REF	VAR	Tipo de mutación	Cambio aminoacídico
2	<i>BRCA2</i>	rs80359082	G	A	No sinónima	N372H
13	<i>BRCA2</i>	rs80358557	C	T	Sin sentido	Q1037*
14	<i>BRCA1</i>	rs80356862	G	C	No sinónima	A1623G
19	<i>BRCA1</i>	rs80358027	C	T	Cambio en el splicing	-
22	<i>BRCA2</i>	rs80359775	TGTA	-	Delección	-
36	<i>BRCA1</i>	rs80358981	C	T	Sin sentido	R2520*
	<i>BRCA1</i>	rs80357219	C	T	Sin sentido	W1782*
	<i>BRCA1</i>	rs80357260	G	A	Sin sentido	Q1395*

Ahora bien, el análisis bioinformático arrojó una gran cantidad de información acerca de cuáles fueron los SNPs encontrados a lo largo de los genes *BRCA1/2*, por lo que es conveniente describir aquellas variantes localizadas a lo largo de las muestras secuenciadas. Estos resultados están concentrados en el cuadro 10.

Cuadro 10. Variantes encontradas dentro de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en las muestras analizadas.

Gen	IDS	Significancia clínica	REF	VAR	Muestras portadoras
<i>BRCA1</i>	rs45489593	Incierta	G	A	18 (36%)
	rs1060915	Benigna	A	G	20 (40%)
	rs16941	Benigna	T	C	20 (40%)
	rs16940	Benigna	A	G	20 (40%)
	rs1799966	Otra	T	C	20 (40%)
	rs16942	Benigna	T	C	18 (36%)
	rs799917	Incierta	G	A	22 (44%)
	rs1799949	Benigna	G	A	19 (38%)
	rs3765640	Incierta	A	G	15 (30%)
	rs80358084	Otra	G	A	1 (2%)
	rs80357060	Incierta	C	T	1 (2%)
	rs1800062	Incierta	C	T	1 (2%)
	rs80356862	Patogénica	G	C	1 (2%)
	rs4986852	Otra	C	T	2 (4%)
	rs799923	No probada	G	A	6 (12%)
	rs80358027	Patogénica	C	T	1 (2%)
	rs1799950	Otra	T	C	2 (4%)
	rs80357260	Patogénica	G	A	1 (2%)
	rs80357284	Patogénica	C	T	1 (2%)
	rs80357325	Incierta	G	A	1 (2%)
	rs8176140	Incierta	T	A	8 (16%)
	rs8176258	Incierta	G	A	1 (2%)
	rs4985859	Benigna	C	A	2 (4%)
rs56119278	Benigna	A	G	1 (2%)	
rs80357219	Patogénica	C	T	1 (2%)	
rs80356858	Benigna	G	A	1 (2%)	
<i>BRCA2</i>	rs144848	Otra	A	C	16 (32%)
	rs206075	Benigna	A	G	48 (96%)
	rs206076	Benigna	G	C	47 (94%)
	rs169547	Incierta	T	C	46 (92%)
	rs1799943	Benigna	G	A	14 (28%)
	rs1801406	Benigna	A	G	17 (34%)
	rs4987117	Otra	C	T	1 (2%)
	rs1799955	Benigna	A	G	16 (32%)

rs11571707	Otra	T	C	8 (16%)
rs9534262	Benigna	T	C	34 (68%)
rs80359082	Presumiblemente patogénica	G	A	1 (2%)
rs4942486	No probada	T	C	33 (66%)
rs543304	Benigna	T	C	12 (24%)
rs9595456	Incierta	G	A	12 (24%)
rs1801426	Otra	A	G	12 (24%)
rs2320236	Variante intrónica	T	C	14 (28%)
rs9590940	Otra	A	C	2 (4%)
rs2126042	Incierta	C	T	18 (36%)
rs144549870	Variante intrónica	TATCT	-	1 (2%)
rs11571744	Incierta	C	T	1 (2%)
rs80358557	Patogénica	C	T	1 (2%)
rs182828913	Probablemente benigna	C	T	1 (2%)
rs11571610	Incierta	A	C	4 (8%)
rs766173	Incierta	A	C	5 (10%)
rs1801439	Benigna	A	G	4 (8%)
rs11571651	Otra	G	T	8 (16%)
rs1801499	Benigna	T	C	5 (10%)
rs2227943	Benigna	T	C	1 (2%)
rs2227944	Otra	A	T	1 (2%)
rs1799944	Benigna	A	G	4 (8%)
rs80359775	Patogénica	TGTA		1 (2%)
rs11571769	No probada	G	A	3 (6%)
rs55939572	Otra	A	C	1 (2%)
rs370581599	Variante intrónica	G	A	1 (2%)
rs190726611	Incierta	G	A	1 (2%)
rs191553604	Incierta	T	G	1 (2%)
rs200065709	Incierta	A	G	1 (2%)
rs3783265	Incierta	T	C	2 (4%)
rs80358423	Incierta	G	A	1 (2%)
rs80358934	Incierta	C	T	1 (2%)
rs80358981	Patogénica	C	T	1 (2%)
rs811002796	Patogénica	G	A	1 (2%)

*IDS: Identificaciones; REF**: Nucleótido de referencia; VAR***: Nucleótido variante.

Capítulo 6

6. Discusión.

Las investigaciones desarrolladas por grupos de científicos expertos en biomedicina molecular han sido encaminadas a sumar esfuerzos por encontrar biomarcadores para la detección o el tratamiento oportuno de los distintos tipos de enfermedades graves que aquejan a las distintas poblaciones y etnias alrededor del planeta (43).

Las cifras presentadas por el GLOBOCAN al año 2012, hacen un llamado a los grupos de salud a nivel mundial para colocar especial atención en las tumoraciones ginecológicas, que desafortunadamente ocupan las posiciones primera (CM), tercera (CaCU), quinta (CE) y séptima (CO) tanto en incidencia como en mortalidad en la mujer (1).

El combate principal contra los diferentes tipos de tumores inicia con la prevención, la cual en nuestro país es ampliamente promovida por la Secretaría de Salud en los diferentes niveles. El claro ejemplo, es la lucha contra el CaCU, en donde muy proactivamente se invita a las mujeres a que se realicen la prueba de Papanicolaou, como medida para prevenir o diagnosticar oportunamente este tumor. La introducción de la citología de Papanicolaou en la década de 1980 ha venido a tener un impacto, discreto, pero significativo en las cifras de mortalidad asociadas a CaCU (44).

Los incansables esfuerzos por encontrar mejores pruebas de diagnóstico y pronóstico para las pacientes que padecen algún tipo de tumor ginecológico, están

estrechamente relacionados con profundizar el conocimiento genético de la enfermedad. Tal es el caso visto del CaCU, tumor del cuál recientemente se develó su paisaje genómico, conocimiento del cual desprenderán diversas vertientes en el entendimiento de esta temible enfermedad. En este trabajo, nuestro laboratorio tuvo participación aportando muestras de pacientes mexicanas, ayudando a su ejecución y apoyando en la interpretación de los resultados (19).

Al igual que con el CaCU, el CM ya cuenta con una descripción de su paisaje genómico, esto gracias a los desarrollos tecnológicos en las técnicas de NGS. El paisaje genómico de esta neoplasia ha demostrado que, además del rol de los genes *BRCA1/2*, otros nuevos genes han podido asociarse como claves para el desarrollo tumoral, por ejemplo los genes *PPP2R2A*, *MTAP* y *MAP2K4* (45, 46).

En nuestro país, al estar la atención del sector salud tradicionalmente centrada en los CM y CaCU, con buenos resultados, ahora surgen los de CO y CE reclamando investigaciones para mejorar su diagnóstico. Empero, a la fecha se ha descrito sólo un trabajo llevado a cabo por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en el cual se buscaron mutaciones en línea germinal de pacientes de 92 pacientes con CO, encontrando la mutación deletérea del exón 9 al 12 en 9% (9/92) de las pacientes que fueron reclutadas en el centro del país (se analizó únicamente ADN de sangre periférica) (47).

El presente trabajo sienta las bases para el conocimiento genético de los tumores de ovario en la población de la República Mexicana; secuenciando los genes *BRCA1/2*, se inicia con un ambicioso proyecto que buscará describir las mutaciones presentes en otro grupo de genes, esto para encaminarse a desarrollar una prueba diagnóstica. Es por ello que este trabajo es sólo una rama de la línea de investigación que está siguiendo nuestro grupo de trabajo; primero se contempló la generación de un Biobanco de CO y CE en donde logramos aportar 50 muestras de CO y 60 de CE. La siguiente fase del proyecto se apoyará en las descripciones genéticas obtenidas de la secuenciación de las muestras provenientes del Biobanco generado, la información ahí recopilada se utilizará para buscar aquellas mutaciones más frecuentes y hacer un rastreo en muestras de Papanicolaou que se vayan ingresando al Biobanco Piloto Institucional.

Nuestro trabajo encontró la variante rs144848 (N372H) en el 36% de las muestras analizadas (16/50). Según los resultados arrojados por la base de datos dbSNP del NCBI, esta variante es del tipo germinal. Es bien sabido que este polimorfismo es característico de la población caucásica (48). Existen sólo un par de estudios donde se plantea la idea de asociar su presencia como un biomarcador. Estas investigaciones reflejan que el SNP mencionado no resultó ser estadísticamente significativo para utilizarlo como alguna de estas dos opciones (49, 50). Ahora bien, otra idea que pudiera ser de utilidad es saber si la proteína codificada (*BRCA2*) sufre algún cambio en su actividad producto de poseer esta variante; sin embargo, la simulación hecha en el software PolyPhen-2 arrojó un valor de 0.00 en el daño de la proteína, lo que significa que esta

mutación es considerada como benigna y por tanto, a pesar de haber un cambio aminoacídico (asparagina por histidina) aún está a discusión la patogenicidad de este SNP.

En adelante, los polimorfismos que aquí se discuten son considerados patogénicos, sólo la variante rs80359082 en el gen *BRCA2*, presente en la muestra 2, está clasificada como posiblemente patogénica. La variante rs80358557, presente en la muestra 13, produce una proteína truncada (*BRCA2*), al haber un cambio en la glutamina 1037 por un codón de paro en el exón 11. Por su parte, el polimorfismo rs80356862 (exón 14 del gen *BRCA1*) de la muestra 14, cambia la alanina de la posición 1623 por una glicina y con ello produce una mutación de cambio de sentido en la proteína. La variante rs80358027 (exón 12 del gen *BRCA1*), hallada en la muestra 19, produce un cambio en el “splicing” de la proteína y, finalmente, la variante rs80359775, encontrada en la muestra 22, produce un cambio en el marco de lectura, con lo que la proteína se ve afectada en su traducción; esto como resultado de una deleción de 4 nucleótidos (TGTA) en el exón 27 del gen *BRCA2*. Cabe señalar que estas variantes están reportadas en la base de datos dbSNP del NCBI, no existiendo literatura donde se hayan descrito previamente. Ahora bien, recientemente se han descrito nuevas variantes polimórficas en los genes *WNT4*, *SYNPO2*, *ABO*, *ATAD5*, *RSPO1*, y *GPX6*, las cuales se sugieren se tomen en cuenta para evaluar las implicaciones clínicas en caso de que mujeres portadoras de alguna mutación en los genes *BRCA1/2* (51).

Mención especial merece la muestra 36, ya que los resultados de la secuenciación mostraron una gran cantidad de variantes presentes en ambos

genes, con mayor precisión 70 variantes de las 174 encontradas, destacando tres variantes patogénicas – una de ellas mutación germinal – en el gen *BRCA1* (rs80358981, rs80357219 y rs80357260) las cuales comprometen la eficacia de la función supresora de tumor de la proteína codificada.

El hecho de que la función de las proteínas producidas por los genes *BRCA1* y *BRCA2* confiera una ventaja a las pacientes portadoras de mutaciones, resulta de utilidad en las opciones de tratamiento quimioterapéutico. Estas pacientes son candidatas a tratamiento usando inhibidores de la PARP (como el medicamento Lynparza de AstraZeneca®), el cual ha sido recientemente aprobado para su uso en países como Estados Unidos de América, Canadá, Brasil, China, Rusia e Israel (52). Estas pacientes se ven beneficiadas por encima de aquellas cuyos genes *BRCA1/2* se encuentran sin mutaciones o bien silenciados epigenéticamente, ya que se han realizado estimaciones que revelan un mejor pronóstico a lo largo del tiempo (53, 54).

Nuestra primera fase del estudio viene a abrir campo en el conocimiento de las mutaciones o variantes polimórficas encontradas en una población mexicana, ya que a la fecha solamente se conoce el estudio realizado por Villarreal-Garza y colaboradores entre el INCan y el laboratorio de City of Hope, así como el realizado por Vaca-Paniagua y colaboradores, también del INCan, en donde se buscan mutaciones en línea germinal mediante el método de pirosecuenciación de exones de los genes *BRCA1/2*. En ambos casos, ninguna de las mutaciones halladas por estos investigadores coinciden con las variantes encontradas en nuestro estudio (47, 55).

Capítulo 7

7. Conclusión

El presente trabajo aportó, en primer lugar, la colección de tumores de ovario resguardados en el Biobanco y otro más de tumores de endometrio. A la fecha, ambas colecciones siguen nutriéndose con especímenes provenientes de pacientes con las patologías mencionadas.

Para los tumores de ovario, se logró describir las variantes polimórficas presentes en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, siendo el primer estudio de este tipo en la República Mexicana.

El conocimiento asentado por este estudio coloca las bases para la búsqueda de aquellas averías genéticas emblemáticas de este tumor, en pro del futuro desarrollo de una prueba molecular de diagnóstico para su detección oportuna.

Referencias

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014. Epub 2014/09/16.
2. Olaparib Approved for Advanced Ovarian Cancer. *Cancer Discovery*. 2015;5(3):218.
3. Kinde I, Bettgowda C, Wang Y, Wu J, Agrawal N, Shih Ie M, et al. Evaluation of DNA from the Papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers. *Science translational medicine*. 2013;5(167):167ra4. Epub 2013/01/11.
4. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1511-8.
5. Abascal-Saiz A, Sotillo-Mallo L, de Santiago J, Zapardiel I. Management of borderline ovarian tumours: a comprehensive review of the literature. *Ecancermedicalscience*. 2014;8:403. Epub 2014/03/08.
6. Li L, Xu Y, Yu C-X. Proteomic Analysis of Serum of Women with Elevated Ca-125 to Differentiate Malignant from Benign Ovarian Tumors. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(7):3265-70.
7. Nossov V, Amneus M, Su F, Lang J, Janco JM, Reddy ST, et al. The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? *American journal of obstetrics and gynecology*. 2008;199(3):215-23. Epub 2008/05/13.
8. Nosov V, Su F, Amneus M, Birrer M, Robins T, Kotlerman J, et al. Validation of serum biomarkers for detection of early-stage ovarian cancer. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009;200(6):639 e1-5. Epub 2009/03/17.
9. Yin BW, Dnistrian A, Lloyd KO. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2002;98(5):737-40. Epub 2002/03/29.
10. Johnson CC, Kessel B, Riley TL, Ragard LR, Williams CR, Xu JL, et al. The epidemiology of CA-125 in women without evidence of ovarian cancer in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial. *Gynecologic oncology*. 2008;110(3):383-9. Epub 2008/07/01.
11. Chao A, Tang YH, Lai CH, Chang CJ, Chang SC, Wu TI, et al. Potential of an age-stratified CA125 cut-off value to improve the prognostic classification of patients with endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 2013. Epub 2013/03/06.
12. Hunn J, Tenney ME, Tergas AI, Bishop EA, Moore K, Watkin W, et al. Patterns and utility of routine surveillance in high grade endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 2015;137(3):485-9.
13. Barroilhet L, Vitonis A, Shipp T, Muto M, Benacerraf B. Sonographic predictors of ovarian malignancy. *Journal of clinical ultrasound : JCU*. 2013. Epub 2013/03/19.
14. Faria SC, Sagebiel T, Balachandran A, Devine C, Lal C, Bhosale PR. Imaging in endometrial carcinoma. *Indian J Radiol Imaging*. 2015;25(2):137-47.
15. Timmermans A, Opmeer BC, Khan KS, Bachmann LM, Epstein E, Clark TJ, et al. Endometrial thickness measurement for detecting endometrial cancer in women with postmenopausal bleeding: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2010;116(1):160-7.
16. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
17. Evans GA. Designer science and the "omic" revolution. *Nat Biotechnol*. 2000;18(2):127.
18. Ellis MJ, Perou CM. The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap. *Cancer Discov*. 2013;3(1):27-34.
19. Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Pedamallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. *Nature*. 2013;25(10).

20. Cancer. Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15. Epub 2011/07/02.
21. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013;497(7447):67-73.
22. Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, et al. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2000;132(10):810-9.
23. George P. Cancer of the uterus: the vaginal smear in the diagnosis California and Western Medicine 1943;59(2).
24. Frech HC. Adenocarcinoma of the ovary diagnosed by vaginal smear. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1949;57(4):802-4.
25. Graham JB, Graham RM, Schueller EF. Preclinical detection of ovarian cancer. *Cancer*. 1964;17(11):1414-32.
26. Takashina T, Ono M, Kanda Y, Sagae S, Hayakawa O, Ito E. Cervicovaginal and endometrial cytology in ovarian cancer. *Acta cytologica*. 1988;32(2):159-62.
27. Huijssoon A, Sastrowijoto P, Harmsel BT. Papillary adenocarcinoma of the ovary presenting in a PAP-smear. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2001;80(7):659-60.
28. Nwanodi O, Choi C, Khulpateea N. Cervicovaginal cytology and diagnosis of ovarian or peritoneal cancer: case report and literature review. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2008;277(2):171-4. Epub 2007/07/27.
29. Tepeoglu M, Ozen O, Ayhan A. Ovarian serous borderline tumor detected by conventional papanicolaou smear: a case report. *Acta cytologica*. 2013;57(1):96-9. Epub 2012/12/12.
30. Chin L, Hahn WC, Getz G, Meyerson M. Making sense of cancer genomic data. *Genes & development*. 2011;25(6):534-55. Epub 2011/03/17.
31. Chen H, Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenomics of ovarian cancer and its chemoprevention. *Frontiers in genetics*. 2011;2:67. Epub 2012/02/04.
32. Gottipati P, Vischioni B, Schultz N, Solomons J, Bryant HE, Djureinovic T, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells. *Cancer Res*. 2010;70(13):5389-98. Epub 2010/06/17.
33. Quail MA, Swerdlow H, Turner DJ. Improved protocols for the illumina genome analyzer sequencing system. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L Haines [et al]*. 2009;Chapter 18:Unit 18 2. Epub 2009/07/08.
34. Tucker T, Marra M, Friedman JM. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *American journal of human genetics*. 2009;85(2):142-54. Epub 2009/08/15.
35. Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepschi AC, de Carvalho AF, et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. *PloS one*. 2013;8(3):e57581. Epub 2013/03/08.
36. Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Front Biosci*. 2013;18:1358-72.
37. Levy-Lahad E, Friedman E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer*. 2007;96(1):11-5. Epub 2007/01/11.
38. Chan M, Ji SM, Yeo ZX, Gan L, Yap E, Yap YS, et al. Development of a next-generation sequencing method for BRCA mutation screening: a comparison between a high-throughput and a benchtop platform. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2012;14(6):602-12. Epub 2012/08/28.
39. Plummer R. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: a new direction for BRCA and triple-negative breast cancer? *Breast Cancer Res*. 2011;13(4).

40. Powell MA, Sill MW, Goodfellow PJ, Benbrook DM, Lankes HA, Leslie KK, et al. A phase II trial of brivanib in recurrent or persistent endometrial cancer: an NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecologic oncology*. 2014;135(1):38-43. Epub 2014/07/16.
41. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(6):579-86. Epub 2014/01/23.
42. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science translational medicine*. 2014;6(224):3007094.
43. Normanno N, Rachiglio AM, Roma C, Fenizia F, Esposito C, Pasquale R, et al. Molecular diagnostics and personalized medicine in oncology: challenges and opportunities. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(3):514-24. Epub 2012/09/20.
44. Lazcano-Ponce E, Palacio-Mejia LS, Allen-Leigh B, Yunes-Diaz E, Alonso P, Schiavon R, et al. Decreasing cervical cancer mortality in Mexico: effect of Papanicolaou coverage, birthrate, and the importance of diagnostic validity of cytology. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2008;17(10):2808-17. Epub 2008/10/10.
45. Gray J, Druker B. Genomics: the breast cancer landscape. *Nature*. 2012;486(7403):328-9.
46. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346-52.
47. Villarreal-Garza C, Alvarez-Gomez RM, Perez-Plasencia C, Herrera LA, Herzog J, Castillo D, et al. Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. *Cancer*. 2015;121(3):372-8.
48. Packer BR, Yeager M, Burdett L, Welch R, Beerman M, Qi L, et al. SNP500Cancer: a public resource for sequence validation, assay development, and frequency analysis for genetic variation in candidate genes. *Nucleic acids research*. 2006;34(Database issue):D617-21. Epub 2005/12/31.
49. Tian CQ, Darcy KM, Krivak TC, Deloia JA, Armstrong D, Davis W, et al. Assessment of the Prognostic Value of Two Common Variants of BRCA1 and BRCA2 Genes in Ovarian Cancer Patients Treated with Cisplatin and Paclitaxel: A Gynecologic Oncology Group Study. *Front Oncol*. 2013;3(206).
50. Ramus SJ, Vierkant RA, Johnatty SE, Pike MC, Van Den Berg DJ, Wu AH, et al. Consortium analysis of 7 candidate SNPs for ovarian cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;123(2):380-8.
51. Kuchenbaecker KB, Ramus SJ, Tyrer J, Lee A, Shen HC, Beesley J, et al. Identification of six new susceptibility loci for invasive epithelial ovarian cancer. *Nat Genet*. 2015;47(2):164-71.
52. Deeks ED. Olaparib: first global approval. *Drugs*. 2015;75(2):231-40.
53. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
54. Tan DS, Kaye SB. Chemotherapy for Patients with BRCA1 and BRCA2-Mutated Ovarian Cancer: Same or Different? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015;35:114-21.
55. Vaca-Paniagua F, Alvarez-Gomez RM, Fragoso-Ontiveros V, Vidal-Millan S, Herrera LA, Cantu D, et al. Full-exon pyrosequencing screening of BRCA germline mutations in Mexican women with inherited breast and ovarian cancer. *PLoS one*. 2012;7(5):24.