

**ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN BRCA1 EN MUJERES CON CÁNCER  
DE MAMA HEREDOFAMILIAR ATENDIDAS EN LOS SERVICIOS DE  
ONCOLOGÍA DE BUCARAMANGA**

**MARÍA CAROLINA SANABRIA SALAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
BUCARAMANGA  
2007**

**ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN BRCA1 EN MUJERES CON CÁNCER  
DE MAMA HEREDOFAMILIAR ATENDIDAS EN LOS SERVICIOS DE  
ONCOLOGÍA DE BUCARAMANGA**

**MARÍA CAROLINA SANABRIA SALAS**

**Tesis de grado para optar al título de Magister en Ciencias Básicas  
Biomédicas**

**Asesor  
Clara Inés Vargas Castellanos. MD. MSc.  
Directora del Área de Investigación en Salud y Tecnología.  
Colciencias.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
BUCARAMANGA  
2007**

## DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a Dios que me acompaño y me dio la fortaleza necesaria para culminarlo a pesar de los contratiempos.

A mis papas que son mi vida y que me apoyaron durante todo el proceso, los amo.

A mis hermanos y sobretodo a mi sobrina hermosa María Alejandra.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Clara Vargas Castellanos, mi tutora y acompañante durante este enriquecedor periodo académico, por todas sus enseñanzas y por su amistad.

A la Dra. Adriana Castillo Pico y a la Dra Leonor Gusmao por su colaboración adicional con respecto a las técnicas moleculares a usar en este estudio y su buena disposición.

Al Dr. Gerardo Muñoz Mantilla, coordinador del programa de maestría, por su apoyo y respaldo desde el primer día.

Al Dr. Ulises Bautista, quien me facilitó la recolección de pacientes de la Empresa Social del Estado, ISS y de la Liga Santandereana Contra el Cáncer en Bucaramanga.

A los doctores Álvaro Niño, Francisco Camacho y Jesús Insuasty pertenecientes a La Junta Médica Oncológica del Hospital Universitario de Santander y a la Dra. Adriana Zableth, coordinadora de La Unidad de Oncología de esta misma institución, por permitirme participar en estas reuniones tan enriquecedoras y contactarme con sus pacientes.

Al equipo de especialistas del Centro Oncológico en Bucaramanga quienes me colaboraron en la recolección de pacientes para este estudio.

A la Dra. María Mercedes Bravo, directora del grupo de Investigación de Biología del Cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología (INC), ESE y grupo investigativo, quienes me acogieron en su espacio y me fortalecieron bases en el trabajo de laboratorio, y al grupo de Genética del INC por proporcionarme muy amablemente células MCF-7.

A David Cregeen, PhD, del Regional Molecular Genetics Laboratory en Londres, Inglaterra, por facilitarme información sobre técnicas de laboratorio y muestras de ADN de pacientes con las mutaciones 185delAG y 5382insC para ser usadas como controles positivos en este estudio.

A todos mis compañeros y docentes que participaron de forma directa o indirecta en mi formación durante este periodo, les deseo muchos éxitos y bendiciones.

Por último pero no menos importante, quiero agradecer muy especialmente a las pacientes que de forma voluntaria participaron en este estudio y a sus familias por la confianza que depositaron en el proyecto y en mí como ejecutora del mismo.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	5
<b>2.1. OBJETIVO GENERAL</b>	5
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	5
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	6
<b>3.1. GLÁNDULA MAMARIA</b>	6
<b>3.1.1. Generalidades</b>	6
<b>3.1.1.1. Embriología.</b>	6
<b>3.1.1.2. Anatomía.</b>	6
<b>3.1.1.3. Fisiología y Desarrollo.</b>	8
<b>3.1.2. Patología Maligna de la Glándula Mamaria, Cáncer de Mama</b>	9
<b>3.1.2.1. Generalidades</b>	9
<b>3.1.2.1.1. Definición y Epidemiología.</b>	9
<b>3.1.2.1.2. Historia Natural del Cáncer de Mama.</b>	10
<b>3.1.2.1.3. Factores de Riesgo.</b>	11
<b>3.1.2.1.4. Clasificación.</b>	13
<b>3.1.2.1.5. Diagnóstico Precoz del Cáncer de Mama.</b>	14
<b>3.2. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y CARCINOGENÉISIS</b>	16
<b>3.2.1. Ciclo Celular y su Regulación</b>	16
<b>3.2.1.1. Generalidades</b>	16
<b>3.2.1.2. Mecanismos de Control del Ciclo Celular</b>	19
<b>3.2.1.2.1. Regulación Intracelular de la Proliferación.</b>	19
<b>3.2.1.2.1.1. Maquinaria de Proliferación Celular.</b>	20
<i>(Complejos Ciclina-Cdk's)</i>	20
<b>3.2.1.2.2. Regulación Intracelular de la Apoptosis. (Caspasas)</b>	24
<b>3.2.1.2.2.1. Proceso de Apoptosis Vía p53.</b>	24
<b>3.2.1.2.3. Regulación Extracelular de la Proliferación y Apoptosis</b>	26
<b>3.2.1.2.3.1. Vías de Señalización Extracelular de Proliferación.</b>	27
<b>3.2.1.2.3.2. Vías de Señalización Extracelular de Apoptosis.</b>	29
<b>3.2.2. Proceso de Carcinogénesis</b>	30
<b>3.2.2.1. Carcinogénesis en la Glándula Mamaria</b>	30
<b>3.2.2.1.1. Oncogenes en el Cáncer de Mama.</b>	30

3.2.2.1.2. Genes Supresores de Tumor en el Cáncer de Mama.	32
3.2.2.1.2.1. Funciones de los Genes BRCA 1-2.	32
3.2.2.1.2.2. Diferencias Entre los Fenotipos de Tumores BRCA1 y BRCA2.	35
3.3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: GEN BRCA1	36
3.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE GENES BRCA	39
4. MATERIALES Y MÉTODOS	41
4.1. MÉTODOS MOLECULARES IMPLEMENTADOS	42
4.1.1. <i>Extracción de ADN</i>	42
4.1.1.1. Precipitación Salina (Salting Out)	42
4.1.1.1.1. Descripción.	42
4.1.1.1.2. Protocolo de Salting Out.	43
4.1.1.2. Extracción de ADN de la Muestra 003 por Chelex	44
4.1.1.2.1. Protocolo de Extracción de ADN por Chelex.	44
4.1.1.3. Extracción de ADN a partir de Células MCF-7, con el kit DNAzol	45
4.1.2. <i>Cuantificación del ADN</i>	45
4.1.2.1. Espectrofotometría	45
4.1.2.2. Electroforesis en Gel de Agarosa	46
4.1.3. <i>PCR-Mismatch y Digestión Enzimática</i>	46
4.1.3.1. Descripción	46
4.1.3.2. Protocolo PCR-Mismatch	50
4.1.3.3. Protocolo de la Digestión Enzimática	51
4.2. MÉTODO DE ANÁLISIS DEL ESTUDIO	53
5. RESULTADOS	54
5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE FACTORES DE RIESGO EN LAS 30 PACIENTES ANALIZADAS	54
5.2. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LAS 30 PACIENTES ANALIZADAS	61
5.3. ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS EXONES 2 Y 20 DEL GEN BRCA1.	65

<b>6. DISCUSIÓN</b>	69
<b>7. CONCLUSIONES</b>	74
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	75
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	76
<b>9. ANEXOS</b>	86

## LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1 Factores de Riesgo Descritos en la Literatura, con sus Respectivos RR (Riesgo Relativo) y Grupo en Riesgo.	13
Tabla 2 Oncogenes Relacionados con el Cáncer de Mama.	31
Tabla 3 Genes Supresores de Tumor Relacionados con el Cáncer de Mama.	33
Tabla 4 Preparación del Mix de Reactivos para el Exon 2 y 20 del Gen BRCA1.	51
Tabla 5 Condiciones en el Termociclador para los Exones 2 y 20 del Gen BRCA1.	51
Tabla 6 Mezcla de Reacción Para la Digestión Enzimática de los Exones 2 y 20 del Gen BRCA1, del Plásmido <i>pUC18</i> y de ADN directo.	52
Tabla 7 Características Generales de las Pacientes Analizadas.	54
Tabla 8 Edad al Momento del Diagnóstico de las 30 Pacientes con Cáncer de Mama ( <i>rangos</i> ).	55
Tabla 9 Edad de la Menarca en las 30 Pacientes.	55
Tabla 10 Consumo de Hormonas Exógenas (AO y/o TRH).	56
Tabla 11 Edad del Primer Parto.	56
Tabla 12 Periodo Acumulado de Lactancia en Meses.	57
Tabla 13 Frecuencia del Estrato Socio-Económico.	58
Tabla 14 Antecedentes Familiares de Cáncer de Mama en Primer y/o Segundo Grado en las Pacientes Analizadas.	58
Tabla 15 Antecedentes Familiares de Cáncer de Mama y Otros, en las 30 Pacientes.	59
Tabla 16 Descripción de las Pacientes Según sus Antecedentes Familiares.	60
Tabla 17 Descripción de las Características Histopatológicas del Tumor de Mama.	61
Tabla 18 Características Clínicas de las 30 Pacientes Estudiadas y sus Frecuencias.	63

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág</b>
<b>Figura 1 Anatomía de la Glándula Mamaria.</b>	<b>7</b>
<b>Figura 2 Modelo de la Historia Natural del Cáncer de Mama.</b>	<b>11</b>
<b>Figura 3 Fases del Ciclo Celular.</b>	<b>18</b>
<b>Figura 4 Puntos de Control del Ciclo Celular.</b>	<b>18</b>
<b>Figura 5 Interrelación Entre la Señalización Intracelular y Extracelular de Proliferación y Apoptosis.</b>	<b>21</b>
<b>Figura 6 Complejo Ciclina – Kinasa (C-CDK).</b>	<b>21</b>
<b>Figura 7 Algunos Mecanismos de Regulación de la Actividad de los Complejos Ciclina-Kinasa (CDK'S), Mediante la Modificación Promotora e Inhibitoria de Kinasas.</b>	<b>23</b>
<b>Figura 8 Vía de Progresión del Ciclo Celular en G1.</b>	<b>23</b>
<b>Figura 9 Bloqueo del Ciclo y Continuación del Mismo Vía p53.</b>	<b>25</b>
<b>Figura 10 Sustratos de Caspasas Ejecutoras y Efectos en la Célula.</b>	<b>25</b>
<b>Figura 11 Vía de Inducción de Apoptosis Dependiente de Kinasas Sensoras de Daños en el ADN (ATM / ATR) y p53.</b>	<b>26</b>
<b>Figura 12 Elementos del Proceso de Transducción de Señales.</b>	<b>27</b>
<b>Figura 13 Señal de Proliferación Mediante el Receptor Tirosin – Kinasa y Ras.</b>	<b>28</b>
<b>Figura 14 Señal de Proliferación Mediada por Estrógenos.</b>	<b>29</b>
<b>Figura 15 Vía de Señalización Extrínseca de la Apoptosis.</b>	<b>31</b>
<b>Figura 16 Estructura Proteica de los Genes BRCA.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 17 Mecanismo de Reparación Homóloga Mediada por BRCA1-2.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 18 Gel de Electroforesis del Exon 2, Muestra 019 con Controles.</b>	<b>66</b>
<b>Figura 19 Análisis de Restricción Enzimática del Exon 2 en una Submuestra del total de Pacientes Estudiadas</b>	<b>66</b>
<b>Figura 20 Electroferograma de Secuenciación Directa del Exon 2 del Gen BRCA1, Muestra 004.</b>	<b>67</b>

**Figura 21 Gel de Electroforesis del Exon 20, Muestra 018 con Controles. 68**

**Figura 22 Análisis de Restricción Enzimática del Exon 20 en una Submuestra del total de Pacientes Estudiadas. 68**

## LISTA DE CUADROS

	<b>Pág</b>
<b>Cuadro 1 Clasificaciones del Cáncer de Mama.</b>	<b>15</b>
<b>Cuadro 2 Lista de Complejos CDK's que Participan en las Diferentes Fases del Ciclo Celular.</b>	<b>22</b>
<b>Cuadro 3 Lista de las Familias de Kinasas Inhibitorias de Complejos CDK's y sus Blancos Según la Fase del Ciclo Celular.</b>	<b>22</b>
<b>Cuadro 4 Primers Para PCR Mismatch Exon 2 (185delAG).</b>	<b>47</b>
<b>Cuadro 5 Primers Para PCR Mismatch Exon 20 (5382insC).</b>	<b>48</b>

## LISTA DE GRÁFICAS

	<b>Pág</b>
<b>Gráfica 1 Frecuencia de Rango de Edades al Momento del Diagnóstico.</b>	<b>55</b>
<b>Gráfica 2 Frecuencia en Rango de Edad del Primer Parto.</b>	<b>57</b>
<b>Gráfica 3 Antecedentes Familiares de Cáncer de Mama.</b>	<b>58</b>
<b>Gráfica 4 Frecuencia en el Reporte Histopatológico.</b>	<b>62</b>
<b>Gráfica 5 Frecuencia en el Reporte del Grado Histopatológico.</b>	<b>62</b>
<b>Gráfica 6 Reporte de BIRADS Mas Frecuente en la Cohorte de Pacientes.</b>	<b>64</b>
<b>Gráfica 7 Estadio de la Enfermedad Más Frecuentemente Reportado.</b>	<b>64</b>
<b>Gráfica 8 Diagnóstico Definitivo de Cáncer de Mama Más Frecuente en la Cohorte de Pacientes.</b>	<b>65</b>

## LISTA DE ESQUEMAS

	<b>Pág</b>
<b>Esquema 1 Metodología del Estudio.</b>	<b>42</b>
<b>Esquema 2 PCR-Mismatch del Exon 2 Silvestre, Gen BRCA1.</b>	<b>48</b>
<b>Esquema 3 PCR-Mismatch del Exon 2 Mutado (185delAG), Gen BRCA1.</b>	<b>49</b>

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág</b>
<b>ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS GENÉTICAS Y MOLECULARES</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO B. CUESTIONARIO PROYECTO CÁNCER DE MAMA</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO C. IMÁGENES DE LOS ANÁLISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DE LOS AMPLIFICADOS, CON EL CAMBIO DE BASE RESPECTIVO, CON LA MUTACIÓN Y SIN LA MUTACIÓN DE INTERÉS. (REBsites)</b>	
<b>Imagen 1 Análisis de la Secuencia Correspondiente al Exon 2 Silvestre con Hinfl.</b>	<b>94</b>
<b>Imagen 2 Análisis de la Secuencia Correspondiente al Exon 2 Mutado (185delAG), con Hinfl.</b>	<b>95</b>
<b>Imagen 3 Análisis de Restricción de la Secuencia Correspondiente al Exon 20 Silvestre, con Ddel.</b>	<b>96</b>
<b>Imagen 4 Análisis de Restricción de la Secuencia Correspondiente al Exon 20 Mutado (5382insC), con Ddel.</b>	<b>97</b>

## GLOSARIO

### **ADN**

*Ácido Desoxirribonucleico.* Macromolécula que codifica la información genética responsable del desarrollo y función de un organismo. Esta información genética puede ser transmitida de una generación a otra, por lo que constituye la base de la herencia. La estructura de la molécula de ADN consiste en una hélice de dos hebras unidas por enlaces de hidrógeno entre pares de bases purina-pirimidina y se encuentra en el núcleo de células somáticas (2n) y germinales (n).

### **ALELO**

Una de dos o más secuencias de ADN en un locus en particular. Típicamente un alelo es normal (ADN normal) y otros alelos mutados son raros.

### **ASHKENAZI, JUDÍOS**

Uno de los dos principales grupos ancestrales de la comunidad Judía, provenientes de Alemania, Polonia y Rusia. El otro grupo son los judíos Sephardicos.

### **AUTOSÓMICO DOMINANTE**

Este tipo de herencia se refiere a la condición genética que se desarrolla cuando solo una de las dos copias del gen es mutada o rara (Heterocigoto), así la otra sea normal.

### **AUTOSÓMICO RECESIVO**

Este tipo de herencia se refiere a la condición genética que se presenta solo cuando las dos copias de un mismo gen están mutadas o son raras (Homocigoto).

### **BRCA1, GEN**

*Breast Cancer Gene 1.* Gen de susceptibilidad para cáncer de mama. Íntimamente relacionado con el cáncer de mama de tipo heredofamiliar por lo que cuando está mutado, se considera de alta penetrancia para la enfermedad. Causante del Síndrome de Cáncer de Mama/Ovario.

### **BRCA2, GEN**

*Breast Cancer Gene 2.* Gen de susceptibilidad para cáncer de mama, también de alta penetrancia cuando está mutado. Se relaciona principalmente con el cáncer de mama sitio específico tanto en mujeres como en hombres.

### **CÁNCER ESPORÁDICO**

En general, el término es usado para referirse al tipo de cáncer que se presenta

cuando no existe una mutación en células de línea germinal de base que lo predisponga o también cuando no existe historia familiar de cáncer. Las mutaciones se dan en células somáticas y hay compromiso de oncogenes.

### **CÁNCER FAMILIAR**

En el cáncer de mama, se refiere al tipo de cáncer de mama que se presenta en un individuo que tiene antecedentes familiares de cáncer de mama (ningún otro), por mutaciones tanto en oncogenes como en genes supresores de tumor.

### **CÁNCER HEREDITARIO**

En el cáncer de mama, se refiere al tipo de cáncer que se presenta en un individuo con antecedentes familiares de cáncer de mama, ovario, próstata y otros, como resultado de mutaciones en genes supresores de tumor en células de línea germinal, que son segregadas de generación en generación.

### **CLON**

Una copia idéntica de una secuencia de ADN o de un gen completo; También se entiende por clon, una o más células derivadas de otra célula idéntica (ej. Línea Celular o Tejido Tumoral).

### **CONFORMATION-SENSITIVE GEL ELECTROPHORESIS**

*CSGE*. Es una técnica molecular para detectar secuencias mutadas en una muestra de ADN. Se logra favoreciendo la denaturación de la doble hebra de ADN y luego favoreciendo la renaturación entre secuencias normales y entre secuencias mutadas. Esto se logra ver en un gel por las diferencias de corrido en la electroforesis.

### **CROMOSOMA**

Estructura física dentro del núcleo celular que consiste en ADN y proteínas.

### **EXON**

Secuencia de ADN codificante de un gen presente en el RNA mensajero (mRNA).

### **FAMILIAR**

Cuando una manifestación/fenotipo (ej. Enfermedad) ocurre con una mayor frecuencia en una familia en particular, que sobre una población en general. Esta predisposición familiar puede tener una causa genética o no.

### **FAMILIAR, HISTORIA**

Comprende los antecedentes de las relaciones genéticas dentro de una familia y las historias médicas de cada uno de sus miembros. Cuando se representa en forma de diagrama usando los símbolos y la terminología respectiva, es denominado, Pedigree o Árbol Familiar.

## **FENOTIPO**

Se denomina fenotipo a toda característica observable o detectable en un organismo, ya sea de tipo estructural, bioquímico, fisiológico o conductual, que resulta como una manifestación de la interacción entre su genotipo y el ambiente en el que se desarrolla.

## **FRAMESHIFT, MUTACIÓN**

*Mutaciones de corrimiento de marco de lectura.* Se refiere al tipo de mutación por inserciones o deleciones (de un número de bases NO múltiplo de tres), que cambia el marco de lectura del código genético. Este tipo de mutaciones, generalmente genera proteínas truncadas y no funcionales, por lo que en su gran mayoría son bastante deletéreas.

## **GEN**

La unidad básica de la herencia que ocupa un lugar en un cromosoma. Existen dos copias de cada gen, uno paterno y uno materno, que en general codifican proteínas específicas o segmentos de proteínas que tienen una determinada función dentro del organismo. Los genes contienen tanto regiones codificantes (Exones) como regiones no codificantes (Intrones).

## **GENÉTICA, CONSEJERÍA**

Consiste en un proceso de comunicación que tiene como objetivo asistir personas afectadas con alguna enfermedad de componente genético y/o con predisposición a ella, en cuanto al entendimiento de la historia natural de la enfermedad, los riesgos de la misma y el modo de transmisión en términos de herencia. Busca también, recomendar métodos de tamizaje, prevención secundaria y seguimiento en general con respecto a la enfermedad en el individuo afectado y su familia, así como, proveer herramientas para facilitar la toma de decisiones en aspectos tan delicados como tener hijos. Además a partir de la consejería genética se toman decisiones para el manejo integral y multidisciplinario de un paciente y su familia.

## **GENÉTICA, PREDISPOSICIÓN**

Se refiere a la elevada posibilidad de desarrollar una enfermedad en particular por presencia de una o más mutaciones genéticas y/o por historia familiar positiva que indique un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. Se refiere también a susceptibilidad genética a una enfermedad.

## **GENOTIPO**

Es el contenido genético (genoma) de un individuo, en forma de ADN (gen, genes), que junto con los factores ambientales determinan un fenotipo.

## **GERMLINE (LÍNEA GERMINAL)**

Se refiere a células de línea germinal, es decir, óvulos y espermatozoides.

### **HETEROCIGOTO, GENOTIPO**

Un genotipo heterocigoto es cuando los dos alelos (copias de un gen) de un locus en particular son diferentes. Uno de los dos alelos es mutado o raro y el otro no.

### **HOMOCIGOTO, GENOTIPO**

Un genotipo homocigoto es cuando los dos alelos (copias de un gen) de un locus en particular son iguales, ya sean los dos normales o mutados.

### **LOCI**

Se llama loci cuando se hace referencia a un par de locus de un gen en particular.

### **LOCUS**

El sitio físico o localización específica de un gen en un cromosoma. Puesto que en las células somáticas tenemos dos copias de cada gen, tenemos entonces dos locus por gen.

### **MICROSATÉLITES**

Segmentos repetitivos de ADN en regiones no codificantes del genoma (entre los genes o dentro de ellos como intrones). Son usados como marcadores en análisis de ligamiento debido a su gran variabilidad en el número de repeticiones entre individuos. Estas regiones son muy inestables y susceptibles a mutaciones.

### **MISSENSE, MUTACIÓN**

*Mutación con sentido o de sentido erróneo.* Consiste en un cambio de base puntual (sustitución) que altera el código genético al cambiar un aminoácido de la proteína final. El efecto de este tipo de mutación es variable, pues depende de las características fisicoquímicas del aminoácido sustituto, si son similares o muy diferentes del original.

### **MUTACIÓN**

Un cambio en la secuencia de ADN en un locus de un gen en particular. Estos cambios pueden ser deletéreos, beneficiosos o neutrales con respecto al efecto en el funcionamiento de una célula.

### **MUTACIONES, ANÁLISIS DE**

Un análisis de mutaciones comprende una serie de técnicas moleculares/genéticas para detectar ya sea una mutación específica, un set de mutaciones o un tipo de mutación.

### **NONSENSE, MUTACIÓN**

*Mutación sin sentido.* Consiste en una mutación puntual en la cual el cambio (sustitución) de un aminoácido por otro, genera un codón (tripleta de nucleótidos) de parada, es decir, un codón que no codifica para ningún aminoácido, generando una proteína truncada o incompleta y por tanto no funcional.

## **NUCLEÓTIDO**

Se define como una molécula formada por una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina en el ADN; adenina, guanina, uracilo o citosina en el RNA), un grupo fosfato y un azúcar desoxirribosa (ADN) o ribosa (RNA). Tanto el ADN (doble cadena) como el RNA (cadena sencilla), son macromoléculas formadas por muchos nucleótidos cuyo orden define el código genético para las diversas proteínas de un organismo.

## **PENETRANCIA**

La penetrancia es un término epidemiológico que se refiere a la probabilidad de que una condición se manifieste como resultado de un genotipo en particular. Se da en términos de porcentaje.

## **PÉRDIDA DE HETEROCIGOCIDAD**

*LOH*. Consiste en una pérdida de una de las dos copias de un gen o pérdida alélica. Este evento se produce por rearrreglos cromosómicos en donde hay pérdida de información genética. Puede ser muy deletéreo puesto que se altera la producción de una proteína, principalmente cuando la copia del gen que permanece está mutado o alterado.

## **POLIMORFISMO**

Se define polimorfismo a un cambio o “mutación” que tiene una frecuencia de al menos el 1% en la población de estudio.

## **PORTADOR**

Se llama portador, a un individuo que tiene un alelo deletéreo para una enfermedad autosómica recesiva que puede o no predisponer a la enfermedad al mismo individuo o a su descendencia.

## **PREDISPOSICIÓN, MUTACIÓN**

Una mutación de línea germinal que aumenta la susceptibilidad de un individuo a desarrollar una enfermedad, es decir, lo hace más susceptible.

## **PROBANDO**

Se llama probando al individuo de una familia a partir del cuál esta es estudiada por una enfermedad genética de comportamiento familiar o hereditario.

## **SÍNDROME DE CÁNCER HEREDITARIO**

Se usa este término para referirse a una patología de múltiples manifestaciones asociadas a una mutación(es) en uno o más genes que generan una importante susceptibilidad genética al cáncer.

## **SINGLE-STRANDED CONFORMATIONAL POLYMORPHISM**

*SSCP*. Una técnica molecular/genética de tamizaje de mutaciones que se basa primero en favorecer la denaturación de la doble hebra de ADN para luego

someter la muestra denaturada a una electroforesis en condiciones no denaturantes, lo que permite que las hebras sencillas adopten una determinada conformación estructural según su secuencia. Si hay alteraciones en la secuencia de alguna de las hebras (mutada), esta va a mostrar un patrón de corrido diferente al resto (normales). Este análisis previo permite identificar que muestras muestran anomalías y deben ser sometidas a un estudio más completo como secuenciación directa. Es muy útil para el estudio de mutaciones puntuales en genes de gran tamaño, puesto que permite ahorrar tiempo y costos.

### **TAMIZAJE, CÁNCER**

Es una serie de actividades que se realizan en la práctica clínica con el objetivo de detectar tempranamente la presencia de un determinado cáncer (en una persona asintomática o población en riesgo) y ofrecer mayores posibilidades de curación y/o sobrevida con calidad.

**TÍTULO\*: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN EL GEN BRCA1 EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA HEREDOFAMILIAR ATENDIDAS EN LOS SERVICIOS DE ONCOLOGÍA DE BUCARAMANGA**

**AUTORES:** SANABRIA MC. MD, VARGAS CI. MD. MSc.\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Cáncer de Mama Heredo/familiar, Gen BRCA1, Mutaciones de Línea Germinal, Epidemiología Molecular del Cáncer de Mama.

**RESUMEN: Introducción.** El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial y en Santander es la 1ra causa de morbi-mortalidad por cáncer en mujeres. Todo cáncer se considera una enfermedad genética y mutaciones en los genes BRCA1-2, confieren un riesgo de 60 a 80% para cáncer de mama. Este estudio se limitó a buscar las 2 mutaciones BRCA1 más reportadas según el BIC. **Objetivo.** Determinar la presencia de mutaciones específicas (185delAG, exon 2 y 5382insC, exon 20) en el gen BRCA1 en mujeres con cáncer de mama heredo-familiar, atendidas en los diferentes servicios de oncología de Bucaramanga. **Métodos.** La muestra incluyó 30 pacientes, de las cuales se obtuvo un consentimiento informado, un cuestionario dirigido y sangre venosa para los estudios moleculares, todo respectivamente codificado. El análisis molecular se realizó mediante PCR-Mismatch, para introducir o eliminar sitios de restricción, y digestión enzimática (*Hinfl* o *Ddel*). **Resultados.** No se hallaron las mutaciones que se estaban buscando en el gen BRCA1 en ninguna de las pacientes. **Conclusión.** Se requieren más estudios al respecto para hacer una mayor contribución al conocimiento de la epidemiología molecular del cáncer de mama en Bucaramanga, Santander. Este estudio pretende motivar a la comunidad científica para continuar con la investigación de los aspectos moleculares del cáncer de mama en pacientes de Bucaramanga, Santander con riesgo para la enfermedad, con el objeto de ofrecer un abordaje más integral, brindándoles de esta manera, mayores posibilidades de sobrevida, una mejor calidad de vida e incluso de curación.

---

\* Tesis

\*\* Facultad de Salud. Maestría Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Clara Inés Vargas Castellanos.

**TITLE\*:** MUTATIONAL ANALYSIS IN THE BRCA1 GENE IN WOMEN WITH FAMILIAL/HEREDITARY BREAST CANCER FOLLOWED IN SOME OF THE ONCOLOGY SERVICES IN BUCARAMANGA.

**AUTHORS:** SANABRIA MC. MD, VARGAS CI. MD. MSc.\*\*

**KEY WORDS:** Hereditary/Familial Breast Cancer, BRCA1 Gene, Germline Mutations, Molecular Epidemiology of Breast Cancer.

**SUMMARY: Background.** Breast cancer is considered a worldwide public health problem, and in Santander is the first leading cause of morbid-mortality by cancer in women. Every cancer is considered a genetic disease and mutations in BRCA1-2 genes arises the risk for breast cancer in 60 - 80%. This study just pretended to look for the two most frequent BRCA1 mutations reported in the BIC database. **Aim.** Determine the presence of specific mutations (185delAG, exon 2 and 5382insC, exon 20) in the BRCA1 gene, in women with familial/hereditary breast cancer followed in some of the oncology services in Bucaramanga. **Methods.** The sample included 30 patients and an inform consent, a questionnaire and a blood sample, all with the respective codes, were obtain. The molecular analysis was done with the PCR-Mismatch method, to insert or eliminate a restriction site, and an enzymatic digestion (*HinfI* or *DdeI*). **Results.** None of the specific mutations were found in this cohort of patients. **Conclusions.** More studies are needed about molecular epidemiology of breast cancer in Bucaramanga, Santander, in order to make a bigger contribution to this issue. This study pretends to make the scientific community to be interested in keep doing molecular studies about breast cancer in patients at risk for the disease in Bucaramanga, Santander, and therefore, being able to offer to the patients, more survival possibilities, a better quality of life and even healing of the disease.

---

\* Tesis

\*\* Facultad de Salud. Maestría Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Clara Inés Vargas Castellanos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La sociedad colombiana atraviesa por una época de grandes transformaciones sociales a nivel demográfico y epidemiológico, afectando la magnitud y la distribución de las causas de enfermedad. Estas transformaciones son la consecuencia de cambios, como son la disminución de la mortalidad por enfermedades infecciosas, la disminución de la fecundidad, el envejecimiento de la población, el surgimiento de enfermedades no transmisibles y crónicas (ej: cáncer), la violencia, la industrialización, una mayor educación y el mejoramiento de tecnologías médicas entre otros. Las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer en general se han incrementado en los últimos años. Con respecto a la mortalidad, los tumores malignos ocupaban el sexto lugar en 1960 (3,7%) y para el año 2000, se ubicaron en el tercer lugar con un 14,7% del total de muertes reportadas, después de enfermedades cardiovasculares y la violencia. (Hormiga C, et al. 2006)

Con respecto a la situación del cáncer de mama en el mundo, se considera un problema de salud pública, siendo la primera causa de morbilidad por cáncer en general, con un 22% (Parkin DM. 2004; Boyle P, et al. 2003; CDC. 2001) y la segunda causa de mortalidad por cáncer con un 15% en mujeres (Stewart SL, et al. 2004). La incidencia de cáncer de mama ha ido en aumento en USA pero la mortalidad ha disminuido, esto se podría explicar por la implementación de mejores métodos de tamizaje y tratamientos. (Stewart SL, et al. 2004; Edwards BK, et al. 2002; Ferlay et al, GLOBOCAN 2000-2002)

Según reportes de la Organización Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS), las tasas estimadas de incidencia ajustadas por edad con respecto al cáncer de mama y el cáncer cervicouterino en América Latina para el año 2000, fueron de 45,1 contra 30,9 respectivamente, mostrando una ligera variación para el año 2002, que reportó 46,0 contra 28,6. En América Latina, los países que mostraron mayores tasas de incidencia para cáncer de mama fueron Uruguay seguido de Argentina. (Ferlay et al, GLOBOCAN 2000-2002)

En Colombia, el Instituto Nacional de Cancerología (INC), estimó que para el periodo 1995-1999 se presentaron 61.641 casos nuevos de cáncer en general, de los cuales 33.504 correspondieron a mujeres. En mujeres la tasa de incidencia ajustada por edad (TAE) por 100000 habitantes para cáncer en todas las localizaciones (excepto piel) fue de 212,9 siendo el cuello uterino (36,8) y la glándula mamaria (30,0) las principales. La TAE por 100000 habitantes de la mortalidad por cáncer en todos los sitios (excepto piel) fue de 121,7 en mujeres, siendo los principales el cáncer de cuello uterino (18,4), estómago (15,9) y mama (12,4). (Piñeros M, et al. 2005)

A pesar que en Colombia en general, el cáncer de mama no parece ser la primera causa de morbilidad en mujeres como se observa a nivel mundial, en Cali no sucede lo mismo. Según el Registro Poblacional de Cáncer de Cali, la tasa de incidencia por cada 100000 habitantes en el periodo 1987-1991 para cáncer de mama fue de 45,7 y para cáncer cervicouterino fue de 42,6 (Rubiano J, et al. Online.2006). Así mismo, en Santander se observa este fenómeno según el nuevo Observatorio de Salud Pública de Santander. Este registro resalta que en Bucaramanga y Área Metropolitana entre el 2000 al 2004, la tasa de incidencia cruda promedio de cáncer de mama por cada 100000 habitantes fue de 32,6 y la del cáncer del cuello uterino fue de 19,8; y con respecto a la mortalidad por cáncer en mujeres en Santander, la tasa mediana de cáncer de mama por cada 100000 habitantes desde 1998 al 2005, fue de 11,1 y la del cáncer de cuello uterino fue de 10,3 en este mismo periodo. (Hormiga C, et al. 2006)

Siendo el cáncer una enfermedad genética, es importante estudiar las bases moleculares, alteraciones genéticas implicadas y su interacción con factores ambientales que contribuyen de alguna forma al desarrollo de esta enfermedad.

El cáncer entonces puede ser o no hereditario, y se caracteriza por la presencia de mutaciones en el ADN de las células de un tejido, que conllevan a la pérdida de control del ciclo celular y a la consecuente inmortalización celular por la proliferación ilimitada y la disregulación de la apoptosis, aspectos claves en la transformación tumoral de un tejido. (CNIO: <http://www.cnio.es/es/cancer/cap100.htm>; Zarate EG. Online, 1997; Romero K. 2004; Ringer DP, et al. Clinical Oncology)

Con respecto al cáncer de mama, se han identificado una gran cantidad de alteraciones genéticas relacionadas de baja y alta penetrancia, entre estas están la amplificación de oncogenes como c-myc y HER-2/neu, así como mutaciones en genes supresores de tumor de alta penetrancia. Aquellos que son de baja penetrancia dependen de su interacción con agentes ambientales, por tanto son los responsables de la mayoría de los cánceres de mama esporádicos. En contraste, los genes de alta penetrancia, siendo los más importantes el BRCA1(Miki Y, et al. 1994) y BRCA2 (Wooster R, et al. 1995), son los responsables de la mayoría de los cánceres de mama familiares/hereditarios. Se ha descrito en la literatura que del 5 al 10% de los cánceres de mama son hereditarios (Easton D, et al. 1993; Oesterreich S, et al. 1999; Honrado E, et al. 2005; Szabo CI, et al. 1997; Claus EB, et al. 1996; Kristensen VN, et al. 2000) y en este grupo de pacientes, la enfermedad se manifiesta en edades tempranas, de forma bilateral y asociado a cáncer de ovario (Marcus, et al. 1996). Mutaciones en los BRCA1 y 2, aumentan la probabilidad de sufrir cáncer de mama en un 60-85%; y a su vez incrementan la probabilidad de desarrollar cáncer de ovario, en un 40 a 60% si la mutación es en el gen BRCA1 y en un 10 a 30% si la mutación es en el gen BRCA2 (Brose MS, et. 2002; Thompson D, et al. 2002; Nathanson KN, et al.

2001; Lalloo F, et al. 2006), afectando, como ya se citó, a personas jóvenes y en edades productivas.

Del total de los cáncer de mama hereditarios el 80 al 90% se han relacionado con mutaciones BRCA en células de línea germinal (de Jong MM, et al. 2002), aunque es posible que esta asociación se haya sobreestimado ya que en recientes estudios como el que realizó Díez et al, 2003 en pacientes con Síndrome Cáncer de mama/ovario en España, se observó que las mutaciones BRCA estaban implicadas en general sólo en un 25% de las familias con alto riesgo, variando esta cifra según las características de cada familia, es decir, en familias con antecedentes de 3 personas con solo cáncer de mama, la frecuencia de estas mutaciones fue del 15%, en familias con más de 5 afectados con solo cáncer de mama fue del 25 al 35% y en familias con antecedentes de cáncer de mama y ovario la frecuencia aumentó al 45%. (Díez O, et al. 2003)

Se han identificado más de 600 mutaciones en cada uno de estos genes, lo que se debe al gran tamaño de los mismos, comprendiendo 24 regiones (22 codificantes y 2 no codificantes) en el gen BRCA1 y 27 regiones (26 codificantes y 1 no codificante) en el gen BRCA2. También es importante destacar la gran variabilidad con respecto al perfil mutacional de los genes BRCA en las diferentes poblaciones y grupos étnicos estudiados; ya que muchas de estas muestran una gran heterogeneidad mutacional en estos genes, mientras que en otras, unas pocas mutaciones con efecto fundador explican la mayoría de los casos de cáncer de mama heredo-familiar, mostrando ser más homogéneas; algunas de estas mutaciones pueden ser incluso compartidas entre poblaciones relacionadas.

Este estudio se limitó a buscar las 2 mutaciones reportadas con más frecuencia en el gen BRCA1, según la base de datos del BIC, en un grupo de mujeres con cáncer de mama de Bucaramanga, Santander con antecedentes de cáncer de mama, ovario y/u otro tipo de cáncer relacionado con mutaciones en el gen BRCA1. El objetivo de este estudio consiste en determinar la presencia de mutaciones específicas (185delAG, exon 2 y 5382insC, exon 20) en el gen BRCA1 en mujeres con cáncer de mama heredo-familiar, atendidas en los diferentes servicios de oncología de Bucaramanga.

El propósito de este estudio, es entonces, sensibilizar a la comunidad científica y médica con respecto a la importancia de estudiar los aspectos moleculares del cáncer de mama en la población de Bucaramanga, Santander, con el objeto de seguir abordando esta enfermedad, no solo desde el punto de vista clínico (*diagnóstico y tratamiento*), sino también desde la perspectiva de la prevención secundaria, relacionado directamente con el tamizaje molecular, identificando de esta manera la población de alto riesgo para la enfermedad (*portadores sanos de mutaciones BRCA1 y BRCA2*) y facilitando la creación de registros poblacionales/familiares en un futuro, en donde podamos tener a disposición las mutaciones más frecuentes en este grupo de pacientes; esto en últimas estará a

favor de lograr aumentar la sobrevivencia de los afectados, mejorando su calidad y productividad, ya que, conocer el perfil mutacional de un gen tan extenso como el BRCA1, en una determinada población, ayuda a optimizar el tamizaje molecular del mismo, haciéndolo más rápido y costo efectivo; permitiendo de esta manera, la implementación de medidas de prevención secundaria, protocolos de detección temprana y tratamientos en estadios tempranos de la enfermedad.

Más aún, en la actualidad están en estudio nuevas opciones terapéuticas basadas en las diferentes funciones de las proteínas BRCA1-2 y otras relacionadas como la proteína PARP1. (Venkitaraman AR. 2002; Khanna KK, et al. 2001; Farmer H, et al. 2005; Nguewa PA, et al. 2003; Bryant HE, et al. 2005) Estas nuevas opciones comprenden agentes quimioterapéuticos, como los Inhibidores de PARP1 y prometen ser menos tóxicos y más específicos ya que su acción está dirigida a la inducción de apoptosis en las células deficientes de las proteínas BRCA1-2 (Farmer H, et al. 2005; Nguewa PA, et al. 2003; Bryant HE, et al. 2005). Estos avances en la biología molecular del cáncer, solo pueden motivarnos a conocer más a fondo la problemática del cáncer de mama en nuestra población, teniendo en cuenta tanto los factores extrínsecos como intrínsecos relacionados y de esta manera tomar la mejor decisión, entre tantas, para cada caso en particular.

A nuestro conocimiento, este es el primer estudio sobre cáncer de mama heredo/familiar que pretende indagar sobre los aspectos genéticos relacionados, en nuestra población.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de mutaciones específicas en el gen BRCA1 en mujeres con cáncer de mama heredo-familiar, atendidas en los diferentes servicios de oncología de Bucaramanga.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1.** Determinar la presencia de la mutación 185delAG en el exón 2 del gen BRCA1, en mujeres con cáncer de mama heredo-familiar atendidas en Bucaramanga.

**2.2.2.** Determinar la presencia de la mutación 5382insC en el exón 20 del gen BRCA1, en mujeres con cáncer de mama heredo-familiar atendidas en Bucaramanga.

**2.2.3.** Describir las características clínicas, histopatológicas y sociodemográficas de las pacientes incluidas en este estudio y si es posible, relacionarlas con la presencia o ausencia de mutación.

### 3. MARCO TEÓRICO

En la siguiente revisión se va a tomar en consideración inicialmente aquellos aspectos relevantes con respecto a la glándula mamaria, comprendiendo las características anatómicas y su desarrollo fisiológico a lo largo de la vida en la mujer. Una vez detallado los aspectos “normales” de la glándula mamaria, se hace referencia a los aspectos relacionados con el desarrollo de malignidad en la misma, teniéndose en cuenta la historia natural de la enfermedad, los factores de riesgo asociados según la literatura, su clasificación clínica y diagnóstico precoz.

El principal propósito de esta revisión es sin embargo, proveer una amplia perspectiva que permita integrar a lo anteriormente mencionado, aquellos aspectos celulares, moleculares y genéticos relacionados con la patología mamaria maligna.

#### 3.1. GLÁNDULA MAMARIA

##### 3.1.1. Generalidades

###### 3.1.1.1. Embriología

Es una glándula sudorípara muy modificada. Desde la quinta a sexta semana embrionaria empieza su desarrollo. Inicia con la invaginación del ectodermo, a partir del cual se forman los alvéolos y conductos lactíferos, y del mesénquima del cual se deriva el tejido de soporte conjuntivo vascularizado (Schwartz S, et al. Cap 14.Vol 1. Edición 7.; Vinagre Martínez LM. AEC. Última Actualización 2004 – 2007)

###### 3.1.1.2. Anatomía

La glándula mamaria (**Figura 1**), localizada entre la fascia superficial y la fascia profunda del músculo pectoral mayor, consta de 15 a 20 lóbulos formados por tejido glandular de tipo tubuloalveolar, por tejido conjuntivo fibroso de sostén (ej: ligamentos de Cooper) y por tejido adiposo. Cada lóbulo esta formado por un conjunto de lobulillos y cada lobulillo a su vez por un conjunto de alvéolos que son considerados como la unidad anatómica y funcional de la glándula. Los alvéolos tienen una forma esférica y están conformados por células cúbicas secretoras de leche, células musculares y por una cavidad interna que se denomina lumen. Estas unidades esféricas drenan a túbulos, el conjunto de túbulos vecinos

desembocan a un conducto común drenando cada lobulillo, y el conjunto de estos últimos llegan finalmente a un conducto lactífero. Hay un conducto lactífero por cada lóbulo, estos conductos tienen de 2-4mm de diámetro y cada uno desemboca en un orificio del pezón. Además, cada conducto tiene un seno lactífero inmediatamente debajo de la areola que constituye un pequeño reservorio de leche materna. (Pardo G, et al. ENCOLOMBIA. Última Actualización en 1998; Schwartz S, et al. Cap 14.Vol 1. Edición 7.; Vinagre Martínez LM. AEC. Última Actualización 2004 – 2007) El pezón y la areola están recubiertos por un epitelio escamoso estratificado queratinizado, y sufre cambios de tamaño y pigmentación como se anotará más adelante (**Ver Fisiología y Desarrollo**). Fibras musculares hacen parte de este complejo (pezón-areola) y permiten la erección del pezón ante estímulos sensoriales y térmicos. La areola además contiene glándulas sebáceas, sudoríparas y otras areolares accesorias (tubérculos de Montgomery). En el pezón se ubican terminaciones nerviosas sensoriales y los corpúsculos de Meissner en las papilas dérmicas. La inervación sensorial de la mama, principalmente de la areola y pezón, es de gran importancia en los procesos neurohumorales relacionados con la eyección de la leche materna. (Schwartz S, et al. Cap 14.Vol 1. Edición 7.; Vinagre Martínez LM. AEC. Última Actualización 2004 – 2007)

**Figura 1 Anatomía de la Glándula Mamaria**



**Fuente:** [http://www.senosalud.org/images/cancerde\\_seno\\_f1.jpg](http://www.senosalud.org/images/cancerde_seno_f1.jpg)

**Irrigación.** Es principalmente por ramas perforantes de la arteria mamaria interna, ramas externas de las arterias intercostales posteriores y ramas de la arteria axilar. **Drenaje Venoso.** Se da principalmente por ramas perforantes de la vena torácica interna, tributarias de la vena axilar y ramas perforantes de las venas intercostales posteriores. **Inervación Sensorial.** Esta dada por las ramas cutáneas externa y anterior de los nervios intercostales del segundo al sexto. La piel de la porción superior de la misma, está inervada por las ramas anterior o

interna del nervio supraclavicular proveniente del plexo braquial. **Drenaje Linfático.** Se da por seis grupos principales: el grupo de la vena axilar, el mamario externo, el escapular, el central, el subclavicular y el interpectoral. El flujo de linfa se dirige en un 75% hacia los ganglios axilares y cabe resaltar además, que la vía linfática es precisamente la principal vía de metástasis del cáncer de mama, seguida de la vía hemática. (Schwartz S, et al. Cap 14.Vol 1. Edición 7.; Vinagre Martínez LM. AEC. Última Actualización 2004 – 2007)

### 3.1.1.3. Fisiología y Desarrollo

El entendimiento de los cambios físicos y fisiológicos a partir de la pubertad (menstruación), en el embarazo y menopausia a los cuales están sometidas las glándulas mamarias, permiten dilucidar mejor el efecto de factores endógenos (genéticos, hormonales, reproductivos) y exógenos (ambientales, dietarios, hormonales) en la malignización de este tejido.

El desarrollo de la mama se da desde sus inicios por diversos estímulos hormonales, como son: estrógeno, progesterona, prolactina, oxitocina, hormona tiroidea, cortisol y hormona del crecimiento. El estrógeno favorece el desarrollo de los conductos, la progesterona por su parte, participa en la diferenciación de las células epiteliales y el desarrollo lobulillar, y la prolactina se encarga de estimular la génesis láctea al final del embarazo y en el posparto, y favorece el desarrollo ductal y lobulillo-alveolar aumentando los receptores celulares estrogénicos. La regulación de la secreción de hormonas como estrógenos y progesterona por el tejido ovárico esta dada por pulsos de hormonas neurotrópicas (gonadotropinas) por la hipófisis anterior como son: LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo-estimulante), y la secreción de estas gonadotropinas, está regulada por la GnRH (Hormona liberadora de gonadotropinas) desde el hipotálamo. Un mecanismo de retroalimentación positiva y negativa, de la concentración sérica de estrógenos y progesterona, es el que regula la secreción de LH, FSH Y GnRH.

En una recién nacida, los niveles séricos de estrógenos y progesterona disminuyen y se mantienen así durante la niñez hasta la pubertad, momento en el cual ocurre un aumento del impulso central del hipotálamo con la consecuente secreción de GnRH y por tanto de LH y FSH, llevando a un aumento en la secreción ovárica de estrógeno y progesterona. Estos pulsos tienen un comportamiento cíclico y su inicio esta marcado principalmente con la menstruación. La mama alcanza su tamaño final a los 20 años, pero, como se hará referencia más adelante, esta sometida a cambios regulados por niveles hormonales fluctuantes característicos tanto en la etapa reproductiva de la mujer (ej: ciclos menstruales, embarazo, posparto), como en la no reproductiva (menopausia).

Los cambios del tejido mamario durante el ciclo menstrual, incluyen: aumento del volumen mamario durante la segunda mitad del ciclo (después del día 14 del ciclo

total de 28 días), que está dado primordialmente por un aumento de la nodularidad y densidad, haciéndolo particularmente sensible. La proliferación de las células epiteliales de la mama y morfogénesis de la mama, están reguladas positivamente por la acción de los estrógenos que actúan como un mitógeno favoreciendo la división celular, además de dirigir el desarrollo ductal durante la pubertad.

En el embarazo los estrógenos y la progesterona contribuyen en parte al crecimiento adicional de la mama junto con el lactógeno placentario y con la prolactina, esta última involucrada con la producción de leche materna. La asociación de estrógeno-progesterona regula la proliferación y cambios morfológicos del proceso de ramificación ductal y alveologénesis durante la madurez sexual y embarazo. Otros cambios de la mama durante el embarazo además del crecimiento de la glándula como tal, son, que la piel de la areola se oscurece y sus glándulas crecen y se tornan prominentes. Con el alumbramiento y en el consecuente posparto inmediato, los niveles de progesterona y estrógeno disminuyen, dándole protagonismo a la actividad lactógena de la prolactina. La oxitocina actuaría en la actividad contráctil responsable de la expulsión de leche.

En la posmenopausia, hay una disminución en la secreción ovárica de estrógenos y de progesterona que da lugar a bajos niveles séricos. Este fenómeno lleva a una involución del tejido glandular. El tejido se torna hipoplásico y con el envejecimiento se pierde el componente graso y de apoyo. (Pardo G, et al.1998; Schwartz S, et al. Edición 7.)

En conclusión, a partir de solo unas pocas células epiteliales del botón mamario en la niñez, surgen más células (proliferan), contribuyendo al desarrollo tanto anatómico y estructural de la glándula mamaria, como fisiológico en cada una de las etapas de la mujer, todo esto gracias a la acción mitogénica y estimulante del estrógeno y la progesterona.

Cabe resaltar que en la medida en que las células del tejido glandular estén sanas y bajo un riguroso equilibrio proliferación – apoptosis, las posibilidades de malignización son menores, pero si por algún motivo extrínseco (ambiental) o intrínseco (genético, adquirido o heredado) ocurre un daño celular, el riesgo de malignización del tejido glandular aumenta en la medida en que se pierde el equilibrio proliferación – apoptosis celular, como se explicara en la sección *Regulación del Ciclo Celular y Carcinogénesis*.

### **3.1.2. Patología Maligna de la Glándula Mamaria, Cáncer de Mama**

#### **3.1.2.1. Generalidades**

##### **3.1.2.1.1. Definición y Epidemiología.**

Tipo de cáncer que se desarrolla en la glándula mamaria, tanto en mujeres como en hombres, aunque en estos últimos es muy raro (1%). Como se hizo referencia anteriormente, es el cáncer más común en las mujeres y la segunda causa de mortalidad, en este mismo grupo, a nivel mundial.

Las tasas de mayor incidencia generalmente son reportadas en diferentes regiones de Estados Unidos, siendo en general la tasa de incidencia (TAE) por cada 100000 habitantes de 91.4 en el año 2000 y 101.1 en el año 2002 (Ferlay et al, Globocan 2000-2002). En Europa, para el año 2000 se mostró la más alta tasa de incidencia (TAE) por cada 100000 habitantes en Holanda con 91.6, siguiendo en orden descendente Dinamarca con 86.2, Francia con 83.2, Bélgica con 82.2 y Suecia con 81.0 (Tyczynski J, et al. 2002). En general las tasas más bajas se reportan en países poco desarrollados y de pocos recursos, posiblemente por un pobre tamizaje y la falta de registros adecuados (Boyle P, et al. 2003). Los países del continente Americano con las más bajas tasas de incidencia (TAE) por cada 100000 habitantes para el año 2000 fueron: Nicaragua con 23.1 y Haití con 4.7 en Centroamérica, y Surinam con 29.7 y Bolivia con 26.6 en Suramérica (Ferlay et al, Globocan 2000-2002); mientras que en Europa para ese mismo año fueron Macedonia con 38.7, Lituania y Belarus con 39.8 cada uno y Latvia con 42.2 (Tyczynski J et al. 2002). A su vez, India, Korea, China y Tailandia han mostrado tasas de incidencia (TAE) bajas que van desde 7 a 20 por 100000 habitantes. (Boyle P, et al. 2003)

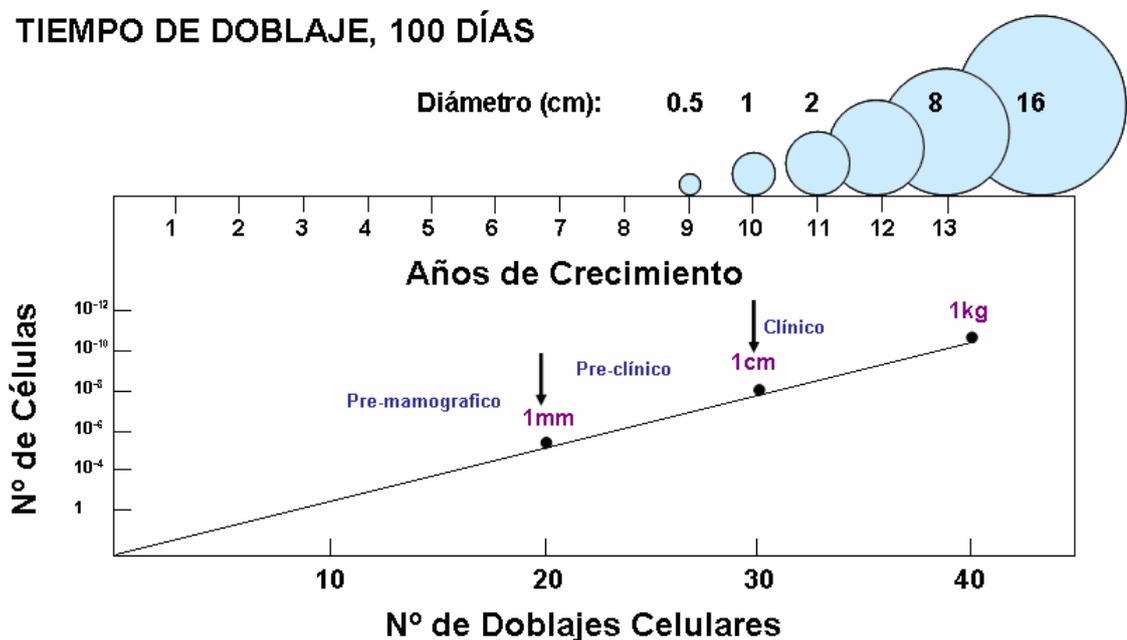
En Colombia, como se anotó antes, el cáncer de mama se ubicó como la segunda causa de morbilidad por cáncer en mujeres, después del cáncer de cérvix, en el periodo de 1995-1999. Según reportes de la Unidad de Oncología del Hospital Universitario Ramón González Valencia, para el periodo de 1990-1995, la morbilidad por cáncer de mama en Santander fue de 19,7%, siendo la segunda causa de morbilidad por cáncer en mujeres (Castro MA, et al. 2000), y para el periodo de 1996-1999, la incidencia del cáncer de mama en Bucaramanga fue de 23,7 x 10000, siendo la primera causa de cáncer en mujeres, mientras que el cáncer de cérvix mostró una incidencia más baja (20,0 x 10000) (Mantilla A, et al. 2006). Este mismo comportamiento, en donde el cáncer de mama tiene una mayor tasa de incidencia que el cáncer de cérvix, se evidenció durante el periodo de el 2000 al 2004, según el Observatorio de Salud Pública de Santander, como se referenció antes (Hormiga C, et al. 2006).

### **3.1.2.1.2. Historia Natural del Cáncer de Mama.**

Se acepta que la historia natural de la enfermedad, tanto en términos de tiempo de desarrollo de la misma, como en términos de la agresividad para definir estadios tempranos o tardíos, está estrechamente relacionada con la tasa de crecimiento del tumor, que se asume es constante y exponencial. La estimación de la tasa de crecimiento de un tejido tumoral se define con respecto al tiempo que tarda el tumor en doblar su tamaño (Gershon-Cohen J, et al. 1963; Gullino PM, et al.

1977). Investigadores han planteado a partir de estudios observacionales, una clasificación para el cáncer de mama en base al tiempo de doblaje del tumor. Se ha designado como tumor rápido, aquél que tiene una tasa de doblaje menor a 75 días, intermedio de 75 a 150 días y lento cuando la tasa de doblaje es mayor a 150 días (Gershon-Cohen J, et al. 1963). Por tanto, un tumor de mama con un tiempo de doblaje de 100 días, se considera de crecimiento intermedio, refiriéndose a que tarda 100 días en doblar su tamaño inicial. Si tomamos como tamaño inicial a una (1) célula maligna, a partir de la cuál se desarrollará el tejido tumoral, quiere decir que pasarán al menos 10 años para que este tejido alcance un tamaño de 1cm y sea clínicamente palpable (**Figura 2**). Con la mamografía es posible detectar masas no palpables desde 0.5cm de diámetro (tamaño que se alcanza desde los 8 a 9 años), dependiendo de la técnica radiográfica como tal, así como de la experticia del radiólogo, entre otros (Rubiano J, et al. Proyecto ISS-Ascofame, Online 2006). Por todo lo anterior, sumado a otros aspectos como la densidad mamaria variable, la poca sintomatología y los limitados métodos de tamizaje y detección temprana disponibles en el momento, hacen del cáncer de mama, un verdadero problema de salud pública a nivel mundial, como se evidencia en los muchos estudios epidemiológicos reportados hasta la fecha, puesto que no hay hasta el momento un mejor método para detectar la enfermedad en estadios tempranos.

**Figura 2 Modelo de la Historia Natural del Cáncer de Mama.**



Fuente: Gullino P M. 1977.

### 3.1.2.1.3. Factores de Riesgo.

Como se ha expuesto anteriormente, el cáncer en términos generales, incluyendo por supuesto el cáncer de mama, es una enfermedad multifactorial y una gran variedad de factores se han relacionado con incrementar el riesgo de desarrollarla. Se han descrito como factores de riesgo para el cáncer de mama, aquellos que tienen que ver con la edad, la historia reproductiva, los antecedentes familiares de cáncer de mama y/o ovario principalmente, que están relacionados con factores hereditarios y genéticos, el uso de hormonas exógenas y otros factores de tipo ambiental.

En términos generales, aspectos ambientales y del estilo de vida, hormonales ya sean endógenos o exógenos, hereditarios y la edad, son factores que asociados favorecen en primera instancia la aparición de cambios genéticos en una célula y la supervivencia y proliferación de la misma.

El riesgo para cáncer de mama se incrementa con la edad hasta la menopausia, lo que sugiere un componente de tipo hormonal. Después de la menopausia, se ha descrito que en algunos países puede, ya sea o disminuirse el riesgo o se mantenerse. Mientras que en Colombia la tasa de incremento edad específica, es muy baja después de los 45 años, en USA el riesgo continúa aumentando nuevamente después de los 75 años, lo que tiene que ver más con la longevidad de las células en una persona de edad avanzada y con el gran acumulo de errores en el material genético de las mismas. (Hulka BS, et al. 2001 referenciado por: Dumitrescu RG, et al. 2005)

El factor de riesgo hormonal (endógeno y/o exógeno), es un actor importante en el desarrollo del cáncer de mama, ya que una vez se adquieren cambios genéticos en una célula del tejido mamario, por factores ambientales y/o hereditarios, los estrógenos y progestágenos que permanentemente están actuando sobre la mama, ejercen una actividad estimulante para el crecimiento y de proliferación del tejido, incluyendo a aquella célula alterada. La menarca temprana <11 años, la menopausia tardía >54 años, la nuliparidad o primer embarazo tardío y la poca lactancia, se han relacionado con una mayor exposición del tejido mamario al efecto mitogénico de estrógenos y progestágenos endógenos. Así mismo, el consumo de hormonas exógenas en forma de anticonceptivos o como terapia de reemplazo hormonal, se han relacionado con el incremento del riesgo para cáncer de mama. (Dumitrescu RG, et al. 2005; McPherson K, et al. 2000; Veronesi U, et al. 2005)

Factores ambientales, como la exposición a radiación ionizante, y factores asociados con el estilo de vida, como la dieta rica en grasas, el consumo de alcohol y el sedentarismo, también se han relacionado con un incremento del riesgo para cáncer de mama.

La historia familiar puede reflejar un gran componente hereditario en la patogénesis del cáncer de mama, por lo cual se ha considerado como el factor de

riesgo más importante para la enfermedad. *(En la Tabla 1, se muestran todos aquellos factores de riesgo descritos en la literatura con sus respectivos RR para la enfermedad, y algunas características de los mismos)*

**Tabla 1 Factores de Riesgo Descritos en la Literatura, con sus Respective RR (Riesgo Relativo) y Grupo en Riesgo.**

<b>FACTORES DE RIESGO PARA CÁNCER DE MAMA, ESTABLECIDOS Y PROBABLES</b>		
<b>FACTOR DE RIESGO</b>	<b>RIESGO RELATIVO</b>	<b>GRUPO DE ALTO RIESGO</b>
<b>EDAD</b>	>10	Vejez
<b>LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA</b>	5	Países Desarrollados
<b>EDAD DE LA MENARCA</b>	3	Antes de los 11 años
<b>EDAD DE LA MENOPAUSIA</b>	2	Después de los 54 años
<b>EDAD DEL 1<sup>ER</sup> EMBARAZO COMPLETO</b>	3	A los 40 años o después
<b>HISTORIA FAMILIAR</b>	Igual o >2	1 antecedente de cáncer de mama en 1 <sup>o</sup> <50 años*
<b>ENFERMEDAD BENIGNA PREVIA DE LA MAMA</b>	4 - 5	Hiperplasia Atípica
<b>CÁNCER DE MAMA PREVIO</b>	>4	
<b>ESTRATO SOCIOECONÓMICO</b>	2	Alto Estrato
<b>DIETA</b>	1.5	Alto consumo de grasas saturadas
<b>PESO CORPORAL:</b> Pre-menopausia Post-menopausia	0.7 2	IMC >35 IMC >35
<b>CONSUMO DE ALCOHOL</b>	1.3	Consumo excesivo
<b>EXPOSICIÓN A RADIACIONES IONIZANTES</b>	3	Gran exposición en niñas >10 años
<b>INGESTA DE HORMONAS:</b> Anticonceptivos Orales Terapia de Reemplazo Hormonal	1.24 1.35	Uso constante Uso por >10 años
* El riesgo aumenta de 4-6 si son 2 los antecedentes de cáncer de mama en 1 <sup>er</sup> grado (1<50 años). <b>IMC</b> (Índice de Masa Corporal)		

Fuente: McPherson K, et al. 2000; Veronesi U, et al. 2005; Dumitrescu RG, et al. 2005.

#### 3.1.2.1.4. Clasificación.

**(En Cuadro 1, se exponen las principales clasificaciones con respecto al cáncer de mama, que además son útiles para la asignación del estadio de este cáncer en el momento del diagnóstico y seguimiento).** En el grado histológico (histopatológico) se tiene en cuenta ciertos aspectos propios del tejido tumoral vistos al microscopio, como son: la formación tubular, pleomorfismo nuclear y número de mitosis, y para cada uno de los anteriores caracteres, se da una puntuación de 1 a 3 según la modificación de Nottingham al sistema de Scarff-Bloom-Richardson; luego se suman y se obtiene una puntuación final que permite clasificar el grado histológico de un tumor como bien, moderadamente o mal diferenciado en orden ascendente. (Schwartz S, et al. Edición 7; Palacios J. I Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Última Actualización el 1 Junio de 1997). En cuanto mayor es la desdiferenciación de un tejido, mayor es su potencial maligno y agresivo, puesto que adquieren un comportamiento de tipo embrionario, que se traduce en un aumento en la tasa de proliferación y expansión clonal. La ya conocida y útil clasificación TNM, facilita hacer una evaluación local del cáncer de mama, con respecto al tamaño del tumor y su extensión, y también permite tomar en consideración el compromiso ganglionar y metastático. Esta clasificación se ve simplificada por etapas como lo muestra el cuadro 1. Con respecto a la histopatología, se destacan los principales que son el carcinoma in situ e invasor tanto del tipo ductal como lobulillar.

### **3.1.2.1.5. Diagnóstico Precoz del Cáncer de Mama.**

Lastimosamente, teniendo en cuenta la etiología del cáncer de mama y su historia natural, no es apropiado hablar de prevención del cáncer de mama para la población en general. Sin embargo, en pacientes de alto riesgo por historia familiar y/o por ser portador de mutaciones en alguno de los genes de alta penetrancia para la enfermedad, como los BRCA, existen métodos descritos como preventivos. Los métodos de prevención para pacientes de alto riesgo incluyen: la mastectomía profiláctica bilateral en portadores asintomático (Schrag D, et al. 1997; Hartmann L, et al. 1999; Meijers-Heijboer H, et al. 2001; Nelson HD, et al. 2005), la mastectomía contralateral profiláctica en pacientes con cáncer de mama previo (Vasen HFA, et al. 2005) y la ooforectomía bilateral (Rebeck TR, et al. 2002; Nelson HD, et al. 2005). El uso de tamoxifeno se ha empleado sobretodo como método de prevención secundaria (Fisher B, et al. 1998; Nelson HD, et al. 2005). A su vez, en pacientes de alto riesgo se hace necesario implementar medidas de tamizaje más rigurosos y desde edades más tempranas, para la detección oportuna del cáncer de mama. En un estudio comparativo con respecto a la sensibilidad y especificidad de 4 diferentes métodos de detección temprana en pacientes portadores de mutaciones BRCA sometidos a exámenes de tamizaje anuales (1 a 3), incluyendo Imágenes por Resonancia Magnética (RMI), Mamografía, Ecografía y Examen Clínico de la Mama cada 6 meses, se determinó que la RMI fue el método más sensible en comparación con los demás (sensibilidad 77% y especificidad 95.4%). La mamografía tuvo una sensibilidad del 36% y especificidad del 99.8%, la ecografía 33% y 96%, y el examen clínico de

la mama 9% y 99.3%, respectivamente. En ese mismo estudio, se reportó que el uso de la RMI, Mamografía y Ecografía combinados mejoró la sensibilidad (95%) (Warner E, et al. 2004, referenciado por: Nelson HD, et al. 2005).

**Cuadro 1 Clasificaciones del Cáncer de Mama.**

MANUAL PARA ASIGNAR LA ETAPA DEL CÁNCER DE MAMA		TIPO HISTOPATOLÓGICO			
<b>DEFINICION DE TNM</b>		Carcinoma, NOS (no especificado de otra manera)			
<b>Tumor primario (T)</b>		Ductal			
TX	No es posible valorar tumor primario	Intraductal ( <i>in situ</i> )			
T0	No hay pruebas de tumor primario	Invasor con componente intraductal predominante			
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : carcinoma intraductal, carcinoma lobulillar <i>in situ</i> o enfermedad de Paget del pezón sin tumor	Invasor, NOS			
T1	Tumor de 2 cm o menor en su dimensión mayor	Comedón			
T1a	0.5 cm o menos en su dimensión mayor	Inflamatorio			
T1b	Más de 0.5 cm pero no más de 1 cm en su dimensión mayor	Medular con infiltrado linfocítico			
T1c	Más de 1 cm pero no más de 2 cm en su dimensión mayor	Mucinoso (coloide)			
T2	Tumor de más de 2 cm pero no más de 5 cm en su dimensión mayor	Papilar			
T3	Tumor de más de 5 cm en su dimensión mayor	Escirro			
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared o la piel del tórax	Tubular			
T4a	Extensión a la pared del tórax	Otros			
T4b	Edema (incluso piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama o nódulos cutáneos satélite limitados a la misma mama	Lobulillar			
T4c	Ambos (T4a y T4b)	<i>In situ</i>			
T4d	Carcinoma inflamatorio (véase la definición de carcinoma inflamatorio en la introducción)	Invasor con componente predominante <i>in situ</i>			
<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>		Invasor			
NX	No es posible valorar ganglios linfáticos regionales (p. ej., extirpados previamente)	Del pezón			
N0	No hay metástasis en ganglios linfáticos regionales	Enfermedad de Paget, NOS			
N1	Metástasis a ganglio(s) linfático axilar ipsolateral móvil	Enfermedad de Paget con carcinoma intraductal			
N2	Metástasis a ganglio(s) linfático axilar ipsolateral fijo a otra(s) estructura(s)	Enfermedad de Paget con carcinoma ductal invasor			
N3	Metástasis a ganglio(s) linfático mamario interno ipsolateral	Otros			
<b>Metástasis distante (M)</b>		Carcinoma indiferenciado			
MX	No es posible valorar la presencia de metástasis distantes	<b>GRADO HISTOPATOLÓGICO (G)</b>			
M0	No hay metástasis distantes	GX No es posible valorar el grado			
M1	Metástasis distantes [incluye metástasis a un (o unos) ganglio linfático supraclavicular ipsolateral]	G1 Bien diferenciado			
		G2 Moderadamente diferenciado			
		G3 Mal diferenciado			
		G4 Indiferenciado			
		<b>AGRUPAMIENTO DE LA ETAPA</b>			
		Etapa 0	Tis	N0	M0
		Etapa I	T1	N0	M0
		Etapa IIA	T0	N1	M0
			T1	N1*	M0
		Etapa IIB	T2	N0	M0
			T2	N1	M0
		Etapa IIIA	T3	N0	M0
			T0	N2	M0
			T1	N2	M0
		Etapa IIIB	T2	N2	M0
			T3	N1	M0
			T3	N2	M0
		Etapa IV	T4	cualquier N	M0
			cualquier T	N3	M0
			cualquier T	cualquier N	M1

**Fuente:** Beahrs OH, et al. Edición 4, referenciado por: Schwartz S, et al. Edición 7.

Para la población en general, afectada en su mayoría por cáncer de mama esporádico, no existen métodos de prevención, por lo tanto, las esperanzas se centran en hacer un diagnóstico precoz de la enfermedad, idealmente en estadíos in situ, en donde no ha habido aún una diseminación a ganglios ni a otras localizaciones distantes, y el cáncer es aún muy localizado. Esto es importante, ya que permite dar un tratamiento oportuno, que sea entonces más efectivo en términos de prolongar la sobrevivida de los afectados e incrementar las posibilidades de curación (Vázquez T, et al. 2005).

## 3.2. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y CARCINOGENESIS

### 3.2.1. Ciclo Celular y su Regulación

#### 3.2.1.1. Generalidades

La reproducción es una característica fundamental de todos los organismos vivos, incluyendo la célula (unidad fundamental de la vida). Al igual que un organismo vivo (plantas, animales y humanos), la célula tiene un periodo de vida limitado que esta regulado por diferentes mecanismos que garantizan la integridad de la misma en cuanto a su genoma y por tanto, su funcionamiento. El buen desempeño de las células de un tejido, permiten la conservación del mismo como parte de un órgano, garantizando el buen funcionamiento de este dentro de un sistema fisiológico en un organismo vivo. La vida de la célula consta de varios ciclos conocidos como "Ciclos Celulares"; el promedio de ciclos que alcanza una célula durante su vida, son aproximadamente 50, comprendiendo cada uno de estos dos (2) grandes fases, *la Interfase*, en la que el material genético se encuentra unido a proteínas pero no condensado y que abarca G1, S y G2, y *la Mitosis* como tal, en la que el material genético es condensado en forma de cromosomas. (**Figura 3**)

Partiendo de la base que el éxito del ciclo celular depende de los siguientes principios: unidireccionalidad (regulado por la actividad de las kinasas), irreversibilidad (regulado por la disponibilidad de las ciclinas y actividad del los complejos ciclina-cdk's) y adaptabilidad (dependiendo de factores externos a la célula, es decir del tejido donde se encuentra), se hace necesario que exista una serie de eventos que garanticen el cumplimiento de los mismos. Estos eventos se han descrito como puntos de control del ciclo celular (**Figura 4**), en los cuales participan un gran número de proteínas con actividad proto-oncogénica y supresora de tumor que regulan, directamente y en conjunto, los procesos de proliferación celular, reparación del ADN, supervivencia, senescencia y apoptosis. Existen tres puntos de control básicos a lo largo del ciclo celular, que serán descritos a continuación junto con cada una de las fases del ciclo:

## Interfase

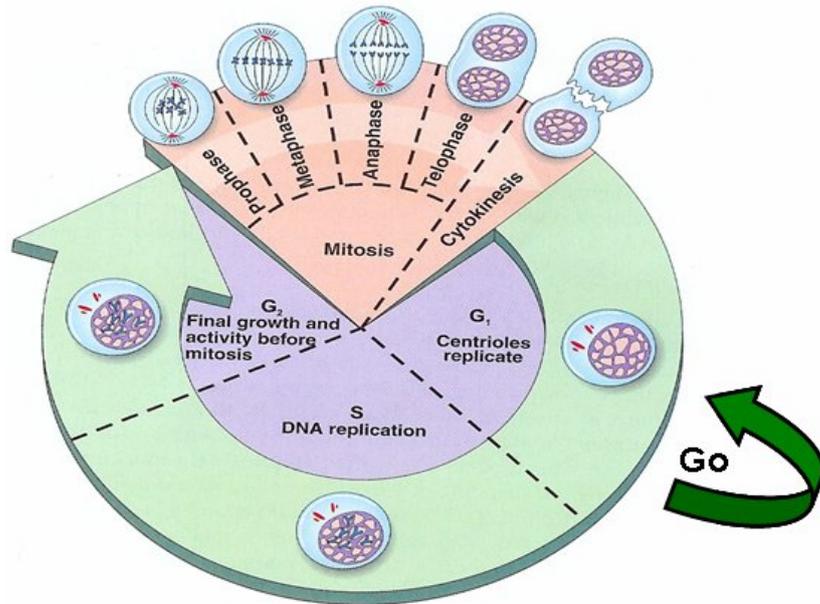
**Fase G1 (Gap = Intervalo 1):** esta es la primera fase del ciclo celular, en el cual la célula “nace y crece de tamaño”. La célula se considera metabólicamente activa y en continuo crecimiento. El ADN es interfásico, como se mencionó anteriormente, lo que permite que se lleven a cabo procesos de transcripción de genes que codifican para proteínas necesarias para pasar a la siguiente fase de Síntesis de ADN o Replicación, y completarla (ej. Ciclinas, Kinasas, DNA Polimerasa, Helicasas, etc...). La duración de esta fase es de 11 horas aproximadamente y la carga genética es  $n$  (equivalente a 23 cromosomas). En esta fase existe un punto de control (**Punto de Control en G1 o R**), en el cuál la célula revisa las condiciones del ambiente en el que se encuentra, de manera que sean favorables para dar origen a más células hijas. **Fase G0:** esta se encuentra al final de la fase G1, antes de la fase S, y es en realidad un “estado quiescente”, en el cual la célula no crece ni puede avanzar en el ciclo celular para la síntesis del ADN, a menos que reciba una señal que así lo indique, pero es metabólicamente activa. Es el caso de las neuronas que son células muy activas pero se dividen muy poco, es decir, permanecen en estado G0 o de “reposo”. **Fase S:** en esta fase se lleva a cabo la replicación, síntesis o duplicación del ADN. Este proceso debe ser muy controlado y fiel, para garantizar que las dos células hijas resultantes de una célula, sean idénticas a esta. La fase S tiene una duración de 8 horas aproximadamente y la carga genética es de  $2n$  (equivalente a 23 Pares de cromosomas), y así se mantiene hasta el final de la mitosis antes de la división celular. **Fase G2 (Gap = Intervalo 2):** en esta etapa, continúa el crecimiento celular y se sintetizan proteínas necesarias para entrar en la siguiente fase de mitosis y culminarla. Esta fase tiene una duración de 4 horas aproximadamente. Al final de esta etapa, se encuentra otro punto de control (**Punto de Control G2-M**), en el cuál la célula revisa que el material genético haya sido copiado de forma correcta y fiel durante la fase S y que no existan errores en el nuevo material sintetizado. Además, la verificación de las condiciones ambientales apropiadas para continuar con el proceso, se hace necesario antes de entrar a la fase de división celular como tal.

## Mitosis (Fase M)

La fase de mitosis consiste en la repartición equitativa y por tanto conservada del material genético duplicado a cada una de las células hijas, (2), resultantes de una división celular, de manera que estas sean idénticas a su progenitora en cuanto a la información genética se refiere. La fase de mitosis tiene varios pasos que incluyen la profase, metafase, anafase y telofase, y culmina con la citocinesis (separación de las células hijas), para dar comienzo a un nuevo ciclo. Esta fase tiene una duración total de 1 hora. En la metafase hay un último punto de control (**Punto de Control M**), en el cuál una serie de proteínas detienen el ciclo hasta verificar que todos los cromosomas están completamente alineados y unidos al huso acromático, de esta manera se garantiza la repartición equitativa de los

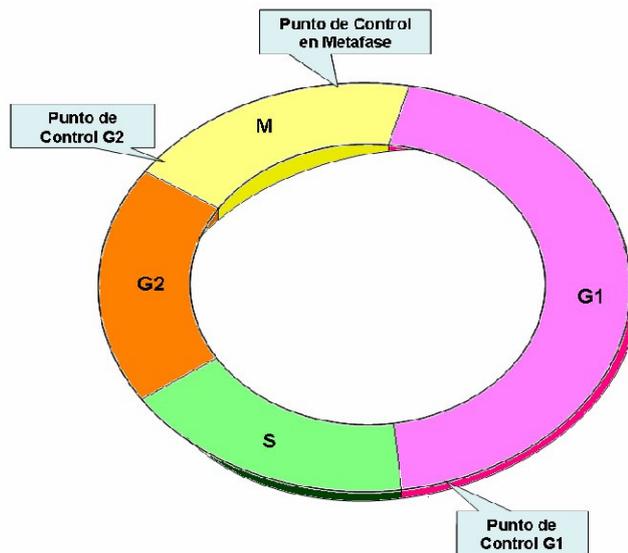
cromosomas a cada una de las células hijas, es decir, cada célula queda con una carga genética de  $n$ , y lista para iniciar un nuevo ciclo.

**Figura 3 Fases del Ciclo Celular.**



**Fuente:** Núñez R, et al. UNAM.  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/embrio/Archivos/Docencia/CicloCel.pdf>.

**Figura 4 Puntos de Control del Ciclo Celular.**



**Fuente:** Realizado por el autor.

Como se referenció antes, la fidelidad del proceso de división celular debe ser regulada. Esta regulación consiste en la detención del ciclo celular para: reparar el ADN, esperar hasta que mejoren las condiciones en su microambiente, o para inducir apoptosis. Estos procesos regulatorios se activan precisamente en los puntos de control mencionados anteriormente. Por ejemplo, cuando existe un daño genético en una célula, por medio de la actividad de la proteína p53, gen supresor de tumor conocido como el guardián del genoma, se llevan a cabo una serie de eventos que involucran la activación e inactivación de otros genes (proto-oncogenes y genes supresores) por medio de fosforilación o inhibición estequiométrica, con el objeto de generar inicialmente un bloqueo del ciclo y favorecer la reparación del material genético. Una vez reparado el daño, proceso en el cual intervienen más proteínas, incluyendo las BRCA1-2, se da vía libre al ciclo celular. En caso de no ser posible la reparación, por la misma vía de la p53, se activa el mecanismo de muerte celular programada (apoptosis) permitiendo que esta célula se suicide, por el bien del tejido en el que se encuentra, pues es la única manera de garantizar la conservación y el buen funcionamiento del mismo. Igualmente, cuando por ejemplo no hay suficientes nutrientes o espacio para las futuras células, el proceso de ciclo celular se detiene hasta nueva orden.

Entonces, el control del ciclo celular debe ser positivo y negativo, es decir, deben haber factores que estimulen la proliferación, así como factores que la inhiban o bloqueen hasta resolver algún impase. Además, también debe haber un control positivo y negativo de la muerte celular, que permita la eliminación de células dañadas y potencialmente lesivas para un tejido, así como la supervivencia de una célula necesaria, en presencia de un micro ambiente no muy favorable. Los mecanismos de regulación del ciclo celular no solo son positivos y negativos, sino también son intracelulares y extracelulares, como se anotará mas adelante. (Cooper G, Edition 2. 2000; Park M, et al. 1998; Dash B, et al. Vol 1.; Tapon N, et a. 2001; Núñez R, et al. UNAM. Última Actualización el 2 de Oct de 2007; Foster I. 2007. in press; Gasco M, et al. 2002)

### **3.2.1.2. Mecanismos de Control del Ciclo Celular**

Los mecanismos de control intracelulares y extracelulares, tanto para proliferación, bloqueo y apoptosis, están estrechamente ligados e interrelacionados (**Figura 5**), permitiendo la coordinación de estas actividades mediante la señalización desde la misma célula como desde fuera de ella según la situación.

#### **3.2.1.2.1. Regulación Intracelular de la Proliferación.**

Estudios han revelado que el ciclo celular en eucariotas es regulado por un set de proteínas kinasas conservadas que al ensamblarse con proteínas tipo ciclinas, forman complejos de ciclina-kinasas CDK's (**Figura 6**) y se activan (esta activación debe ser potenciada por otro complejo con actividad kinasa CAK, mediante fosforilación), promoviendo la proliferación celular. (**En el Cuadro 2, se listan los**

**complejos ciclina-quinasas que participan en las diferentes fases del ciclo celular).** Estos complejos pueden ser inactivados por: **1. Fosforilación** (ej: La *kinasa Wee1* fosforila al complejo MPF, Factor Promotor de Maduración formado por la ciclina B y la *kinasa cdc2 (o cdk1)* en la fase S-G2, inhibiéndolo; este efecto es contrarrestado por la *fosfatasa cdc25* que elimina los grupos fosfatos inhibitorios del complejo para activarlo y dar paso a la mitosis), **2. CKI's, proteínas inhibitorias de CDK's (en el Cuadro 3, se nombran las familias de proteínas inhibitorias de complejos, sus blancos y las fases del ciclo donde actúan),** que ejercen un impedimento estequiométrico alterando la actividad *kinasa* del complejo (ej: *p21* de la familia CIP/KIP de las CKI's, inhiben la actividad del complejo formado por la ciclina D y la *kinasa 4* en G1), y **3. Por la acción proteolítica** que requiere primero la *ubiquitilación* de la proteína blanco (CDK's) para que posteriormente un complejo enzimático, *El Proteosoma*, degrade la proteína (ej: al final de la mitosis se requiere la degradación del complejo MPF, acción que es efectuada por la vía *ubiquitina-proteosoma*, dando paso a la *citokinesis* y a un nuevo ciclo celular). **(Figura 7)**

Las *quinasas* son la subunidad enzimática del complejo, son de varios tipos (*cdk 1, 2, 4 y 6*), se encuentran disponibles a lo largo del ciclo celular pero de forma inactiva y son dependientes de *ciclinas*, de ahí su sigla *Cdk* (*kinasa Dependientes de Ciclinas*). Las *ciclinas* son la subunidad estructural del complejo, también son de varios tipos (*A, B, D y E*), y como su nombre lo dice, están disponibles de manera cíclica. En cada fase del ciclo celular, se van sintetizando solo aquellas *ciclinas* compatibles con determinadas *quinasas*, para activarlas, y de esta manera formar los complejos *Ciclina-Cdk's* necesarios para avanzar y completar la siguiente fase del ciclo celular. Al final de cada fase, el sistema de regulación del ciclo celular se encarga de degradar, por la vía *ubiquitina-proteosoma*, la *ciclina* del complejo y de esta manera, evitar la posibilidad de repetir una fase en un mismo ciclo, garantizando de esta forma la *unidireccionalidad*, *irrevesibilidad* y *éxito* del ciclo. (Alberts B, et al. 2002. Edition 4.; Núñez R, et al. UNAM. Última Actualización el 2 de Oct de 2007; Cooper G, Edition 2. 2000; Park M, et al. 1998; Dash B, et al. Vol 1; Foster I. 2007. in press)

#### **3.2.1.2.1.1. Maquinaria de Proliferación Celular. (Complejos *Ciclina-Cdk's*)**

El motor de la proliferación celular son los complejos de *Ciclina-Kinasas (c-cdk's)*. Por ejemplo en G1, se hace necesario activar la transcripción de proteínas necesarias para la fase S. Para esto los complejos de *Ciclina D-Cdk 4* o *Ciclina D-Cdk 6*, ejercen su actividad *kinasa*, o de *fosforilación*, sobre *Rb*, un gen supresor de tumor muy conocido, para inactivarlo. En su estado activo, la proteína *Rb* se encuentra *hipofosfatada* y reteniendo a proteínas de la familia de factores de transcripción *E2F*. Por lo tanto, cuando la señal de proliferación se hace evidente en G1, los complejos de *ciclina-quinasas*, propios de esta fase, fosforilan a *Rb* y lo inactivan, quedando entonces libres los factores de transcripción *E2F*, que

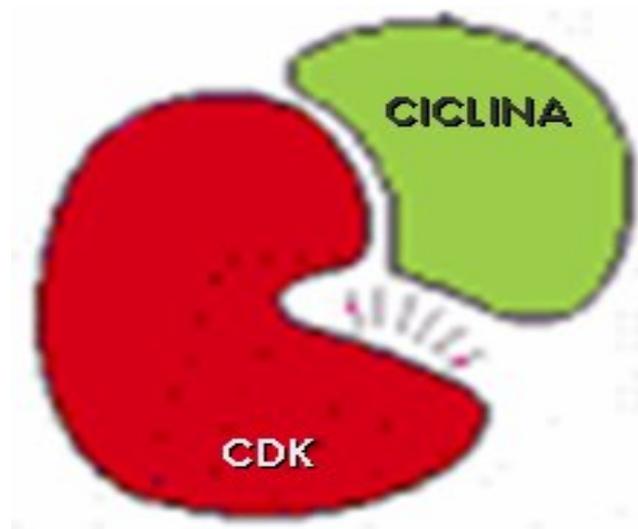
actuarán para promover la síntesis de otras proteínas necesarias para la fase S, dando continuidad al ciclo celular. (**Figura 8**)

**Figura 5 Interrelación Entre la Señalización Intracelular y Extracelular de Proliferación y Apoptosis.**



Fuente: Realizado por el autor.

**Figura 6 Complejo Ciclina – Kinasa (C-CDK).**



Fuente: Alberts B, et al. Edition 4. 2002, referenciado por: Núñez R, et al. UNAM. Última Actualización el 2 de Oct de 2007.

La señal de proliferación celular se puede detener y cambiar por una señal de bloqueo del ciclo, en casos como se ha mencionado anteriormente, para reparar un daño o superar alguna eventualidad.

**Cuadro 2 Lista de Complejos CDK's que Participan en las Diferentes Fases del Ciclo Celular.**

FASES DEL CICLO CELULAR	COMPLEJO CICLINA-KINASA	
	CICLINA	KINASAS COMPATIBLES
G <sub>1</sub> -Cdk	Ciclina D*	Cdk4, Cdk6
G <sub>1</sub> /S-Cdk	Ciclina E	Cdk2
S-Cdk	Ciclina A	Cdk2
M-Cdk	Ciclina B	Cdk1**
* En mamíferos hay 3 tipos de ciclinas (D1, D2 y D3).		
** También conocida como Cdc2.		

Fuente: Cooper G, Edition 2. 2000. Online book.

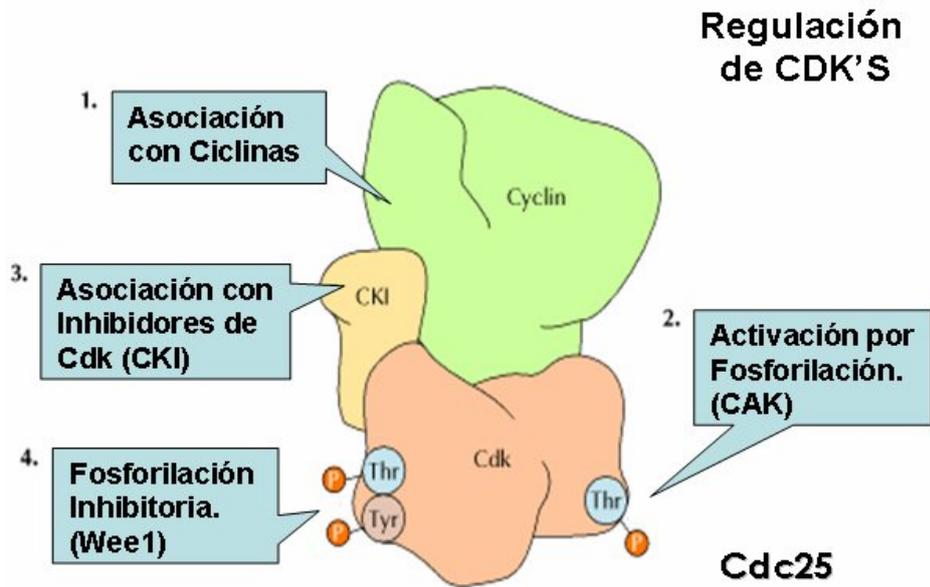
**Cuadro 3 Lista de las Familias de Kinasas Inhibitorias de Complejos CDK's y sus Blancos Según la Fase del Ciclo Celular.**

PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE CDK's (CKI)	COMPLEJO CICLINA-KINASA	FASE DEL CICLO CELULAR
<b>EN MAMÍFEROS</b>		
<b>Familia Cip/Kip (p21, p27, p57)</b>	Cdk4 / Ciclina D	G <sub>1</sub>
	Cdk6 / Ciclina D	G <sub>1</sub>
	Cdk2 / Ciclina E	G <sub>1</sub> / S
	Cdk2 / Ciclina A	S
<b>Familia Ink4 (p15, p16, p18, p19)</b>	Cdk4 / Ciclina D	G <sub>1</sub>
	Cdk6 / Ciclina D	G <sub>1</sub>

Fuente: Cooper G, Edition 2. 2000. Online book.

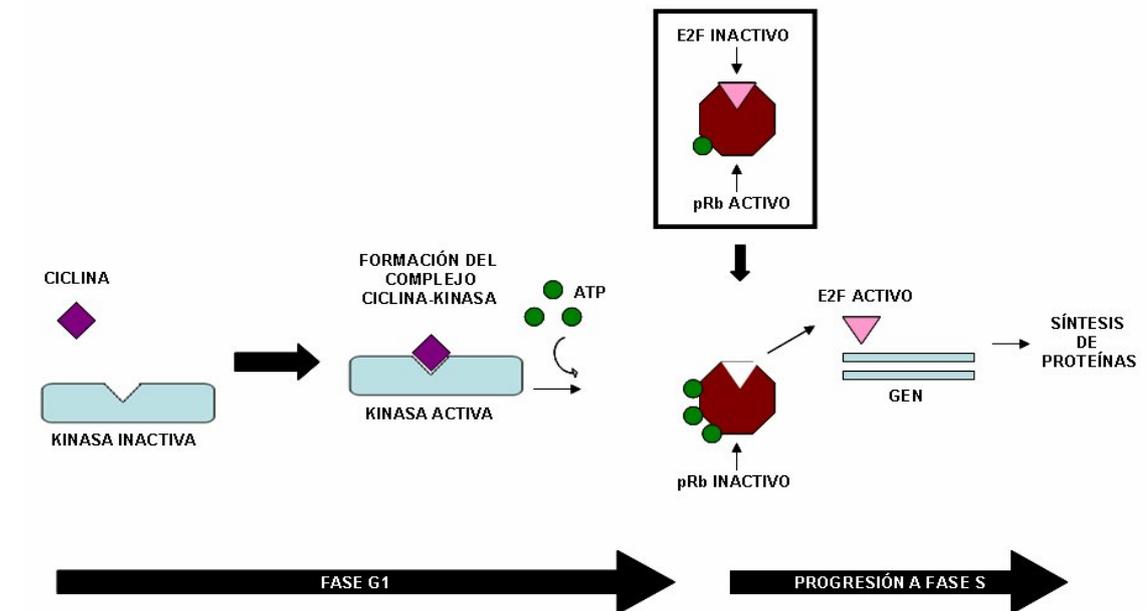
Muchas otras proteínas intervienen en este tipo de señalización, que se hace mediante un impedimento estequiométrico sobre el complejo ciclina-cdk. Este impedimento es realizado por un grupo de proteínas inhibitorias de cdk's (CKI's), resultando en la inactivación del complejo ciclina-cdk, lo que permite mantener el estado hipofosforilado y activo de la proteína Rb, y por lo tanto, favorece el secuestro permanente de las proteínas de transcripción E2F. Al no haber transcripción de genes ni síntesis de proteínas necesarias para la siguiente fase, no es posible continuar y se bloquea el ciclo hasta nueva orden. Cuando se ha resuelto el impase que generó el bloqueo, la nueva señalización de proliferación incluye la degradación de las CKI's por la vía ubiquitina-proteosoma, y la consecuente liberación y activación del complejo ciclina-cdk, para continuar. (**Figura 9**) (Cooper G, Edition 2. 2000; Park M, et al. 1998; Dash B, et al. Vol 1; Foster I. 2007. in press; Núñez R, et al. UNAM. Última Actualización el 2 de Oct de 2007; Tapon N, et al. 2001; Gasco M, et al. 2002.)

**Figura 7 Algunos Mecanismos de Regulación de la Actividad de los Complejos Ciclina-Kinasa (CDK'S), Mediante la Modificación Promotora e Inhibitoria de Kinasas.**



Fuente: Cooper G, Edition 2. 2000.

**Figura 8 Vía de Progresión del Ciclo Celular en G1.**



Fuente: Realizado por el autor.

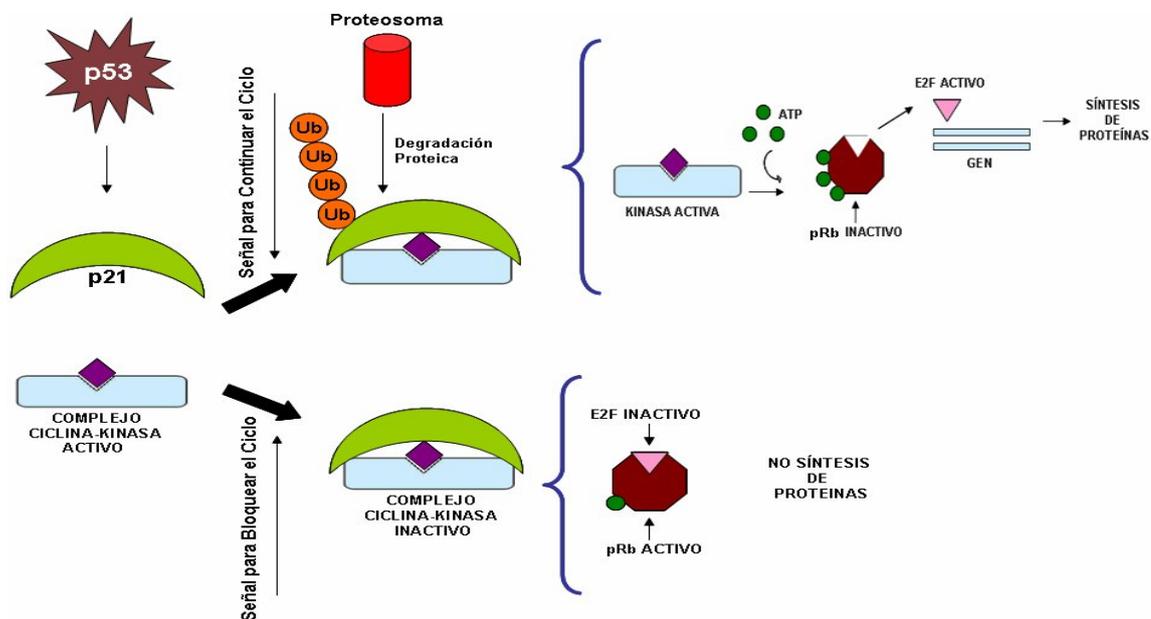
### 3.2.1.2.2. Regulación Intracelular de la Apoptosis. (Caspasas)

La apoptosis (Muerte Celular Programada) es el proceso activo de muerte celular autoinducida, que requiere gasto energético y que se encuentra controlado genéticamente. Este proceso es diferente de la necrosis, que sucede asociado a una respuesta inflamatoria. En la apoptosis la célula sigue un programa que resulta en el suicidio, siendo este proceso regulado por factores intracelulares y extracelulares, como se expone mas adelante. El motor intrínseco de la apoptosis es la cascada proteolítica de las **CASPASAS** (Cisteinil-Aspartato-Específico de Proteasas); que son proteínas enzimáticas que generan una cascada de efectos en la célula llevándola a la muerte. Se encuentran en forma de procaspasas o proenzima inactiva y consta de tres regiones: un predominio, una subunidad mayor y una subunidad menor; la proenzima es clivada o autoclivada en residuos de aspartato y es separada en las tres regiones ya nombradas para posteriormente unirse con otra igualmente clivada, formando un heterotetramérico que consta de dos subunidades menores y 2 mayores. A este complejo activo se le denomina caspasa (forma activa) que ejerce la actividad proteolítica al ser estimulada por factores extracelulares e intracelulares. Hay un gran número de caspasas y están clasificadas como Iniciadoras y Ejecutoras. Las caspasas iniciadoras son aquellas que se expresan ante un estímulo y activan las caspasas ejecutoras, y las caspasas ejecutoras son aquellas que llevan a cabo los cambios celulares responsables de la muerte de la misma, como son, fragmentación de la membrana nuclear, condensación de la cromatina, fragmentación del DNA, formación de cuerpos apoptóticos, entre otros. A nivel intracelular por ejemplo, cuando hay un daño del genoma, se activa la transcripción de genes cuyas proteínas bloquean o mejor detienen el ciclo celular (ej: p21) y reparan el DNA (proteínas mismatch, BRCA1, BRCA2, RAD 51, entre otros), en caso de no poderse reparar el daño, otros genes que favorecen la apoptosis son transcritos (Bax, Bad, Bid), generando así, la cascada proteolítica y muerte celular. (**Figura 10**) (Dávila JC. 1999; Alberts B, et al. 2002. Edition 4)

#### 3.2.1.2.2.1. Proceso de Apoptosis Vía p53

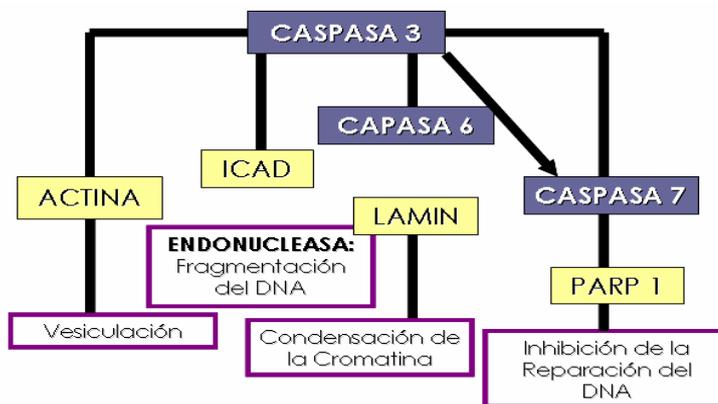
Cuando ocurre un daño en el ADN (UV - IR) diversas kinasas sensoras son activadas, dentro de las cuales se encuentran ATM, ATR y DNA-PK. Estas kinasas fosforilan una serie de proteínas como BRCA1 y Nbs1 para reparación del ADN y p53 para bloqueo del ciclo y/o inducción de apoptosis. La p53 al ser estimulada, actúa como factor de transcripción de otras proteínas para bloquear el ciclo celular, como la ya nombrada p21 y otras como la GADD45 (Growth Arrest on DNA Damage, arresto en el ciclo por daño del ADN), que regula a su vez la actividad de otra proteína PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Nuclear), secuestrándola, deteniendo la replicación del ADN y favoreciendo, tanto el bloqueo del ciclo, como la reparación del ADN, de ser posible.

**Figura 9 Bloqueo del Ciclo y Continuación del Mismo Vía p53.**



Fuente: Realizado por el autor.

**Figura 10 Sustratos de Caspasas Ejecutoras y Efectos en la Célula.**



Fuente: Realizado por el autor.

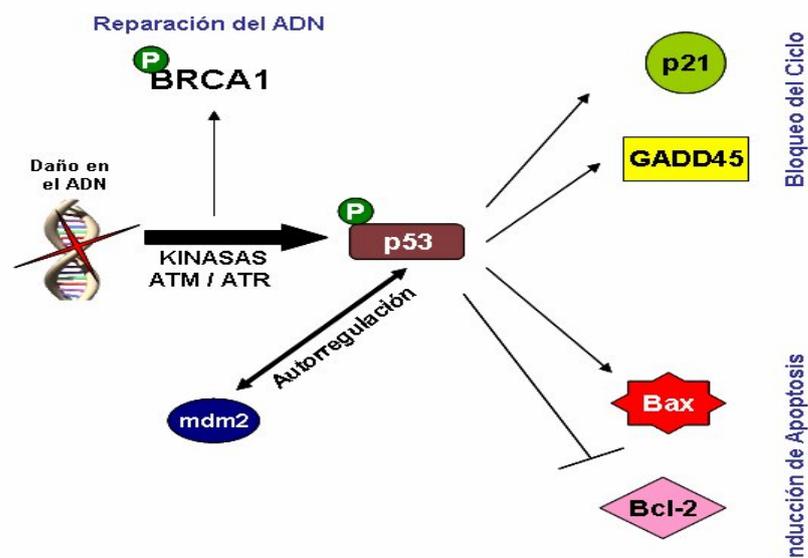
Las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) son inhibidas por la vía de la p53 cuando se induce la apoptosis, en contraste con la activación de proteínas proapoptóticas (Bax, Bad, Bid). Una vez se transcriben los genes proapoptóticos, sus proteínas derivadas que se encuentran en la membrana mitocondrial, forman canales mediante los cuales se escapa el citocromo c al citoplasma. El citocromo c junto

con la procaspasa 9 y la proteína Apaf 1, forman *El Apoptosoma* que finalmente activa la caspasa 3, esta se conoce como la vía apoptótica mitocondrial o intrínseca. **(Figura 10 y 11)** (Dávila JC. 1999; Alberts B, et al. 2002. Edition 4; Dash B, et al. Checkpoint Controls and Cancer. Vol 1; Foster I. 2007. in press; Levine AJ, et al. 1991; DeVita VT, et al. 2005. Edition 6)

### 3.2.1.2.3. Regulación Extracelular de la Proliferación y Apoptosis.

Los mecanismos de regulación extracelular juegan un papel importante en procesos que vimos anteriormente de proliferación y apoptosis en el mantenimiento y conservación de un tejido, órgano y sistema. El mecanismo principal de control extracelular se da por medio de transducción de señales, que consiste en el conjunto de señales de proliferación, bloqueo, supervivencia o muerte celular que son enviadas a la misma en respuesta de un estímulo. El proceso de transducción de señales requiere de un primer mensajero – extracelular (ligando hidrosoluble o liposoluble), que puede ser factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores que interaccionen con receptores transmembranales (ej: tirosin kinasa) o intracitoplasmáticos (para ligandos extracelulares liposolubles que atraviesan fácilmente la membrana, ej: Estrógenos); y de segundos mensajeros – intracelulares que actuarían generando la cascada de señales hasta provocar el efecto deseado. El proceso de transducción de señales entonces consta de los siguientes elementos: ligando, receptor, transductor y efector. **(Figura 12)**

**Figura 11 Vía de Inducción de Apoptosis Dependiente de Kinasas Sensoras de Daños en el ADN (ATM / ATR) y p53.**

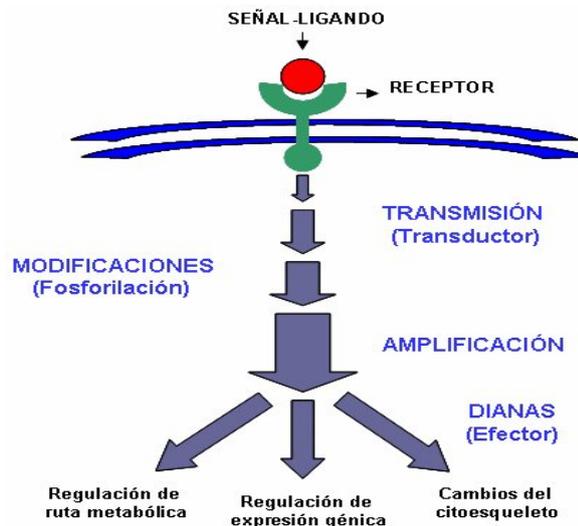


Fuente: Realizado por el autor.

### 3.2.1.2.3.1. Vías de Señalización Extracelular de Proliferación.

Ligandos hidrosolubles como el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), requieren de un receptor transmembranal específico con el cuál interactuar y generar una cascada de señales que finalmente provoque la respuesta deseada, en este caso, la respuesta deseada es de proliferación celular. Los receptores tirosin-kinasa (ej: Her2/neu), son proteínas transmembranales que constan de tres dominios, extracelular, transmembranal e intracelular, y que tienen actividad tirosin-kinasa (actividad enzimática que consiste en la fosforilación de otras proteínas en residuos de tirosina, a partir de moléculas de ATP del medio, modulando la actividad de la proteína blanco). El ligando (primer mensajero), se une al dominio extracelular del receptor, activándolo, proceso que implica el acercamiento de dos receptores y la consecuente formación de dímeros.

**Figura 12 Elementos del Proceso de Transducción de Señales.**



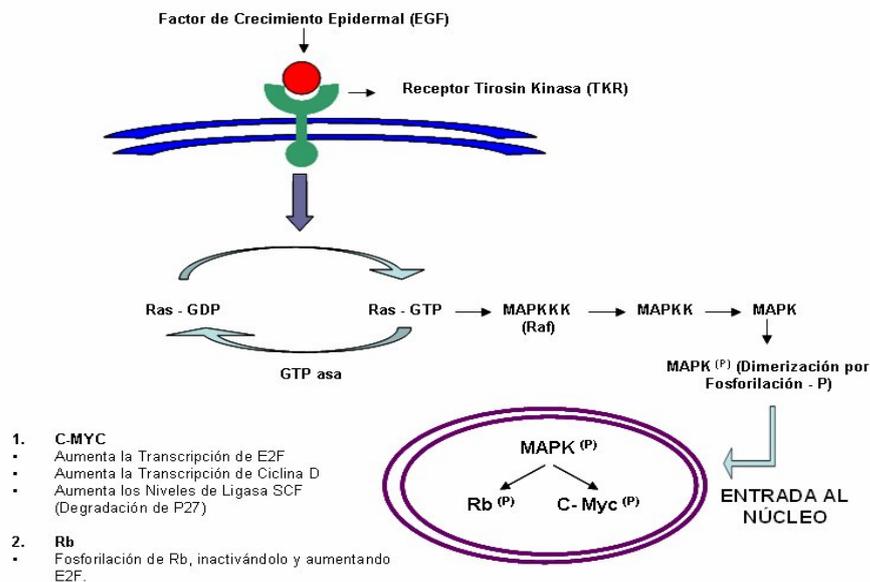
**Fuente:** Realizado por el autor.

Este acercamiento permite la fosforilación mutua de los receptores y su activación. Siguiendo a la activación del receptor, proteínas adaptadoras facilitan la unión y activación de GEF (Factor Intercambiador de Nucleótidos de Guanina). GEF es una proteína que participa activamente en la modificación de la Proteína Ras (segundo mensajero), de actividad GTPasa, favoreciendo así, la capacidad de pasar de un estado activo (Ras-GTP), a un estado inactivo (Ras-GDP). Estando activa la proteína Ras, se genera entonces la cascada de señales, que en este caso en particular, resultará en la estimulación de la proliferación celular, mediada por procesos de fosforilación y activación de proteínas de actividad proto-oncogénica y supresora de tumor, como c-myc y Rb respectivamente, que modulan la actividad de otras proteínas relacionadas directamente con el control

del ciclo celular (ciclina, CKI, E2F y Rb). Este proceso es controlado, ya que Ras-GTP, vuelve a su estado inactivo, Ras-GDP, finalizando la señal. **(Figura 13)** (Alberts B, et al. 2002. Edition 4; Tapon N, et al. 2001)

Ligandos liposolubles como las hormonas (estrógenos y progestágenos), pueden atravesar la membrana citoplasmática por difusión e interactuar con su respectivo receptor intracelular. Los receptores de estrógenos y progestágenos, ER y PR, son proteínas diméricas regulatorias de genes, ya que junto con sus ligandos modulan la transcripción de diversos genes involucrados con el ciclo celular. La vía de proliferación celular dependiente de estrógenos ha sido de gran interés, ya que se han asociado con varios aspectos normales y patológicos del desarrollo de la glándula mamaria. Los estrógenos actúan en la fase G1 del ciclo, induciendo la transcripción de los proto-oncogenes c-myc y ciclina D1. Al tener disponibilidad de ciclina D1 en esta fase, se forman complejos ciclinaD1-cdk4, que como ya se referenció antes, tienen actividad kinasa sobre Rb, inactivándolo y dejando libre al los factores de transcripción E2F, para avanzar a la fase S.

**Figura 13 Señal de Proliferación Mediante el Receptor Tirosin – Kinasa y Ras.**



**Fuente:** Realizado por el autor.

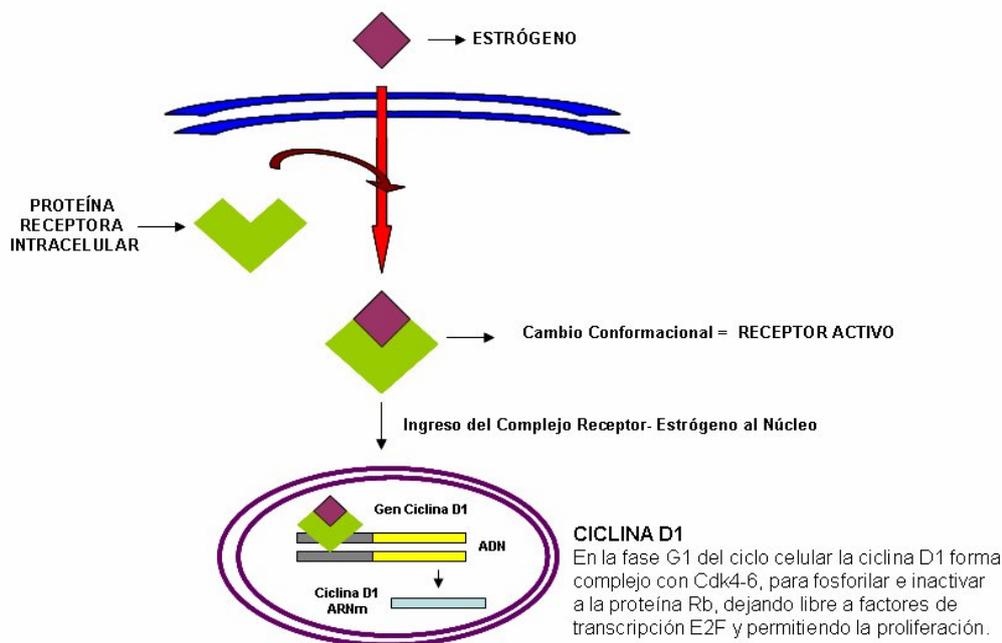
El factor de transcripción c-myc, también es estimulado por la presencia de estrógenos. Esta proteína de actividad regulatoria, favorece la transcripción de ciclina D1 y E2F, favoreciendo aún más la proliferación celular. Además, la proteína ligasa E3, SCF, cuya actividad consiste en ubiquitar proteínas blanco (p27, p21) para ser luego degradadas mediante la vía ubiquitina-proteosoma,

también es estimulada por c-myc, evitando de esta manera que estas CKI, inhiban los complejos de ciclina-quinasas, parando el ciclo. (**Figura 14**) (DeVita VT, et al. 2005. Edition 6; Sabbah M, et al. 1999; Doisneau-Sixou SF, et al. 2003; McNeil CM, et al. 2005.)

### 3.2.1.2.3.2. Vías de Señalización Extracelular de Apoptosis.

Además de la ya referenciada vía apoptótica mitocondrial o intrínseca, existe otra vía que involucra señalizaciones extrínsecas de muerte celular. Esta vía está mediada por ligandos y receptores de muerte celular, en donde una molécula de ligando Fas genera la trimerización de su receptor. En la porción intracelular del receptor se conservan unos dominios de muerte (DD) que permiten la mediación de una proteína FADD (Proteína de Asociación a Fas con Dominios de Muerte, DD) que facilita el reclutamiento de pro-caspasas 8 y/o 10. Estas procaspasas se autoclivan y autoactivan para dar inicio a la cascada de caspasas. Una vez activas las caspasas 8/10, estas tienen la capacidad de clivar y activar las demás caspasas (3, 6, 7) que van a actuar sobre las proteínas blanco, ya descritas en la figura 12. Además, las caspasas 8 y 10 pueden activar la proteína proapoptótica Bid y conectarse de esta manera con la vía mitocondrial apoptótica, potenciando el proceso de muerte celular programada. (**Figura 15**) (Alberts B, et al. 2002)

**Figura 14 Señal de Proliferación Mediada por Estrógenos.**



Fuente: Realizado por el autor.

### 3.2.2. Proceso de Carcinogénesis

El proceso de carcinogénesis se ha descrito mediante dos vías, la mutadora y la supresora. La vía mutadora se caracteriza por ser más lenta y no compromete los genes reguladores del ciclo celular (proto-oncogenes y genes supresores de tumor), sino las regiones microsatélite del genoma. Un gran acumulo de mutaciones en estas regiones, genera inestabilidad de microsatélites. Esta alteración puede comprometer la organización de la cromatina, o incluso, afectar las regiones promotoras de los genes, modificando los patrones de expresión génica. Los tumores que se desarrollan por esta vía, como el cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC), son ejemplos ya estudiados, en los cuales además se han identificado mutaciones en los genes de reparación por mal apareamiento, "mismatch" (*hMLH1* y *hMLH2*) y son diploides o pseudodiploides, porque no presentan inestabilidad cromosómica sino genómica.

La vía supresora por su parte, es la vía más rápida de carcinogénesis, pues implica el compromiso de genes reguladores del ciclo celular, es decir de proto-oncogenes y genes supresores, generando fácilmente una gran inestabilidad, que es típicamente cromosómica. El número mínimo de mutaciones necesarias para que una célula se malignice, son 7. Las células tumorales por esta vía son aneuploides y se caracterizan por presentar grandes rearrreglos cromosómicos, pérdida de heterocigocidad e inestabilidad genómica. El cáncer de mama se desarrolla por esta vía, como se mencionó anteriormente. (Perucho M. 1998; Montenegro YM, et al. 2002)

#### 3.2.2.1. Carcinogénesis en la Glándula Mamaria

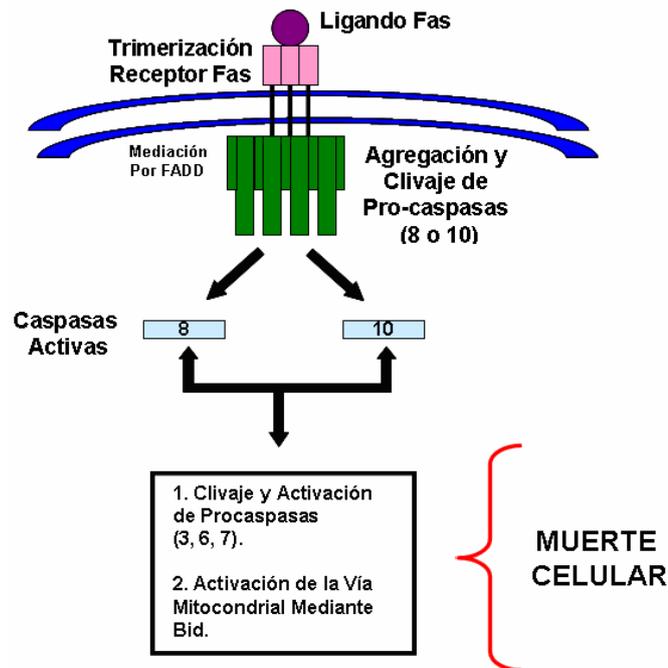
Múltiples oncogenes y genes supresores de tumor se han relacionado con la patología maligna mamaria, indicando una pérdida del control del ciclo celular como base.

##### 3.2.2.1.1. Oncogenes en el Cáncer de Mama.

Se denomina protooncogenes, ha aquellos genes que favorecen la proliferación y supervivencia de la célula, pero en condiciones en las que existe un error en estos, alterando su funcionamiento, se denominan *Oncogenes*, debido a que adquieren un gran potencial maligno. Típicamente las mutaciones de los oncogenes se presentan en células somáticas y se comportan como dominantes, puesto que con una sola de las 2 copias del gen que este mutada, la actividad de la proteína se ve afectada. La alteración del funcionamiento de la proteína consiste en la potenciación de su actividad oncogénica, aún en condiciones de error en la célula, cuando debería morir. Esto favorece aún más, un mayor acumulo de mutaciones en genes iguales o más importantes, llevando finalmente a la malignización celular. **(En la Tabla 2, se listan los oncogenes relacionados con**

*el cáncer de mama, según la literatura, su función normal y su tipo de alteración*) (Osborn C, et al. 2004; DeVita VT, et al. 2005. Edition 6)

**Figura 15 Vía de Señalización Extrínseca de la Apoptosis.**



Fuente: Realizado por el autor.

**Tabla 2 Oncogenes Relacionados con el Cáncer de Mama.**

PROTOONCOGEN	FUNCIÓN	ALTERACIÓN (ONCOGEN)
<b>HER-2/neu</b>	Receptor Tirosin-Kinasa	Amplificación (Proliferación)
<b>Ras</b>	Proteína G (GTPasa)	Mutación (Proliferación, Supervivencia)
<b>PI3-K</b>	Kinasa, Vía PI3-k / Akt	Mutación (Supervivencia)
<b>Akt</b>	Kinasa, Regulación (-) p53	Amplificación (Supervivencia)
<b>Ciclina D1</b>	Regulador Ciclo Celular	Amplificación (Proliferación y Supervivencia)
<b>Ciclina E</b>	Regulador Ciclo Celular	Amplificación (Proliferación y Supervivencia)
<b>c-Myc</b>	Factor de Transcripción	Amplificación (Proliferación)

Fuente: Realizado por el autor.

### 3.2.2.1.2. Genes Supresores de Tumor en el Cáncer de Mama.

Los genes supresores de tumor, son aquellos que como su nombre lo indica, evitan el desarrollo potencial de cáncer, regulando de forma negativa el ciclo celular. La regulación negativa, consiste en bloquear el ciclo, ya sea para reparar un daño en el ADN o para inducir apoptosis en caso que el daño no pueda ser reparado. Cuando existe un error en estos genes se pierde la actividad de la proteína, quiere decir, que no sería posible bloquear el ciclo para reparación ni para inducción de apoptosis en aquellas situaciones que así lo requieran. De esta manera, persisten los daños en el ADN y más aún, la célula alterada continua dividiéndose. Las mutaciones en los genes supresores de tumor se comportan como recesivas, debido a la importancia del funcionamiento de los mismos, es decir, que se requiere el daño de los dos alelos del gen, para que se altere definitivamente su función, o que uno de los alelos tenga la mutación y el otro se pierda, es decir, que haya pérdida de heterocigocidad. Las mutaciones se presentan tanto en células somáticas como en células de línea germinal, por lo que pueden ser heredadas. Los genes supresores de tumor pueden ser clasificados según su función como guardianes o cuidadores. Los guardianes son aquellos que, como p53 y Rb, están directamente involucrados con la inhibición del crecimiento tumoral y los cuidadores son aquellos que mantienen la integridad del genoma, incluyendo la de los genes guardianes, estos son por ejemplo FANC, BRCA1 y BRCA2. La inactivación de los primeros favorece la proliferación de las células malignas y la formación del tumor, y la inactivación de los últimos altera los procesos de reparación, favoreciendo aún más el potencial oncogénico de una célula. **(En la Tabla 3, se hace referencia a los genes supresores de tumor que se relacionan con el cáncer de mama, según la literatura, su función normal y tipo de alteración)** (Osborn C, et al. 2004; Sherr CJ. 2004; Venkitaraman AR. 2002; Oliveira AM, et al. 2005; Ruiz FP, et al. 2001; DeVita VT, et al. 2005. Edition 6)

#### 3.2.2.1.2.1. Función de los Genes BRCA1-2.

Los genes **BRCA** (**BR**east **CA**ncer genes o genes del cáncer de mama), son genes supresores de tumor que participan en la regulación del ciclo celular mediante la coordinación de procesos de transcripción de proteínas, recombinación cromosómica, reparación de ADN y mantenimiento de la integridad cromosómica. Su amplio campo de acción se debe a que interactúan con un gran número de proteínas supresoras de tumor, oncogénicas, de reparación, de control del ciclo y represores/activadores transcripcionales, a través de sus dominios. **(Figura 16)**

El gen BRCA1 está localizado en el cromosoma 17q12-21 y tiene 24 regiones, de las cuales 22 son codificantes y 2 son no codificantes, que generan una proteína de 1863 aa (NIH/NHGRI, Última Revisión en agosto del 2006; Ruiz FP, et al. 2001). La proteína BRCA1 consta de una región N-terminal, que contiene un

dominio RING mediante el cual forma un complejo con la proteína BARD1 (BRCA1-BARD1) con actividad de ubiquitina ligasa E3, controlando de esa manera la vida media de diferentes proteínas de regulación del ciclo celular. Así mismo, mediante la regiones NLSs (señalización de localización nuclear), interactúa con el complejo MRE11/RAD50/Nbs1 (complejo enzimático con actividad exonucleasa y helicasa), para llevar a cabo los mecanismos asociados a la reparación homóloga y no homóloga. Contiene además 2 regiones C-terminal que le confiere la propiedad de factor de transcripción de proteínas como p53, BRCA2 y otras de reparación y control del ciclo.

**Tabla 3 Genes Supresores de Tumor Relacionados con el Cáncer de Mama.**

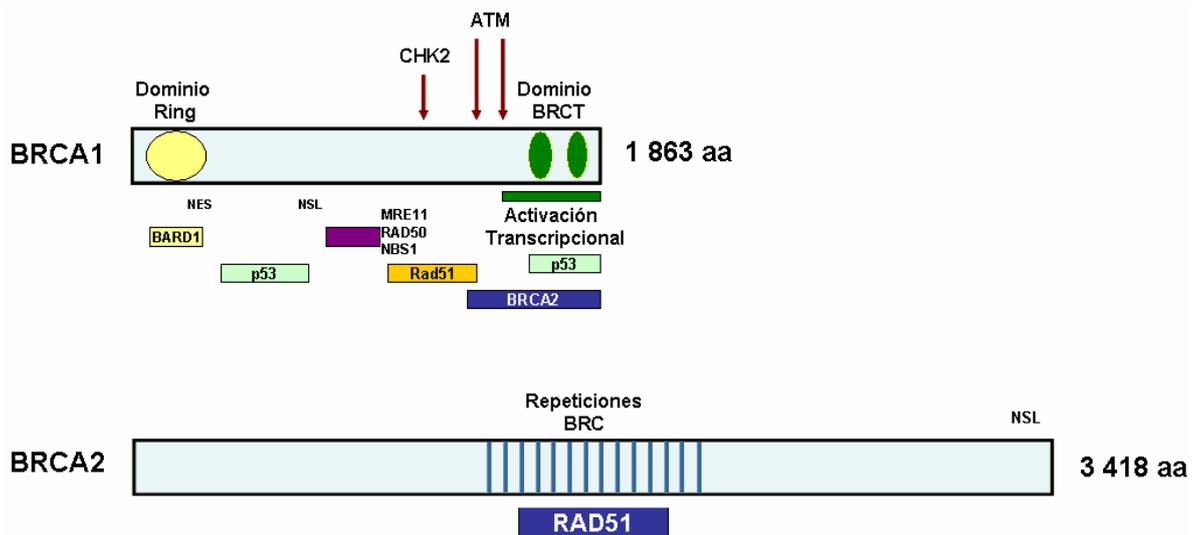
<b>GENES SUPRESORES</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>ALTERACIÓN POR MUTACIÓN</b>
<b>p53</b>	Arresto del ciclo, Factor Transcripción, Apoptosis	Proliferación, No Apoptosis
<b>Rb</b>	Arresto del ciclo	Proliferación
<b>p27</b>	Inhibidor de Cdk's, Arresto del ciclo	Proliferación
<b>BRCA1</b>	Reparación del ADN, Regulador Transcripcional	No Reparación, Inestabilidad Cromosómica y Genómica
<b>BRCA2</b>	Reparación del ADN	No Reparación, Inestabilidad Cromosómica y Genómica
<b>CHK2</b>	Kinasa activadora de p53 por daño en el ADN	No Control del Ciclo Vía p53
<b>PTEN</b>	Fosfatasa, Inactiva a Akt	No Regulación (-) Sobre p53, Vía Akt.
<b>ATM</b>	Kinasa Sensora de daño en el ADN	No Señalización de Reparación del ADN, Vía p53 / BRCA1.

**Fuente:** Realizado por el autor.

Además, a lo largo de la proteína BRCA1, existen otras regiones mediante las cuales puede interactuar con proteínas como el ATM (de reconocimiento y respuesta al daño en el ADN) y RAD 51 (primordial para la reparación homóloga-libre de error). La proteína BRCA1 actúa como cofactor de p53, lo estabiliza y estimula la vía dependiente de p53 (p21 y GADD45) para favorecer el arresto del ciclo celular. Con respecto a los procesos de reparación del ADN, estos se encuentran ligados a eventos específicos de fosforilación como respuesta a daños en este. Dependiendo del tipo de agresor, IR o UV, se activa una determinada kinasa sensora que tendrá como blanco la proteína BRCA1. Es así como entonces, la proteína BRCA1 puede ser fosforilada por la kinasa ATM en G1 y G2/M o por la kinasa CHK2 en G2/M, ante la exposición a IR. A su vez, por la exposición a UV, BRCA1 es fosforilada por la kinasa ATR. Estos eventos de

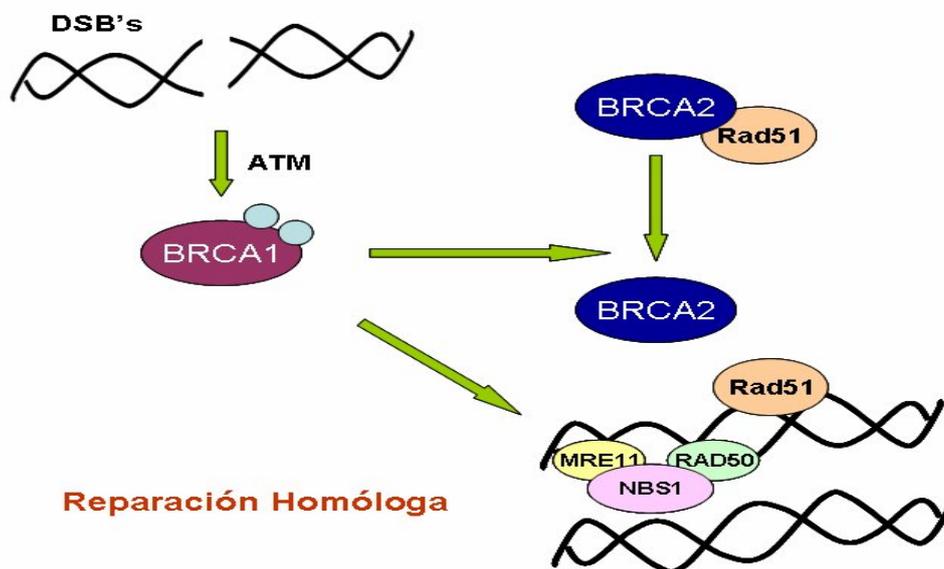
fosforilación activan a BRCA1 y la re-ubica en los sitios de replicación marcados por PCNA, donde es necesario reparar rompimientos de doble hebra, DSB's. En el sitio a reparar, se llevan a cabo una serie de modificaciones como son la fosforilación de histonas mediante H2A-X, que facilita la migración de BRCA1 y la remodelación de la cromatina mediada por SWI/SNF, que permite el acceso de más proteínas que hacen parte de la maquinaria de reparación. Los procesos de reparación de DSB's mediados por BRCA1, son la Reparación Homóloga (HR, libre de error) y la Reparación Mediante la Unión de Extremos no Homólogos (NHEJ, promotora de posibles errores). La reparación NHEJ involucra el complejo proteico de reparación MRE11/Rad50/Nbs1, que contienen actividad helicasa y exonucleasa, para eliminar los residuos de los extremos lesionados, posterior a este evento, las proteínas Xrcc4 y ligasa 4 unen los extremos. Este método de reparación, puede llevar a errores y generar rearrreglos debido a que no se basa en la recombinación con su homólogo. La reparación homóloga, HR, inicia con la actividad helicasa y exonucleasa del complejo MRE11/Rad50/Nbs1 y la posterior migración de BRCA2-RAD51, inducido por BRCA1. La proteína de unión a extremos, RAD52, junto con RAD51, forman unos filamentos desde los extremos del ADN hasta donde se encuentra su homólogo para iniciar el proceso de recombinación. Por actividad de la polimerasa de ADN, se lleva a cabo la extensión y copia fiel del fragmento lesionado, formando las uniones Holliday típicas de la recombinación en meiosis, para finalizar con la unión de los fragmentos mediante la ligasa 1. **(Figura 17)** (Khanna KK, et al. 2001; Yoshida K, et al. 2004; Venkitaraman AR. 2002; Chu-Xia Deng. 2006)

**Figura 16 Estructura Proteica de los Genes BRCA**



**Fuente:** Realizado por el autor.

**Figura 17 Mecanismo de Reparación Homóloga Mediada por BRCA1-2**



**Fuente:** Realizado por el autor.

El gen BRCA2 está localizado en el cromosoma 13q12-13, tiene 27 regiones, de las cuales 26 son codificantes y 1 es no codificante, y genera una proteína de 3418 aa (NIH/NHGRI, Última Revisión en agosto del 2006; Ruiz FP, et al. 2001). La proteína BRCA2, como se muestra en la *figura 16*, tiene una región de interacción con RAD51, por medio de la cual se hace partícipe de los fenómenos de reparación homóloga, ya descritos anteriormente (Khanna KK, et al. 2001; Yoshida K, et al. 2004; Venkitaraman AR. 2002; Gretarsdottir S, et al. 1998).

Cabe resaltar, que mutaciones en alguno de los genes BRCA, traerán como resultado el mal funcionamiento de sus proteínas, con respecto a las actividades de reparación y control del ciclo celular en sí, generando más alteraciones en la célula y finalmente favoreciendo el desarrollo de cáncer (Tirkkonen M, et al. 1997).

### **3.2.2.1.2.2. Diferencias entre los Fenotipos de Tumores BRCA1 y BRCA2.**

En cuanto a la expresión de estos genes para cáncer de mama, se han encontrado diferencias. Las mutaciones BRCA1 se relacionan con el Síndrome de Cáncer de Mama/Ovario, y se caracterizan por expresar un fenotipo epitelial basal, por lo que expresan marcadores mioepiteliales como citokeratinas, cadherinas, EGFR y ciclinas A y B entre otras, además son de alto grado histológico, muy proliferativos, y receptores hormonales y erbB-2 negativos. En su mayoría son Carcinomas Ductales Invasivos y también se relaciona con Carcinomas Medulares. Los tejidos tumorales se caracterizan por ser invasivos y por presentar en mayor proporción áreas necróticas e infiltrados linfocíticos (Honrado E, et al.

2005; Foulkes W, et al. 2003; Breast Cancer Linkage Consortium, et al. 1997; Chappuis PO, et al. 2000; Lakhani SR, et al. 1998; Chappuis PO, et al. 2000; Palacios J, et al. 2003; Lakhani SR. 1999).

Las mutaciones BRCA2 se relacionan con el Síndrome de Cáncer de Mama Sitio Específico y son responsables del cáncer de mama tanto en mujeres como en hombres. Dentro de sus características fenotípicas se ha visto que son de menor grado que los relacionados con mutaciones BRCA1, pero son de mayor grado que en el cáncer de mama esporádico. Además, de ser receptores E2/P2 positivos, también expresan marcadores como ciclinas D1 y p27. En los tejidos tumorales se observan menos áreas necróticas y menos infiltrado linfocítico que los BRCA1. Su relación histopatológica es con el Carcinoma Ductal Invasivo y Carcinoma Lobular Invasivo en su mayoría, pero también con el Carcinoma Medular en menor proporción que el BRCA1 (Honrado E, et al. 2005; Armes JE, et al. 1998; Lakhani SR, et al. 2002; Breast Cancer Linkage Consortium, et al. 1997; Chappuis PO, et al. 2000; Lakhani SR, et al. 1998; Chappuis PO, et al. 2000; Palacios J, et al. 2003; Lakhani SR. 1999).

### **3.3. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA: GEN BRCA1**

Según la base de datos de mutaciones BRCA en cáncer de mama (BIC) del NIH (National Institutes of Health, USA), en el gen BRCA1 el número total de registros en los 24 exones es de 12012 (última consulta en Marzo de 2007), de los cuales, los que tienen mayor porcentaje de reportes son el exon 2 con el 17.7% (2125/12012), regiones del exon 11 (11c y 11d con aproximadamente 12% cada uno) y el exon 20 con el 10,6% (1273/12012). De estos los más sencillos de abordar son el exon 2 y 20, pues el exon 11 en su totalidad es el 60% del gen, haciendo su estudio más laborioso por su tamaño. El tipo de mutación más frecuentemente reportado en este gen es el de corrimiento de marco de lectura (frameshift) en un 48.3% debido a deleciones e inserciones, y el producto más frecuente de las mutaciones del gen BRCA1 en general, es una proteína truncada (86%) (NIH/NHGRI, Revisión en Marzo de 2007). Igualmente, tanto en el exon 2 como en el exon 20 el tipo de mutación más frecuente es por corrimiento de marco de lectura (96% y 82% respectivamente), siendo las mutaciones más reportadas de este tipo la 185delAG con el 93,2% (1597/1713) para el exón 2 y la 5382insC con el 81,1% (836/1030) para el exón 20 (NIH/NHGRI, Revisión en Agosto de 2006). El fenómeno anterior bien puede deberse ya sea a que son realmente las mutaciones más frecuentemente reportadas porque se han hallado en varias poblaciones o a que son los exones y/o mutaciones más estudiados en diferentes poblaciones.

Las mutaciones específicas de estos genes tienen una frecuencia variable según los grupos poblacionales (Mullineaux L, et al. 2003), debido a aspectos

geográficos, ambientales y por supuesto genéticos, característicos de cada población. Se han publicado diversos estudios en diferentes poblaciones, siendo la correspondiente a Judíos Ashkenazi de las más estudiadas debido a la alta frecuencia de mutaciones BRCA asociadas al desarrollo de cáncer de mama (principalmente en el Síndrome de Cáncer de mama/ovario), en relación con otras poblaciones. Las mutaciones BRCA fundadoras en la población judía Ashkenazi son las 185delAG y 5382insC (BRCA1) y la 6174delT (BRCA2); la prevalencia de estas mutaciones es del 57% en mujeres con Síndrome de Cáncer de Mama/Ovario en esta población (Fishman A, et al. 2000; Gershoni-Baruch R, et al. 2000) y la frecuencia combinada de estas mutaciones es de 2.0 a 2.5% en población general Ashkenazi (Tonin P, et al. 1996).

<b>Gen</b>	<b>Alteración</b>	<b>Frecuencia en Población General Judía Ashkenazi</b>	
<b>BRCA1</b>	185delAG	1.0 %	(Struewing JP, et al. 1995; Roa BB, et al. 1996;
	5382insC	0.1 %	Fitzgerald MG, et al. 1996; Neuhausen S, et al.
<b>BRCA2</b>	6174delT	1.4 %	1996; Thorlacius S, et al. 1996; Oddoux C, et al. 1996; Offit K, et al. 1996)

Se han realizado estudios en poblaciones sin descendencia judías Ashkenazi, en las cuales se han detectado estas mutaciones con una frecuencia variable según el grupo poblacional. En Texas, por ejemplo, se encontró 1 familia con la mutación 185delAG (7,7%) en 13 familias con cáncer de mama y ovario con mutaciones BRCA (Schorge JO, et al. 2001). En España, Osorio et al (1998), encontraron que 2/87 familias con cáncer de mama/ovario tenían la mutación 185delAG, de las cuales 1 carecía de ancestro Ashkenazi (Osorio A, et al. 1998) y en otro estudio, Díez et al (1999), se halló esta misma mutación en el 1,9% de pacientes con cáncer de mama familiar (Díez O, et al. 1999).

En Alemania se encontró una frecuencia de la mutación 5382insC de 4,0% (10/248) en pacientes con cáncer de mama/ovario familiar y de 1,0% (8/800) en pacientes no seleccionados (Backe J, et al. 1999). Esta mutación se ha encontrado también en Apulia, Italia en 6/7 pacientes con cáncer de mama, historia familiar positiva y mutación en el gen BRCA1 (Tommasi S, et al. 2005). De Benedetti et al (1998), también en Italia, hallaron esta misma mutación en 11 de 142 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama y/u ovario independiente de su historia familiar (De Benedetti V, et al. 1998). Por otra parte, en Polonia la frecuencia de 5382insC fue del 12,5% (1/8) en familias de alto riesgo para cáncer de mama con mutación BRCA (Van der Looij M, et al.2000).

En población Latino-Americana/Hispana son pocos los estudios que se han hecho para hallar la frecuencia de estas mutaciones en mujeres con cáncer de mama esporádico, familiar o hereditario. La mutación 185delAG se ha encontrado en: el Valle de San Luis Colorado USA (6/19) pacientes con ancestro Latino/Español (Mullineaux L, et al. 2003), en Chile en el 0,26% de mujeres sanas con 2 o más

familiares con cáncer de mama (Jara L, et al. 2002) y en el 3,12% de familias de alto riesgo (Jara L, et al. 2006). Por otra parte, la mutación 5382insC se ha encontrado en Brasil en el 25% de pacientes con antecedentes familiares y mutación BRCA (Dufloth RM, et al. 2005).

En Colombia, el único reporte público a la fecha es de Torres et al (2007), que consistió en el estudio de 53 familias colombianas, con cáncer de mama y/u ovario hereditario, en las cuales se realizó una tamización de mutaciones germinales en la totalidad de los genes BRCA1 y BRCA2 mediante la combinación de las técnicas DHPLC, SSCP y PTT, seguido de secuenciación directa, además se realizaron estudios haplotípicos para confirmar efecto fundador de mutaciones. Los hallazgos relacionados con este estudio, permitieron identificar tres mutaciones fundadoras, dos en BRCA1 (3450delCAAG y A1708E) que representaron el 100% de las mutaciones BRCA1 identificadas, y una mutación fundadora en BRCA2 (3034 del-ACAA) que represento el 40% de las mutaciones identificadas en esta cohorte de pacientes. La frecuencia de mutaciones BRCA encontrada en las familias fue de 24.5% (13/53), ocho en BRCA1 y cinco en BRCA2. Ninguna de las mutaciones más frecuentes en BRCA1 (185delAG, 5382insC) ni en BRCA2 (6174delT) se encontró en este grupo de pacientes (Torres, et al. 2007).

Con respecto a la mutación 185delAG, se ha calculado una ancestría aproximada de 1200 - 2000 años (46 generaciones), ya que en análisis de haplotipos se ha evidenciado que tanto judíos Ashkenazi como judíos Sefarditas y judíos del Medio Oriente (Irán e Irak), comparten el mismo haplotipo asociado; esto indica que la mutación estaba presente antes de la primera dispersión judía (destrucción del segundo templo de Salomón, en los años 70, durante la invasión romana a Israel) y que comparten un ancestro común; aún así se han encontrado otras poblaciones como Inglaterra, en las que un haplotipo diferentes se ha asociado a la segregación de esta mutación, indicando que también ha podido ocurrir de forma independiente en otras regiones geográficas (Neuhausen, et al. 1996; Díez O, et al. 1999; Bar-Sade RB , et al. 1998). Es posible que como consecuencia de la inquisición y persecución judía en España, que precedió la época de la conquista de América por Cristóbal Colon en 1492 (en este periodo ocurre la segunda dispersión judía, en la que muchos de ellos se vieron obligados a convertirse al cristianismo o a migrar, ya fuera a América o a Europa Oriental –Alemania-; los judíos que provenían de España, fueron denominados sefarditas y se ubicaron no solo en América, principalmente Latinoamérica, sino también en países del mediterráneo y norafricanos, entre otros; los judíos que se asentaron en Alemania y mas tarde en Polonia y otros de Europa Oriental, fueron llamados Ashkenazis), judíos de España que viajaron con Cristóbal Colon a nuestras tierras, fueran ya portadores de esta mutación. En lo que respecta a la mutación 5382insC, se ha calculado una ancestría aproximada de 38 generaciones, y se ha establecido que su origen es Báltico, ya que presenta una mayor prevalencia en países de Europa Oriental, que se ve, disminuye en Europa Central y Occidental; los análisis de

haplotipos muestran un origen común en todos los casos, Alemania, Polonia, Rusia, Hungría, Italia, Francia, e incluso en Norteamérica-Cánada (Neuhausen, et al. 1996; Díez O, et al. 1999). A mediados de los siglos XIX y XX, antes de la segunda guerra mundial, arribaron a algunas regiones de Colombia, incluido Santander, algunos Alemanes; Geo Von Lengerke, llegó a Santander en 1852, y junto con él a mediados de 1871, llegó una comisión de más de cien alemanes solteros, incluyendo judíos, que se distribuyeron en Cúcuta, Ocaña, Bucaramanga y Socorro. Por la edad calculada de esta mutación, podríamos pensar que es posible que los inmigrantes alemanes la hayan ingresado a nuestra población.

En un reporte publicado en Universia Colombia, el 20 de Julio de 2006, se referenció que en una tesis de doctorado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, se hizo un estudio sobre Variabilidad Genética que incluyó la composición genómica en poblaciones de los Santanderes. Según este reporte, se hizo un análisis de haplogrupos, con la técnica de secuenciación, para Santander y Norte de Santander y se determinaron las variaciones específicas del ADN mitocondrial y del cromosoma Y, con el fin de establecer el origen de los linajes maternos y paternos, respectivamente. Con respecto al análisis del mtADN, al comparar con poblaciones europeas, africanas, y amerindias, principalmente de la familia lingüística chibcha, provenientes de bancos de datos, los resultados demuestran que para las poblaciones de Santander existe un 92,9% de contribución amerindia, concluyéndose entonces que el mayor aporte femenino, fue por parte de mujeres nativas de Santander. Por su parte, los resultados del análisis del cromosoma Y, muestra una alta contribución de linajes europeos en Santander con un 86.6%; dentro de esa contribución europea, se encontraron marcadores genéticos judíos en un 12,7%, de los cuales el 7% correspondió al haplotipo Cohen, perteneciente al apellido Judío más antiguo, *Cohanim*, que se encuentra tanto en judíos Ashkenazi como en judíos Sefarditas (Solano V. 2006. Online, Comunicación Telefónica con la Dra. Torres).

Si bien las mutaciones 185delAG ni 5382insC de los exones 2 y 20, respectivamente, del gen BRCA1, no fueron halladas en el estudio de Torres et al, (2007), la antigüedad ancestral de las mismas, la historia migratoria y composición genómica de nuestra región según estudios de variabilidad genética, y la alta frecuencia con la cual se han encontrado estas dos mutaciones a nivel mundial según el BIC, motivaron el desarrollo de este proyecto en nuestra población.

### **3.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE GENES BRCA**

El abordaje de los genes BRCA es complejo debido al tamaño de los mismos y a la heterogeneidad que los caracteriza. Para el estudio molecular de estos genes, se pueden implementar diversas técnicas, dentro de las que se encuentran aquellas que permiten el análisis completo del gen, como la secuenciación directa

(gold standard). Algunas otras técnicas de tamizaje también se pueden implementar para el estudio de todo el gen, como son, SSCP (Polimorfismos de Conformación de una Hebra), HA (Análisis Heteroduplex), DGGE (Electroforesis en Gel de Gradiente Denaturante, CSGE (Conformación Sensitiva en Gel de Electroforesis), PTT (Test de Proteína Truncada) y DHPLC (Cromatografía Líquida Denaturante de Alta Resolución), de estas las técnicas CSGE y DGGE ofrecen los mayores porcentajes de sensibilidad, con 98% y 95%, respectivamente. Otros métodos de tamizaje son usados para identificar mutaciones ya caracterizadas y conocidas en una población, como son, ASO (hibridación oligonucleotídica alelo-específica), análisis mediante enzimas de restricción y PCR-Mismatch, esta última usada en el presente estudio. (Tian H, et al. 2000; Gayther S, et al. 1997; Warren W, et al. 1997)

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

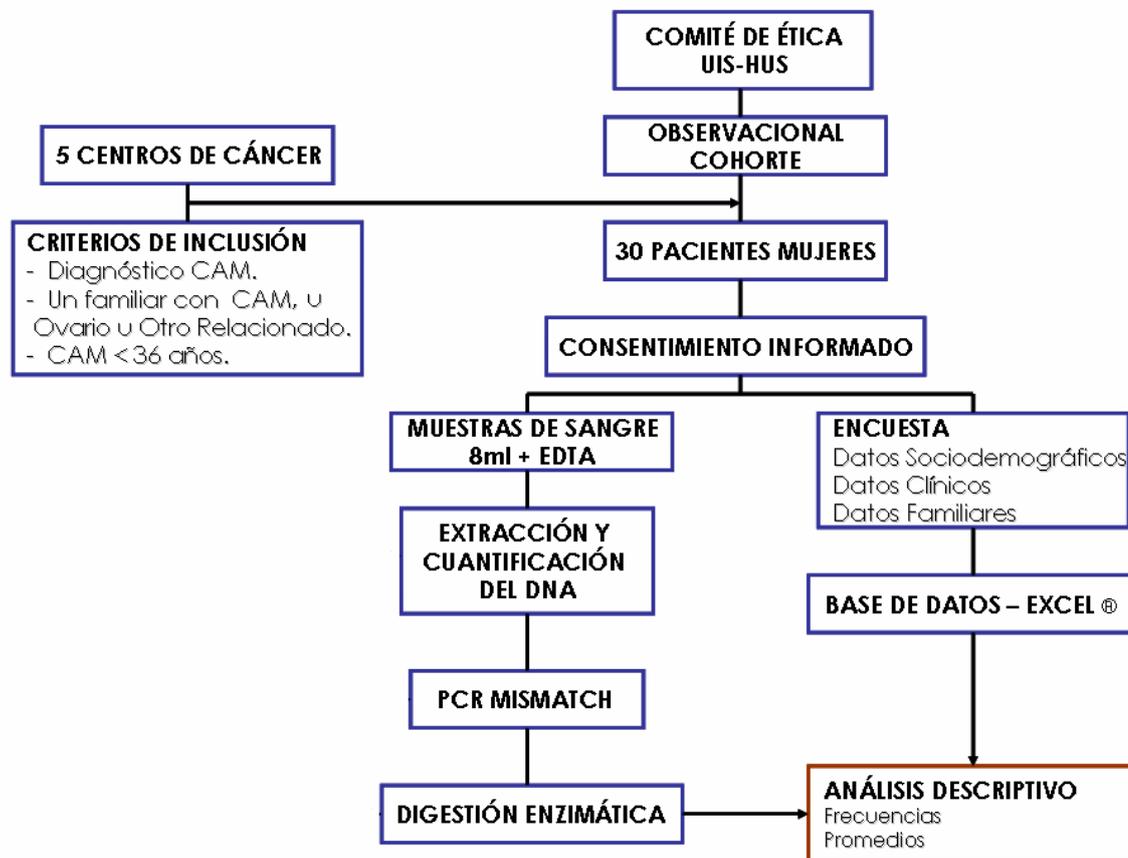
Se realizó un estudio descriptivo que consistió en determinar la presencia o ausencia de dos de las mutaciones más frecuentes en el gen BRCA1 según lo reportado en la base de datos *Breast Cancer Core Information, BIC*, ([http://www.nhgri.nih.gov/Intramural\\_research/Lab\\_transfer/Bic/Member/index.html](http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/Member/index.html)), en una muestra de pacientes, mujeres, santandereanas con cáncer de mama sugestivo de ser del tipo heredo-familiar.

Las mutaciones que se buscaron fueron la 185delAG en el exón 2 y la 5382insC en el exón 20 del gen BRCA1, puesto que además de ser las más reportadas en el BIC como se citó previamente, se han encontrado en diversos grupos poblacionales relacionados con el nuestro. El análisis de estas mutaciones se hizo a partir de muestras de sangre periférica (8 ml) de cada paciente. Los pacientes fueron recolectados a lo largo de un año, desde Marzo del 2006 hasta Marzo del 2007 y el total de pacientes incluidos fue de 30. **(En el Esquema 1, se especifican los pasos metodológicos que se siguieron con el desarrollo del presente estudio).**

Los criterios de inclusión previamente establecidos fueron: mujeres con diagnóstico de cáncer de mama confirmado con biopsia, de cualquier edad con al menos 1 antecedente familiar en primero o segundo grado de cáncer de mama, ovario y/u otro tipo de cáncer relacionado con este gen como son el de próstata, estómago, colon, páncreas, útero y vesícula biliar (Montero J. <http://www.cirugest.com/htm/index.php>; Ford D. 1998; Struewing JP, et al. 1997). Además, como la posibilidad de encontrar mutaciones en el gen BRCA1 aumenta en la medida en que el cáncer de mama se presente en edades muy tempranas, se incluyeron cuatro (4) pacientes con cáncer de mama diagnosticado a los 36 años o antes, a pesar de no tener antecedentes familiares de cáncer en general. El criterio de exclusión previamente establecido y tenido en cuenta, fue que alguna de las pacientes estuviera emparentada con otra participante de este mismo estudio. Estas pacientes se contactaron a partir de los servicios oncológicos de la Liga Santandereana de Lucha Contra el Cáncer, La Clínica Comuneros Francisco de Paula Santander, El Hospital Universitario de Santander, El Centro Oncológico y Oncosalud de Bucaramanga.

La participación de las pacientes fue voluntaria, lo que se confirmó con la firma del consentimiento informado (**Anexo A**). Se realizó un cuestionario (**Anexo B**) dirigido para recopilar datos personales relacionados con factores sociodemográficos, antecedentes clínicos y antecedentes familiares. Este estudio fue evaluado por el comité de ética UIS-HUS (Universidad Industrial de Santander-Hospital Universitario de Santander), y aprobado bajo el código **CB0601**.

## Esquema 1 Metodología del Estudio



### 4.1. MÉTODOS MOLECULARES IMPLEMENTADOS

#### 4.1.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se hizo a partir de 4 ml, por el método de Salting Out según el protocolo del Laboratorio de Genética de la UIS.

##### 4.1.1.1. Precipitación Salina (Salting Out)

###### 4.1.1.1.1. Descripción.

Debido a que las proteínas son menos solubles en soluciones altamente salinas, el método de Salting Out permite la precipitación de las proteínas de las células sanguíneas (incluyendo aquellas adheridas al ADN) y la consecuente liberación

del ADN que se encuentra en los linfocitos. Las moléculas proteicas están formadas por aminoácidos hidrofóbicos y aminoácidos hidrofílicos que en solución acuosa adquieren una configuración estructural que favorece la disolución de estas proteínas en el agua. Este fenómeno es posible debido a que los aminoácidos hidrofóbicos de la proteína son protegidos por los aminoácidos hidrofílicos, siendo estos últimos los que realmente van a interactuar y formar enlaces de hidrógeno con las moléculas acuosas. En un medio acuoso pero altamente salino, las moléculas acuosas tienen una mayor afinidad por las sales iónicas que por los aminoácidos hidrofílicos, por lo tanto, las proteínas se coagulan al hacerse más fuertes los enlaces hidrofóbicos entre ellas. De esta manera es posible precipitar posteriormente las proteínas mediante centrifugación. Posteriormente, el uso de detergentes polarizantes, como el SDS 10%, le proporciona a las proteínas adheridas al ADN (histonas y no histonas) una carga negativa, razón por la cual son posteriormente repelidas por el material genético (por su carga negativa), liberando y purificando de esta manera el ADN. (Miller SA, et al. 1988; Salting out, [http://en.wikipedia.org/wiki/Salting\\_out](http://en.wikipedia.org/wiki/Salting_out))

#### **4.1.1.1.2. Protocolo de Salting Out.**

1. Tomar la muestra de sangre venosa, 4 ml por tubo (2 tubos debidamente codificados) con EDTA y homogenizar rápidamente por inversión para evitar la coagulación de la muestra. *(A partir del otro tubo se obtiene Buffy Coat por centrifugación y/o mancha de sangre, ambos debidamente codificados, para almacenar en caso de ser insuficiente el ADN extraído por Salting Out).*
2. Se pasa la muestra de sangre (4 ml) a un tubo de polipropileno (con el código correspondiente), agregar Buffer de Lisis I (Solución a 4°C con: Sucrosa 0.3 M, Tris HCl 10 Mm (pH 7.5), Cloruro de Magnesio 5 mM, Triton 100X) llevando a 15 ml, tapar y mezclar suavemente por inversión hasta 10 veces. *(Las características salinas, hiperosmolares y detergentes del Buffer de Lisis I, permite la lisis de los glóbulos rojos y la precipitación proteica).*
3. Centrifugar durante 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm).
4. Retirar el tubo, descartar el sobrenadante dejando escurrir bien los tubos sin desprender el botón celular del fondo.
5. Adicionar 1.4 ml de Buffer de Lisis II (Solución a T° ambiente y pH 8.0 con: Buffer EDTA-Na y NaCl), 38 ul de SDS y 330 ul de Perclorato de Sodio, tapar el tubo y mezclar en vortex durante 10 segundos. *(El Buffer de Lisis II permite lisar los glóbulos blancos, y tanto el SDS como el Perclorato de Sodio facilitan la separación de las proteínas del ADN y su precipitación).*
6. Agregar 0.6 ml de NaCl 6 M, tapar el tubo y mezclar fuerte en vortex *(con el objetivo de solubilizar el ADN y precipitarlo)*, luego centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm.
7. Una vez centrifugado, pasar el sobrenadante (que contiene el ADN disuelto) a otro tubo de polipropileno (con el código correspondiente) sin dejar pasar el precipitado (este último se desecha).

8. Agregar 2.1 ml de Isopropanolol (-20°C), tapar el tubo y mezclar suavemente por inversión hasta visualizar las fibras de ADN (*como algodón*).
9. Tomar un tubo eppendorf de 1.5 ml (codificado correctamente) y agregar 0.2 ml de Buffer TE.
10. Con una punta envolver las fibras de ADN y retirarlas del tubo.
11. Tomar 0.7 ml de Etanol al 70% y lavar el ADN en la tapa del mismo tubo de polipropileno.
12. Una vez lavado el ADN, se coloca en el tubo eppendorf (codificado previamente) con el Buffer TE, asegurándose que se desprenda bien de la punta.
13. Tapar el tubo y guardarlo en refrigeración (2-8°C).

#### **4.1.1.2. Extracción ADN de la Muestra 003 por Chelex**

De una paciente, 003, de la que solo se contó con un tubo de sangre + EDTA, no se obtuvo con éxito el ADN por medio de salting out, así que se procedió a extraer el ADN por el método de Chelex a partir de una mancha de sangre. Chelex es una resina de intercambio iónico que une magnesio protegiendo el ADN durante el proceso de extracción. La extracción de ADN por el método Chelex, se hizo según el protocolo manejado en el Laboratorio de Genética de la UIS.

##### **4.1.1.2.1. Protocolo de Extracción de ADN por Chelex.**

1. Marcar un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril con el código de la muestra respectiva y verter 1 ml de agua destilada.
2. Recortar un fragmento de 0,3 cm x 0.3 cm y partirlo en pequeños pedazos dentro del eppendorf. (*Las tijeras deben ser estériles*).
3. Incubar a T° ambiente por 30 minutos hasta un día (*hasta que los papeles queden lo más blanco posible*), mezclando en vórtex repetidamente.
4. Centrifugar a 10.000 – 15.000 rpm por 3 minutos.
5. Retirar el sobrenadante con una pipeta hasta dejar 50 ul, o lo más seco posible. (*Repetir el lavado por 30 minutos una vez más si es necesario, centrifugar y secar*).
6. Añadir Chelex al 5% hasta un llevar a un volumen final de 200ul (añadir 150 ul), agitar el recipiente de Chelex todo el tiempo durante este paso, para asegurar que se toma resina puesto que se tiende a ir al fondo.
7. Incubar en baño maría a 56°C por 30 minutos.
8. Agitar en vórtex por 10 segundos cada muestra.
9. Introducir los tubos en agua a 100°C por 8 minutos.
10. Agitar en vórtex por 10 segundos cada muestra.
11. Centrifugar a 10.000- 15.000 rpm por 3 minutos.
12. Recoger el sobrenadante (donde se encuentra el ADN disuelto) y pasarlo a otro eppendorf estéril y marcado con el respectivo código. (*Evitar que se pase el Chelex del fondo*).
13. Almacenar a 4°C en nevera.

#### **4.1.1.3. Extracción de ADN a partir de Células MCF-7, con el kit DNAzol**

Las células MCF-7 (ATCC N° HTB-22TM) corresponden a una línea celular de cáncer de mama de tipo epitelial proveniente de un adenocarcinoma de tejido mamario y que consta de varias alteraciones moleculares que le otorgan su potencial maligno, como la expresión de los oncogenes WNT7B y Tx-4, y Receptores Estrogénicos (ER) positivos. Estas células carecen de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, aunque pueden tener otros cambios que modifiquen su transcripción, como pérdida alelica en el gen BRCA1 (Elstrodt F, et al. 2006), por esta razón son usadas en este estudio como controles negativos.

El DNAzol, es un reactivo detergente de lisis a base de guanidina que hidroliza el ARN y precipita selectivamente el ADN a partir de un lisado de células. La extracción de ADN con DNAzol (según el protocolo del kit) requiere que a partir de un cultivo celular MCF-7, se obtenga la mayor cantidad de células para homogenizar con el reactivo DNAzol (*1 ml de DNAzol para cada 107 células*). Esta mezcla se debe preferiblemente centrifugar por 10 minutos a 10.000 gravedades. Se obtiene el sobrenadante para precipitar el ADN con Etanol al 100% (*0,5 ml de Etanol 1005 por cada 1 ml de DNAzol usado en la mezcla*) y se mezcla hasta 8 veces por inversión hasta observar el ADN precipitado. Una vez identificado y obtenido el ADN, se lava cuidadosamente con 1 ml de Etanol al 75% y después se solubiliza en NaOH 8mM. (Molecular Research Center. Inc. <http://www.mrcgene.com/dnazol.htm>)

#### **4.1.2. Cuantificación de ADN**

Es importante conocer la cantidad y calidad del material genético obtenido mediante los métodos de extracción, con el objetivo de lograr estandarizar la cantidad de ADN necesaria para tener los mejores resultados en los procedimientos analíticos posteriores. En este estudio se hizo la cuantificación de ADN mediante Espectrofotometría y Electroforesis en gel de Agarosa.

##### **4.1.2.1. Espectrofotometría**

Consiste en un método de análisis óptico que permite comparar la radiación absorbida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto y una que tiene una cantidad conocida de la misma sustancia, con el objetivo de determinar de forma más precisa la concentración de ADN en una determinada muestra. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se diluyen 10 ul de ADN (*previamente puesto por 30 minutos en baño maría a 56°C para denaturarlo*) en 990 ul de H<sub>2</sub>O destilada. Mezclar en vórtex y pasar a una cubeta de cuarzo. Se debe calibrar primero el espectrofotómetro con solo H<sub>2</sub>O destilada y posteriormente leer las muestras a 260 nm. El anterior protocolo se siguió según lo manejado en el laboratorio de genética de la UIS.

*El cálculo de la concentración de ADN se hizo mediante la fórmula:*

$D.O. \times 5 = ( ) \text{ ug/ml}$ , donde D.O. es la densidad óptica y 5 es el factor de dilución.

#### **4.1.2.2. Electroforesis en Gel de Agarosa**

Para preparar el gel de agarosa al 1,5%, se pesan 0,75 gr agarosa, se vierten en un Erlenmeyer y se agrega a continuación el buffer TBE 0.5X, esta mezcla se coloca en una placa de calentamiento hasta que disuelva en su totalidad. Una vez este homogénea la mezcla, se añade 1 ul de Bromuro de Etidio (usar guantes y tapabocas para evitar el contacto físico o por inhalación de esta sustancia debido a que es cancerígena), se mezcla bien el bromuro y se vierte esta solución en el molde para el gel (con el peine puesto y previamente equilibrado). El gel se deja solidificando por aproximadamente 30 minutos, y mientras se va preparando la cámara de electroforesis con 800 ml de buffer TBE 0.5X. Una vez solidificado el gel, se retira el peine cuidadosamente y se coloca con su molde en la cámara de electroforesis. La cámara debe estar equilibrada y el buffer debe tapar el gel completamente.

Para sembrar, en este caso, el ADN directo, se debe colocar primero en un papel no absorbente 2 ul del buffer de corrido 6X que viene con el marcador de peso. Se toman 3 ul del ADN extraído, se mezcla con la gota del buffer de corrido 6X y se siembra en el fondo del pozo evitando que se salga, este proceso se repite con cada una de las muestras. Terminado el proceso de sembrado, se ubican los electrodos de manera que la dirección sea desde el polo negativo al polo positivo. Se deja correr a 150 voltios por unos 15 minutos.

El gel se observa en el transiluminador de luz ultravioleta para análisis el ADN extraído. *(En este caso no se requiere sembrar en alguno de los pozos el marcador de peso, puesto que solo se va a verificar la cantidad y calidad de ADN de forma subjetiva, evaluando la presencia de ADN y el grosor de la banda, así como señales de posible degradación del material genético).* El anterior protocolo se realizó según lo establecido en el laboratorio de genética-UIS)

#### **4.1.3. PCR-Mismatch y Digestión Enzimática**

##### **4.1.3.1. Descripción**

Esta técnica consiste en una PCR convencional con modificaciones y es usada para identificar algunas mutaciones puntuales en una región de un gen de interés con la ayuda de enzimas de restricción. La principal característica de esta técnica en particular, es el uso de un par de primers de los cuales uno de ellos contiene en su secuencia una base "Mismatch", es decir, una base no complementaria a la cadena molde que queremos estudiar; esto con el objetivo de introducir un cambio de base en el amplificado resultante, que permita crear o eliminar un sitio de

restricción para una enzima en particular. El amplificado resultante que corresponde a el alelo normal (silvestre) y a el alelo mutado (inserciones o deleciones puntuales), serán diferentes en su secuencia, por lo tanto, al ser sometidas posteriormente a un proceso de restricción con la misma enzima, mostrarán diferentes patrones de digestión que se podrán observar en una electroforesis al comparar los tamaños de las bandas, permitiendo de esta manera evidenciar si existe o no la mutación en particular que se está buscando, las posibilidades son: homocigoto para la mutación (si los dos alelos están mutados), homocigoto silvestre (si no existe la mutación en ninguno de los dos alelos) o heterocigoto para la mutación (si están presentes los dos alelos, tanto el mutado como el silvestre en una misma muestra de estudio) (Backe J, et al. 1999; Jara L, et al. 2002; Jara L, et al. 2002; Jara L, et al. 2004; Abeliovich D, et al. 1997).

Durante el proceso de PCR-Mismatch, es importante tener en cuenta que lo que se está buscando es introducir un error en el amplificado, por lo tanto, se debe ser cuidadoso en el manejo de la temperatura de alineamiento T.A. y otros factores, para que no se amplifiquen regiones inespecíficas que alteren el resultado y el análisis final. La técnica PCR-Mismatch para detectar las mutaciones 185delAG y 5382insC del gen BRCA1 ha sido usada y referenciada previamente en diferentes estudios y los primer's usados en este estudio, así como las respectivas enzimas de restricción, ya han sido reportados por varios grupos con buenos resultados (Backe J, et al. 1999; Jara L, et al. 2002; Jara L, et al. 2002; Jara L, et al. 2004; Abeliovich D, et al. 1997). **(En los Cuadros 4 y 5, se muestran los primer's mismatch usados para amplificar cada región de interés con el cambio de base, que esta en rojo, y el tamaño del amplificado en pares de bases, antes y después de la digestión enzimática).**

El análisis teórico de los sitios de restricción de cada una de las enzimas respectiva para cada amplicon, se realizo en el software online REBsites (<http://tools.neb.com/REBsites/index.php3>), permitiendo confirmar el tamaño de los amplificados según cada par de primer's mismatch usado, así como los sitios de restricción de la enzima en presencia y ausencia de la mutación en estudio, verificando el tamaño de los fragmentos a obtener en cada caso en particular.

**Cuadro 4 Primer's para PCR Mismatch Exon 2 (185delAG)**

MUTACIÓN	PRIMERS NORMAL Y MISMATCH	T.A. C°	AMPLICON	ENZIMA RESTRICCIÓN	FRAGMENTOS RESULTANTES (pb)
185delAG Exon 2	F 5'-GAA GTT GTC ATT TTA TAA ACC TTT-3' R 5'-TGA CTT ACC AGA TGG GAG AC-3'	55	N:170 pb M:168 pb	Hinf I 5'G <sup>^</sup> ANTC 3'CTNA <sup>^</sup> G	N: 149 + 21 M: 168

Fuente: Abeliovich, et al 1997. Confirmado en <http://tools.neb.com/REBsites/index.php3>

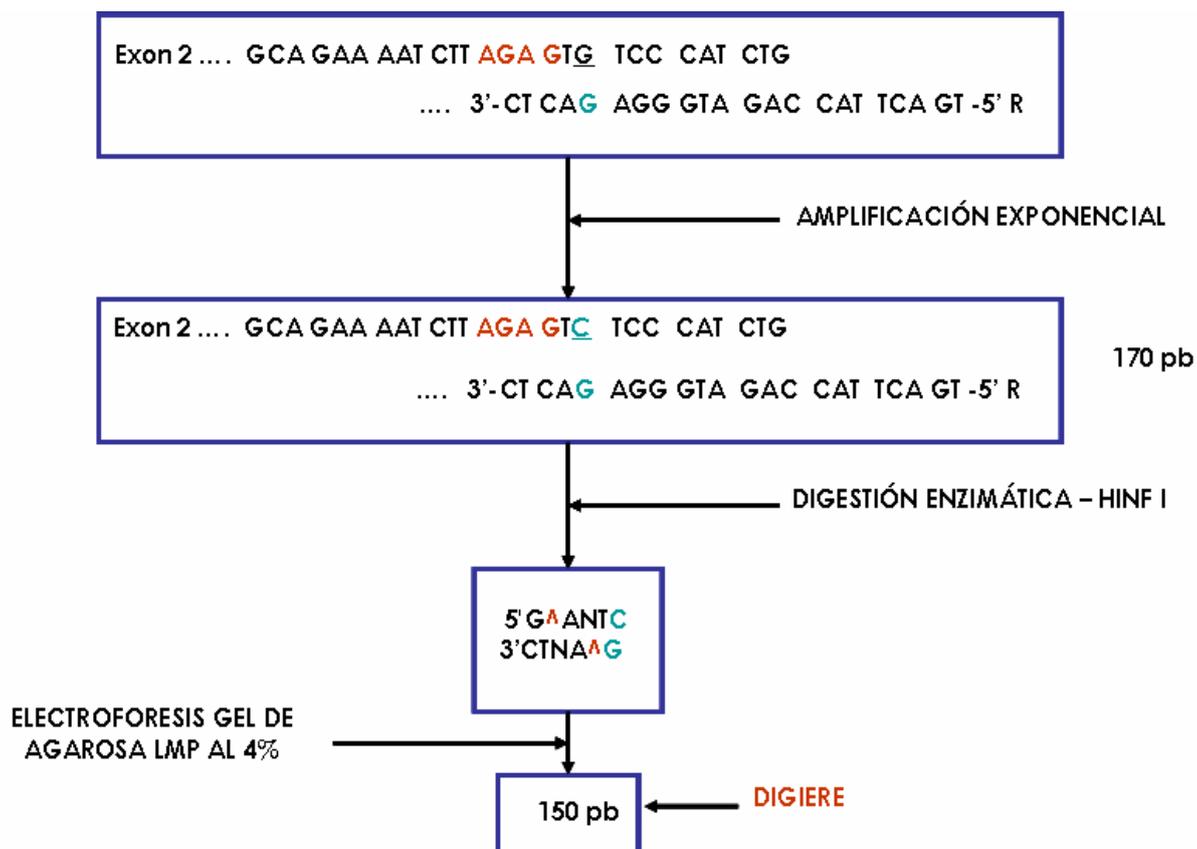
**Cuadro 5 Primer's para PCR Mismatch Exon 20 (5382insC)**

MUTACIÓN	PRIMERS NORMAL Y MISMATCH	T.A. C°	AMPLICON	ENZIMA RESTRICCIÓN	FRAGMENTOS RESULTANTES (pb)
5382insC Exon 20	F 5'CCA AAG CGA GCA AGA GAA TCT C-3' R 5'GGG AAT CCA AAT TAC ACA GC-3'	61	N: 270 pb M: 271 pb	Ddel 5'CA <sup>A</sup> TNAG 3'GANT <sup>A</sup> C	N: 214 + 36 + 20 M: 235 + 36

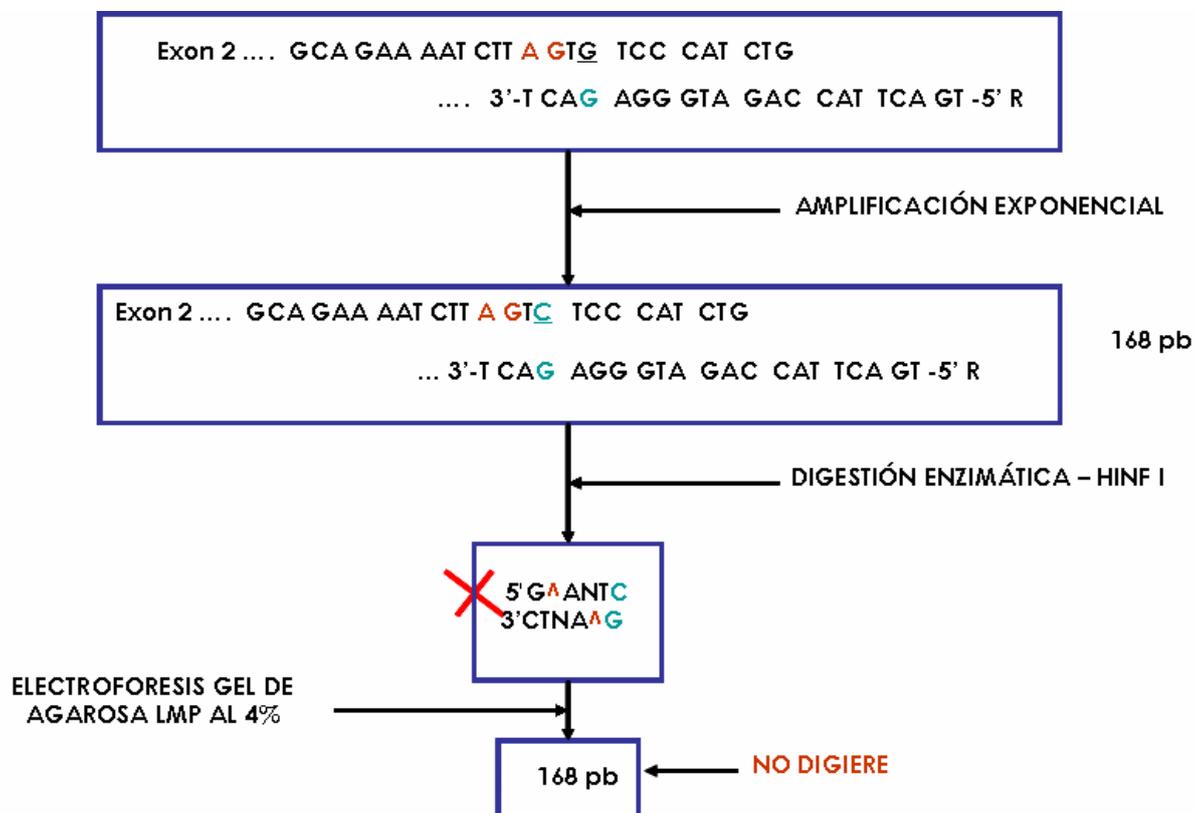
Fuente: Backe J, et al 1999. Confirmado en <http://tools.neb.com/REBsites/index.php3>

*(En los Esquemas 1 y 2 se explica el mecanismo de amplificación mediante PCR-Mismatch del exon 2, tanto silvestre como mutado -185delAG-, respectivamente, el tamaño en pares de bases de los amplificados respectivos y los tamaños (pb) de los fragmentos resultantes esperados después de la digestión enzimática con Hinf I en cada uno de los casos; la base mismatch del primer reverse para el exon 2, es una G).*

**Esquema 2 PCR-Mismatch del Exon 2 Silvestre, Gen BRCA1**



### Esquema 3 PCR-Mismatch del Exon 2 Mutado (185delAG), Gen BRCA1



Una vez obtenidos los amplificados, con un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción (alelo normal) o sin un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción (alelo mutado), se someten a digestión enzimática para obtener los respectivos fragmentos. Para hallar la mutación 185delAG (exon 2) se usó la enzima HinfI y para la mutación 5382insC (exon 20) se usó la enzima Ddel. Posterior a la digestión, los fragmentos se analizan en gel de agarosa LMP (Low Meeting Point o Bajo Punto de Fusión) al 4%, en el cuál se espera observar: para el alelo normal del exon 2, un fragmento de 149pb (digerido) y para el alelo mutado de este mismo exon, un fragmento de 168pb (no digerido) (**En las Imágenes 1 y 2, ANEXO C, se muestra el análisis con la enzima de restricción HinfI de la región con mutación y sin mutación, amplificada con el cambio de base, como guía de lo que se espera obtener en cada caso en particular**) (Abeliovich D, et al 1997, <http://tools.neb.com/REBSites/index.php3>). Igualmente para el alelo normal del exon 20, se espera observar un fragmento de 214pb (digerido en dos sitios) y para el alelo mutado de este mismo exon, un fragmento de 235pb (habiéndose eliminando uno de los sitios de restricción) (**En las Imágenes 3 y 4, ANEXO C, se muestra el análisis con la enzima de restricción Ddel de la región con mutación y sin mutación, amplificada con el cambio de base, como guía de lo que se espera obtener en este caso en particular**)

(Backe J, et al 1999, <http://tools.neb.com/REBSites/index.php3>). A continuación se explica en detalle el protocolo correspondiente a la PCR-Mismatch, que fue estandarizado y usado en el laboratorio de genética de la UIS.

#### 4.1.3.2. Protocolo PCR-Mismatch

1. Prender el baño maría a 56°C y colocar las balas codificadas con el ADN previamente diluido (1/10 o 1/20, según su cuantificación) por 30 min, con el objetivo de denaturarlo y posterior a esto, retirar. *(Se colocan tanto las muestras a analizar, como los controles positivos para cada mutación y el control negativo MCF-7).*
2. Hacer limpieza en el área de trabajo (mesón y micropipetas) con hipoclorito y alcohol, y preparar el material incluyendo puntas estériles, bandeja con hielo donde se colocan todos los reactivos menos la Taq Polimerasa (dNTP's diluidos (4), Cloruro de Magnesio, Buffer de la Taq Polimerasa y set de los respectivos Primer's diluidos), servilletas, balas de PCR estériles, bala(s) de 1.5 con agua destilada, bala(s) de 1.5 para preparar el respectivo mix de reactivos, etc... *(La Taq Polimerasa debe estar en hielo, nunca descongelar y se debe añadir de último).*
3. Marcar las balas con el respectivo código incluyendo siempre el control positivo y negativo, y el blanco (sin muestra, solo mix y agua destilada).
4. Preparar el mix ***(En la Tabla 4, se muestran las cantidades y concentraciones de cada reactivo dentro del mix de PCR. El mix fue el mismo para las dos regiones, cambiando solo el set de primer's)*** y adicionar a cada bala 38 ul del mismo. *(Pipetear la cantidad adecuada sin contaminar el material).*
5. Agregar a cada bala 12 ul de su respectiva muestra de ADN ya denaturada y mezclada en vortex, incluyendo los controles y el agua destilada para el blanco, completando un volumen final de 50 ul por bala. *(Tapar las balas en la medida en que se sirve el ADN respectivo y cambiar de punta para cada muestra).*
6. Una vez terminado lo anterior, se llevan las balas al termociclador, se revisan que estén bien tapadas y activa el programa deseado según lo estandarizado para la región que se quiere amplificar. ***(En la Tabla 5, se muestran las condiciones de la PCR, para cada región a analizar)***
7. Al terminar el proceso de amplificación en el termociclador, las balas se disponen en una gradilla y se guardan en la nevera de PCR para posteriores análisis.
8. Siempre se deben verificar todos los amplificados en un gel de agarosa al 2.5% (50 cc de Buffer TBE 0.5X + 1,25 gr de agarosa + 2 ul de Bromuro de Etidio), antes de seguir con los otros análisis, en este caso, con la digestión enzimática. *(Todas las electroforesis se hicieron en un gel de agarosa al 2.5% de 20 pozos, incluyendo en estos los controles, el blanco y un marcador de peso molecular de 50 pb, y las condiciones de corrido fueron a 45 mV por 80 minutos y fue visto y analizado en un Transiluminador UV).*

**Tabla 4 Preparación del Mix de Reactivos para el Exon 2 y 20 del Gen BRCA1.**

MEZCLA DE REACCIÓN EXON 2 Y EXON 20. GEN BRCA1		
REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL = FINAL	CANTIDAD A USAR POR TUBO
dH2O		19,8 ul
BUFFER	10X = 1X	5 ul
MgCl2	25mM = 1,5mM	3 ul
dNTP's x 4	10mM = 0,2mM x 4	0,5 ul x 4
Primers (F ' - R')	5uM = 0,4uM x 2	4 ul x 2
TucanTaq Poli	0,2u	0,2 und
<b>SUBTOTAL DE LA MEZCLA POR BALA</b>		<b>38 ul</b>
DNA	250ng/ul = 50ng/ul	12 ul
<b>VOLUMEN FINAL POR BALA</b>		<b>50 ul</b>

**Tabla 5 Condiciones en el Termociclador para los Exones 2 y 20 del Gen BRCA1.**

PCR MISMATCH 185delAG (Exon 2)			PCR MISMATCH 5382insC (Exon 20)		
CONDICIONES EN TERMOCICLADOR			CONDICIONES EN TERMOCICLADOR		
DENATURACIÓN INICIAL		94°C x 3 min	DENATURACIÓN INICIAL		94°C x 3 min
30 CICLOS	DENATURACIÓN	94°C x 30 seg	30 CICLOS	DENATURACIÓN	94°C x 30 seg
	<b>ALINEAMIENTO</b>	<b>55°C x 30 seg</b>		<b>ALINEAMIENTO</b>	<b>61°C x 30 seg</b>
	EXTENSIÓN	72°C x 30 seg		EXTENSIÓN	72°C x 30 seg
EXTENSIÓN FINAL		72°C x 10 min	EXTENSIÓN FINAL		72°C x 10 min
T° FOREVER		4°C	T° FOREVER		4°C

#### 4.1.3.3. Protocolo de la Digestión Enzimática

*(La actividad de las enzimas fue confirmada previamente mediante la digestión del Plásmido pUC18 y de ADN sin diluir, cada uno con su respectivo control sin digerir). (En la Tabla 6, se hace referencia a las cantidades y concentración de cada reactivo usado en el mix para la digestión enzimática; estos valores fueron diferentes cuando se usó el amplificado de las pacientes, el ADN directo y el plásmido pUC18)*

1. Limpiar el lugar de trabajo y las pipetas con hipoclorito y alcohol, antes de empezar el procedimiento.
2. El Buffer de la enzima se debe precalentar en baño maría a 37°C por 25 min.
3. Preparar el resto de los reactivos con los que se va a trabajar incluyendo el agua destilada y el BSA correspondiente a cada enzima, mientras el Buffer 10X de la enzima respectiva se precalienta. *(La enzima a usar, se debe añadir a final y mantener en hielo mientras su uso)*
4. Preparar balas de PCR con los amplificados de las muestras que se van a analizar y codificar las balas de PCR estériles correspondientes, en donde se

montará la respectiva digestión. *(Incluir digeridos y no digeridos de los respectivos controles positivos y negativo, de muestras y del Plásmido pUC18).*

5. Se prepara el mix de las muestras que se van a digerir, en una bala aparte del mix de las muestras que no se van a digerir.

6. Una vez listo el mix (**Tabla 6**) que incluye Buffer 10X a 37°C, agua destilada y BSA, con o sin la enzima según el caso, se sirve en cada bala respectiva un volumen de 10 ul.

7. A cada bala según como corresponda se le añaden 10 ul del amplificado de cada muestra para obtener un volumen final de 20 ul. *(Es importante servir cada muestra con una punta diferente y tapar cada bala para evitar contaminación).*

8. **Digestión del Plásmido pUC18:** debe ser más diluido para obtener mejores resultados, por lo tanto a las balas correspondientes que contienen 10 ul del mix, solo se le agregan 5 ul del mismo y luego se le agregan 5 ul de agua destilada para completar un volumen final de 20 ul. *(El plásmido debe estar a T° ambiente en el momento de usarse).*

9. Una vez terminados los pasos 7 y 8, se llevan las balas al baño maría a 37°C por 16 hr (para la digestión del exon 20) o por 20 hr (para la digestión del exon 2).

10. Al terminar el proceso de digestión a las 16 hr o 20 hr según como corresponda, las balas se disponen en una gradilla y se guardan en la nevera de PCR o mejor se dispone a continuar con la visualización de las bandas obtenidas.

11. Se procede a visualizar las muestras digeridas y no digeridas en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 4% (50 cc de Buffer TBE 0.5X + 2 gr de agarosa LMP + 1.5 ul de Bromuro de Etidio), incluyendo los controles positivos y negativo, el plásmido y el marcador de peso molecular de 50 pb. *(El tiempo de corrido fue de 45 mV por 2 hr y 30 min, y se vio y analizó en un Transiluminador UV).*

**Tabla 6 Mezcla de Reacción Para la Digestión Enzimática de los Exones 2 y 20 del Gen BRCA1, del Plásmido pUC18 y de ADN directo.**

REACTIVOS	MUESTRAS (ul)		PLÁSMIDO (ul)		ADN DIRECTO (ul)	
	DIGERIDOS	NO DIGERIDOS	DIGERIDOS	NO DIGERIDOS	DIGERIDOS	NO DIGERIDOS
Buffer 10X	2	2	2	2	2	2
BSA	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
dH2O	7,3	7,8	12,3	12,8	15,3	15,8
Enzima	0,5		0,5		0,5	
ADN	10	10	5	5	2	2
<b>TOTAL</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

## 4.2. MÉTODO DE ANÁLISIS DEL ESTUDIO

El análisis de los resultados es de tipo descriptivo, para lo cuál se construyó una base de datos en EXCEL®, en la cuál se consignó la información sobre variables obtenidas previamente mediante el cuestionario aplicado a cada paciente. Para cada variable continua se hizo el cálculo de promedios y para las variables de tipo nominal y ordinal se hizo el cálculo de frecuencias. En las muestras analizadas de cada paciente se detectó la presencia o ausencia de mutación y se describió la frecuencia de cada una de estas en la muestra de pacientes de este estudio. Los resultados están presentados como tablas y gráficos tipo histograma.

## 5. RESULTADOS

El total de pacientes incluidos en el análisis genético y en el análisis descriptivo, fue de 30; a continuación se hará referencia a los promedios y frecuencias de variables continuas y nominales/ordinales, respectivamente.

### 5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE FACTORES DE RIESGO EN LAS 30 PACIENTES ANALIZADAS

Entre las características que presentaban las pacientes analizadas en el estudio se encuentran las siguientes: El promedio de edad al momento del diagnóstico de las 30 pacientes fue de 49,6 años, (SD 9,1; 27-75 años) (**Tabla 7**), de los cuales el 16,7% (5/30) fueron <37 años (27 a 36 años), el 43,3% estuvieron entre los 37 a 50 años y el 40% entre los 51 a 75 años. (**Tabla 8 y Gráfica 1**)

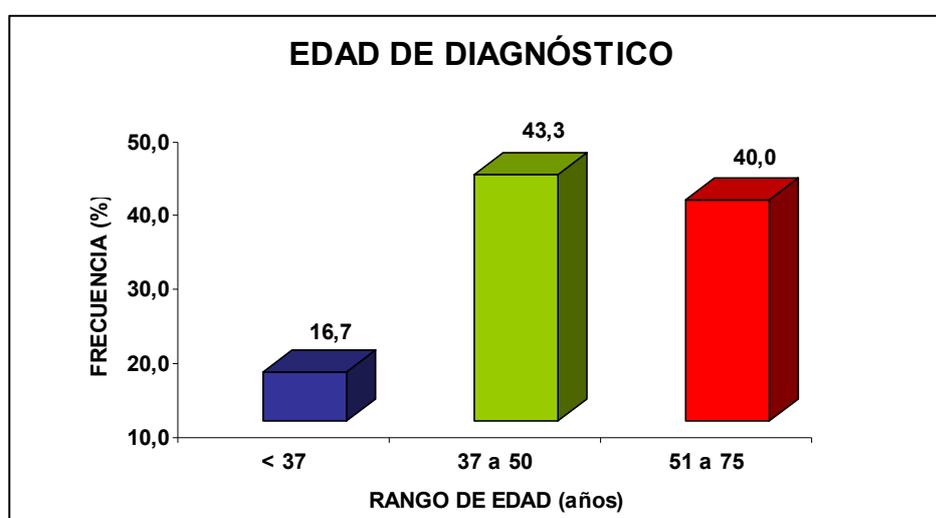
**Tabla 7 Características Generales de las Pacientes Analizadas.**

VARIABLES CONTINUAS	PACIENTES (%)	PROMEDIOS	SD	Rangos	
				Límite Inferior	Límite Superior
EDAD DE DIAGNÓSTICO	100	49,6 años	9,1	27 años	75 años
EDAD DE LA MENARCA	100	13,3 años	6,2	9 años	17 años
EDAD DE LA MENOPAUSIA					
NO	50				
SI	50	49,8 años	9,1	45 años	60 años
EDAD DEL PRIMER PARTO					
NO (Nulípara)	6.7				
SI	93.7	21,2 años	7,5	15 años	42 años
LACTANCIA ACUMULADA					
NO	13.3				
SI	86.7	56,7 meses	9,0	3 meses	196 meses
CONSUMO DE HORMONAS					
NO	66.7				
SI	33.3	6,52 años	4,5	0,6 años	18 años

**Tabla 8 Edad al Momento del Diagnóstico de las 30 Pacientes con Cáncer de Mama (rangos).**

EDAD DE DIAGNÓSTICO (años)	NÚMERO PACIENTES	FRECUENCIA (%)
27 a 36	5	16,7
37 a 50	13	43,3
51 a 75	12	40,0
<b>TOTAL DE PACIENTES</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>

**Gráfica 1 Frecuencia de Rango de Edades al Momento del Diagnóstico.**



La edad promedio de la primera menstruación (menarca) fue de 13,3 años (**Tabla 7**), siendo la edad de 13 años la más frecuente entre las pacientes, con un 33,3% (10/30). Tres pacientes refirieron una edad de menarca menor o igual a 11 años, incluyendo una de 9 años. (**Tabla 9**)

**Tabla 9 Edad de la Menarca en las 30 Pacientes.**

MENARCA (años)	NÚMERO DE PACIENTES
9	1
11	2
12	5
13	10 (33.3%)
14	5
15	6
17	1
<b>TOTAL DE PACIENTES</b>	<b>30</b>

Con respecto al consumo de hormonas exógenas tipo anticonceptivos orales (AO) y/o terapia de reemplazo hormonal (TRH) en tiempo acumulado (años), el 66,7% refirió no haber tomado ningún tipo de hormonas y el 33,3% (**Tabla 10**) refirió haber tomado algún tipo de hormonas por un periodo de 0,6 a 18 años. De este 33,3% que dijo haber consumido hormonas exógenas, el tiempo promedio en años fue de 6.52 (**Tabla 7**).

**Tabla 10 Consumo de Hormonas Exógenas (AO y/o TRH).**

AO y/o TRH	NÚMERO DE PACIENTES	FRECUENCIA (%)
No	20	66,7
Si	10	33,3
<b>TOTAL DE PACIENTES</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>

El promedio de edad del primer parto (EPP) de las pacientes fue de 21,2 años (**Tabla 7**), en donde el 43,3% de las pacientes estuvieron dentro del rango de 15 a 20 años, seguido por el 40% en el rango de 21 a 35 años (**Tabla 11 y Gráfica 2**). Solo una paciente tuvo el primer parto después de los 40 años (42 años).

El número de embarazos a término más frecuente entre las pacientes fue de 3 y 4, con un 23,3% (7/30) cada uno (*datos no mostrados*). Dos de las pacientes son nulíparas, una con 27 años y la otra con 59 años (**Tabla 11**).

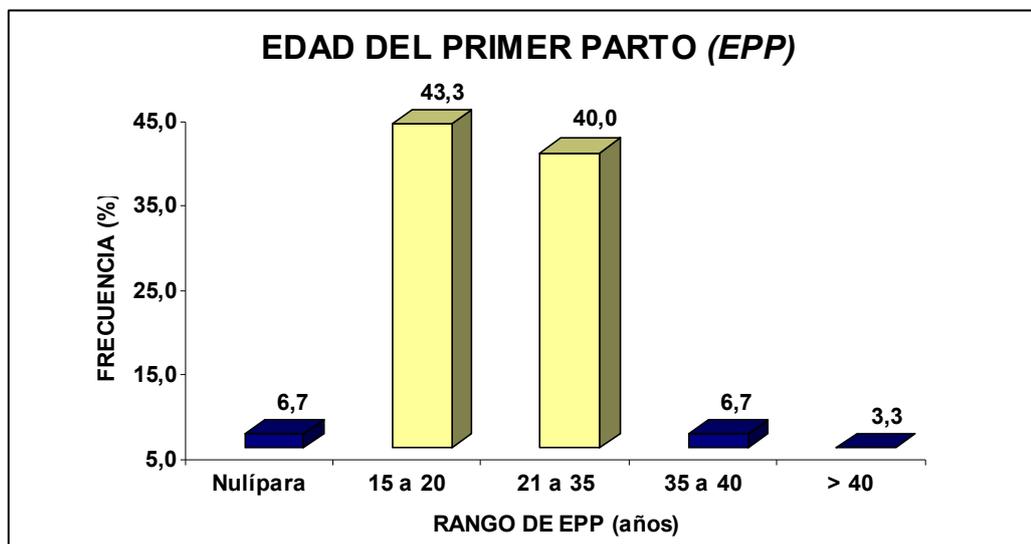
**Tabla 11 Edad del Primer Parto.**

EPP (años)	NÚMERO DE PACIENTES	FRECUENCIA (%)
<b>Nulípara</b>	2	6,7
<b>15 a 20</b>	13	43,3
<b>21 a 35</b>	12	40,0
<b>35 a 40</b>	2	6,7
<b>&gt; 40</b>	1	3,3
<b>TOTAL DE PACIENTES</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>

Los datos referentes a la lactancia en tiempo acumulado en meses durante la vida, mostraron que el 13,3% (4/30) de las pacientes no dio lactancia, de las cuales 2 son nulíparas. La mayoría de pacientes (40%) refirió dar lactancia durante 25 a 96 meses (de 2 a 8 años acumulado) (**Tabla 12**). El promedio de lactancia en meses entre el total de pacientes que dieron lactancia (87,7%), fue de 56,7 (SD 9; 3 -195 meses) (**Tabla 7**).

Solo el 50% reportó edad de la menopausia, cuyo promedio fue de 49,8 años (**Tabla 7**), siendo las edades más frecuentes, 50 y 52 (*datos no mostrados*).

**Gráfica 2 Frecuencia en Rango de Edad del Primer Parto.**



**Tabla 12 Periodo Acumulado de Lactancia en Meses.**

LACTANCIA (meses)	NÚMERO DE PACIENTES	FRECUENCIA (%)
0	4	13,3
1 a 12	5	16,7
13 a 24	4	13,3
25 a 48	6	20,0
49 a 96	6	20,0
> 97	5	16,7
<b>TOTAL DE PACIENTES</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>

El análisis de la variable ordinal, Estrato Socio Económico, mostró que la mayoría de las pacientes pertenecían a los estratos 1 a 4, siendo el más frecuente el estrato 1 con un 43,3% (13/30). (**Tabla 13**)

A continuación, se hace una descripción de las familias de las 30 pacientes analizadas, desde el punto de vista de antecedentes de cáncer de mama, ovario y/u otro tipo de cáncer.

En total, el 53,3% de las pacientes no refirió ningún antecedente de cáncer de mama en los familiares; el 46,7% (14/30) presentó al menos un (1) familiar en primer o segundo grado afectado de cáncer de mama. (**Tabla 14, Tabla 16 y Gráfica 3**)

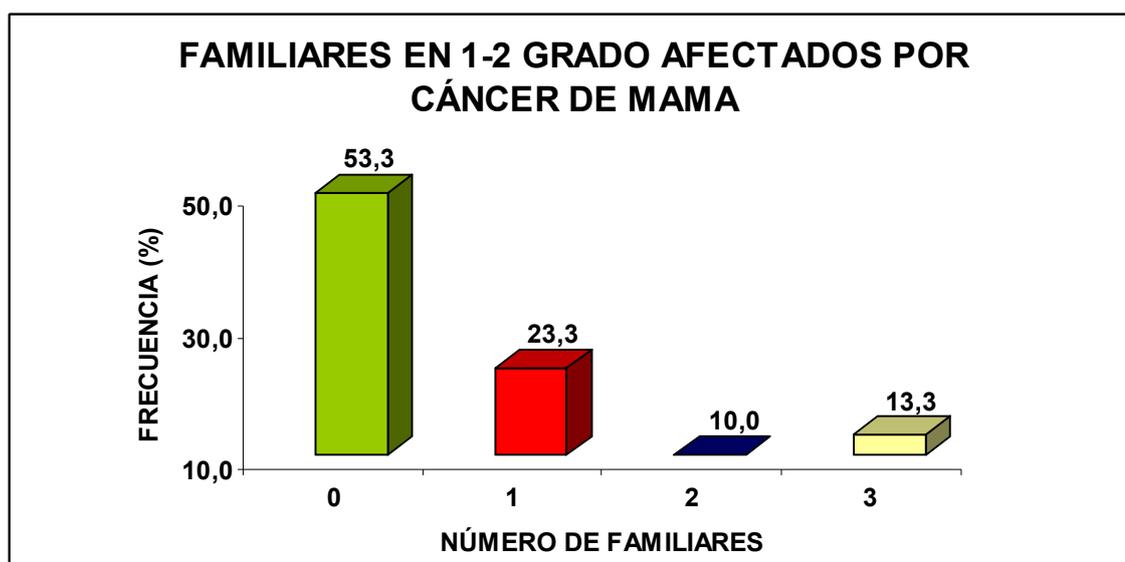
**Tabla 13 Frecuencia del Estrato Socio-Económico.**

ESTRATO SOCIO-ECONÓMICO	NÚMERO DE PACIENTES
1	13 (43,3%)
2	5
3	5
4	5
5	1
6	1
<b>TOTAL DE PACIENTES</b>	<b>30</b>

**Tabla 14 Antecedentes Familiares de Cáncer de Mama en Primer y/o Segundo Grado en las Pacientes Analizadas.**

NÚMERO DE FAMILIARES CON CÁNCER DE MAMA	NÚMERO DE PACIENTES	FRECUENCIA (%)
0	16	53,3
1	7	23,3
2	3	10,0
3	4	13,3
<b>TOTAL DE PACIENTES</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>

**Gráfica 3 Antecedentes Familiares de Cáncer de Mama.**



De las 30 pacientes incluidas en el análisis descriptivo, 5 tenían 36 años o menos al momento del diagnóstico y de estas 4 (13.3%) no reportaron ningún cáncer de mama, ovario u otro en los familiares (**Tabla 15 y 16**).

En general, el 86,7% (26/30) de las pacientes refirió al menos 1 antecedente de cáncer de mama, ovario u otros relacionados con mutaciones en el gen BRCA1, como son de próstata, estómago, colon, útero y vesícula biliar, entre otros. De estos el 20% (6/30) refirió antecedentes familiares de solo cáncer de mama, el 40% (12/30) antecedentes familiares de otros tipos de cáncer, diferente a mama, solamente, y el 26% (8/30) refirió antecedentes familiares tanto de cáncer de mama, como de otros tipos (**Tabla 15 y 16**).

**Tabla 15 Antecedentes Familiares de Cáncer de Mama y Otros, en las 30 Pacientes.**

CÁNCER EN LOS FAMILIARES	NÚMERO DE PACIENTES	FRECUENCIA (%)
<b>CÁNCER DE MAMA Y/U OTROS CÁNCER</b>		
Solo Cáncer de Mama	6	20
Solo Otros Cáncer	12	40,0
Cáncer de Mama y Otros Cáncer	8	26,7
<b>TOTAL DE PACIENTES</b>	<b>26</b>	<b>86,7</b>
<b>NINGÚN CÁNCER</b>	4	13,3
<b>TOTAL DE PACIENTES</b>	<b>30</b>	<b>100</b>

Solo una paciente de 52 años al momento del diagnóstico, presento un familiar afectado de cáncer de ovario. La familiar afectada es una prima que fue diagnosticada a los 38 años (línea paterna). Esta misma paciente, presentó múltiples familiares afectados por cáncer en las dos líneas paternas. Por la línea materna, referenció una tía con diagnóstico de cáncer de mama a los 30 años, un tío diagnosticado de cáncer gástrico a los 40 años y una prima diagnosticada de cáncer de tiroides a los 37 años. Por la línea paterna, referenció dos primas de 60 y 52 años al momento del diagnóstico de cáncer de mama, tres tíos(as) afectadas por cáncer de páncreas (86 años), cáncer gástrico (80 años) y cáncer de piel (84 años), y la prima, que ya se referenció, afectada por cáncer de ovario. (**Tabla 16**)

Una paciente refirió una hermana afectada tanto por cáncer de mama como de útero, pero este dato no fue confirmado con la historia clínica de la familiar, por este estudio. (**Tabla 16**)

**Tabla 16 Descripción de las Pacientes Según sus Antecedentes Familiares.**

* PACIENTE N°	EDAD DE DIAGNÓSTICO (años)	ANTECEDENTES FAMILIARES DE CANCER. (Años) <sup>Grado</sup>		
		MAMA	OVARIO	OTRO
1	67			Cervix (48,55) <sup>1</sup> Nasal (80,48) <sup>1-2</sup> Próstata (18,65) <sup>1-2</sup> Gástrico (33) <sup>2</sup> No Especificado (40) <sup>2</sup>
2	70			Próstata (60,70) <sup>1</sup>
3	46	(35) <sup>2</sup>		
4	40	(40) <sup>1</sup>		Próstata (70) <sup>1</sup>
5	68			Esófago (70) <sup>1</sup> Colon (38) <sup>2</sup>
6	59			Vesícula Biliar (72) <sup>1</sup>
7	67			Cerebral (56) <sup>1</sup> Útero (22) <sup>2</sup> Gástrico (50) <sup>2</sup>
8	46	(46) <sup>1</sup>		Tiroide (40) <sup>1</sup> Gástrico (60) <sup>2</sup> No Especificado (60) <sup>2</sup>
9	67	(35,55) <sup>2</sup>		Colon (59) <sup>1</sup> Esófago (60) <sup>2</sup> Leucemia (50,60) <sup>2</sup> Gástrico (50,60) <sup>2</sup> LP Esófago-gástrico (83) <sup>1</sup>
10	45	(48,52,64) <sup>1</sup>		Útero (48) <sup>1</sup>
11	35	(26,62) <sup>1</sup>		
12	35			
13	46			Hepático (68) <sup>1</sup>
14	41			Útero (50) <sup>2</sup>
15	75			Colon (50) <sup>1</sup>
16	55	(?,?) <sup>2</sup>		Gástrico (60) <sup>2</sup> Hepático (70,70) <sup>2</sup> No Especificado (50) <sup>2</sup>
17	60	LM (50,56,60) <sup>1</sup>		LP Tejidos Blandos (34) <sup>2</sup>
18	27			
19	83			Útero (83) <sup>2</sup>
20	39	(72) <sup>2</sup>		
21	32			
22	52	LM (30) <sup>2</sup> LP (52,60) <sup>2</sup>	LP (38) <sup>2</sup>	LM Gástrico (40) <sup>2</sup> LM Tiroides (37) <sup>2</sup> LP Gástrico (80) <sup>2</sup> LP Páncreas (86) <sup>2</sup> LP Piel (84) <sup>2</sup>
23	53	(44) <sup>1</sup>		
24	36			
25	44	(45) <sup>1</sup> LP (46,50) <sup>2</sup>		LP Hepático (70) <sup>2</sup> LM Pulmonar (46) <sup>2</sup> LM Hepático (53) <sup>2</sup>
26	61			Próstata (?) <sup>1</sup> No Especificado (<40) <sup>2</sup>
27	41			Gástrico (?) <sup>2</sup>
28	47			Colon (68) <sup>2</sup>
29	38	(50) <sup>2</sup>		
30	50	(48) <sup>1</sup>		

\* El número del paciente no corresponde con el sistema de codificación implementado.

## 5.2. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS Y CLÍNICAS DE LAS 30 PACIENTES ANALIZADAS

Se exponen inicialmente las características histopatológicas del cáncer de mama de las pacientes estudiadas y posteriormente, se realizará la descripción de las características clínicas.

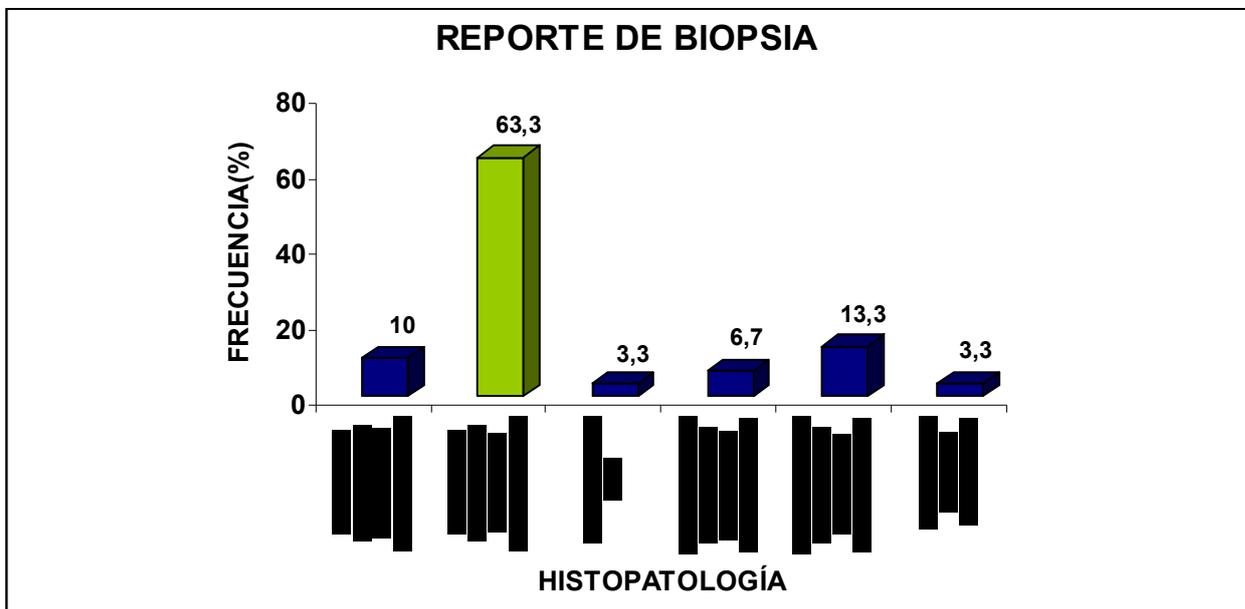
La mayoría de pacientes no reporto o no tenían resultado del BACAF (76,7%), solo de 7 se tomó el dato, y de estos, 4 (13,3%) tuvieron resultado positivo para malignidad. (**Tabla 17**)

El tipo histopatológico más frecuentemente reportado en esta cohorte fue el Carcinoma Ductal Infiltrante Moderadamente/Pobrementemente Diferenciado, con un 63,3% (19/30). Solo una paciente fue diagnosticada en estadio in situ y fue de tipo ductal. (**Tabla 17 y Gráfica 4**)

**Tabla 17 Descripción de las Características Histopatológicas del Tumor de Mama.**

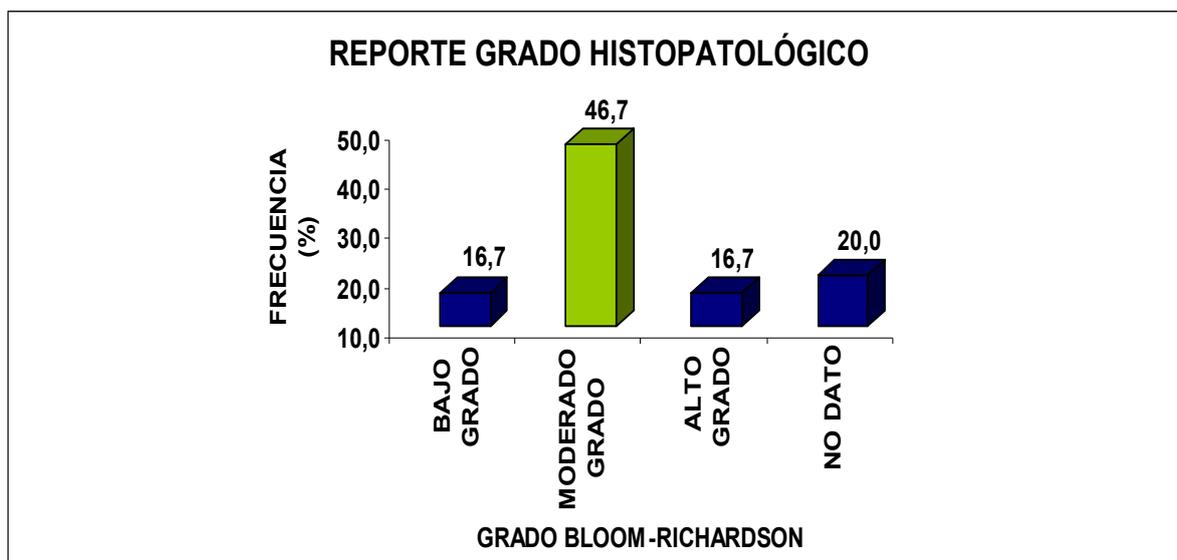
CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	NÚMERO DE PACIENTES	FRECUENCIA (%)
<b>BACAF</b>		
<i>Positivo Para Malignidad</i>	4	13,3
<i>Altamente Sospechoso Para Malignidad</i>	1	3,3
<i>Sospechosos/Sugestivo Para Malignidad</i>	2	6,7
<i>No Dato</i>	23	76,7
<b>TOTAL PACIENTES</b>	30	100,0
<b>BIOPSIA</b>		
<i>Carcinoma Ductal Infiltrante Altamente Diferenciado</i>	3	10
<i>Carcinoma Ductal Infiltrante Mod/Poco Diferenciado</i>	19	63,3
<i>Carcinoma Ductal In Situ</i>	1	3,3
<i>Carcinoma Lobulillar Infiltrante Altamente Diferenciado</i>	2	6,7
<i>Carcinoma Lobulillar Infiltrante Mod/Poco Diferenciado</i>	4	13,3
<i>Carcinoma Tubulo-Lobulillar</i>	1	3,3
<b>TOTAL PACIENTES</b>	30	100,0
<b>GRADO HISTOLÓGICO BLOOM- RICHARDSON</b>		
<i>Bajo Grado</i>	5	16,7
<i>Moderado Grado</i>	14	46,7
<i>Alto Grado</i>	5	16,7
<i>No Dato</i>	6	20,0
<b>TOTAL PACIENTES</b>	30	100,0
<b>RECEPTORES HORMONALES</b>		
<i>ER (-) y PR (-)</i>	14	46,7
<i>ER (-) y PR (+)</i>	2	6,7
<i>ER (+) y PR (-)</i>	0	0,0
<i>ER (+) y PR (+)</i>	9	30,0
<i>No Dato</i>	5	16,7
<b>TOTAL PACIENTES</b>	30	100,0

**Gráfica 4 Frecuencia en el Reporte Histopatológico.**



El grado histológico bloom-richardson reportado con mayor frecuencia fue el moderado, con un 46,7%. La frecuencia de alto grado fue de 16,7% y de bajo grado 16,7%. (*Tabla 17 y Gráfica 5*)

**Gráfica 5 Frecuencia en el Reporte del Grado Histopatológico.**



El 46,7% de los pacientes reportaron ser receptores hormonales negativos y el 30% receptores hormonales positivos, siendo este último de mejor pronóstico. **(Tabla 17)**

A continuación se expone el análisis de las características clínicas del cáncer de mama en las 30 pacientes estudiadas.

El reporte mamográfico BIRADS 4, indicador de sospecha para malignidad de la mama, fue el más frecuente con un 66,7% (20/30), y el 20% reportó BIRADS V (Altamente sospecho de malignidad). **(Tabla 18 y Gráfica 6)**

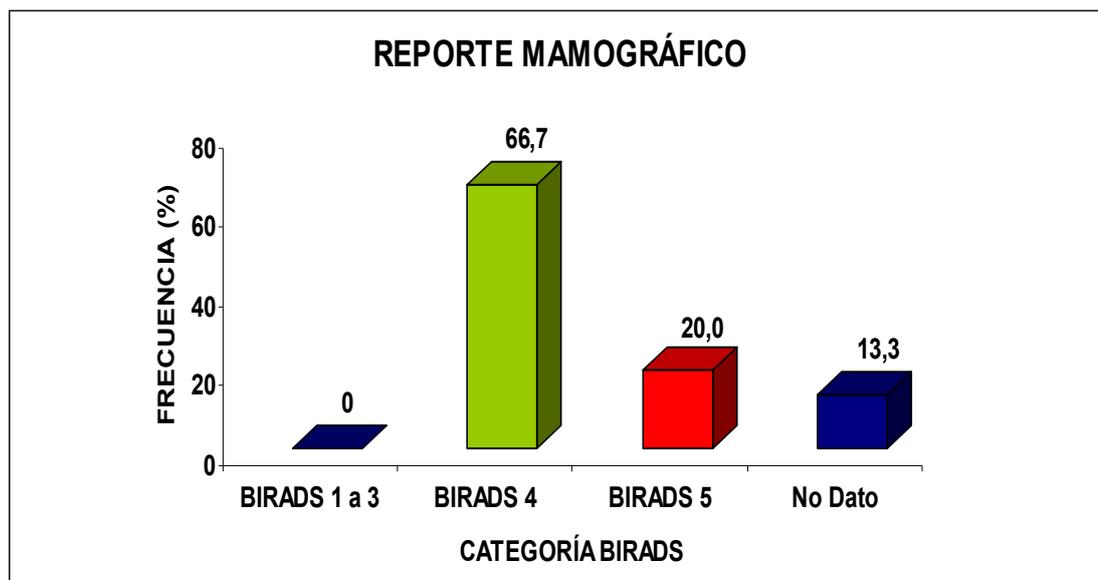
El estadio mas frecuente al momento del diagnóstico fue E IIIB con un 43,3%, lo que sigue siendo en un estadio muy avanzado. **(Tabla 18 y Gráfica 7)**

**Tabla 18 Características Clínicas de las 30 Pacientes Estudiadas y sus Frecuencias.**

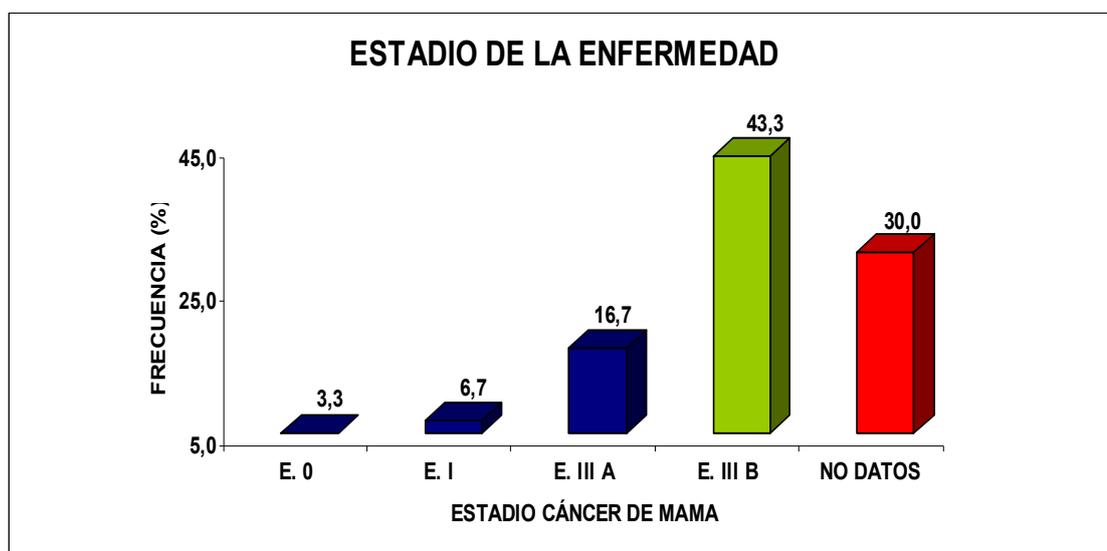
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	NÚMERO DE PACIENTES	FRECUENCIA (%)
<b>MAMOGRAFÍA</b>		
<i>BIRADS IV</i>	20	66,7
<i>BIRADS V</i>	6	20,0
<i>No Dato</i>	4	13,3
<b>TOTAL PACIENTES</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>
<b>ESTADÍO EN EL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO</b>		
<i>Estadio Cero (0)</i>	1	3,3
<i>Estadio I</i>	2	6,7
<i>Estadio II A</i>	0	0,0
<i>Estadio II B</i>	0	0,0
<i>Estadio III A</i>	5	16,7
<i>Estadio III B</i>	13	43,3
<i>Estadio IV</i>	0	0,0
<i>No Dato</i>	9	30,0
<b>TOTAL PACIENTES</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>
<b>DIAGNÓSTICO DEFINITIVO</b>		
<i>Carcinoma Ductal</i>	21	70
<i>Carcinoma Lobulillar</i>	7	23,3
<i>Carcinoma Ductal In Situ</i>	1	3,3
<i>Carcinoma Lobulillar In Situ</i>	0	0,0
<i>Carcinoma Tubulo-Lobulillar</i>	1	3,3
<b>TOTAL PACIENTES</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>
<b>LOCALIZACIÓN DEL TUMOR</b>		
<i>Unilateral</i>	30	100,0
<i>Bilateral</i>	0	0,0
<b>TOTAL PACIENTES</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>

El cáncer ductal fue el más frecuente (70%), como ya se ha referenciado en la literatura. Se reportó un caso de carcinoma tubulo-lobulillar con un 75% de tipo tubular, y 10 y 15% lobulillar y ductal in situ, respectivamente. **(Tabla 18 y Gráfica 8)** El 100% de los pacientes tenían compromiso unilateral **(Tabla 18)**.

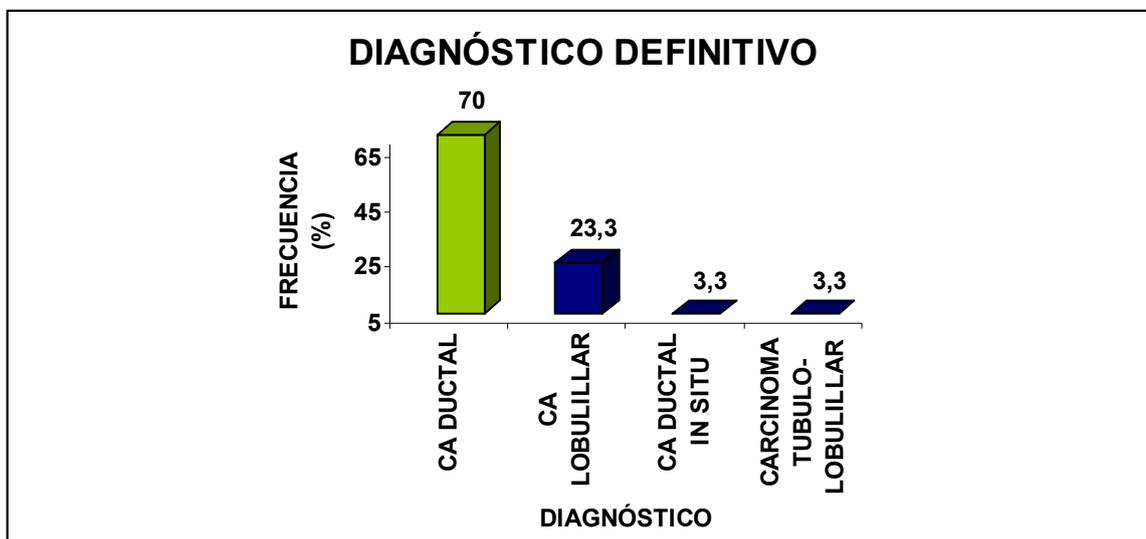
**Gráfica 6 Reporte de BIRADS más Frecuente en la Cohorte de Pacientes.**



**Gráfica 7 Estadio de la Enfermedad más Frecuentemente Reportado.**



**Gráfica 8 Diagnóstico Definitivo de Cáncer de Mama más Frecuente en la Cohorte de Pacientes.**



### 5.3. ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS EXONES 2 Y 20 DEL GEN BRCA1.

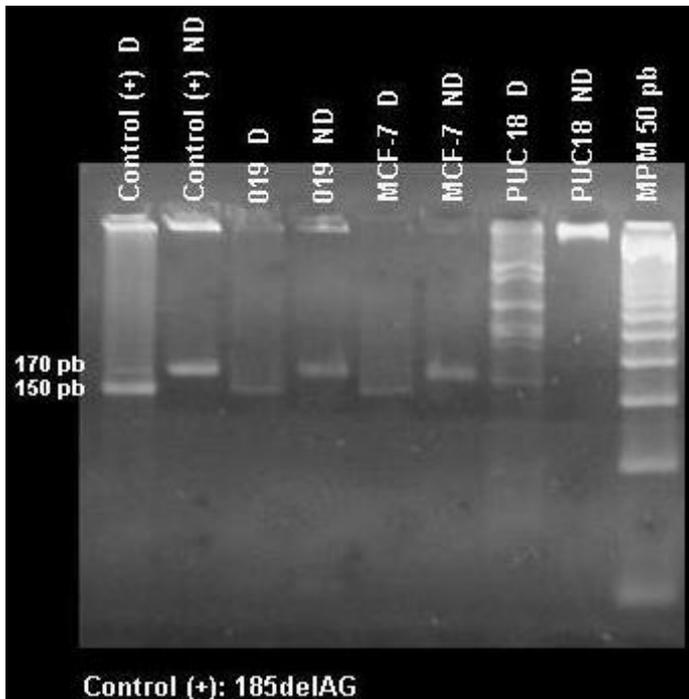
Por medio de la técnica PCR-Mismatch, que se describió previamente, se hizo el análisis molecular del gen BRCA1, con el fin de hallar alguna de las dos mutaciones más reportadas en diversas poblaciones según varios estudios y el BIC, en las 30 pacientes de esta cohorte.

En el análisis correspondiente al exón 2, no se encontró la mutación 185delAG en esta cohorte de pacientes analizadas. **(En la Figura 18, se observa la muestra 019, representando las 30 muestras negativas para la mutación 185delAG, junto con el control positivo, el control negativo (línea celular MCF-7) y el plásmido pUC18 (para probar la actividad de la enzima Hinf I), todos digeridos y sin digerir, en un gel de Agarosa LMP al 4% con un marcador de peso molecular, MPM, de 50 pb).**

En la figura 19, además, se expone una submuestra del total de pacientes analizadas para el exón 2, en la cual se observa -en todos los casos- una banda de 150 pb, correspondiente al alelo normal, es decir, negativo para la mutación 185delAG. **(En la Figura 19 se observan las muestras 001, 002, 004-018 digeridas con Hinf I, junto al control negativo (línea celular MCF-7) digerido y sin digerir, en un gel de Agarosa LMP al 4% con un MPM de 50 pb).** La flecha roja señala la muestra 004, que es negativa para la mutación de interés en el exón

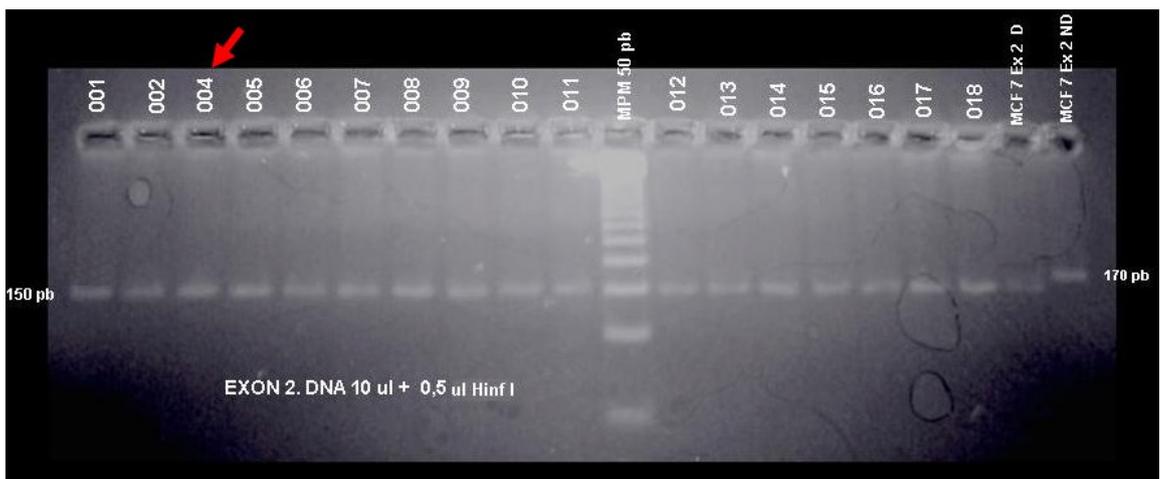
2 del gen BRCA1, este resultado se correlaciona y valida con lo observado mediante secuenciación directa (*ver Figura 20*).

**Figura 18 Gel de Electroforesis del Exon 2, Muestra 019 con Controles.**

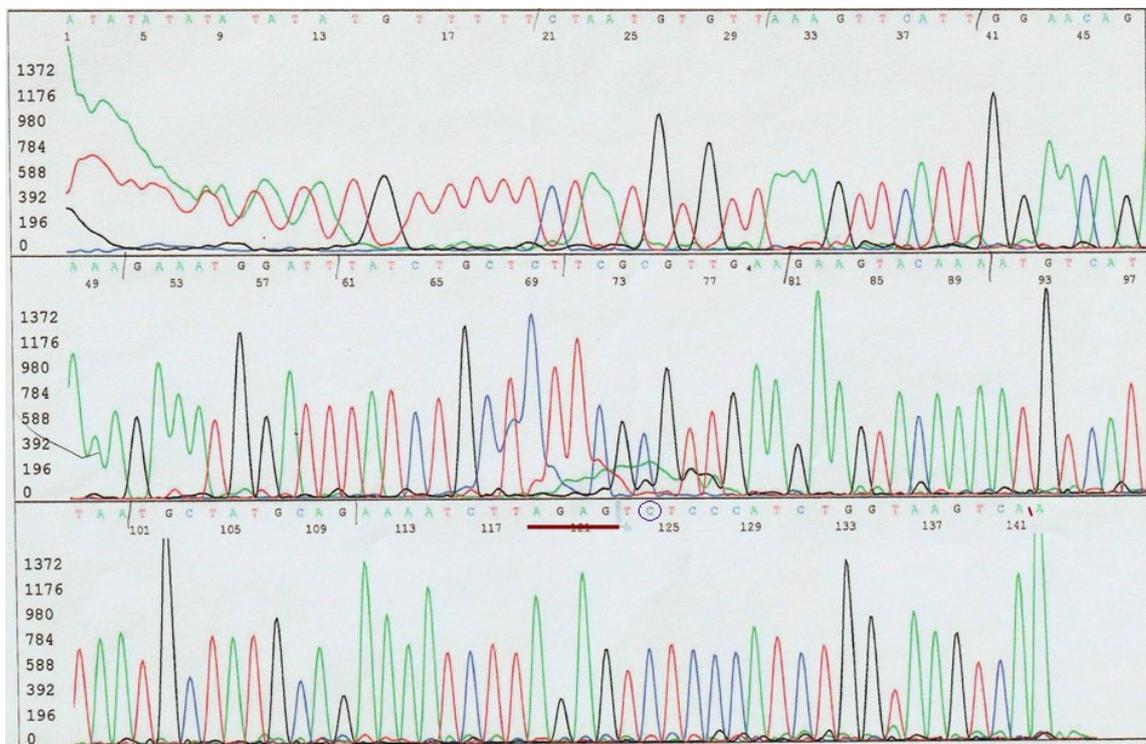


Los amplificadores (controles (+) y (-) y muestra 019) sin enzima Hinf I **-ND-**, correspondientes al exon 2, se ven a la altura de 170 pb. Las bandas tanto del control (-) como de la muestra 019 digeridos **-D-**, se muestran a la altura de 150 pb, correspondiente a alelos silvestres. En el control (+) digerido **-D-**, por su parte, se observan dos bandas, una a 170 pb y otra a 150 pb, confirmando ser heterocigoto para la mutación 185delAG.

**Figura 19 Análisis de Restricción Enzimática del Exon 2 en una Submuestra del total de Pacientes Estudiadas**



**Figura 20 Electroferograma de Secuenciación Directa del Exon 2 del Gen BRCA1, Muestra 004.**

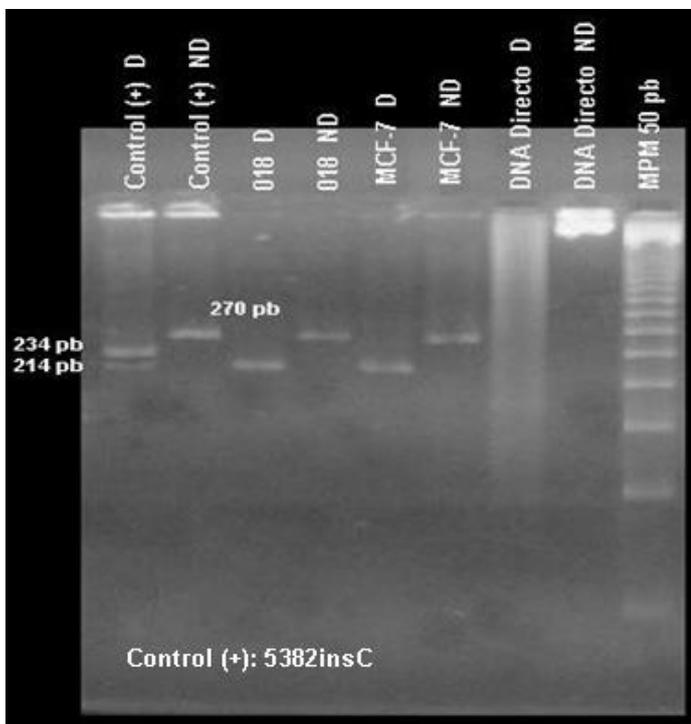


La línea roja subraya la secuencia normal **AG AG** y el círculo morado señala el cambio de base generado mediante la técnica de PCR-Mismatch, en el que se buscaba cambiar una **G** por una **C**, como es posible observar.

En el análisis correspondiente al exon 20, tampoco se encontró la mutación 5382insC en ninguna de las pacientes analizadas (**En la Figura 21, se puede observar una de las muestras analizadas, 018, representando las 30 muestras negativas para la mutación 5382insC, junto con el control positivo, el control negativo (línea celular MCF-7) y el ADN directo (para probar la actividad de la enzima Dde I), todos estos digeridos y sin digerir, en un gel de Agarosa LMP al 4% con un MPM, de 50 pb).**

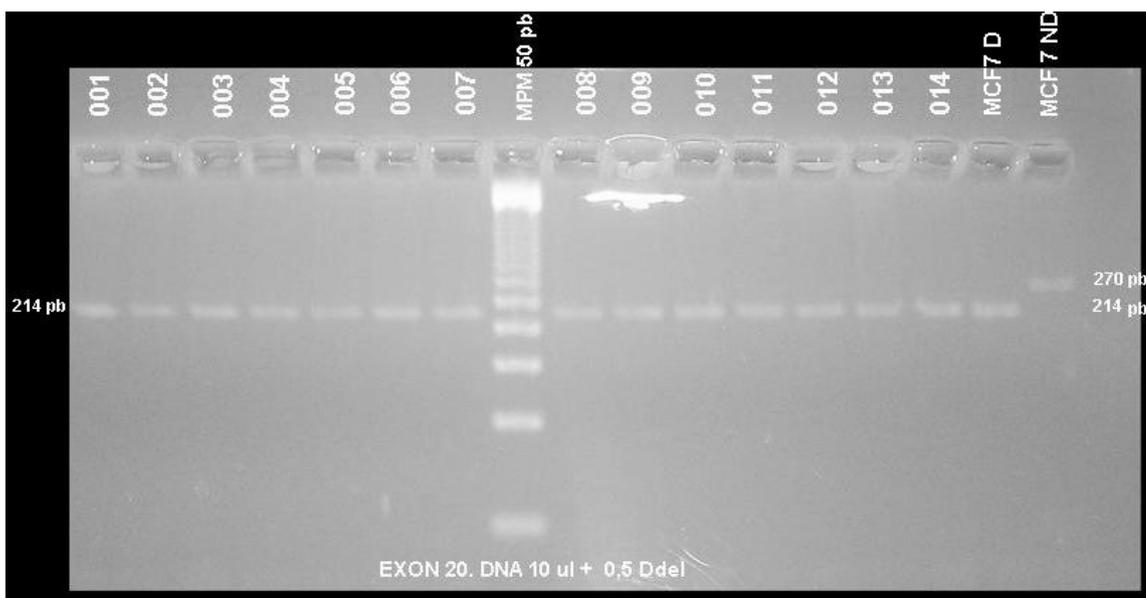
En la figura 22, se puede observar en una submuestra de esta cohorte de pacientes, en todos los casos, una banda de 214 pb, correspondiente al alelo normal, o sea, negativo para la mutación 5382insC. (**En la Figura 22 se observan las muestras 001-014 digeridas con Dde I, junto al control negativo (línea celular MCF-7) digerido y sin digerir, en un gel de Agarosa LMP al 4% con un MPM de 50 pb).**

**Figura 21 Gel de Electroforesis del Exon 20, Muestra 018 con Controles.**



Los amplificados (controles (+) y (-) y muestra 018) sin enzima Dde I **-ND-**, correspondientes al exon 20, se ven a la altura de 270 pb. Las bandas tanto del control (-) como de la muestra 018 digeridos **-D-**, se muestran a la altura de 214 pb, correspondiente a alelos silvestres. En el control (+) digerido **-D-**, por su parte, se observan dos bandas, una a 234 pb y otra a 214 pb, confirmando ser heterocigoto para la mutación 5382insC.

**Figura 22 Análisis de Restricción Enzimática del Exon 20 en una Submuestra del total de Pacientes Estudiadas**



## 6. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es un problema de salud pública, que afecta a la población de mujeres a nivel mundial, y que por sus dificultades en el diagnóstico oportuno y manejo, se ha convertido en una prioridad para la mayoría de los países, principalmente aquellos que reportan las más altas incidencias. Es por esto que el estudio de esta patología desde el punto de vista molecular y genético, ha tomado un gran impulso desde el descubrimiento e identificación de los genes BRCA1-2, de alta penetrancia para cáncer de mama (Miki Y, et al. 1994; Wooster R, et al. 1995).

Debido al alto riesgo para cáncer de mama y/u ovario asociado a mutaciones en los genes BRCA1-2, el análisis molecular de éstos se ha popularizado y diversos métodos de abordaje han sido descritos, con el objeto de optimizar el estudio de los mismos, primordialmente en los grupos de alto riesgo para la enfermedad, que son básicamente aquellos con múltiples antecedentes familiares de cáncer de mama y/u ovario. Otro grupo de pacientes como aquellos con cáncer de mama en edades muy tempranas, bilateralidad del tumor primario, y cáncer de mama y ovario en la misma persona, se han descrito como población de alto riesgo para tener una mutación en alguno de los genes BRCA, y por lo tanto, se deben incluir en los estudios genéticos (Kutner S. 1999).

En esta cohorte de pacientes con cáncer de mama, no se tuvieron en cuenta criterios estrictos de alto riesgo; el 86.7% tenían al menos un familiar en 1º o 2º afectado por cáncer de mama, ovario u otro tipo de cáncer relacionado con BRCA1, como de colon, próstata, estómago, útero, hígado, vesícula biliar y páncreas (Montero J. <http://www.cirugest.com/htm/index.php>; Ford D. 1998; Struewing JP, et al. 1997), y el 13.3%, a pesar que no tenían ningún antecedente de cáncer, correspondió a pacientes con cáncer de mama de aparición temprana, a los 36 años o menos para el momento del diagnóstico, todos los anteriores se tomaron como indicadores de una posible susceptibilidad heredo-familiar. En otros estudios también se han usado criterios poco restrictivos, por ejemplo, Ikeda et al (2001), incluyeron pacientes con cáncer de mama, con al menos un familiar en 1º con cáncer de mama o cáncer de ovario, para el análisis de genes BRCA, en población japonesa, encontrando mutaciones BRCA1 en el 13.3% (15/113) de las pacientes; en otros como el realizado por Peto et al (1999), se analizaron 254 pacientes con cáncer de mama de aparición temprana, antes de los 36 años, y encontraron mutaciones BRCA1 en el 3.5% (9/254), a su vez, en el estudio realizado por Ruiz-Flórez et al (2002), se incluyeron a 32 mujeres mexicanas con cáncer de mama diagnosticado a los 35 años o antes y encontraron mutaciones BRCA1 en el 3.13% (1/32). (Ikeda, et al. 2001; Peto, et al. 1999; Ruiz-Flórez, et al. 2002)

En términos de resultados del análisis molecular, en nuestra cohorte de pacientes no se encontró la mutación de interés (185delAG) en el exon 2. En otros estudios, como en el realizado por Trincado et al (1999) en Chile, que incluyeron 15 pacientes con cáncer de mama familiar y 40 de tipo esporádico, tampoco se encontró esta mutación; sin embargo, en estudios más recientes en esta misma población, se logró identificar la mutación en bajas frecuencias; Jara et al (2002), analizaron esta mutación en 382 mujeres sanas, con al menos 2 familiares de cáncer de mama, encontrando una frecuencia del 0.26% (1/382) y Jara et al (2006), la encontraron en el 3.17% (2/63) de las familias, seleccionadas por criterios de alto riesgo para la enfermedad. (Trincado, et al. 1999; Jara, et al. 2002; Jara, et al. 2006) La mutación 5282insC del exon 20, BRCA1, tampoco se encontró en las 30 pacientes incluidas en este estudio. En Latinoamérica se han llevado a cabo algunos estudios en su búsqueda, como, Jara et al (2002), quienes no encontraron la mutación en 382 mujeres sanas, con al menos 2 familiares con cáncer de mama; por su parte Dufloth et al (2005), en una muestra de 31 pacientes de Brasil, con cáncer de mama e historia familiar, encontraron la mutación en un 3.2% (1/31). (Jara, et al. 2002; Dufloth, et al. 2005)

Con respecto a las características histopatológicas y clínicas de esta cohorte, se encontró que el tipo histopatológico más frecuente fue el *Carcinoma Ductal Infiltrante Moderado/Pobrementemente Diferenciado* con un 63.3%, para un diagnóstico definitivo de *Carcinoma Ductal* con una frecuencia del 70%, acorde con el 77.6% reportado en la literatura (Mantilla et al. 2006). El 60% de las pacientes analizadas fueron diagnosticadas en estadios IIIA (16.7%) y IIIB (43.3%), indicando que lastimosamente se sigue detectando el cáncer de mama en etapas muy avanzadas, cuando las posibilidades de sobrevida y curación de las pacientes están reducidas, lo anterior corresponde con el 71.5% reportado en estudios locales (Mantilla et al. 2006). Con respecto a los receptores hormonales, se observó que en el 46,7% de los tumores, los receptores de estrógenos (ER) y progestágenos (PR) fueron negativos, y que en el 30% fueron positivos. Esto habría sido interesante verlo desde la perspectiva de la presencia de mutaciones en los genes BRCA1 y/o BRCA2, ya que estudios como el llevado a cabo por Palacios et al (2003), logra relacionar de forma significativa los tumores BRCA1 (+) con la negatividad de los ER y PR ( p 0.001 y p 0.002, respectivamente), mediante análisis inmunohistoquímicos de tejidos de cáncer de mama (Palacios, et al. 2003); lo anterior corresponde con las características fenotípicas de tumores BRCA1 ya descritas, que son de tipo epitelial basal y suelen ser de alto grado. Aunque en este estudio en particular, el grado histológico Bloom-Richardson más frecuente fue moderado, con un 46.7%, valdría la pena extender el análisis mutacional en esta cohorte de pacientes, no solo en el gen BRCA1 sino también en el BRCA2, dadas las características inmunohistoquímicas ya referidas.

Es interesante ver que en esta cohorte de pacientes, otros factores de riesgo ya conocidos para cáncer de mama, como la edad de la menarca (13.3 años), la

edad de la menopausia (49.8 años), la edad del primer parto (21.2 años), la lactancia acumulada durante la vida (56.7 meses equivalente a 4.7 años entre el 86.7% de las pacientes) y el consumo de hormonas (6.52 años entre el 33.3% de las pacientes), no parecen haber jugado un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad multifactorial; sin embargo, por el número de muestra no es posible concluir al respecto. El promedio de edad de diagnóstico de esta cohorte fue de 49.6 años que coincide con el promedio de edad de la menopausia (49.8 años), esto teniendo en cuenta que el riesgo de cáncer de mama aumenta con la edad y que es más frecuente en mujeres posmenopáusicas -para el cáncer de mama en general-, nos hace pensar que la edad no constituyó un claro factor de riesgo para este grupo; sin embargo, se debe tener en cuenta que cuando existe una historia familiar de cáncer de mama y otros tipos como de ovario, la edad de presentación es más temprana en los nuevos afectados.

Según la base de datos "BIC" del NIH, las mutaciones 185delAG, exon 2 y 5382insC, exon 20, del gen BRCA1, son las más reportadas (NIH/NHGRI, Última revisión en Marzo de 2007) y se han encontrado en diversos grupos poblacionales como son Judíos -Ashkenazis y Sefarditas- (Struwing JP, et al. 1995; Roa BB, et al. 1996; Fitzgerald MG, et al. 1996; Neuhausen S, et al. 1996; Thorlacius S, et al. 1996; Oddoux C, et al. 1996; Offit K, et al. 1996), Alemanes (Backe J, et al. 1999) y Españoles (Osorio A, et al. 1998), que parecen tener relación con población santandereana de acuerdo a: la historia migratoria de estos grupos a la región, los estudios de linajes mediante la tipificación haplotípica de cromosoma Y (Solano V. 2006. Online, Comunicación Telefónica con la Dra. Torres) y la ancestría de cada una de estas mutaciones (Neuhausen, et al. 1996; Díez O, et al. 1999; Bar-Sade RB, et al. 1998). Lo anterior motivó aún más la realización de este estudio, para lo cual se empleó el método de PCR-Mismatch, ya descrito en otras poblaciones como Chile, Alemania y Ashkenazi's (Jara L, et al. 2002; Jara L, et al. 2002; Backe J, et al. 1999; Abeliovich D, et al. 1997); el método de PCR-Mismatch en este estudio, resultó ser sencillo de realizar y de analizar, más aún, fue reproducible y se pudo validar con la secuenciación directa. El grupo de Jara, en Chile, lo ha empleado en varios de sus estudios, así mismo, este fue usado previamente por Abeliovich y Backe para el análisis de estas mismas mutaciones; lo anterior nos generó confianza en la técnica y en los primeros reportados. Otros métodos pueden ser usados en el abordaje de los genes BRCA, y su escogencia debe ser en términos del tipo de mutación que se quiera buscar y en la sensibilidad que se quiera obtener en el proceso, cabe resaltar, que la heterogeneidad observada en cuanto a las frecuencias de mutaciones BRCA en diversas poblaciones, se han atribuido no solamente a diferencias en cuanto a factores ambientales (geografía-estilo de vida-cultura-dieta) y factores genéticos, sino también a los criterios de inclusión de las familias/población, a las técnicas moleculares de análisis empleadas y a la metodología del análisis molecular como tal, es decir, si se estudia la totalidad de los genes, o solo algunas regiones. Es claro que los estudios realizados hasta la fecha han fallado en identificar otros genes de alta penetrancia diferentes a los BRCA; teniendo en cuenta que estos

genes explican solo una pequeña proporción de los cáncer de mama heredo-familiar, se propone que este cáncer es, no solo multifactorial sino también poligénico y que existirían muchos loci involucrados en su desarrollo, de los cuales cada uno tendría un pequeño efecto en el riesgo para la enfermedad. Easton et al (2007) realizaron un estudio de asociación con el objeto de identificar otros loci de susceptibilidad para cáncer de mama; este estudio se realizó en tres etapas en las que se contó con un stock de SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms) para identificar variantes ya conocidas a lo largo del genoma, en cada una de las etapas estos SNP's fueron genotipados en grupos casos (familias con 2 o más casos de cáncer de mama en 1º) y controles, solo aquellos SNP's que mostraron diferencias significativas en los dos grupos, fueron escogidos para continuar a la siguiente etapa. De esta manera, de un stock de 266.722 SNP's usados en la primera etapa, se terminó con un stock de 30 SNP's en la tercera etapa. Al final, los análisis de asociación permitieron identificar cinco (5) loci relacionados con el cáncer de mama, cuatro (4) de estos contienen posibles genes causales, que son: FGFR2 (Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos), TNRC9 o TOX3 (de función desconocida), MAP3K1 o MEKK (Kinasas de las Kinasas de las Proteínas Kinasas Activadas por Mitógenos 1) y LSP1 o WP43 (Proteína Específica de Linfocitos 1). El gen que mostró mayor asociación con el cáncer de mama, fue el FGFR2; así mismo es de resaltar que tres (3) de los cuatro (4) genes identificados están relacionados con mecanismos del control del crecimiento celular y señalización; este hallazgo abre nuevas expectativas con respecto a la investigación en genética del cáncer de mama, pues a diferencia de este estudio, los anteriores se centraron en analizar genes de reparación y de la síntesis y metabolismo de hormonas sexuales. (Easton, et al. 2007)

Si bien es cierto que se cumplió con el mínimo de pacientes propuesto previamente para este estudio, los criterios de inclusión no fueron estrictos; se recomienda que en una próxima oportunidad se opte por tener criterios de inclusión de **Alto Riesgo** para ser portador de mutaciones en estos genes; algunas propuestas con respecto a los criterios de alto riesgo son: los recomendados por el U.S. Preventive Services Task Force (Tres o más familiares con cáncer de mama; Mínimo dos familiares con cáncer de mama, al menos uno de ellos <50 años; Un familiar con cáncer de mama y ovario; Dos o más familiares con cáncer de ovario; Un familiar en primer grado con cáncer de mama bilateral; Un caso de cáncer de mama en un familiar masculino y Un afectado con cáncer de mama antes de los 30 años) (U.S. Preventive Services Task Force. 2005) y los propuestos por Stoppa-Lyonnet (Dos familiares en 1º con cáncer, 1 o más cáncer de mama <40 años y/o cáncer de ovario a cualquier edad; Tres o más familiares en 1-2º con cáncer de mama u ovario) (Stoppa-Lyonnet, et al. 1997). Así mismo recomendamos ampliar el tamaño de la muestra, con el objetivo de obtener resultados con mayor significancia estadística.

A nuestro conocimiento, este es el primer estudio sobre cáncer de mama heredo/familiar en Bucaramanga, Santander, que pretende indagar sobre los

aspectos genéticos relacionados y que ha despertado el interés de la comunidad universitaria UIS; aún así, estamos concientes del mínimo aporte a la comunidad científica, en general, con respecto a este tema; por lo mismo, sugerimos que en un proyecto futuro, se estudie una mayor proporción del gen BRCA1 (si es posible en su totalidad), así como abordar también el gen BRCA2, con el fin de proporcionar un aporte más significativo, desde el punto de vista estadístico, en la determinación del perfil genético de estos dos genes en la población de riesgo de Bucaramanga, Santander. También es importante contemplar dentro de los análisis moleculares en pacientes con cáncer de mama, el estudio no solo de genes de alta penetrancia, sino de nuevos genes identificados como asociados a esta patología.

## 7. CONCLUSIONES

1. A pesar que el tamaño de la muestra no permite hacer análisis de significancia estadística, se observa con respecto a las características histopatológicas y clínicas, resultados comparables con los encontrados en la literatura.
2. La frecuencia reportada a partir de este estudio para las mutaciones 185delAG, exon 2 y 5382insC, exon 20 del gen BRCA1, son de 0%, para cada una.
3. Debido a que no se encontró ninguna de las dos mutaciones objeto de este estudio, no se pudo relacionar la presencia de mutación con las características clínicas, histopatológicas y/o familiares de la cohorte de pacientes.
4. Resultaría interesante, sin embargo, dar continuidad a este estudio, desde el punto de vista de tamizaje genético, pues los resultados correspondientes a los receptores hormonales negativos en esta cohorte, sugieren el compromiso del gen BRCA1 en este grupo en particular.
5. En una población donde no se conoce aún el espectro mutacional de un determinado gen, en especial tan extenso y heterogéneo como son los genes BRCA, es importante hacer abordajes iniciales que incluyan el análisis genético de la totalidad del gen, con el fin de hacer un tamizaje que permita identificar las características genotípicas en la población y en base a esto, diseñar posteriormente estudios más específicos al respecto.
6. A nuestro conocimiento, este es el primer abordaje desde el punto de vista genético y molecular del cáncer de mama, en población santandereana.
7. Más estudios con respecto a los aspectos moleculares y genéticos del cáncer de mama son requeridos en la población de Bucaramanga, Santander, para continuar indagando sobre la epidemiología molecular de esta enfermedad, en lo posible, en mujeres de alto riesgo, y usar entonces esta información para el desarrollo e implementación de metodologías que faciliten la identificación de la población en riesgo, y por tanto el abordaje de los mismos, desde el punto de vista de la prevención secundaria, el diagnóstico precoz y el tratamiento oportuno en los afectados, mejorando su sobrevivencia y su calidad de vida, e incluso, logrando su curación.

## 8. RECOMENDACIONES

1. Trabajar en la posibilidad de estudiar de forma más completa los genes BRCA en las pacientes de esta cohorte.
2. Para estudios de investigación a futuro, en esta misma línea, ampliar el tamaño de la muestra en lo posible, teniendo en cuenta criterios de inclusión más estrictos.
3. Para efecto de estudiar el espectro mutacional de los genes BRCA en nuestra población, el uso de técnicas de tamizaje es ideal, pues van a permitir identificar variantes que pueden ser caracterizadas posteriormente mediante secuenciación directa, permitiendo de esta manera, una reducción en los costos.
4. Con el paso anterior, es posible identificar mutaciones recurrentes y determinar si tienen efecto fundador, mediante análisis haplotípicos adicionales; al identificar las mutaciones más frecuentes en la población y que están explicando la mayoría de los casos de cáncer de mama, es posible optimizar el análisis genético, tanto en tiempo como en costos, pues se buscarían inicialmente las mutaciones más frecuentes mediante técnicas menos costosas y laboriosas, y solo cuando el resultado sea negativo, se continuaría con una búsqueda más extensa en cada caso en particular.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abeliovich D, Kaduri L, Lerer I, Weinberg N, Amir G, Sagi M, Zlotogora J, et al.** The founder mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. *Am. J. Hum. Genet.* **1997;60**:505-514.
2. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** *Molecular Biology of the Cell.* **2002.** Edition 4. Garland Science.
3. **Armes JE, Egan AJ, Southey MC, et al.** The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population-based study. *Cancer.* **1998;83**:2335 – 2345.
4. **Backe J, Hofferbert S, Skawran B, Dork T, Stuhmann M, et al.** Frequency of BRCA1 mutation 5382insC in German breast cancer patients. *Gynecologic Oncology.* **1999;72(3)**:402-406.
5. **Bar-Sade R B, Kruglikova A, Modan B, Gak E, Hirsh-Yechezkel G, Theodor L, Novikov I, Gershoni-Baruch R, et al.** The 185delAG BRCA1 mutation originated before the dispersion of Jews in the Diaspora and is not limited to Ashkenazim. *Human Molecular Genetics.* **1998; Vol.7(5)**: 801-805.
6. **Beahrs O H, Henson D E, et al.** Manual for Staging of Cancer. *American Joint Committee on Cancer. Philadelphia, JB Lippincott. 4 Edition:* 151 – 152.
7. **Boyle P, Leon ME, Maisonneuve P and Autier P.** Cancer Control in Women. Update 2003. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* **2003;1**:179-202.
8. **Breast Cancer Linkage Consortium, et al.** Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. *The Lancet.* **1997;349**:1505-1510.
9. **Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL.** Cancer Risk Estimates for BRCA1 Mutation Carriers Identified in a Risk Evaluation Program. *J Natl Cancer Inst.* **2002;94**:1365-1372.
10. **Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, et al.** Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature.* **2005;434**:913-917.
11. **Castro MA, Cobos F, Corzo E, Forero P, Insuasty JS.** Registro y Análisis del Comportamiento del Cáncer en la Unidad de Oncología del Hospital Universitario Ramón González Valencia de Bucaramanga durante los Años de 1990 a 1995. *MÉDICAS UIS.* **2000;14**:92-97.
12. **CDC.** United States Cancer Statistics. **2001.**
13. **Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. España:**  
<http://www.cnio.es/es/cancer/cap100.htm>

14. Chappuis PO, Kapusta L, Bégin LR, Wong N, Brunet J-S, et al. Germline BRCA1/2 mutations and p27<sup>kip1</sup> protein levels independently predict outcome after breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18 (24):4045-4052.
15. Chappuis PO, Nethercot V and Foulkes WD. Clinico-pathological characteristics of BRCA1 and BRCA2 related breast cancer. *Semin. Surg. Oncol*. 2000;18: 287-295.
16. Chu-Xia Deng. Survey and Summary. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Research*. 2006;34, Issue 2:1416-1426.
17. Claus EB, Schidkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The Genetics Attributable Risk of Breast and Ovarian Cancer. *Cancer*. 1996;77:2318-2324.
18. Cooper G. THE CELL, A Molecular Approach. *The Cell Cycle*. 2000. *Second Edition*. Online book.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&dopt=cmd=GenBookHL&term=the+cell+cycle+AND+cooper%5Bbook%5D+AND+166117%5Buid%5D&rid=cooper.chapter.2432>
19. Dash B and El-Deiry W. Chapter 4: Cell Cycle Checkpoint Control Mechanisms That Can Be Disrupted in Cancer. *Methods in Molecular Biology, vol. 280: Checkpoint Controls and Cancer, Volume 1: Reviews and Model Systems*. Pag 99 – 161.
20. Dávila JC. Crónica de una muerte celular programada. *Encuentros en la Biología. Biología Molecular, Celular y del Desarrollo. Universidad de Málaga*. 1999; Número 58. <http://www.encuentros.uma.es/>
21. De Benedetti V, Radice P, Pasini B, Stagi L, Pensotti V, Mondini P, Manoukian S, et al. Characterization of ten novel and 13 recurring BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Italian breast and/or ovarian carcinoma patients. *Human Mutation, Mutation in Brief Online*. 1998;#178.
22. de Jong M. M., Nolte I. M., te Meerman G. J., van der Graaf W. T., Oosterwijk J. C., Kleibeuker J. H., Schaapveld M., de Vries E. G. Genes Other Than BRCA1 and BRCA2 Involved in Breast Cancer Susceptibility. *J. Med. Genet*. 2002;39:225-242.
23. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Section 1: Molecular Biology of Breast Cancer. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 2005. 6th Edition.
24. Díez O, Osorio A, Duran M, et al. Análisis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat*. 2003;22:301-312.
25. Díez O, Osorio A, Robledo M, Barroso A, Doménech M, Cortés J, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Jewish mutations in Spanish breast cancer patients. *British Journal of Cancer*. 1999;79:1302-1303.
26. Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA and Sutherland RL. International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer: Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*. 2003;10:179–186.

27. Dufloth RM, Carvalho S, Heinrich JK, Shinzato JY, Cabello dos Santos C, et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family History. *Sao Paulo Med J.* 2005;123(4):192-197.
28. Dumitrescu R G, Cotarla I. Understanding breast cancer risk – where do we stand in 2005?. *J. Cell. Mol.* 2005;Vol 9, N° 1:208-221.
29. Easton D, Ford D, Peto J. Inherited Susceptibility to Breast Cancer. *Cancer Surv.* 1993;18:95-113.
30. Easton D, Karen P, Dunning A, Pharoah P, Thompson D, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature.* 2007;Vol 447:1087-1095.
31. Edwards B. K., Howe H. L., Ries L. A., Thun M. J., Rosenberg H. M., Yancik R., Wingo P. A., Jemal A., Feigal E. G. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1973-1999, Featuring Implications of Age and Aging on U.S. Cancer Burden. *Cancer.* 2002;94:2766-2792.
32. Elstrodt F, Hollestelle A, Nagel J, Gorin M, Wasielewski M, van den Ouweland A, Merajver S, Ethier S, and Schutte M. BRCA1 Mutation Analysis of 41 Human Breast Cancer Cell Lines Reveals Three New Deleterious Mutants. *Cancer Res.* 2006; 66(1): 41-5.
33. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, et al. Targeting the DNA Repair Defect in BRCA Mutant Cells as a Therapeutic Strategy. *Nature.* 2005;434:917-920.
34. Ferlay J, Bray F, Pisani P and Parkin DM: Globocan 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. *IARC Press, Lyon, France, 2001.* *Organización Panamericana de la Salud (OPS). GLOBOCAN. 2000-2002: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/NC/pcc-cc-sit-data.htm>*
35. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N, et al. Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1371–88.
36. Fishman A, Dekel E, Chetrit A, Lerner-Geva L, Bar-Am A, Beck D, et al. Patients with double primary tumors in the breast and ovary – Clinical Characteristics and BRCA1-2 Mutations Status. *Gynecol Oncol.* 2000;79:74-8.
37. Fitzgerald MG, MacDonald DJ, Krainer M, Hoover I, O’Neil E, Unsal H, Silva-Arrieto S, et al. Germline BRCA1 mutations in Jewish and Non-Jewish women with early-onset breast cancer. *New Engl. J. Med.* 1996;334:143-149.
38. Ford, D., D. F. Easton, M. Stratton, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *American Journal of Human Genetics.* 1998;62: 676-689.
39. Foster I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography.* 2007. doi:10.1016/j.radi.2006.12.001. in press.
40. Foulkes W, Stefansson I, Chappuis P, Akslen L. Germline BRCA1 Mutations and Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 2003;95:1482-1485.

41. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2002;Vol 4 (2). Online.
42. Gayther S and Ponder B. Mutations of the BRCA1 and BRCA2 genes and the possibilities for predictive testing. *Molecular Medicine Today*. 1997;April:168-174.
43. Gershon-Cohen, J., Berger, S. M., and Klickstein, H. S. Roentgenography of breast cancer moderating concept of "biologic predeterminism." *Cancer*. 1963; 16:961-964.
44. Gershoni-Baruch R, Dagan E, Fried G, Bruchim Bar-Sade R, Friedman E et al. Significantly lower rates of BRCA1/BRCA 2 founder mutations in Ashkenazi women with sporadic compared with familial early onset breast cancer. *European Journal of Cancer*. 2000;36:983-986.
45. Gretarsdottir S, Thorlacius S, Valgardsdottir R, Gudlaugsdottir S, Sigurdsson S, Steinarsdottir M, et al. BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. *Cancer Res*. 1998;58:859-862.
46. Gullino P M. Natural History of Breast Cancer. Progresión From Hyperplasia to Neoplasia as Predicted by Angiogenesis. *Cancer*. 1977;39:2697-2703.
47. Hartmann L, Schaid D, Woods J, Crotty T, Myers J, Arnold PG, Petty P, Sellers T, Johnson J, McDonnell S, Frost M, Jenkins R. Efficacy of Bilateral Prophylactic Mastectomy in Women With a Family History of Breast Cancer. *New Engl J Med*. 1999;Vol 340(3):77-84.
48. Honrado E, Benítez J y Palacios J. The Molecular Pathology of Hereditary Breast Cancer: Genetic Testing and Therapeutic Implications. *Modern Pathology Online*. 2005 1-16.
49. Hormiga C, Rodríguez L, Uribe C. Análisis de la Situación de las Enfermedades Neoplásicas en Santander. *Revista del Observatorio de Salud Pública de Santander*. 2006;Año 2, Número 3, Oct-Dic.
50. Hulka B S, Moorman P G. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*. 2001;38:103-113.
51. Ikeda N, Miyoshi Y, Yoneda K, Shiba E, Sekihara Y, Kinoshita M, Noguchi S. Frequency of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Japanese breast cancer families. *Int. J. Cancer*. 2001; 91, 83–88.
52. Jara L, Ampuero S, Santibáñez E, Seccia L, Rodríguez J, Bustamante M, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in a South American Population. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2006;166:36-45.
53. Jara L, Ampuero S, Santibáñez E, Seccia L, Rodríguez J, Bustamante M, Lay-son G, et al. Molecular analysis of the eighteen most frequent mutations in the BRCA1 gene in 63 Chilean breast cancer families. *Biol Res*. 2004;37:469-481.
54. Jara L, Ampuero S, Seccia L, Bustamante M, Blanco R, et al. Analysis of 5382insC (BRCA1) and 6174delT (BRCA2) mutations in 382 healthy Chilean women with a family history of breast cancer. *Biological Research*. 2002;35(1).
55. Jara L, Ampuero S, Seccia L, Bustamante M, Blanco R, et al. Frecuencia de la mutación 185delAG en el gen BRCA1 en mujeres chilenas sanas con antecedentes familiares de cáncer de mama. *Rev. Méd. Chile*. 2002;130(10):1113-1123.

56. Khanna K K and Jackson S P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*. 2001;27:247-253.
57. Kristensen VN, Borresen-Dale AL. Molecular Epidemiology of Breast Cancer: Genetic Variation in Steroid Hormone Metabolism. *Mutation Research*. 2000;462:323-333.
58. Kutner S. Breast Cancer Genetics and Managed Care. The Kaiser Permanente Experience. *CANCER*. 1999; Supl. Vol 86 (11): 2570-2574.
59. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, et al. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90 (15):1138-1145.
60. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*. 2002;20:2310-2318.
61. Lakhani SR. The pathology of familial breast cancer. Morphological aspects. *Breast Cancer Research*. 1999; Vol 1 N° 1:31-35.
62. Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'Dair L, Pharoah P, Antoniou A, Hartley R, Shenton A, et al. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risk to relatives. *European Journal Of Cancer*. 2006;42:1143-1150.
63. Levine, AJ, Momand, J, and Finlay, CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature (Lond.)*, 1991;351: 453-456.
64. Mantilla A, Vesga BE, Insuasty JS. Registro de Cáncer, Unidad de Oncología, Hospital Universitario Ramón González Valencia, Bucaramanga, Colombia. (1996 – 1999). *MedUNAB*, 2006;9:14-19.
65. Marcus, J., P. Watson, D. Page, S. Narod, G. Lenoir, P. Tonin, I. Linder-Stephenson, G. Salerno, T. Conway & H. Lynch. Hereditary breast cancer: Pathobiology, Prognosis and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer* 1996;77:697-707.
66. McNeil CM, Musgrove EA. Review of: c-Myc suppresses p21WAF1/CIP1 expression during estrogen signalling and antioestrogen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Online*. 2005. doi:10.1017/S1470903106004925. Page 1 of 4.
67. McPherson K, Steel C M, Dixon J M. ABC of Breast Diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *British Medical Journals*. 2000;Vol 321:624-628.
68. Meijers-Heijboer H, van Geel B, van Putten WL, Henzen-Logmans S, Seynaeve C, Menke-Pluymers M, Bartels C, Verhoog L, van den Ouweland A, Niermeijer M, Brekelmans C and Klijn J. Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *New Engl J Med*. 2001; 345(3):159–164.
69. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W. A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science*. 1994;266:66-71.

70. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;Vol 16(3):1215
71. Molecular Research Center. Inc. DNazol® Genomic DNA Isolation Reagent. Última Actualización en Diciembre 29 del 2003.  
<http://www.mrcgene.com/dnazol.htm>.
72. Montenegro YM, Ramírez AT, Muletón CM. Cáncer colo-rectal heredado. *Revista de Cirugía*. 2002; Vol 17(1).  
<http://encolombia.com/medicina/cirugia/ciru17102-cancercolon.htm>
73. Montero R J. Cáncer de mama: generalidades, epidemiología, factores de riesgo, cáncer de mama esporádico, cáncer de mama familiar, cáncer de mama hereditario, clasificación TNM. *Cirugest*.  
<http://www.cirugest.com/htm/index.php>
74. Mullineaux L, Castellano T, Wood M, Graw S. Identification of Germline 185delAG BRCA1 Mutations in Non-Jewish Americans of Spanish Ancestry from the San Luis Valley, Colorado. *Cancer*. 2003;98:597-602.
75. Nathanson KN, Wooster R, Weber BL. Breast Cancer Genetics: What We Know and What We Need. *Nature Medicine*. 2001;7:552-556.
76. National Institutes of Health/National Human Genome Research Institute: Revisiones en: Agosto de 2006 y Marzo de 2007.  
[http://www.nhgri.nih.gov/Intramural\\_research/Lab\\_transfer/Bic/Member/index.html](http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/Member/index.html).
77. Nelson HD, Huffman LH, Fu R, Harris EL. Genetic Risk Assessment and BRCA Mutation Testing for Breast and Ovarian Cancer Susceptibility: Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2005;143:362-379.
78. Neuhausen SL, Mazoyer S, Friedman L, Stratton M, Offit K, Caligo A, Tomlinson G, Cannon-Albright L, Bishop T, et al. Haplotype and Phenotype Analysis of Six Recurrent BRCA1 Mutations in 61 Families: Results of an International Study. *Am. J. Hum. Gene*. 1996;58:271-280.
79. Neuhausen S, Gilewski T, Norton L, Tran T, McGuire P, et al. Recurrent BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer. *Nature Genetics*. 1996;13:126-128.
80. Nguewa PA, Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Pharmacological modulation of Poly(ADP-ribose) Polymerase mediated cell death: Exploitation in cancer chemotherapy. *Molecular Pharmacology*. 2003;64:1007-1014.
81. Núñez R, Escalona J R. Ciclo Celular. Departamento de Embriología. *Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de México*. Última actualización 02-Oct-2007.  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/embrio/Archivos/Docencia/CicloCel.pdf>
82. Oddoux C, Struwing JP, Clayton CM, Neuhausen S, Brody LC, Kaback M, et al. The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nature Genetics*. 1996;14:188-190.
83. Oesterreich S., Fuqua S. A.. Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer. *Endocr. Relat. Cancer*. 1999;6:405-419.

84. Offit K, Gilewski T, McGuire P, Schluger A, Hampel H, Brown K, et al. Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. *The Lancet*. 1996;347:1643-1644.
85. Oliveira A M, Ross J and Fletcher J. Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer. The Gatekeepers and the Caretakers. *Am J Clin Pathol*. 2005;124 (Suppl 1): S16-S28.
86. Osborn C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *The Oncologist*. 2004;9: 361-377.
87. Osorio A, Robledo M, Alberto J, Diez O, Alonso C, Baige M, Benitez J. Molecular analysis of the six most recurrent mutations in the BRCA1 gene in 87 Spanish breast/ovarian cancer families. *Cancer Letters*. 1998;123:153-158.
88. Palacios J. Factores pronósticos anatomopatológicos en el cáncer de mama. *I Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica*. Última Actualización el 1 Junio de 1997. <http://www.conganat.org/congreso/default.htm>
89. Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrió D, Barroso A, Rodríguez S, et al. Immunohistochemical characteristics defined by tissue Microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: Differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Clinical Cancer Research*. 2003;9:3606-3614.
90. Pardo G, Méndez H, Goethe B, León A, Peñalosa M y Fernández R. LACTANCIA MATERNA. Guía de Manejo. Anatomía y fisiología de la glandula mamaria. *INET COLOMBIANA S.A. ENCOLOMBIA*. Última Actualización en 1998. <http://encolombia.com/lactancia anatomia23.htm>.
91. Park M and Koff A. Overview of the Cell Cycle. *Current Protocols in Cell Biology*. 1998. Unit 8.1.1 – 8.1.9.
92. Perucho M. Cáncer del fenotipo mutador de microsatélites. *Investigación y Ciencia*. 1998; Junio: 46-55.
93. Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Patients With Early-Onset Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:943–9.
94. Piñeros M, Ferlay J, Murillo R. Incidencia estimada y mortalidad por cáncer en Colombia, 1995-1999. Colombia: Instituto Nacional de Cancerología, IARC, Ministerio de la Protección Social; 2005. [http://www.incancerologia.gov.co/documentos/3\\_20\\_2007\\_1\\_13\\_22\\_PM\\_libro\\_1.pdf](http://www.incancerologia.gov.co/documentos/3_20_2007_1_13_22_PM_libro_1.pdf)
95. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, van't Verr L, Garber J, Evans G, Isaacs C, Daly M, Matloff E, Olopade O and Weber B. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *New Engl J Med*. 2002; 346(21):1616–1622.
96. Ringer DP, Schnipper LE. Clinical Oncology. Chapter 2: Principles of Cancer Biology. Pages: 21-35.

97. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet.* 1996;14:185-187.
98. Romero K. Biología del Crecimiento Tumoral. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. 2004:  
[www.med.ucv.ve/ftproot/AnatomiaPatologica/Neoplasias%20Clase%2010.doc](http://www.med.ucv.ve/ftproot/AnatomiaPatologica/Neoplasias%20Clase%2010.doc)
99. Rubiano J, Trujillo D, Gutiérrez D, Bueno M. Tamizaje de Cáncer Ginecológico. Cáncer de Seno. *Guías de Práctica Clínica Basadas en la Evidencia. Proyecto ISS-Ascofame.* Online 27 de Marzo del 2006.
100. Ruiz- Flores P, Calderón A, Barrera-Saldaña H. Breast Cancer Genetics BRCA1 and BRCA2: Main Susceptibility Genes. *Revista de Investigación Clínica.* 2001;53:46-64.
101. Ruiz-Flores P\*, Sinilnikova OM, Badzioch M, Calderon –Garcidueñas AL, Chopin S, Fabrice O, González-Guerrero JF, Szabo C, Lenoir G, Goldgar DE, Barrera-Saldaña HA. BRCA1 and BRCA2 Mutation Analysis of Early-Onset and Familial Breast Cancer Cases in Mexico. *HUMAN MUTATION Mutation in Brief #555 (2002) Online.*
102. Sabbah M, Courilleau D, Mester J, Redeuilh G. Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: Involvement of a cAMP response-like element. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;Vol 96:11217-11222.
103. Schorge JO, Mahoney NM, Miller DS, Coleman RL, Muller CY, et al. Germline BRCA1-2 mutations in Non-Ashkenazi families with double primary breast and ovarian cancer. *Gynecologic Oncology.* 2001;83:383-387.
104. Schrag D, Kuntz K, Garber J, Weeks J. Decision Analysis — Effects Of Prophylactic Mastectomy and Oophorectomy on Life Expectancy Among Women With BRCA1 or BRCA2 Mutations. *New Engl J Med.* 1997;Vol 336(20):1465–1471
105. Schwartz S, Spencer S y Fischer D. Principios de Cirugía. *Séptima Edición. Capítulo 14, Mama. Mc Graw Hill. Vol 1.* Pág 581-650.
106. Sherr C. Principles of Tumor Suppression. *Cell.* 2004;Vol 116:235–246.
107. Solano V. ¿Por dónde llegamos los colombianos?. *Universia.* 2006;Online. <http://www.universia.net.co/tesis-de-grado/matemáticas-y-ciencias-naturales/por-donde-llegamos-los-colombianos.html>
108. Stewart S. L., King J. B., Thompson T. D., Friedman C, Wingo P. A. Cancer Mortality Surveillance – United States, 1990-2000. *MMWR. Surveill. Summ.* 2004;53:1–108.
109. Stoppa-Lyonnet D, Laurent-Puig P, Essioux L, Pages S, Ithier G, Ligot Laurent, Fourquet A, Salmon R, Clough K, Pouillart P, The Institute Curie Breast Cancer Group, Bonalti-Pellie C, Thomas G. BRCA1 Sequence Variations in 160 Individuals Referred to a Breast/Ovarian Family Cancer Clinic. *Am. J. Hum. Genet.* 1997;60:1021-1030.
110. Struewing J.P., Hartge P., Wacholder S., Baker S.M., Berlin M., McAdams M., Timmerman M.M., Brody L.C., Tucker M.A. The risk of cancer associated

with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi jews. *N Engl J Med.* 1997;336:1401-1408.

111. Struewing JP, Abeliovich D, Peretz T, et al. The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat Genet.* 1995;1:198-200.

112. Szabo CI, King M-C. Population Genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet.* 1997;60:1013-1020.

113. Tapon N, Moberg K and Hariharan I. The coupling of cell growth to the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology.* 2001;Vol 13: 731 – 737.

114. Thompson D, Easton DF. Cancer Incidence in BRCA1 Mutations Carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1358-1365.

115. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, et al. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nature Genetics.* 1996;13:117-119.

116. Tian H, Jaquins-Gerstl A, Munro N, Trucco M, Brody L and Landers J. Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis by Capillary and Microchip Electrophoresis: A Fast, Simple Method for Detection of Common Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genomics.* 2000;63:25-34.

117. Tirkkonen M, Johannsson O, Agnarsson BA, Olsson H, Ingvarsson S, et al. Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res.* 1997;57:1222-1227.

118. Tommasi S, Crapolicchio A, Lacalamita R, Bruno M, Monaco A, et al. BRCA1 mutations and polymorphisms in a hospital-based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italia. *Mutation Research.* 2005;578:395-405.

119. Tonin P, Weber B, Offit K, Couch F, Rebbeck TR, et al. Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nat Med.* 1996;2:1179-1183.

120. Torres D, Rashid MU, Gil F, Umana A, Ramelli G, Robledo JF, Tawil M, Torregrosa T, Briceno I, Hamann U. High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia. *Breast Cancer Res Treta.* 2007;103(2):225-232.

121. Trincado P; Fardella C; Mayerson D; Montero L; O'Brien A; Barrueto K; Gallegos R. Prevalencia de la delección 185AG del gen BRCA1 en mujeres chilenas con cáncer de mama. *Rev. méd. Chile.* 1999;127(1):19-22.

122. Tyczynski J, Bray F, D. Parkin M. Breast Cancer In Europe. *ENCR CANCER FACT SHEETS*. European Network of Cancer Registries, International Agency for Research on Cancer. 2002;Vol 2, December. <http://www.encl.com.fr/breast-factsheets.pdf>

123. U.S. Preventive Services Task Force. Genetic Risk Assessment and BRCA Mutation Testing for Breast and Ovarian Cancer Susceptibility: Recommendation Statement. *Ann Intern Med.* 2005;143:355-361.

124. Van der Looij M, Wysocka B, Brozek Izabela, Jassem J, et al. Founder BRCA1 mutations and two novel germline BRCA2 mutations in breast cancer and/or ovarian cancer families from north-eastern Poland. *Human Mutation Online.* 2000;320.

- 125. Vasen HFA, Tesfay E, Boonstra H, Mourits MJE, Rutgers E, Verheyen R, Oosterwijk J, Beex L.** Early detection of breast and ovarian cancer in families with BRCA mutations. *European Journal of Cancer*. 2005;41: 549–554.
- 126. Vázquez T, Krygier G, Barrios E, Cataldi S, Vázquez A, Alonso R, Estellano F, Folle E, Laviña R, Delgado F, Pressa C.** Análisis de sobrevida de una población con cáncer de mama y su relación con factores pronósticos: estudio de 1.311 pacientes seguidas durante 230 meses. *Rev Med Uruguay*. 2005;21:107-121.
- 127. Venkitaraman AR.** Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *CELL*. 2002;108, Issue 2:171-182.
- 128. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G.** Breast Cancer. *The Lancet*. 2005;Vol 365:1727-1741.
- 129. Vinagre Martínez LM.** Guía Clínica de Cirugía de la Mama. Anatomía quirúrgica de la mama. *Asociación Española de Cirujanos AEC. Editorial ARÁN.* Última Actualización 2004 – 2007.  
[http://www.aecirujanos.es/publicados\\_por\\_la\\_AEC/guia\\_cirugia\\_mama/capitulo1\\_guia\\_cirugia\\_mama.pdf](http://www.aecirujanos.es/publicados_por_la_AEC/guia_cirugia_mama/capitulo1_guia_cirugia_mama.pdf)
- 130. Warner E, Plewes DB, Hill KA, Causer PA, Zubovits JT, Jong RA, et al.** Surveillance of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with magnetic resonance imaging, ultrasound, mammography, and clinical breast examination. *JAMA*. 2004;292:1317-25.
- 131. Warren W, Hovig E, Smith-Sorensen B, Borrensen AL, Fujimura F, et al.** Detection of Mutations by Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis and SSCP-Hybrid Methods. *Current Protocols in Human Genetics*. 1997;Supplement 15:7.4.1-7.4.23.
- 132. Wikipedia<sup>R</sup>.** Salting out. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Salting\\_out](http://en.wikipedia.org/wiki/Salting_out). Última Actualización el 8 October de 2007.
- 133. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Manglon J.** Identification of the Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA2. *Nature*. 1995;378:789-792.
- 134. Yoshida K and Miki Y.** Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 2004;95 Issue 11:866-871.
- 135. Zarate E G.** Cáncer. *Monografías Online*. 1997:  
<http://www.monografias.com/trabajos12/cancer/cancer.shtml>

## 10. ANEXOS

### ANEXO A. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS GENÉTICAS Y MOLECULARES

COD: \_\_\_\_\_ MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS  
BIOMÉDICAS UIS

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PRUEBAS GENÉTICAS Y MOLECULARES

**Médico Informante** \_\_\_\_\_

**Investigador Principal** **MARÍA CAROLINA SANABRIA SALAS. MD.**

**Teléfono Casa** **6352235**      **Celular**      **310-7931361**

**Director de Tesis** \_\_\_\_\_

**Servicio** \_\_\_\_\_

**Nombre del Paciente** \_\_\_\_\_ **Cédula** \_\_\_\_\_

**Nombre del Acudiente (Parentesco)** \_\_\_\_\_ **Cédula** \_\_\_\_\_

#### TÍTULO DEL ESTUDIO

Análisis de mutaciones en el gen BRCA1 en mujeres con cáncer de mama heredo-familiar atendidas en los servicios de oncología de Bucaramanga.

#### INTRODUCCIÓN

El cáncer en general, incluyendo el de mama es una enfermedad genética y multifactorial que puede ser o no hereditaria. En la actualidad se considera un problema mundial de salud pública, siendo la primera causa de enfermedad por cáncer en con un 22% y la segunda causa de muerte por cáncer con un 15% en mujeres.

Debido a que la frecuencia de cáncer de mama ha ido en aumento no solo a nivel mundial sino también en Santander, Colombia, es importante evaluar todos los factores relacionados con esta enfermedad.

Con el objetivo de determinar la relación de la presencia de mutaciones genéticas con el desarrollo de Cáncer de Mama en mujeres que como usted han sido diagnosticadas, se le invita a formar parte de este estudio.

#### PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Gracias a novedosas técnicas de biología molecular y genética se han podido identificar marcadores característicos en los diferentes tipos histopatológicos del cáncer de mama, que a su vez se relacionan con determinados cambios/mutaciones en genes específicos. Esto quiere decir que el cáncer de mama tiene varias "caras" que comparten similitudes, pero que también pueden diferir, es por esto que no todos los tipos de cáncer ni todos los pacientes se deben tratar bajo los mismos parámetros, sino que el tratamiento y seguimiento debe ser individual para cada una de ellas.

**COD:**

\_\_\_\_\_

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS  
BIOMÉDICAS UIS**

Este es un estudio que se espera contribuya a generar un mayor conocimiento de esta enfermedad en mujeres de nuestra población con diagnóstico de cáncer de mama heredo-familiar, así como también a proponer programas de consejería genética en un futuro, que tengan como fin la orientación de pacientes y médicos en la escogencia de las mejores opciones terapéuticas y de seguimiento para cada paciente en particular.

**PROCEDIMIENTO**

El estudio se hará en mujeres diagnosticadas con cáncer de mama, de cualquier edad, con al menos 1 antecedente familiar de cáncer de mama, ovario u otro tipo de cáncer asociado a mutaciones en el gen BRCA1 como el de próstata, gástrico, colon, páncreas, vía biliar y útero. No se incluirán mujeres en el estudio que estén emparentadas con otras de este mismo estudio. La duración de este será de un año.

Se incluirán un mínimo de 30 mujeres con las características ya descritas que hayan sido atendidas en servicios de oncología de Bucaramanga.

Se extraerán 10 ml de sangre venosa de cada paciente. Esta muestra será rotulada con un código para proteger la identidad de cada paciente, será analizada por medio de técnicas moleculares para el estudio de mutaciones en el ADN y además se mantendrá almacenada y congelada para ser usada en estudios posteriores relacionados.

Además, se le hará una encuesta completa para recopilar datos personales de la enfermedad actual, factores sociodemográficos, antecedentes clínicos y familiares.

El resultado de la prueba, se le hará saber solo si usted así lo desea, de lo contrario no.

**RIESGOS Y MOLESTIAS**

Los riesgo y molestias están relacionados en su mayoría con factores psicosociales, principalmente en el caso de las pacientes que decidan conocer los resultados de la prueba, debido al mal concepto que pueden desarrollar con respecto a si mismas por ser portadoras de mutaciones para la enfermedad. Con respecto a este punto, es necesario evitarlo al máximo. Esto se logrará explicándole muy bien al paciente todo lo referente a la enfermedad y los hallazgos en su caso en particular.

Los riesgos que existen al extraer sangre son mínimos e incluyen: molestia, pérdida de sangre o amoratamiento en el lugar de penetración de la aguja.

**COSTOS PARA USTED**

Ninguno.

**SU PARTICIPACIÓN ES VOLUNTARIA**

Este formulario de consentimiento le brinda información sobre el estudio la cual le será debidamente explicada. Una vez que usted entienda el estudio y acepte participar en él, se le solicitará que firme este formulario de consentimiento. Usted recibirá una copia para guardar en sus archivos.

COD:

\_\_\_\_\_

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS  
BIOMÉDICAS UIS**

**Declaro estar informado y haber comprendido que** (*paciente*)

\_\_\_\_\_ puede estar afectado o ser portador de una alteración genética (hereditaria) y que es importante la realización de pruebas genéticas para entender la relación de estas en el desarrollo de cáncer de mama en mujeres de nuestra población.

**Doy consentimiento** a los Dra María Carolina Sanabria Salas, aspirante a título de Maestría para utilizar la muestra (10 ml sangre periférica) y procesarlas con técnicas moleculares para el estudio de posibles alteraciones genéticas relacionadas con la enfermedad.                      SI                      NO

**Doy consentimiento** para el almacenamiento y conservación de las muestras, para su uso en investigaciones futuras relacionadas con la enfermedad, una vez aprobado por el comité de ética.                      SI                      NO

**Doy consentimiento** para a la utilización de las muestras como población control en otros estudios científicos relacionados con la enfermedad, para ampliar el conocimiento acerca del comportamiento molecular y genético del Cáncer de mama, todo esto con previa aprobación del comité de ética.                      SI                      NO

Se me ha informado que tengo derecho a decidir si quiero saber o no el resultado de las pruebas realizadas, y que tengo derecho a cambiar de opinión en el futuro.

Actualmente,

Sí deseo conocer el resultado relacionado con la patología \_\_\_\_\_

No deseo conocer el resultado relacionado con la patología \_\_\_\_\_

**Lugary Fecha:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Firma del paciente**

\_\_\_\_\_  
**Firma Testigo o  
Persona Responsable**

\_\_\_\_\_  
**DRA. MARÍA CAROLINA SANABRIA SALAS.  
RM: 11154-03  
ESTUDIANTE DE MAESTRÍA UIS.**

## ANEXO B. CUESTIONARIO PROYECTO CÁNCER DE MAMA

COD: \_\_\_\_\_ MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS  
BIOMÉDICAS UIS

PROYECTO CÁNCER DE MAMA

CUESTIONARIO

DATOS PERSONALES

FECHA: \_\_\_\_\_

NOMBRE: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_ CC: \_\_\_\_\_

FECHA NACIMIENTO/LUGAR: \_\_\_\_\_

PROCEDENCIA: \_\_\_\_\_

RESIDENCIA: \_\_\_\_\_

TELÉFONO: \_\_\_\_\_ CELULAR: \_\_\_\_\_

NIVEL SOCIOECONÓMICO: \_\_\_\_\_

SEGURIDAD SOCIAL: \_\_\_\_\_

EPS: \_\_\_\_\_

ENFERMEDAD ACTUAL (CÁNCER DE MAMA)

1) FECHA DEL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD: \_\_\_\_\_

2) EDAD AL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_

3) MAMOGRAFÍAS: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ CUANTAS? \_\_\_\_\_

FECHA DE LA ÚLTIMA MAMOGRAFÍA: \_\_\_\_\_

REPORTE DE LA ÚLTIMA MAMOGRAFÍA: \_\_\_\_\_

OBSERVACIONES:

\_\_\_\_\_

4) CITOLOGÍAS: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ CUANTAS? \_\_\_\_\_

FECHA DE LA ÚLTIMA CITOLOGÍA: \_\_\_\_\_

REPORTE DE LA ÚLTIMA CITOLOGÍA: \_\_\_\_\_

OBSERVACIONES:

\_\_\_\_\_

5) BIOPSIAS: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ CUANTAS? \_\_\_\_\_

FECHA DE LA ÚLTIMA BIOPSIA: \_\_\_\_\_

REPORTE DE LA ÚLTIMA BIOPSIA: \_\_\_\_\_

COD:  
\_\_\_\_\_

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS  
BIOMÉDICAS UIS

OBSERVACIONES:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**ANTECEDENTES PERSONALES**

**ENFERMEDADES DIAGNOSTICADAS EN USTED ASOCIADAS A LA  
ENFERMEDAD ACTUAL**

1) CARDIACAS: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ CUÁL? \_\_\_\_\_

2) PULMONARES: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ CUÁL? \_\_\_\_\_

3) ENFERMEDAD BENIGNA DE LOS SENOS:  
\_\_\_\_\_

4) OTRAS:  
\_\_\_\_\_

5) CÁNCER DE OVARIO:

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

SI SU RESPUESTA ES SI, ESCRIBA LA EDAD DEL DIAGNÓSTICO  
\_\_\_\_\_

6) OTROS TIPOS DE CÁNCER:

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ CUÁL? \_\_\_\_\_

SE HA SOMETIDO A ALGÚN PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO MAYOR O  
MENOR? , COMO

BIOPSIA DE SENOS

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ PORQUÉ? \_\_\_\_\_

MASTECTOMÍA (CIRUGÍA MAYOR DE LOS SENOS)

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ PORQUÉ? \_\_\_\_\_

OTRAS CIRUGÍAS DE SENOS

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ CUÁL? \_\_\_\_\_  
PORQUÉ \_\_\_\_\_

COD:  
\_\_\_\_\_

MAESTRIA EN CIENCIAS BÁSICAS  
BIOMÉDICAS UIS

**CIRUGÍA DE OVARIOS**

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ CUÁL? \_\_\_\_\_  
PORQUÉ \_\_\_\_\_

**REPRODUCTIVOS**

1) EDAD DE LA PRIMERA MENSTRUACIÓN:

ANTES DE LOS 12 AÑOS ?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

ESCRIBA LA EDAD APROXIMADA: \_\_\_\_\_

2) EDAD DEL PRIMER PARTO: \_\_\_\_\_

3) TOTAL DE PARTOS: \_\_\_\_\_

4) DIO LECHE MATERNA A SU(S) HIJO(S)?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

POR CADA UNO DE SUS HIJOS ESCRIBA EL TIEMPO DE LACTANCIA

HIJOS	1	_____	MESES
	2	_____	MESES
	3	_____	MESES
	4	_____	MESES
	5	_____	MESES

5) EDAD DE LA MENOPAUSIA: \_\_\_\_\_

6) USÓ ANTICONCEPTIVOS ORALES?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ TIEMPO \_\_\_\_\_

7) USÓ TERAPIA DE REPLAZO HORMONAL EN LA MENOPAUSIA?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ TIEMPO \_\_\_\_\_

SOLO ESTRÓGENOS \_\_\_\_\_  
ESTRÓGENOS Y PROGESTÁGENOS \_\_\_\_\_

COD:  
\_\_\_\_\_

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS  
BIOMÉDICAS UIS

ANTECEDENTES FAMILIARES

1) ALGÚN FAMILIAR(ES) SUYO(S) HAN SIDO DIAGNOSTICADOS DE CÁNCER DE MAMA?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ CUANTOS? \_\_\_\_\_

FAMILIAR (PARENTEZCO)

EDAD DEL DIAGNÓSTICO

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2) ALGÚN FAMILIAR(ES) SUYO(S) HAN SIDO DIAGNOSTICADOS DE CÁNCER DE OVARIO?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ CUANTOS \_\_\_\_\_

FAMILIAR (PARENTEZCO)

EDAD DEL DIAGNÓSTICO

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3) ALGÚN FAMILIAR(ES) SUYO(S) HAN SIDO DIAGNOSTICADOS DE OTRO TIPO DE CÁNCER?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

TIPO DE CANCER	FAMILIAR (PARENTEZCO)	EDAD DEL DIAGNOSTICO

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS

1) HIZO EJERCICIO DURANTE LOS 12 A 24 AÑOS?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

COD:  
\_\_\_\_\_

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS  
BIOMÉDICAS UIS

1) CONSUMO DE ALCOHOL? SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

- 3 VECES POR SEMANA \_\_\_\_\_
- CADA SEMANA \_\_\_\_\_
- SOLO EN REUNIONES SOCIALES \_\_\_\_\_

2) CONSUMO DE FRUTAS Y VERDURAS?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

DIARIA \_\_\_\_\_ SEMANAL \_\_\_\_\_ OCASIONAL \_\_\_\_\_

3) CONSUMO DE GRASAS EN LAS COMIDAS (FRITOS, MARGARINAS, ETC)

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

5) CONSUMO DE CARNES ROJAS

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

OBSERVACIONES FINALES: PESO \_\_\_\_\_ TALLA \_\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_\_

---

---

---

En el espacio de **OBSERVACIONES**, a lo largo del cuestionario, se anotaron los datos respecto al estadio de la enfermedad, el grado histopatológico y el status de receptores hormonales, así como otras anotaciones relacionadas con el reporte de la biopsia y/u otros items.

**ANEXO C. IMÁGENES DE LOS ANÁLISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DE LOS AMPLIFICADOS, CON EL CAMBIO DE BASE RESPECTIVO, CON LA MUTACIÓN Y SIN LA MUTACIÓN DE INTERÉS.**

**Imagen 1** Análisis de la Secuencia Correspondiente al Exon 2 Silvestre con HinfI.

REBsites. <http://tools.neb.com/REBsites/index.php3>

Fragmento de la Secuencia del Exon 2 Silvestre

[GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTTtaaaaagatatatatatgTTTTctaagtggttaagttcattgg aacagaaagaaatggatttatctgctcttcgcttgaagaagtacaaaatgtcattaatgctatgcagaaaatcttagaGTcTCCCATCTGGTAAGTCA]

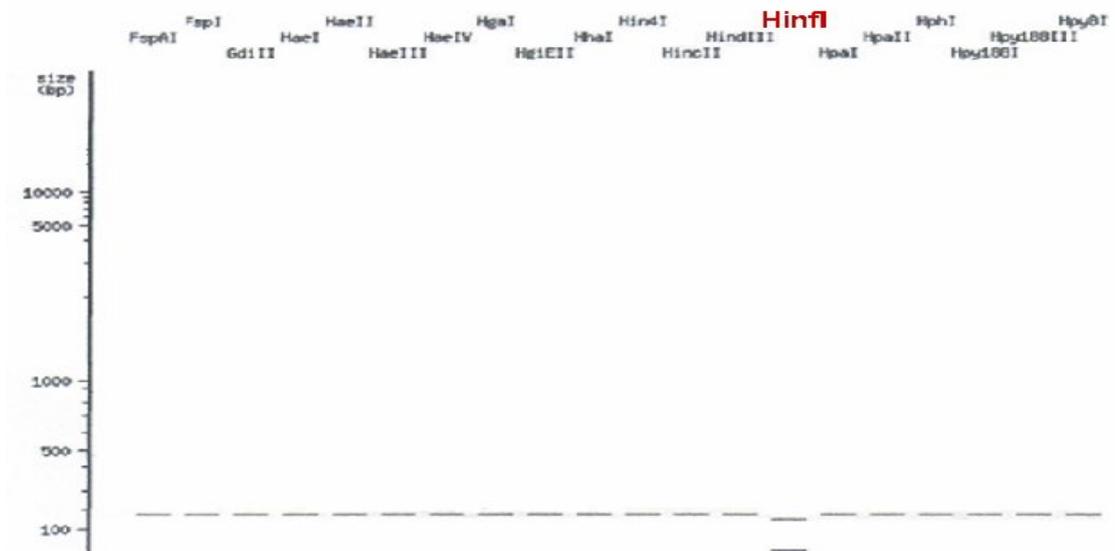
**Fragment list**

exon 2 silvestre digested with HinfI

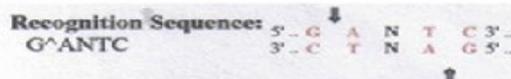
FRAGMENTO DE 170 pb

#	Coordinates	Length (bp)
1	1-149	149
2	150-170	21

View in Agarose



**HINF I** <http://rebase.neb.com/cgi-bin/azlist?re2>



**Imagen 2 Análisis de la Secuencia Correspondiente al Exon 2 Mutado (185delAG), con HinfI.**

**Fragmento de la Secuencia del Exon 2 Mutado**

[GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTTtaaaaagatatatatatggtttttctaatgtgt  
 taaagttcattggaacagaaagaaatggatttatctgctcttcgcggtgaagaagtaca  
 aaatgtcattaatgctatgcagaaaatcttaGTCTCCCATCTGGTAAGTCA]

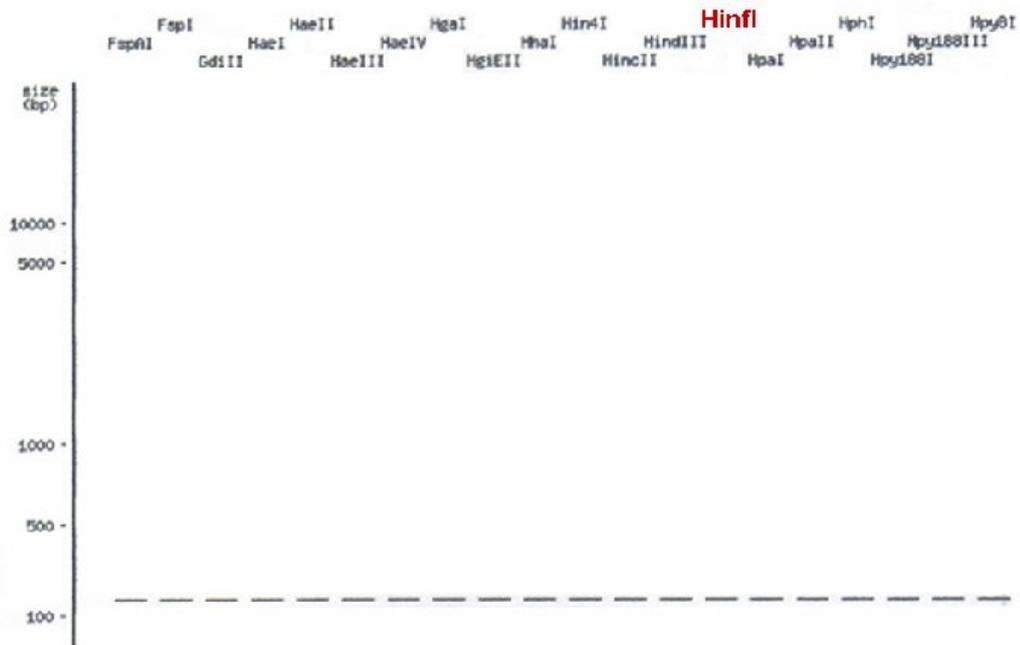
**Fragment list**

exon 2 185delAG digested with HinfI

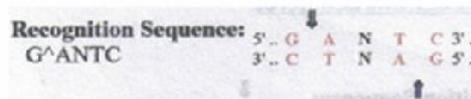
FRAGMENTO  
 DE  
 168 pb

#	Coordinates	Length (bp)
1	1-168	168

View in Agarose



**HINF I** <http://rebase.neb.com/cgi-bin/azlist?re2>



**Imagen 3 Análisis de Restricción de la Secuencia Correspondiente al Exon 20 Silvestre, con Ddel.**

REBsites. <http://tools.neb.com/REBsites/index.php3>

**Fragmento de la Secuencia del Exon 20 Silvestre**

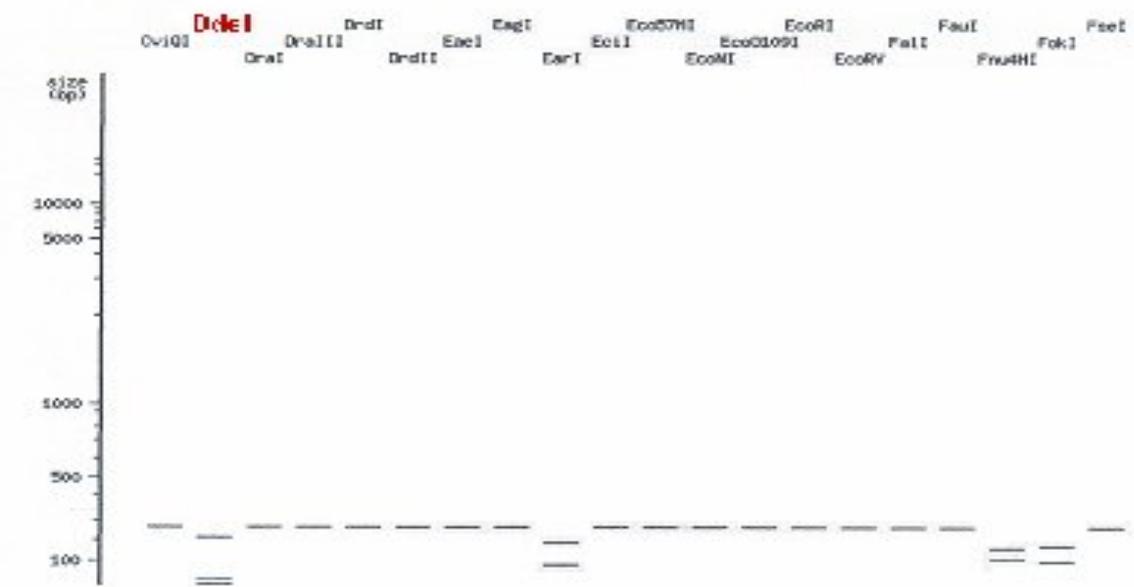
[CCAAAGCGAGCAAGAGAATC1Caggacagaaaggtaaagctccctccctcaagttgacaaaaatctcaccaccca  
ctctgtatccactccccttgcagagatgggccccttcatttgaagactatcacatacacacagtgctagatacttcacacaggtcttt  
ttcactctccatcccaccacataaataagtattgtctctactttatgaatgataaaactaagagattagagagGCTGTGTAATT  
GGATTCCC]

**Fragment list**  
exon 20 silvestre digested with Ddel

FRAGMENTO  
DE  
270 pb

#	Coordinates	Length (bp)
1	21-234	214
2	235-270	36
3	1-20	20

View in Agarose



**Dde I** <http://rebase.neb.com/cgi-bin/azlist?re2>

Recognition Sequence:  
C^TNAG

↓  
5'-C-T-N-A-G-3'  
3'-G-A-N-T-C-5'

**Imagen 4 Análisis de Restricción de la Secuencia Correspondiente al Exon 20 Mutado (5382insC), con Ddel.**

Fragmento de la Secuencia del Exon 20 Mutado

[CCAAAGCGAGCAAGAGAATCCaggacagaaaggtaaagctccctccctcaagttgacaaaatctcaoccccaod  
actctgtattocactccctttgcagagatgggcccctccattttgtaagacttattacatacatcacacagtgctagatacttccacacagggtctt  
ttcactctccatcccaaccacataaataagttatgctctactttatgaatgataaaactaagagattagagagGCTGTGTAATTT  
GGATTCCC]

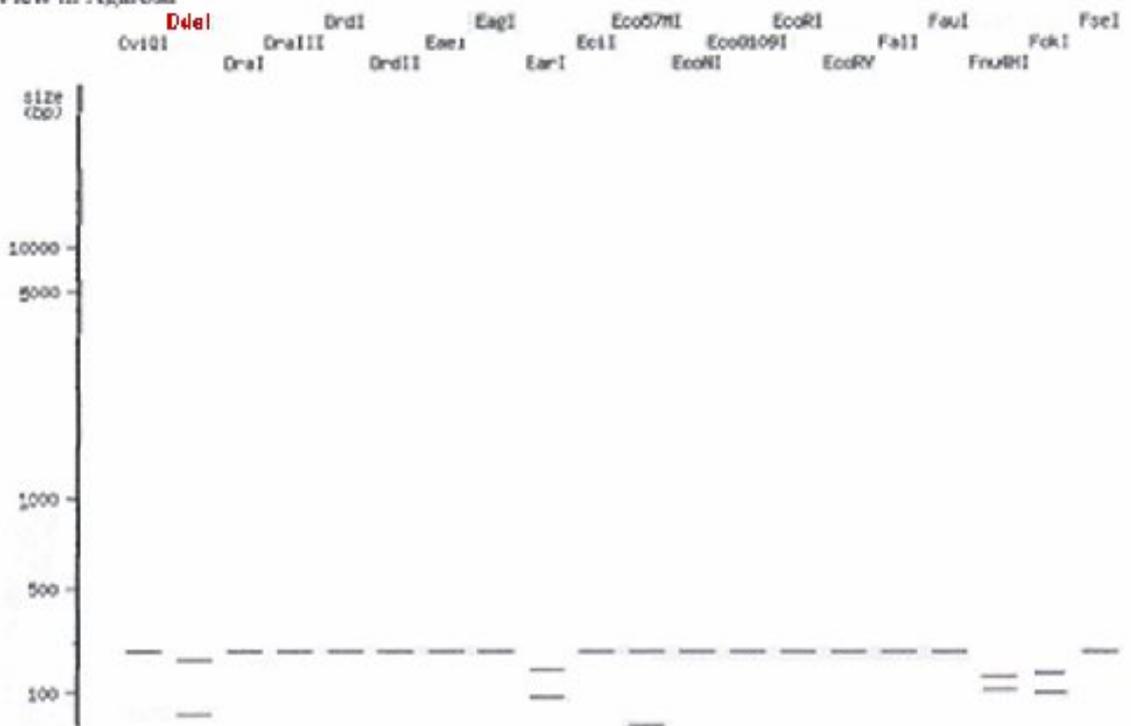
**Fragment list**

exon 20 5382insC (5385insC) digested with Ddel

FRAGMENTO  
DE  
271 pb

#	Coordinates	Length (bp)
1	1-235	235
2	236-271	36

View in Agarosa



Dde I <http://rebase.neb.com/cgi-bin/azlist7re2>

Recognition Sequence: 5'-C T N A T C P-3'  
3'-G A N T C P-5'