

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



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

**POR**

**ANA LAURA CALDERON GARCIDUEÑAS**

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

**Marzo de 1998**



TM

RC280

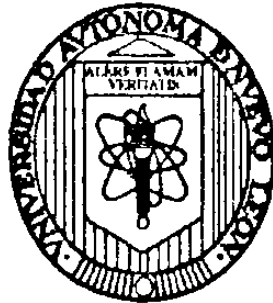
.B8

C3

c.1

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



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

**Por**

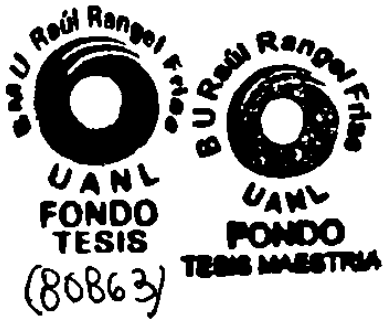
**ANA LAURA CALDERON GARCIDUEÑAS**

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

**Marzo de 1998**

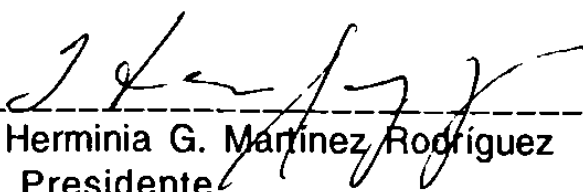


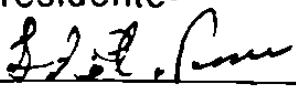
TM  
RC280  
.B8  
C3

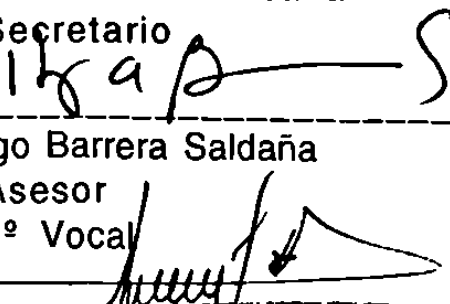


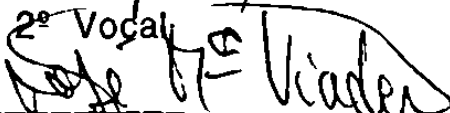
**BUSQUEDA DE LAS MUTACIONES MAS FRECUENTES  
DEL GEN BRCA1 EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA,  
EN EL NORESTE DE MEXICO**

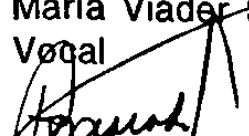
**Aprobación de la Tesis:**

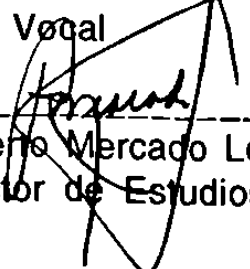
  
-----  
Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez  
Presidente

  
-----  
Dra. Lilia Cárdenas Ibarra  
Secretario

  
-----  
Dr. Hugo Barrera Saldaña  
Asesor  
1º Vocal

  
-----  
Dr. Juan Francisco González Guerrero  
2º Vocal

  
-----  
Dr. José María Viader Salvadó  
3º Vocal

  
-----  
Dr. Roberto Mercado Longoria  
Subdirector de Estudios de Postgrado

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

## **AGRADECIMIENTOS**

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

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

**Dr. Mike Badzioch**

**Dr. Larry Brody**

**Dra. Lilia Cárdenas Ibarra**

**Dr. Juan Francisco González Guerrero**

**Dr. Franklin Uriel Parás Barrientos**

**Dr. Tofic Saleh**

**Dr. Grady Saunders**

**M.C. Ana María Sifuentes**

**Tamara Staines Bone**

**Dra.Tina Stellrecht**

**Dr. Enrique Villarreal Ríos**

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

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

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



## TABLA DE CONTENIDO

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

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

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

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

## LISTA DE TABLAS

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



## LISTA DE FIGURAS

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

## NOMENCLATURA

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

<b>ml</b>	<b>Mililitros</b>
<b>mm</b>	<b>Milímetros</b>
<b>mM</b>	<b>Concentración Milimolar</b>
<b>µg</b>	<b>Microgramos</b>
<b>µl</b>	<b>Microlitros</b>
<b>µM</b>	<b>Concentración Micromolar</b>
<b>n</b>	<b>Número de Muestra</b>
<b>NaCl</b>	<b>Cloruro de sodio</b>
<b>ng</b>	<b>Nanogramos</b>
<b>nm</b>	<b>Nanómetros</b>
<b>p</b>	<b>Probabilidad</b>
<b>Pac</b>	<b>Paciente</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>
<b>pH</b>	<b>-log[H<sup>+</sup>]</b>
<b>RNA</b>	<b>Acido Ribonucleico</b>
<b>SDS</b>	<b>Sodio duodecil sulfato</b>
<b>Taq</b>	<b>DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i></b>
<b>UANL</b>	<b>Universidad Autónoma de Nuevo León</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>
<b>V</b>	<b>Voltios</b>
<b>X</b>	<b>Veces la concentración</b>

## RESUMEN

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Nuevo León

Ana Laura Calderón Garcidueñas

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

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

Area de Estudio: Medicina Molecular

Número de páginas: 102

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

FIRMA DEL ASESOR:

