

DESCRIPCIÓN DE MUTACIONES PRESENTES EN EL GEN *BRCA1* EN PACIENTES CON
CÁNCER DE SENO FAMILIAR EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

VALERIA PAZ FIGUEROA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2017

DESCRIPCIÓN DE MUTACIONES PRESENTES EN EL GEN *BRCA1* EN PACIENTES CON
CÁNCER DE SENO FAMILIAR EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

VALERIA PAZ FIGUEROA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de Biólogo

Director

SANDRA JAQUELINE MENA HUERTAS

Doctorado en Ciencias Mención Biología Celular y Molecular

MARÍA CLARA YÉPEZ CHAMORRO

Magister en Ciencias Biomédicas

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

SAN JUAN DE PASTO

2017

“Las líneas y conclusiones aportadas son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1ro N°324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la

Universidad de Nariño

Nota de aceptación

SANDRA JAQUELINE MENA HUERTAS

Director

MARÍA CLARA YEPEZ CHAMORRO

Director

EDITH MARIELA BURBANO ROSERO

Jurado

LUISA MERCEDES BRAVO GOYES

Jurado

San Juan de Pasto, 30 de agosto de 20017

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por darme la oportunidad de finalizar mi carrera y cumplir con esta meta; a mi mamá, por todo su apoyo y comprensión a lo largo de este camino (por todo, desde las plantas en la sala hasta las muestras en la nevera), a mi familia, por estar siempre presentes.

A mis asesoras, las profesoras Jaqueline Mena y María Clara Yépez, por todos sus consejos y paciencia. Al Centro de Estudios en Salud de la Universidad de Nariño, por el apoyo en la financiación del estudio, sin los que éste no hubiera sido posible.

A los profesores Edith Mariela Burbano, Alexandra España, Milena Guerrero, Luz Estela Solarte, Sonia Mahecha y Eric García por sus enormes aportes académicos y apoyo en los momentos difíciles.

Al doctor Gilberto Benítez, por su ayuda en el contacto con las pacientes, y a ellas, por abrirnos las puertas de sus hogares y permitirnos realizar esta investigación.

A Camilo, Diana, Eddy, Milena y Maira por toda su colaboración en los procesos de laboratorio, porque no habría podido llegar al final de este proyecto sin ellos.

A todos mis compañeros, los amigos que compartieron clases y experiencias, y que se han convertido en una familia más.

DEDICATORIA

A mi mamá

A las pacientes que participaron en el estudio

A mis amigos, que son mi segunda familia.

RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad con elevada incidencia mundial y causante del mayor porcentaje de muertes relacionadas con cáncer en mujeres. Su aparición se asocia a múltiples factores; sin embargo, mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 se relacionan con el incremento en la probabilidad de padecer la enfermedad. La frecuencia de estas mutaciones está afectada por las características étnicas de la población. En Colombia se conocen dos mutaciones recurrentes para BRCA1, reportadas como de carácter fundador (3450delCAAG y A1708E), pero los estudios no han incluido poblaciones del sur occidente del país. Mediante la secuenciación de la región 241 – 453 del exón 10 y del exón 11 completo en nueve pacientes con cáncer de seno familiar y sus familiares en primer grado de consanguinidad, se determinan mutaciones encontradas en los exones 10 y 11 del gen BRCA1, en pacientes con cáncer de mama familiar de la región andina del departamento de Nariño. En las secuencias obtenidas, alineadas con la de referencia NG_005905 (GenBank), se observaron dos mutaciones: 1186A>G (con una incidencia del 2/9) y 4224A>G (con una incidencia del 1/9). Sólo 1186A>G, encontrada en una pareja de hermanas diagnosticadas con cáncer de mama, había sido reportada con anterioridad en un estudio griego, pero nunca para poblaciones latinas. Esto lleva a la conclusión de que las mutaciones encontradas difieren a otras reportadas para Colombia y Latinoamérica. Con base en esto y teniendo en cuenta que el nivel de mestizaje varía entre regiones, se evidencia la necesidad de ampliar investigaciones de evaluación genética específicas para poblaciones del sur occidente colombiano.

ABSTRACT

Breast cancer is a disease with a high worldwide incidence, and causing the highest percentage of cancer-related deaths in women. Its occurrence is associated with multiple factors; however, mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes are related to the increased likelihood of disease. The frequency of these mutations is affected by the ethnic characteristics of the population. In Colombia, two recurrent *BRCA1* mutations are known (3450delCAAG and A1708E), but the studies have not included populations from the western part of the country. By sequencing the 241-453 region of exon 10 and complete exon 11 in nine patients with familial breast cancer and their relatives in the first degree of parentage, mutations found in exons 10 and 11 of the *BRCA1* gene are determined in patients with familial breast cancer in the Andean region of the department of Nariño. The obtained sequences, aligned with the reference NG_005905 (GenBank), two mutations were observed: 1186A> G (with an incidence of 2/9) and 4224A> G (with an incidence of 1/9). Only 1186A> G, found in a pair of sisters, both diagnosed with breast cancer, had previously been reported in a Greek study, but never for a Latin population. This leads to a conclusion that the mutations found differ from other information for Colombia and Latin America. Based on this and taking into account that the level of miscegenation varies between regions, it is evident the need to expand specific genetic evaluation research for populations in south-western Colombia.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ANEXOS	14
GLOSARIO	15
INTRODUCCIÓN	17
1. HIPÓTESIS	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVO GENERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. MARCO TEÓRICO	24
4.1. Tipos de tumores asociados a cáncer de mama	25
4.1.1. Lesiones epiteliales benignas	25
4.1.2. Lesiones precursoras	26
4.1.3. Carcinoma no invasivo	26
4.1.4. Carcinoma Invasivo	26
4.2. Etapas del desarrollo de cáncer de seno	27
4.3. Epidemiología	29

4.4.	Etiología	30
4.4.1.	Factores reproductivos	31
4.4.2.	Dieta.....	31
4.4.3.	Hormonas exógenas y endógenas	31
4.4.4.	Componentes genéticos	32
4.4.4.1.	Genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	33
4.5.	ESTADO DEL ARTE.....	36
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
5.1.	Diseño de estudio	39
5.2.	Población de estudio.....	39
5.2.1.	Criterios de inclusión y exclusión.....	39
5.3.	Diseño muestral.....	40
5.4.	Control de sesgos	40
5.5.	Consideraciones éticas	40
5.6.	Toma de muestras y recolección de la información	41
5.7.	Extracción de ADN	42
5.8.	Cuantificación y cualificación de ADN	43
5.9.	Análisis de muestras de interés	43
5.10.	Amplificación por PCR	45
5.11.	Secuenciación de ADN.....	45

5.12. Análisis y procesamiento de secuencias	46
6. RESULTADOS	47
6.1. Población de estudio.....	47
6.2. Cuantificación y cualificación del ADN	50
6.3. Amplificación por PCR.....	52
6.4. Análisis y procesamiento de secuencias.....	55
6.4.1. Análisis de secuencias amplificadas del exón 10	56
6.4.2. Análisis de secuencias amplificadas del exón 11	58
7. DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	66
LITERATURA CITADA.....	67
ANEXOS	78
Anexo 1: Formato de autorización institucional	78
Anexo 2: Resumen ejecutivo presentado a los pacientes.	79
Anexo 3: Formato de consentimiento informado presentado a los pacientes que cumplen los criterios de inclusión.	82
Anexo 4. Cromatograma en formato ABI para la secuencia amplificada del exón 10 de <i>BRCA1</i> de la paciente número 4 (P4C).	86

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación entre los sistemas de clasificación SEER y TNM. Fuente: American Joint Committee on Cancer (2014).

Tabla 2. Secuencias primer para la amplificación para el exón 10 y 11 del gen BRCA1.

Tabla 3. Pacientes, familiares y controles incluidos en el muestreo.

Tabla 4. Resultados de espectrofotometría, dados en (ng/ μ L).

Tabla 5. Distribución de las muestras en los pozos de electroforesis de los productos amplificados de la PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resultados de electroforesis. Las siglas indicadas refieren a los códigos dados para cada paciente. Fuente: esta investigación

Figura 2. Resultados de electroforesis de los productos amplificados para la optimización de PCR. Fuente: esta investigación

Figura 3. Resultados de electroforesis para los productos amplificados de la PCR acorde con los parámetros mencionados en la tabla 5. Fuente: esta investigación

Figura 4. Alineamiento de la secuencia Forward y la secuencia complementaria Reverse para los amplificados de los exones 10 y 11. Fuente: esta investigación

Figura 5. Alineamiento de las secuencias Forward resultado para el exón 10. Fuente: esta investigación

Figura 6. Variaciones encontradas en las secuencias de las muestras P4C y P9C para el exón 10. Fuente: esta investigación

Figura 7. Alineamiento de las secuencias Forward resultado para el exón 11. Fuente: esta investigación

Figura 8. Variación encontrada en la secuencia de la muestra P5C para el exón 11. Fuente: esta investigación

Figura 9. Secuencia peptídica de la mutación encontrada en la muestra P5C para el exón 11. Fuente: esta investigación

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Formato de autorización institucional

Anexo 2: Resumen ejecutivo presentado a los pacientes.

Anexo 3: Formato de consentimiento informado presentado a los pacientes que cumplen los criterios de inclusión.

Anexo 4. Cromatograma en formato ABI para la secuencia amplificada del exón 10 de *BRCA1* de la paciente número 4 (P4C).

GLOSARIO

BIC: Siglas en inglés para *Breast Cancer Information Core*, una base de datos de libre acceso online referente a mutaciones y polimorfismos en los genes BRCA1 y BRCA2

INCIDENCIA: Refleja el número de "nuevos casos" en un determinado periodo de tiempo. Es un índice dinámico que requiere seguimiento en una población de interés

LINFOMA: Es un tipo de cáncer que se origina en el sistema linfático y que afectan el sistema inmune del cuerpo

MASTECTOMÍA: Operación quirúrgica que consiste en la extirpación de la glándula mamaria o de una parte de ella.

MUTACIONES FUNDADORAS: Mutaciones comunes a una población formada por efecto fundador.

NEOPLASIA: formación de un neoplasma, es decir, la multiplicación progresiva de células en condiciones que no permitirían o que detendrían la multiplicación de células normales. Puede ser benigna o maligna. El cáncer es un tipo de neoplasia maligna

OMS Organización Mundial para la Salud

PCR Siglas en inglés para *Polymerase Chain Reaction*, o *Reacción en Cadena de la Polimerasa*, una técnica de biología molecular en la que se obtienen un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

SARCOMA: Es un tipo de cáncer que se origina en tejidos tales como los huesos o los músculos

SECUENCIACIÓN TIPO SANGER: Método basado en la clonación del ADN, y el empleo de dideoxinucleótidos que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3', al que se incorpora

una cadena de ADN en crecimiento y que detienen la elongación. Estos dieoxinucleótidos sirven de marcadores, que permiten la deducción de la secuencia de ADN introducida.

TAE: Tasa Ajustada por Edad, indica el número teórico de casos o muertes que tendría una determinada población si se actuara sobre una población teórica de referencia, de 100.000 habitantes para cada género.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de seno es una enfermedad relativamente común, causante de la mayor cantidad de muertes relacionadas con cáncer en mujeres a nivel mundial, y en la que, pese a la gran cantidad de tratamientos disponibles, resultará en el fallecimiento de más de la mitad de sus afectados en países subdesarrollados o de economías emergentes (World Health Organization, 2015).

En estos países, la preocupación está enfocada en el diagnóstico tardío, lo que disminuye las probabilidades de supervivencia, no sólo después del primer diagnóstico, sino también a largo plazo (World Health Organization, 2014; World Health Organization, 2015). En Colombia, por ejemplo, esta enfermedad resultará en el 15.3 % de las muertes anuales relacionadas a neoplasia en mujeres, constituyéndose como la que provoca mayor mortandad en la población femenina en el país (World Health Organization, 2015).

El municipio de Pasto cuenta con el registro de cáncer poblacional desde 1998, y según los datos epidemiológicos registrados en este, se evidencia que en el período 2008-2012, reportó 313 nuevos casos, con una Tasa Ajustada por Edad (TAE) de 27.8 casos por cada 100000 personas-año, y 115 muertes (TAE 10,8) con una mortalidad del 11,9% (Centro de Estudios en Salud Universidad de Nariño, 2017), siendo el segundo con mayor incidencia y la segunda causa de muerte femenina por cáncer en el municipio, después del cáncer de cuello uterino (Yépez-Chamorro, Bravo-Ocaña, Hidalgo-Troya, Jurado-Fajardo, & Bravo-Goyes, 2012)

Este padecimiento está relacionado a múltiples factores de riesgo, siendo el más conocido el género, aunque también puede tenerse en cuenta la edad, historia familiar o personal asociada a neoplasia, edad de la menarquía y de menopausia, la edad del nacimiento del primer hijo, estilo

de vida, estatus socioeconómico e incluso tratamientos hormonales que están relacionados con un aumento en las probabilidades de presentar la enfermedad en cualquier momento (Bradley, Given, & Roberts, 2002; Miao, et al., 2011; World Health Organization, 2015).

Sin embargo, a nivel genético-molecular se ha determinado que la susceptibilidad de desarrollar este tipo de cáncer se incrementa hasta en un 65 % con la presencia de formas mutantes de los genes supresores de tumores BRCA-1, BRCA-2 y p53, aunque estas mutaciones son poco frecuentes, y surgen sólo en el 5 a 10% de los casos (Preventive Services Task Force Recommendation, 2013; World Health Organization, 2015).

Los genes BRCA pertenecen a un grupo de genes supresores de tumores que codifican proteínas relacionadas con el mantenimiento de la integridad genómica y la reparación de la doble hebra de ADN durante la recombinación homóloga (Roy, Chun, & Powell, 2012; Sun, et al., 2014).

Teniendo en cuenta esto, se esperaría que estos genes tuvieran alto grado de conservación, sin embargo, y especialmente en chimpancés y humanos, se ha observado una alta cantidad de mutaciones, relacionadas a selección positiva, pero con consecuencias antagónicas en la formación de cánceres (Lou, et al., 2014), lo cual explica las variaciones de frecuencias de mutaciones en *BRCA1/2* en diferentes contextos étnicos, y hace importante la implementación de estudios en poblaciones de alto mestizaje, como las latinoamericanas, donde la presencia de múltiples comunidades étnicas en las mismas regiones geográficas ha llevado a mezclas asimétricas de tres grupos étnicos; amerindio, africano y europeo, que varían a lo largo del territorio colombiano (Rondón, Osorio, Peña, Garcés, & Barreto, 2008; Gorodetska, et al., 2015).

Estas formas mutantes predisponen a la aparición de cáncer de mama y de ovario con una alta penetrancia, aumentando en 50 a 70 % la posibilidad de su desarrollo para portadores de

mutaciones en *BRCA1*, y de 40 a 50 % en portadores de mutaciones en *BRCA2*, presentándose tumores histológicamente agresivos y proliferativos, y acrecentando también el riesgo en otros tipos de cáncer, como el de páncreas, ovario y próstata (Venkitamaran, 2009; Grushko, et al., 2002).

Si bien los tratamientos varían de acuerdo con el estadio y la extensión del cáncer; mastectomía, quimioterapia y radioterapia son los tratamientos más comunes. Los portadores de mutaciones en los genes *BRCA* requieren seguimiento continuo, incluso después de remisión, dada la alta reincidencia que puede presentarse, e incluso tratamiento previo, consejo y testeo genético para reducir el riesgo de aparición de la enfermedad cuando se conocen antecedentes (Preventive Services Task Force Recommendation, 2013; Slavin, et al., 2012).

El gen *BRCA1* está formado por 24 exones, de los cuales el 10 es el más largo, con una extracción de 6852 nucleótidos, y, en conjunto con los exones 11 y 12, es considerado como de mayor importancia clínica (Clark, Rodríguez, Snyder, Hankins, & Boehning, 2012; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014; Raponi, et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior y dado que no existen estudios enfocados a mutaciones de estos genes de interés correspondiente a personas diagnosticadas en el municipio de Pasto, se propone resolver la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las mutaciones más frecuentes encontradas en las regiones 241 – 453 del exón 10 (123357-123577 en la secuencia con código de acceso en GenBank NG_005905), y el exón 11 completo del gen *BRCA1* (126877-127155 en la secuencia con código de acceso en GenBank NG_005905) en pacientes con historia de cáncer de mama familiar, en el diagnosticadas en el municipio de Pasto? De esta manera se pretende identificar posibles mutaciones comunes a pacientes del departamento de Nariño, que permitan realizar estrategias de detección temprana en familias con antecedentes.

1. HIPÓTESIS

Se ha determinado que las mutaciones presentes en *BRCA1* son responsables de la mayoría de casos de cáncer de mama familiar, y que estas se ubican principalmente en el exón 10 y 11, se espera que los individuos seleccionados por presentar antecedentes de riesgo presenten mutaciones en el exón del gen señalado.

Por otro lado, y teniendo en cuenta que las mutaciones relacionadas con cáncer de mama varían de acuerdo con las características étnicas de las personas afectadas, es probable que las variaciones encontradas en pacientes diagnosticados en el departamento de Nariño, que poseen diferentes porcentajes de mestizaje con relación a otras zonas del país, sean diferentes y específicas frente a las encontradas en otros estudios realizados en Colombia.

2. JUSTIFICACIÓN

Existen estudios realizados en Colombia que afirman la existencia de mutaciones presentes en los genes *BRCA*, que varían según la población y la región geográfica, en las que se han descrito tres mutaciones comunes (*BRCA1* 3450 delCAAG en el exón 11, *BRCA1* A1708E en el exón 18 y *BRCA2* 3034 delACAA en el exón 11), posiblemente de origen europeo y que pudieron haber surgido por causa de efecto fundador (Torres, et al., 2007; Torres, et al., 2009; Sanabria, Muñoz, & Vargas, 2009; Ortiz, et al., 2012; Hernández, et al., 2014).

En vista de que las mutaciones en *BRCA1* resultan en una mayor probabilidad de aparición de cáncer, y que *BRCA1* es el gen que presenta una más alta proporción de mutaciones clínicamente significativas, sobre todo en los exones 10 y 11 del gen *BRCA2* (que presentan cerca de 60 % de todas las secuencias codificantes en estudio, y un alto porcentaje de mutaciones clínicamente relevantes) estos se han convertido en uno de los genes más estudiados en poblaciones afectadas (Torres, et al., 2007; Clark, Rodríguez, Snyder, Hankins, & Boehning, 2012).

Por otro lado, Sandoval, de la Hoz y Yunis (1993), señalaron que las migraciones y los consiguientes procesos de mestizaje registrados a lo largo de la historia de nuestro país han resultado en diferentes grados de mestizaje que varían a lo largo del territorio, indicando un alto porcentaje de aporte genético indígena (entre 43-52%) en el departamento de Nariño, mientras que en el resto del país presentó mayores aportes de genotipo caucásico y africano, lo que también puede indicar una posible variación en la frecuencia y presencia de mutaciones de *BRCA1* presentes en la población (Sanabria, Muñoz, & Vargas, 2009).

Aunque es imposible garantizar que la enfermedad no se desarrolle, la detección temprana de mutaciones puede llevar a la implementación de acciones para prevenir la posible aparición del cáncer de mama, pero, en poblaciones latinas, desafortunadamente, no se conoce por completo, la forma en la que la proporción de éstas contribuye en la aparición de cáncer de mama y ovario (Torres, et al., 2007), principalmente por que la frecuencia con la que se realizan análisis para los genes *BRCA* es relativamente baja, pese a que la secuenciación de nueva generación ha aumentado en gran medida la cantidad de estudios de éste tipo en los países de Latinoamérica y el Caribe (Narod & Rodríguez, 2011; Dutil, et al., 2015).

El conocimiento de las regiones específicas donde ocurren las mutaciones de relevancia para la población puede significar un aumento en los tratamientos preventivos como la cirugía profiláctica, cambios en el estilo de vida que lleven a cambios en los factores de riesgo modificables, como el uso de hormonas exógenas e historia reproductiva, e incluso el uso de moduladores de receptores de estrógenos (Kobayashi, Ohno, Sasaki, & Matsuura, 2013), por lo que este tipo de estudios sería beneficioso en cuanto representaría un aumento significativo de la esperanza de vida de pacientes afectados, además de la disminución de la incidencia de esta neoplasia.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las mutaciones más frecuentes encontradas en las regiones 241 – 453 del exón 10 (123357-123577 en la secuencia de referencia GenBank NG_005905), y el exón 11 completo del gen *BRCA1* (126877-127155 en la secuencia de referencia GenBank NG_005905), en pacientes con cáncer de mama familiar de la región andina del departamento de Nariño.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir las principales mutaciones encontradas en las regiones 241 – 453 del exón 10 (123357-123577 en la secuencia de referencia GenBank NG_005905), y el exón 11 completo del gen *BRCA1* (126877-127155 en la secuencia de referencia GenBank NG_005905), presentes en los pacientes con cáncer de mama familiar de la zona andina del departamento de Nariño.

4. MARCO TEÓRICO

La mama es una estructura compleja requerida para la producción y secreción de leche; en animales reproductivamente maduros, la glándula mamaria consiste en un pezón, ductos asociados que permiten el paso de la leche y que convergen al pezón de manera radial y lóbulos compuestos por células secretorias epiteliales y tejidos que proveen soporte (Macéa & Tavares, 2006; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014).

El pezón está compuesto por fibras musculares lisas longitudinales y horizontales con relación a su base, que pueden permanecer separadas o unidas a los ductos crenulados del pezón, que emergen a través de poros en la superficie de la piel (Hassiotou & Geddes, 2012).

Los lóbulos, que hacen parte del tejido glandular, contienen alveolos (de 10 a 100) con unidades secretoras individuales; por otro lado, los ductos son un sistema de canales que surgen desde el alveolo y se unen en un solo ducto que lleva al pezón, el seno consiste de tejido del epitelio ductal rodeado de tejido conectivo fibroso; una capa interna que encapsula el lumen (o espacio) ductal, y que contiene células epiteliales cuboidales con capacidad de diferenciación, y una capa basal o externa de células mioepiteliales contráctiles, que rodean a las primeras y tienen propiedades similares al tejido muscular liso (Hassiotou & Geddes, 2012; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014).

Las enfermedades que surgen en los senos son originadas en los diferentes subtipos epiteliales que cubren las paredes de los ductos que, expuestas a carcinógenos o por expresión génica, se ven alterados y afectan las características moleculares de las células y desarrollan los primeros estadios del cáncer de mama (Hassiotou & Geddes, 2012), aunque la expansión de las

enfermedades malignas del seno dependen del drenaje linfático (Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014).

El cáncer de seno es una enfermedad considerada como heterogénea, posee varias causas, y no es posible hablar de una sola asociada al curso del desarrollo de la enfermedad en el paciente, por lo que el término comprime diversas características morfológicas y comportamientos clínicos, que requieren, a su vez, diferentes acercamientos en su tratamiento (Weigelt, Geyer, & Reis-Filho, 2010; Badve, et al., 2011).

4.1. Tipos de tumores asociados a cáncer de mama

La clasificación de los diferentes tipos de cáncer de seno está bien establecida y se ha hecho de acuerdo a su tipo y grado histológico, es decir, al patrón de crecimiento de los tumores, y al grado de diferenciación y actividad proliferativa que presentan las lesiones, respectivamente, aunque la clasificación de lesiones pre-invasivas es un reto más grande (World Health Organization, 2003; Badve, et al., 2011). Se definen los tipos de lesiones a continuación;

4.1.1. Lesiones epiteliales benignas

Son un grupo de desórdenes heterogéneos que surgen generalmente en la unidad terminal lobular del ducto, aunque pueden también aparecer en los ductos mayores en la región central del seno, con características similares a las del carcinoma invasivo, presentándose como una masa palpable o no; las características de estas lesiones varían según la edad del paciente, y el tipo de enfermedad (World Health Organization, 2003; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014).

4.1.2. Lesiones precursoras

Se trata de lesiones difíciles de diagnosticar porque generalmente pueden asemejarse a lesiones malignas en las pruebas de diagnóstico usuales, la diagnosis generalmente se realiza por procedimientos de biopsia, aunque dado el tamaño de la muestra, muchas veces, el análisis genético da resultados contradictorios, por lo que la determinación de estas lesiones se realiza por medios histológicos (World Health Organization, 2003; Schreer & Lüttges, 2005).

4.1.3. Carcinoma no invasivo

Refiere a las lesiones confinadas al lugar donde se originaron, es decir, los lóbulos o ductos, sin expandirse aún a tejidos cercanos o a los lóbulos linfáticos; diagnosticado de manera temprana tienen un buen pronóstico y no necesariamente están asociados a un riesgo aumentado de desarrollo posterior de otros tipos de carcinomas más agresivos (World Health Organization, 2003; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014).

4.1.4. Carcinoma Invasivo

Los carcinomas invasivos describen a un grupo de tumores epiteliales que invaden tejidos, siendo, en su mayoría, adenocarcinomas derivados del epitelio mamario y de los lóbulos. Se trata de trastornos generalmente asintomáticos, que llegan a notarse por la presencia de bultos

(asociados o no a dolor) y por anomalías del pezón (World Health Organization, 2003; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014).

4.2. Etapas del desarrollo de cáncer de seno

Las lesiones, de acuerdo a la expansión y tamaño que éstas presenten, pueden considerarse como Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS), donde las células epiteliales “cancerosas” residen sólo en los ductos y lóbulos, siendo precursoras a los Cánceres de Mama Invasivos (CMI) que son potencialmente letales, pues se han expandido a otras partes del seno, e incluso, a otros órganos del cuerpo (Allred, 2010).

Los estadios o etapas del cáncer de seno pueden describirse de acuerdo a la expansión de los tumores y el compromiso con otros tejidos y órganos, o basándose en el sistema conocido como TNM (Tumor, Nódulo, Metástasis); el primero, un sistema de extensión de la enfermedad, desarrollado por el Instituto Nacional de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales del Cáncer (SEER, por sus siglas en inglés) en donde se consideran cinco estadios, en los que por lo general CDIS pertenece al 0, mientras que CMI pertenece al IV (National Cancer Institute, 2001; Breastcancer.org, 2015).

La clasificación TNM es la más utilizada en la práctica clínica, sobre todo porque ofrece asistencia en la diferenciación y clasificación del cáncer, permitiendo una adecuada estandarización local, regional e internacional de los tratamientos, incidencias y resultados, además de una evaluación de la prognosis de la enfermedad (Edge & Compton, 2010). La relación entre los dos sistemas de clasificación se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Relación entre los sistemas de clasificación SEER y TNM. Fuente: *American Joint Committee on Cancer* (2014).

SEER		TNM	
0	Tis	N0	M0
IA	T1*	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
IIA	T0	N1**	M0
	T1*	N1**	M0
IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
IIIA	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
IIIB		N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
IIIC	Cualquier T	Cualquier N	M1
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

*T1 incluye T1mi

**Sólo tumores T0 y T1 con micro metástasis nodales se excluyen

del estadio IIA y se clasifican como estadio IB

4.3. Epidemiología

El cáncer de mama es el más frecuente en el mundo en mujeres, la mayor causa de muerte por neoplasias en países poco desarrollados, y la segunda mayor en países desarrollados, aunque según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se trata de la quinta causa de muerte en general, aunque los rangos de mortalidad varían entre las regiones debido principalmente a la oportunidad, disponibilidad, asequibilidad y calidad de tratamientos. Para el año 2012, el proyecto GLOBOCAN reportó 1.671.149 nuevos casos, con una Tasa Ajustada por Edad (TAE) de 43,1 casos por cada 100.000 personas-año, y 521.907 muertes (TAE de muertes 12,9) (Globocan, 2012).

En Colombia, es el cáncer que mayor incidencia y mortalidad asociada a neoplasias presenta, resultando en una incidencia de 8686 nuevos casos para 2012, con TAE de 35.9 casos por cada 100000 personas-año, y una mortalidad de 2649 muertes para el mismo año (TAE 10.8), principalmente porque pese a la aplicación de políticas institucionales para el control de los factores de riesgo y la disponibilidad de pruebas de detección temprana, los diagnósticos son generalmente tardíos, lo que disminuye las probabilidades de supervivencia (Globocan, 2012; World Health Organization, 2014; World Health Organization, 2015).

Nariño sigue la tendencia latinoamericana de presentar una alta incidencia de cáncer de cuello uterino en mujeres, resultado de la exposición a factores de riesgo en la región, como la

alta prevalencia de infección del virus del papiloma humano; sin embargo, según el registro de cáncer poblacional, los casos de cáncer de mama representan el 16.9 % de los casos totales, lo cual lo ubica como el segundo tipo de neoplasia más común en el departamento (Yépez-Chamorro, Bravo-Ocaña, Hidalgo-Troya, Jurado-Fajardo, & Bravo-Goyes, 2012).

4.4. Etiología

El cáncer de mama es un evento multifactorial, que incluye factores reproductivos, dieta, hormonas exógenas y componentes genéticos dentro de los elementos que aumentan las probabilidades de aparición de la enfermedad (World Health Organization, 2003; World Health Organization, 2015).

La enfermedad es más común en mujeres que en hombres (éstos presentan un rango de incidencia de menos de 1%) y sus posibilidades de aparición aumentan con la edad, doblándose cada diez años hasta la menopausia, donde el rango de incidencia disminuye (McPherson, Steel, & Dixon, 2000; Miao, et al., 2011).

Las características demográficas de la población también afectan la diagnosis y la supervivencia de los pacientes, si bien se sabe que hay poblaciones étnicas, como la japonesa y china, que presentan bajo riesgo frente a otras poblaciones, como las caucásicas, teniendo especialmente en cuenta el caso de la población judía asquenazí, que presentan una alta frecuencia en dos mutaciones fundadoras en los genes *BRCA1/2* (Bradley, Given, & Roberts, 2002; World Health Organization, 2003; Narod & Rodríguez, 2011). No obstante, y de acuerdo con la World Health Organization (2011) la eficiencia de un análisis demográfico está determinada por la cantidad de pacientes y la calidad de los datos suministrados por los mismos,

lo que disminuye la eficiencia del uso de características demográficas en los estudios de este tipo.

4.4.1. Factores reproductivos

El cáncer de seno ocurre con mayor frecuencia en mujeres con menarquia temprana o con una menopausia tardía (McPherson, Steel, & Dixon, 2000; World Health Organization, 2003). Por otro lado, las mujeres que permanecen nulíparas o que tienen hijos a mayor edad también se pueden ver afectadas, aunque se le ha dado menos importancia a la protección dada por el embarazo en los últimos años (McPherson, Steel, & Dixon, 2000; World Health Organization, 2003; Althuis, et al., 2004).

4.4.2. Dieta

No existe una relación clara o constante entre el consumo de grasa en las poblaciones y la enfermedad, aunque se cree que el consumo de fruta y vegetales está asociado a un ligeramente riesgo menor de aparición de ésta (World Health Organization, 2003; Althuis, et al., 2004; Dumitrescu & Cotarla, 2005). La obesidad, por otro lado, aumenta la producción de estrógenos, y puede aumentar el riesgo de desarrollo de cáncer una vez llegada la menopausia (Althuis, et al., 2004; Dumitrescu & Cotarla, 2005).

4.4.3. Hormonas exógenas y endógenas

Hormonas sexuales, como el estrógeno, juegan un papel crítico en la etiología del cáncer; hay dos teorías importantes en el desarrollo de los tumores de seno, la primera, conocida como la hipótesis del exceso de estrógeno, sugiere que el desarrollo de cáncer de seno depende de la exposición del tejido mamario a estrógenos, la segunda, postula que el riesgo se incrementa con la combinación de altos niveles de estrógeno y progesterona (World Health Organization, 2003).

Hormonas endógenas (causadas por cambios hormonales normales y cambios metabólicos provocados por el exceso de peso) y exógenas (como las introducidas por tratamientos hormonales usados, a menudo, después de la menopausia, o por el uso prolongado de contraceptivos orales) resultan en un incremento considerable de la posibilidad de desarrollo de cáncer de seno (World Health Organization, 2003; Althuis, et al., 2004; Dumitrescu & Cotarla, 2005).

4.4.4. Componentes genéticos

Existen otros genes asociados al desarrollo del cáncer de seno, como *p53*, *STK11/LKB1*, *RAD3p/TEL1p*, *CHEK2*, *ATM*, *ATR* o *PTEN*, que actúan en reparación o control de daños durante el ciclo celular, pero el riesgo asociado a estos es menor, y en ocasiones, no se tiene claro la verdadera relación entre sus variantes y el desarrollo del cáncer, siendo responsables de casos esporádicos, o bien la proliferación de aberraciones cromosómicas originadas por estas mutaciones surge asociado a variantes en los genes *BRCA*, e incluso en regiones del genoma distantes, confiriendo pequeñas cantidades de riesgo a quienes las poseen (Venkitamaran, 2002; Venkitamaran, 2009; Narod & Rodríguez, 2011; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014), y otros genes de alta penetrancia como *p53*, *ATM* o *PTEN* que aumentan la posibilidad de

aumentar la aparición del cáncer hasta en 65 %, sin embargo, estas mutaciones sólo surgen en cerca del 5 a 10 % de los casos, por que presentan bajas frecuencias alélicas en la población en general (Dumitrescu & Cotarla, 2005; Preventive Services Task Force Recommendation, 2013; World Health Organization, 2015).

En países latinoamericanos, existen 33 estudios sobre líneas germinales desarrollados en la región en el periodo comprendido entre 1994 y 2015, pero presenta el problema que, en poblaciones como las hispanas, los amplios procesos de mestizaje llevan a que el conocimiento inexacto de la estructura genética de las diferentes regiones no permita poder afirmar que pueda desarrollarse un único panel de variantes patogénicas para *BRCA*, y menos aún, si la incidencia encontrada en otras poblaciones pueda aplicarse a lo largo del territorio colombiano (Rondón, Osorio, Peña, Garcés, & Barreto, 2008; Narod & Rodríguez, 2011; Dutil, et al., 2015; Gorodetska, et al., 2015).

4.4.4.1. Genes *BRCA1* y *BRCA2*

Los genes *BRCA* son considerados genes supresores de tumores, codificando proteínas que cumplen funciones esenciales de reparación en la recombinación homóloga de la doble cadena de ADN, con roles de guardianes de la integridad genómica, actuando en los mecanismos de protección de la integridad del genoma en células proliferativas (Venkitamaran, 2002; Roy, Chun, & Powell, 2012; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014).

BRCA1 y *BRCA2* son los genes más estudiados, siendo los que presentan linajes identificados con mayor frecuencia, representando una alta proporción de las mutaciones encontradas en casos de cáncer familiar (entre 15 % y 20 % para *BRCA1*, aunque puede

observarse en 80 % de familias donde hay más de seis casos), y las mutaciones presentes en cualquiera de éstos pueden aumentar el riesgo de aparición de neoplasias, no sólo en el tejido mamario, sino también en el ovario, trompas de Falopio y peritoneo (Venkitamaran, 2002; Venkitamaran, 2009; Narod & Rodríguez, 2011; Preventive Services Task Force Recommendation, 2013; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014).

El gen *BRCA1* está ubicado en el brazo largo del cromosoma 17, en la posición 17q21, y está compuesto de 24 exones, que se transcriben en una proteína consistente de 1863 aminoácidos; mientras tanto, el gen *BRCA2* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 13, en la posición 13q12-13, está compuesto de 26 exones, que codifican para una proteína de 3418 aminoácidos; y si bien ambos cumplen roles centrales en la conservación de la estabilidad estructural y numérica de los cromosomas durante la división celular, y la mutación en líneas germinales de cualquiera de los dos genes desemboca en la aparición del Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (SCMOH), los dos genes no tienen semejanzas demasiado grandes, ni en sus funciones, ni en las proteínas para las que codifican, e incluso, la influencia de *BRCA1* en la aparición del cáncer es mayor, aumentando hasta en 80 % la posibilidad de que la enfermedad aparezca en cualquier momento, frente a 60 % que presenta *BRCA2* (Venkitamaran, 2009; Clark, Rodríguez, Snyder, Hankins, & Boehning, 2012; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014).

El gen *BRCA1* es requerido para una adecuada recombinación entre secuencias homólogas, interactuando con complejos de proteínas y enzimas que alteran la cromatina y la estructura de ADN, y que participan en la reparación de rupturas en la doble cadena de ADN por la inhibición de la actividad de proteínas encargadas de la formación de cadenas simples en las zonas de ruptura (Venkitamaran, 2002; Roy, Chun, & Powell, 2012).

Es después de la aparición del daño en las células durante la fase S del ciclo de división celular cuando se da la fosforilación de la proteína BRCA1, sirviendo diferentes propósitos en puntos de chequeo, trabajando en las diferentes rutas que señalan el retraso en el ciclo celular en la presencia de diferentes lesiones de ADN, además de trabajar como un regulador transcripcional específico cuya expresión afecta el refuerzo de los puntos de chequeo, entre otras respuestas biológicas, aunque la información sobre los procesos en los que se ve implicado es en su mayoría incompleta, se sabe que las células que presentan modificaciones en *BRCA1* son más susceptibles a daños por oxidación, pues se piensa que las proteínas truncadas que se originan son las que desencadenan degradación proteasomal y ubiquitinación (Gilmore, et al., 2017).

Si bien se sabe que la mayoría de las mutaciones de importancia clínica se encuentran ubicadas en los exones 10-12, siendo el 10 el de mayor tamaño en el gen, con una extensión de 6852 nucleótidos, y presentando cerca de 55 % de mutaciones registradas en la base de datos del Breast Cancer Information Core (BIC) (Couch & Weber, 1996; Venkitamaran, 2002; Breast Cancer Information Core, 2012; Clark, Rodríguez, Snyder, Hankins, & Boehning, 2012).

Por otro lado, el gen *BRCA2* está ligado con BRAF35, que está asociado a la condensación de cromatina y participa en la condensación de cromosomas durante la división celular; *BRCA2* también tiene funciones en la regulación en los puntos de control de los estadios G2 y M, pero se requieren más estudios para conocer en detalle la participación *BRCA2* como regulador de eventos en el ciclo celular y si esto es independientemente de su rol en la reparación de ADN (Venkitamaran, 2002; Venkitamaran, 2009).

Se evidencia la importancia de estos genes en los procesos de integridad estructural del genoma, sin embargo, es contradictorio el hecho que estos genes no se conserven evolutivamente, si no que haya una rápida evolución de éstos en los mamíferos, y sobre todo en

los primates, lo que ha llevado a la conservación de regiones específicas y la selección positiva de mutaciones en otras, influenciando su función y contribuyendo a la susceptibilidad a cáncer (Fleming, Potter, Ramirez, Ostrander, & Ostrander, 2003; Lou, et al., 2014). La pérdida de la función de estas proteínas particulares, debido a mutaciones significativas o deletéreas, es la causante del SCMOH, aumentando la probabilidad de desarrollo de tumores histológicamente agresivos y proliferativos, con alta reincidencia (Narod & Rodríguez, 2011; Preventive Services Task Force Recommendation, 2013; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014).

4.5. ESTADO DEL ARTE

Aunque era un hecho ya conocido que la historia familiar juega un factor importante en la aparición del cáncer de seno (Kelsey, 1979), y que tenía también un componente genético, apenas hasta principios de la década de los noventa se logró señalar como posible responsable de la mayoría de casos de cáncer familiar a un gen en 17q21 (Hall, et al., 1990) y fue ubicado por Easton et al. (1993) y formalmente llamado “*BRCA1*”. Wooster et al. (1994) describió un segundo gen asociado a la enfermedad “*BRCA2*” en familias con cáncer familiar no relacionados con *BRCA1*.

Las formas mutantes en *BRCA1* propuestas como potenciales candidatas en la aparición del cáncer de seno familiar se reportaron por primera vez en los estudios realizados por Miki et al. (1994), quienes describieron algunas mutaciones que se encontraban en este gen y su posible asociación con casos de cáncer de mama y ovario hereditarios.

La diseminación de información se vio altamente favorecida por la creación de una base de datos central por parte del BIC, que contiene datos relacionados a mutaciones, polimorfismos

y metodologías para la detección de dichas mutaciones, disponibles en Internet y de libre acceso a investigadores (Couch & Weber, 1996; Breast Cancer Information Core, 2012).

También era conocido que la incidencia de la enfermedad podía variar según las características étnicas de la población (Kelsey, 1979). Los estudios de Struwing et al (1995) y Neuhausen (1996) llevaron a la detección y descripción de tres mutaciones entre mujeres de ascendencia judía Asquenazi del Este de Europa (señalada como de interés por el alto número de casos familiares y tempranos), consideradas como posiblemente fundadoras por su alta recurrencia.

Estas mutaciones: 185delAG de *BRCA1*, 6174delT *BRCA2*, y 5382insC de *BRCA1*, y que actualmente se usan en el diagnóstico preventivo del síndrome de cáncer de mama y ovario familiar en la mayoría de poblaciones caucásicas, pues han sido reportadas en otras poblaciones de Europa y Norteamérica (Neuhausen, et al., 1996; Neuhausen, et al., 1996), donde están implicadas en cerca de 78.4 % de los casos de neoplasia temprana, mientras que en la población general, la prevalencia de mutaciones en *BRCA* es de hasta 10 %, de las cuales, la mayoría pertenece a *BRCA1*, lo que sugiere que las mutaciones en este gen pueden estar relacionadas a la aparición de tumores de seno y ovario esporádicos (Couch & Weber, 1996; Kobayashi, Ohno, Sasaki, & Matsuura, 2013; Dutil, et al., 2015).

En poblaciones latinas, las primeras contribuciones se observaron con los estudios en comunidades estadounidenses de diferentes orígenes étnicos, pero que no podían tomarse en cuenta para la población latina en general, debido a la baja proporción que representaba en el grupo de estudio (Whittemore, Gong, & Itnyre, 1997; Anton-Culver, Cohen, Gildea, & Ziogas, 2000).

El alto costo del testeo genético limitaba los estudios en muchos países de la región (Narod & Rodríguez, 2011; Dutil, et al., 2015), pero, con el surgimiento de la secuenciación de segunda generación, el desarrollo de este tipo de análisis ha aumentado en frecuencia, llevando a la descripción de mutaciones prevalentes en estas comunidades en 33 publicaciones en 13 países de latinoamérica, caribe y poblaciones hispanas en los Estados Unidos (Dutil, et al., 2015).

Para Colombia, se han realizado cuatro estudios entre 2006 y 2014, que han identificado tres mutaciones comunes en diferentes zonas del país. Torres et al (2007) describió trece mutaciones en 57 individuos en Bogotá y la costa caribe y pacífica, señalando tres (*BRCA1* 3450 delCAAG en el exón 10, *BRCA1* A1708E en el exón 17 y *BRCA2* 3034 delACAA en el exón 10) como las más frecuentes y de posible origen europeo.

Un estudio posterior (Torres, et al., 2009) realizado con 766 pacientes en Bogotá y otros realizados en otras seis ciudades al norte del país (Ortiz, et al., 2012; Hernández, et al., 2014) confirmaron la presencia de las mismas mutaciones en casos de cáncer familiar, y sugirieron el uso de estas mutaciones como parte de un panel para diagnóstico clínico, sin embargo, existe evidencia de que el alto mestizaje durante la historia del país ha dado como resultado a diferentes índices de mezclas que pueden resultar en variaciones en las frecuencias de mutaciones que pueden encontrarse en el país (Sandoval, de la Hoz, & Yunis, 1993; Rondón, Osorio, Peña, Garcés, & Barreto, 2008).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diseño de estudio

Observacional descriptivo de series de casos de las mutaciones presentes en el gen *BRCA1* en pacientes con cáncer de seno familiar en la zona andina del departamento de Nariño (Hernández-Ávila, Garrido-Latorre, & López-Moreno, 2000).

5.2. Población de estudio

Se incluyeron los casos de tumores de seno familiar (n=9) en mujeres diagnosticadas en el consultorio del Médico Cirujano de Seno y Tumores de Tejidos Blandos Dr. Gilberto Enrique Benítez España, durante el periodo 2013-2015, del cual se obtuvo la información y datos de las pacientes. La información de la base de datos del consultorio fue corroborada con el Registro poblacional de Cáncer del municipio de Pasto.

5.2.1. Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron pacientes que cumplían uno o más de los siguientes criterios, (Torres et al., (2007))

1. Diagnóstico antes o a los 35 años
2. Historia familiar de al menos un caso de cáncer de mama diagnosticado a cualquier edad.
3. Historia familiar de una diagnóstico de cáncer ovario a cualquier edad.

Se excluyeron las pacientes que presentaban morfologías hematopoyéticas, y carcinomas no asociados con el cáncer de mama como sarcomas y melanomas.

5.3. Diseño muestral

Se realizó un muestreo por conveniencia a partir de las pacientes atendidas en el consultorio que aceptó participar en la investigación. Las restricciones de inclusión a la población de estudio, así como el estudio de las historias clínicas, se realizaron para disminuir el efecto de este sesgo sobre los datos obtenidos.

5.4. Control de sesgos

Este estudio presenta error aleatorio debido a que el método de selección de la muestra no fue probabilístico. Para minimizar el error sistemático se controlaron los sesgos de selección de la población de estudio, mediante criterios de inclusión y exclusión establecidos por literatura, y los sesgos de información, utilizando pruebas y protocolos validados.

5.5. Consideraciones éticas

El trabajo se realizó conforme con los requerimientos éticos de la resolución 008430 de 1993 del ministerio de salud y protección social (Ministerio de Salud de Colombia, 2013) y La declaración de Helsinki, promulgada por la Asociación Médica Mundial (Asociación Médica Mundial, 2013). Para ello esta investigación se llevó a cabo mediante la autorización previa de la institución consultada (Anexo 1), y se garantizó el anonimato y privacidad de todos los participantes. Los pacientes, sus familiares y los individuos de control fueron contactados y se solicitó su participación voluntaria, para ello se explicó de manera clara y completa, la información relacionada con el desarrollo de la investigación, se resolvieron posibles inquietudes y se solicitó la firma de un consentimiento informado (Anexos 2 y 3) que permite el uso de la información y muestras recolectadas con fines de investigación. La información de los participantes vinculados fue codificada para mantener su anonimato. Las muestras de sangre de este estudio fueron tomadas por un profesional de salud idóneo y siguiendo todas las normas de bioseguridad requeridas para causar el menor daño posible a los donantes.

5.6. Toma de muestras y recolección de la información

Se obtuvo información sobre historia familiar (antecedentes familiares, sitio de origen) y patología (estadio TNM en el momento de diagnóstico) de todos los individuos por medio de la historia clínica y por medio de una entrevista.

La extracción de sangre se realizó según lo indicado por Andriolo et al. (2010) por venopunción en la zona antecubital de la parte anterior del brazo, frente y bajo del codo, donde se encuentran ubicadas las venas cefálica, cubital mediana y basílica, que forman el sistema de

distribución venosa denominado “patrón H”, y el “patrón M” conformado por las venas más prominentes; cefálica, cefálica mediana, basílica mediana y basílica. En casos en los que no fue posible obtener sangre de esta manera, se obtuvo desde las venas del dorso de la mano, extrayendo en cada caso 10 mL de sangre, usando dos (2) tubos de extracción por vacío DB Vacutainer© K2 EDTA (Andriolo, et al., 2010; Deschka, 2010). Para mantener la privacidad de los pacientes cada tubo fue codificado y mantenido en refrigeración hasta realizar la extracción de ADN.

5.7. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de sangre periférica por *Salting out*, según el protocolo descrito por Miller et al. (1988) con modificaciones a partir del protocolo descrito por Wang, Hirayasu, Ishizawa y Kobayashi (1994). Se realizó el fraccionamiento de la sangre centrifugando a 3500 rpm por 10 minutos, y se obtuvo el pellet de leucocitos que se suspendió con 3 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM y Na₂ EDTA 2 mM, pH 8.2) 0.2 mL de dodecilsulfato sódico (SDS) a 10 % y 0.5 mL de solución proteinasa K (1 mg de proteinasa K en 1 % de SDS y Na₂EDTA 2 mM), y se dejó en digestión por 12 horas a 37 °C.

Una vez completa la digestión se agregó 1 mL de NaCl 6 M y agitó en vórtex por 15 segundos, seguido de una centrifugación a 2500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se recuperó y se le añadió 2 volúmenes de etanol absoluto, invirtiendo los tubos varias veces hasta que el ADN precipitó. El ADN precipitado se recolectó por centrifugación a 12000 rpm por 10 minutos.

Se realizaron dos lavados, antes de transferir el ADN obtenido a tubos de micro centrífuga de 2 mL. Las muestras se resuspendieron en 200 μ L de agua ultrapura y se disolvieron a temperatura ambiente, antes de ser conservadas a -20 °C (Miller, Dykes, & Polesky, 1988).

5.8. Cuantificación y cualificación de ADN

Después de la extracción se evaluó la integridad del ADN por electroforesis de ácidos nucleicos en un gel de agarosa a 1 %, en tampón TAE 1X, usando como buffer de carga 2 μ L de EZ-Vision® y 2 μ L de azul de bromofenol; la electroforesis se realizó a 90 V por 30 minutos. Adicionalmente, se calculó la concentración de ADN por espectrofotometría, en el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. 2013), usando 1 μ L de muestra), y el mismo volumen de agua ultra pura de grado molecular como blanco; el análisis se realizó con los parámetros fijados para ácidos nucleicos y las constantes apropiadas para ADN.

5.9. Análisis de muestras de interés

Todas las muestras de ADN fueron enviadas para su análisis en los laboratorios de MacroGen Korea en la ciudad de Geumcheon-gu, Seúl, en la República de Corea. Para estos análisis se seleccionaron dos pares de primers universales, uno para el exón 10 y otro para el 11

del gen *BRCA1*, su posición en el gen fue determinada por su grado de significancia, usando la herramienta BLASTn (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990), tomando como secuencia de referencia la reportada para el gen completo en en GenBank (NG_005905) tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias primer para la amplificación para el exón 10 y 11 del gen *BRCA1*.

Nombre del primer	Secuencia	Posición en el gen	
		(Código de acceso NG_005905)	Tamaño (pb)
1	BRCA1-ex10-2_m13-F (Forward)	GTAAAACGACGGC CAGTCTCACTAAAG ACAGAATG	123365 – 123577 212
	BRCA1-ex10-2_m13-R (Reverse)	GCGGATAACAATTT CACACAGGCTTTCT GAATGCTGCTAT	
2	BRCA1-ex11_t7-F (Forward)	AATACGACTCACTA TAGAATCCAGTCCT GCCAATGAG	126877 - 127155 268
	BRCA1-ex11_sp6-R (Reverse)	ACACACCACAGGA AACGTAAGATATCA CAGTGGATTTA	

5.10. Amplificación por PCR

Se realizó un proceso de optimización de la amplificación, para garantizar la calidad de los productos a analizar. De acuerdo a las especificaciones realizadas por los laboratorios de Macrogen Corea, para la amplificación por PCR se usaron concentraciones en el rango de 25~100ng de muestra por reacción. La optimización inicial del procedimiento se realizó con variaciones en las temperaturas de anillamiento entre 45 °C y 68 °C. La visualización de las bandas de los productos se realizó en gel de agarosa a 1 % en tampón TAE 1X, usando una escalera de tamaño molecular de 1 Kb.

Con base en los resultados de optimización, las reacciones finales para los dos set de primers se realizaron a una temperatura de anillamiento de 60°C en un termociclador DNA Engine Tetrad 2 Peltier (BIO-RAD), con una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos para activar la Taq polimerasa Cr. MAX DNA Polymerase (Doctor protein, cat.no.: DR00302); posteriormente se realizaron 35 ciclos de desnaturalización de 94 °C por 30 segundos, anillamiento por 30 segundos y extensión de 72 °C por un minuto. La extensión final fue de 10 minutos a 72 °C.

La purificación de los productos de amplificación se llevó a cabo usando la placa de filtración Multiscreen (Milipore Corp.) y fueron conservados a 4 °C hasta su uso.

5.11. Secuenciación de ADN

Los productos de amplificación se secuenciaron por el método Sanger, usando el kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y el secuenciador ABI PRISM 3730XL Analyzer de 96 capilares en Macrogen Corea. La secuenciación se realizó en ambos sentidos, Forward y Reverse, para poder verificar la integridad y calidad de las secuencias obtenidas.

5.12. Análisis y procesamiento de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron contrastadas con la secuencia de referencia para el gen *BRCA1* en la base de datos GenBank (código de acceso NG_005905), mediante alineamiento de secuencias con el programa ClustalX 2.1 (Larkin, et al., 2007) y fueron visualizadas en Bioedit.

6. RESULTADOS

6.1. Población de estudio

Se revisaron noventa y nueve (99) historias clínicas de pacientes diagnosticadas con carcinoma ductal invasivo, de las cuales se seleccionaron once que cumplían con los criterios de inclusión. De ellas, nueve aceptaron participar en la investigación, y aparecen registradas, en conjunto con tres controles, en la tabla 3.

Tabla 3. Pacientes, familiares y controles incluidos en el muestreo.

Código	Descripción	Diagnóstico histológico	Estadio	Antecedentes familiares	Lugar de procedencia	Edad de diagnóstico
P1C	Paciente 1	Carcinoma ductal invasivo	IIA	Hermana (cáncer de mama)	Túquerres	47
P1F	Hermana paciente 1	-	-	-	Túquerres	-
P2C	Paciente 2	Carcinoma ductal invasivo	IIB	Tía materna (Cáncer de mama)	Pasto	41
P2F	Madre paciente 2	-	-	-	Pasto	-

Código	Descripción	Diagnóstico histológico	Estadio	Antecedentes familiares	Lugar de procedencia	Edad de diagnóstico
P3C	Paciente 3	Carcinoma ductal con diferenciación apocrina	IIA	No	La Cruz	31
P3F	Hija Paciente 3	-	-	-	Pasto	-
P4C	Paciente 4 (hermana de paciente 9)	Carcinoma ductal invasivo bien diferenciado	IA	Hermana (cáncer de mama)	Sandoná	51
P5C	Paciente 5	Carcinoma ductal invasivo	IA	Tía paterna (cáncer de mama)	Pasto	39
P5F	Hija Paciente 5	-	-	-	Pasto	-
P6C	Paciente 6	Carcinoma ductal invasivo no diferenciado multicéntrico	IIB	Dos tías maternas (cáncer de mama)	Pasto	75

Código	Descripción	Diagnóstico histológico	Estadio	Antecedentes familiares	Lugar de procedencia	Edad de diagnóstico
P6F	Hija Paciente 6	-	-	-	Pasto	-
P7C	Paciente 7	Carcinoma ductal invasivo	IA	No	Pasto	34
P7F	Madre paciente 7	-	-	-	Pasto	-
P8C	Paciente 8	Carcinoma ductal invasivo	IA	Dos hermanas (cáncer de mama)	Pasto	44
P8F	Hermana paciente 8	-	-	-	Pasto	-
P9C	Paciente 9	Carcinoma ductal invasivo	IA	Hermana (cáncer de mama)	Sandoná	50
P9F	Hija paciente 9	-	-	-	Sandoná	-
C1	Mujer sin cáncer, sin antecedentes					
C2	Mujer con enfermedad asociada al seno sin especificar					
C3	Mujer sin cáncer, sin antecedentes					

6.2. Cuantificación y cualificación del ADN

Los análisis de electroforesis (Figura 1) y de la espectrofotometría (Tabla 4) indican que, aunque la calidad de las muestras no es ideal, está en el rango de 1.13 y 1.74 (promedio: 1.51), y cumple con los valores mínimos para realizar análisis posteriores. La lectura de absorbancia a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico (en valores dados en ng/μL), y evaluar el grado de pureza mediante el examen de la absorción para las longitudes de onda de 230 nm y 280 nm; La relación entre estos, que para ADN es de 1.8 para la relación 280/260 y 1 para la relación 260/230, indicará la presencia de contaminantes (Desjardins & Conklin, 2010) (Tabla 4). El análisis de electroforesis muestra que ADN obtenido presentaba una integridad adecuada, y se pudo determinar que se obtuvo entre los 93.4 ng/μL y 485.7 ng/μL (promedio 223.7 ng/μL) de concentración por la cuantificación de ácidos nucleicos, cumpliendo así con las condiciones mínimas necesarias establecidas por Macrogen para la realización de los análisis de PCR y secuenciación (concentración mínima de 50ng/μL, sin especificar condiciones de pureza) (Macrogen International Sales Team, s.f.).



Número	Código	Número	Código	Número	Código	Número	Código
1	P1C	6	P3F	11	P6F	16	P9C
2	P1F	7	P4C	12	P7C	17	P9F
3	P2C	8	P5C	13	P7F	18	C1
4	P2F	9	P5F	14	P8C	19	C2
5	P3C	10	P6C	15	P8F	20	C3

Figura 1. Resultados de electroforesis. Las siglas indicadas refieren a los códigos dados para cada paciente. Fuente: esta investigación

Tabla 4. Resultados de espectrofotometría, dados en (ng/ μ L).

Código	Ácido nucleico (ng/ μ L)	A260 (Abs*)	A280 (Abs)	260/280	260/230
P1C	110.2	2.204	1.612	1.37	0.88
P1F	163.8	3.276	1.879	1.74	1.25
P2C	227.8	4.557	3.150	1.45	0.77
P2F	440.2	8.804	6.037	1.46	0.66
P3C	277.4	5.549	3.480	1.59	0.88
P3F	136.6	2.732	1.764	1.55	0.63
P4C	301.2	6.024	4.052	1.49	0.77
P5C	188.5	3.770	2.648	1.42	0.67
Código	Ácido nucleico	A260 (Abs*)	A280 (Abs)	260/280	260/230

	(ng/ μ L)				
P5F	117.0	2.340	1.449	1.62	0.98
P6C	93.4	1.868	1.659	1.13	0.38
P6F	194.4	3.889	2.575	1.51	0.64
P7C	242.5	4.850	2.881	1.68	1.30
P7F	210.2	4.204	2.468	1.70	1.47
P8C	171.1	3.422	2.377	1.44	0.69
P8F	300.9	6.018	4.680	1.29	0.57
P9C	485.7	9.715	6.704	1.45	0.43
P9F	127.4	2.548	1.692	1.51	0.81
C1	187.1	3.742	2.454	1.53	0.65
C2	379.3	7.587	4.674	1.62	0.57
C3	118.6	2.372	1.608	1.47	0.63

Las siglas indicadas refieren a los códigos dados para cada paciente.

*Abs: Absorción

6.3. Amplificación por PCR

El gradiente en las temperaturas usado para la optimización de la PCR, y los resultados de la optimización en los geles de agarosa se muestran en la figura 2. Se tomaron las bandas con mayor integridad para determinar la temperatura de anillamiento a la que se debían realizar los demás procedimientos.

La temperatura de anillamiento más adecuada para el set de primers del exón 11 fue de 58°C y para los del exón 10 fue de 61,5°C, la distribución de los pozos se muestra en la tabla 5; los resultados de la electroforesis se muestran en la figura. 3.

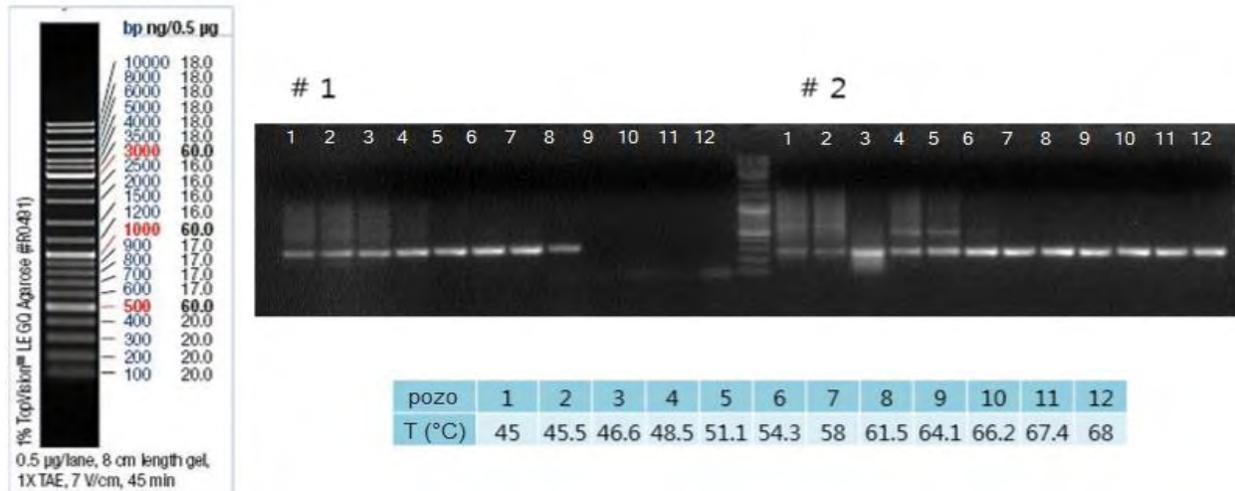


Figura 2. Resultados de electroforesis de los productos amplificados para la optimización de PCR. “#1” hace referencia al set de primers BRCA1-ex11_t7-F y BRCA1-ex11_sp6-R, “#2” refiere al set de primers BRCA1-ex10-2_m13-F y BRCA1-ex10-2_m13-R. Fuente: esta investigación

Con base en estos resultados Macrogen estableció 60°C como temperatura optima de anillamiento para ambos sets tomados como base del promedio de las temperaturas optimas determinadas para cada uno de los sets de primers de amplificación. La distribución de la amplificación de las muestras de la población de estudio en los pozos del análisis de electroforesis se presentan la tabla 5 y se visualizan en las imágenes de la electroforesis de la figura 3.

Tabla 5. Distribución de las muestras en los pozos de electroforesis de los productos amplificados de la PCR. La terminación “A” hace referencia al set de primers BRCA1-ex11_t7-F y BRCA1-ex11_sp6-R, la terminación “B” refiere al set de primers BRCA1-ex10-2_m13-F y BRCA1-ex10-2_m13-R.

Muestra	Pozo							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	P1CA	P1FA	P2CA	P2FA	P3CA	P3FA	P4CA	P5CA
2	P5FA	P6CA	P6FA	P7CA	P7FA	P8CA	P8FA	P9CA
3	P9FA	C1A	C2A	C3A	P1CB	P1FB	P2CB	P2FB
4	P3CB	P8CB	P4CB	P5CB	P5FB	P6CB	P6FB	P7CB
5	P7FB	P8CB	P8FB	P9CB	P9FB	C1B	C2B	C3B

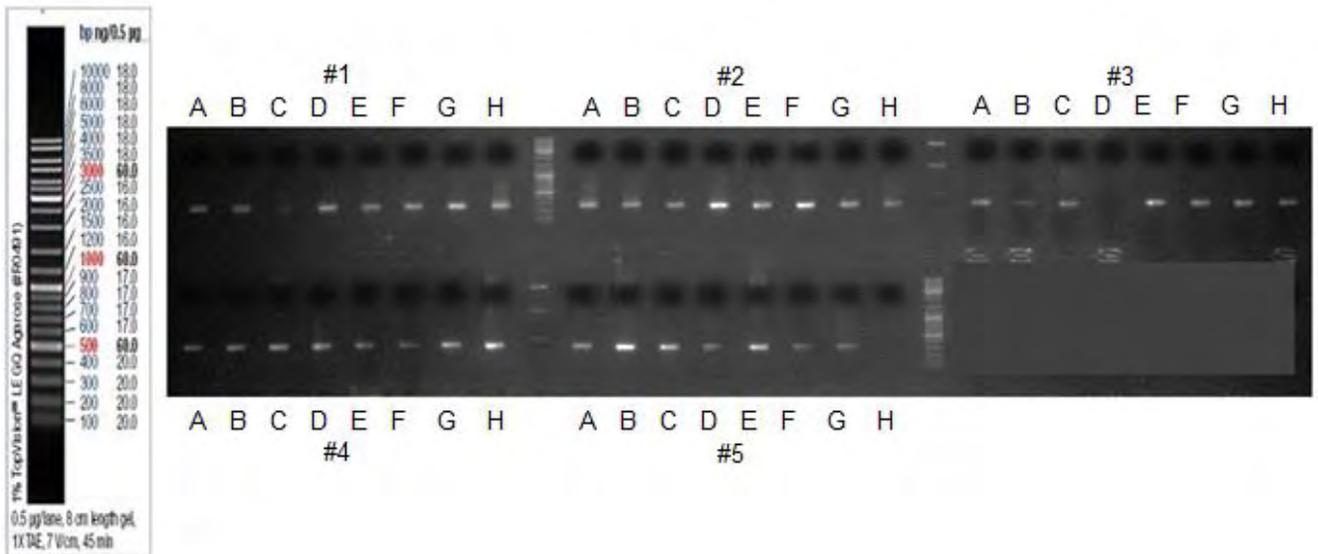


Figura 3. Resultados de electroforesis para los productos amplificados de la PCR acorde con los parámetros mencionados en la tabla 5. Fuente: esta investigación

6.4. Análisis y procesamiento de secuencias

Los cromatogramas recibidos de los análisis realizados en los laboratorios de Macrogen Corea, fueron dados en formato *ABI* (*.abi, *.ab1) (anexo 4), revisados y editados con la función *Edit/View Sequencer Files (Trace)* del programa MEGA 7.0.18 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016); una vez editadas y corregidas, se guardaron en formato *fasta* (*.fas, *.fa, *.seq, *.fsa)

La secuencia del gen *BRCA1* usada para el análisis fue obtenida mediante el alineamiento de la secuencia reportada como de referencia en GenBank (código de acceso NG_005905, actualizada el 12 de julio de 2017). Las secuencias Forward para ambos exones se alinearon con la secuencia del gen *BRCA1* completo, usando el programa ClustalW (Larkin, et al., 2007), y visualizados en BioEdit (Hall T. A., 1999).

Se comprobó si las secuencias Forward y Reverse para ambos fragmentos eran complementarios mediante el alineamiento de las dos secuencias generadas para cada par de primers (figura 4), con ello se verificó la calidad de la secuenciación.

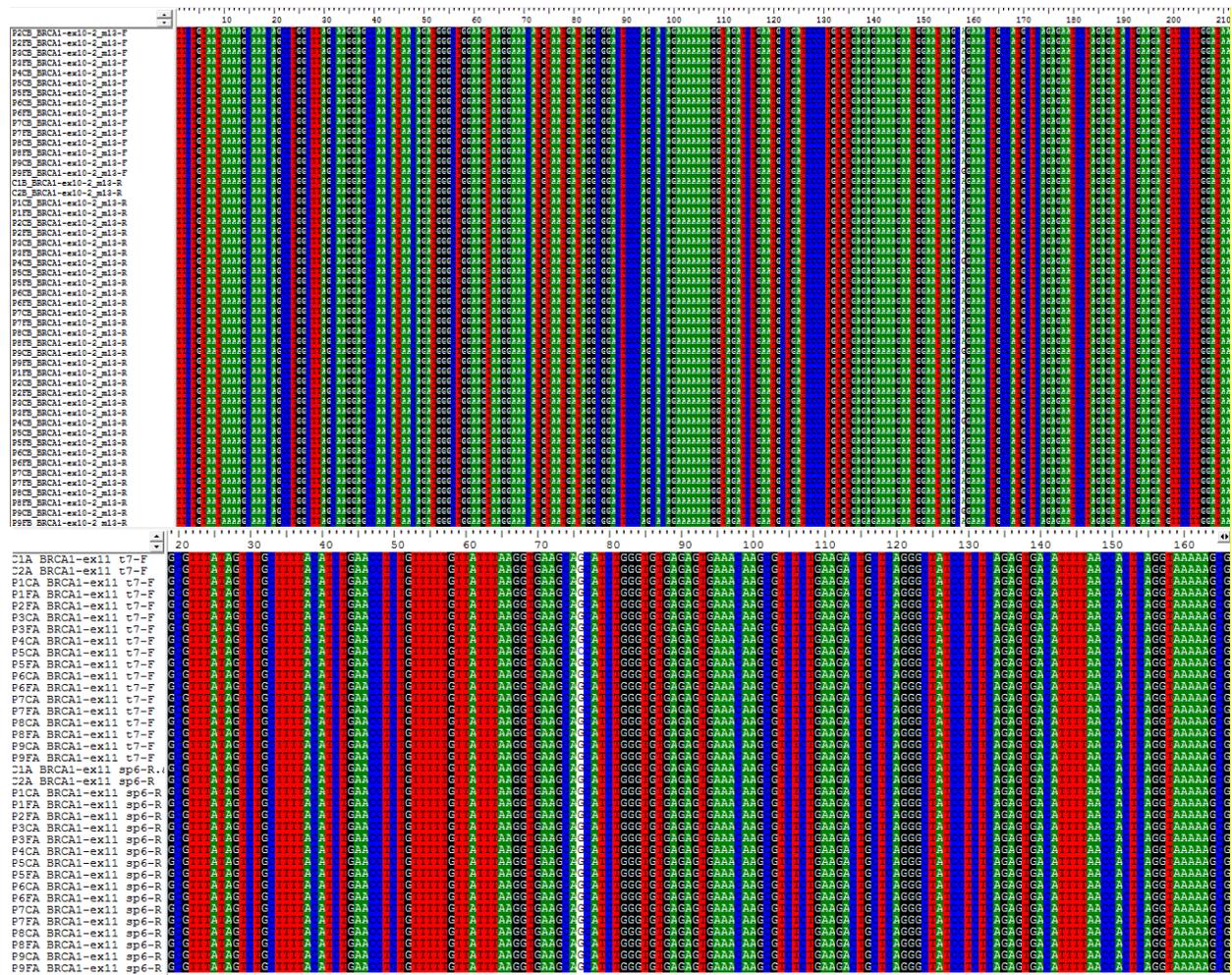


Figura 4. Alineamiento de la secuencia Forward y la secuencia complementaria Reverse para los amplificadores de los exones 10 (superior) y 11 (inferior). Fuente: esta investigación

6.4.1. Análisis de secuencias amplificadas del exón 10

Para el exón 10 (Figura 5), se encontró una variación común a la muestra P4C (Paciente 4 con cáncer) y P9C (Paciente 9 con cáncer), ubicada en la posición 1186, que corresponde al cambio de nucleótido de Adenina (A) a Guanina (G) (figura 6). La mutación, 1186A>G, aparece

previamente reportada por Friedman et al (1994) y Ladopoulou et al (2002), y tiene 29 reportes en el BIC, como una mutación con cambio de sentido, que causa un polimorfismo neutro, con una variación de glutamina (Gln) por arginina (Arg) en el codón 356.

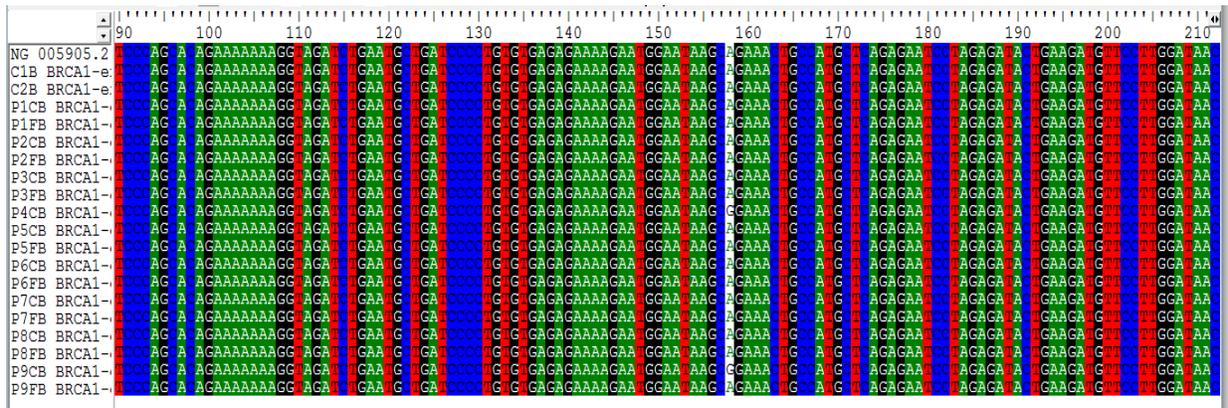


Figura 5. Alineamiento de las secuencias Forward resultado para el exón 10. Fuente:

esta

investigación.

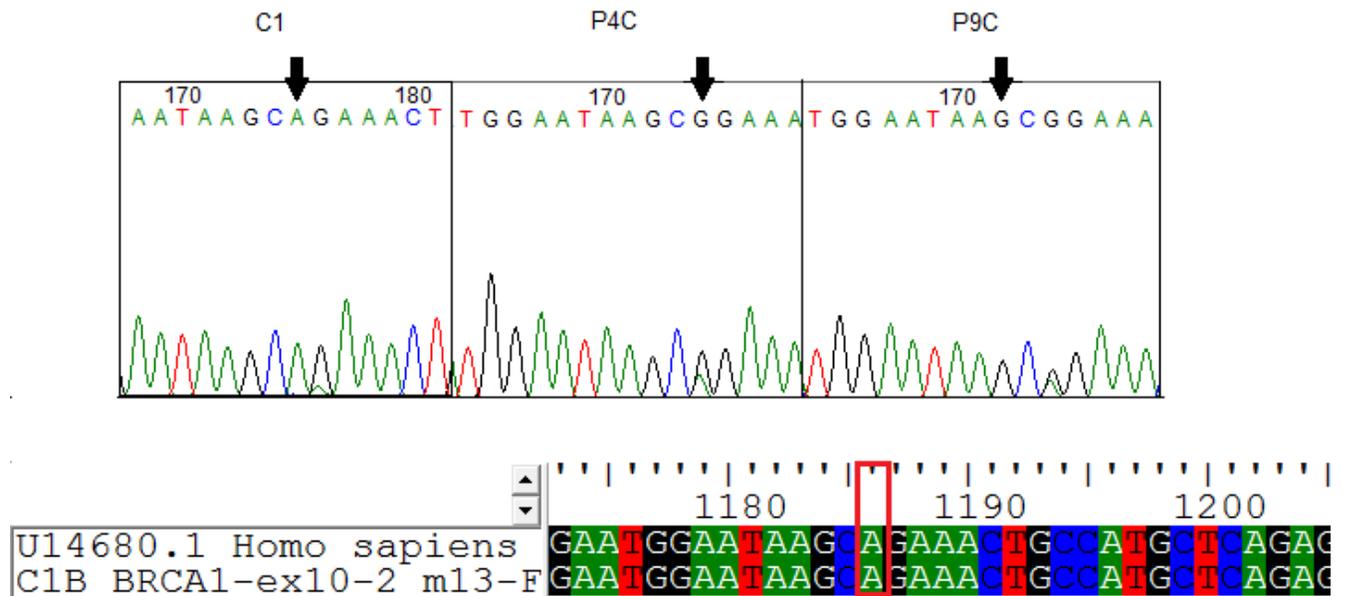


Figura 6. Variaciones encontradas en las secuencias de las muestras P4C y P9C para el exón 10. C1 es la secuencia control que no presenta variaciones frente a la secuencia original (Abajo, alineamiento de C1 con la secuencia reportada). Fuente: esta investigación

6.4.2. Análisis de secuencias amplificadas del exón 11

Para el exón 11 (Figura 7) se encontró una mutación en la muestra P5C (paciente 5 con cáncer) en la posición 4224, correspondiente al cambio de nucleótido G (guanina) por C (citosina) (Figura 8), y lleva al cambio del nucleótido Glutamina (Gln) por Histidina (His) en el codón 1408 (figura 9). Esta mutación, 4224G>C, no aparece reportada en la base de datos ni en la literatura consultada. Es interesante también mencionar el caso de la P2C (paciente 2 con cáncer) en la que la muestra no se secuenció el exón.

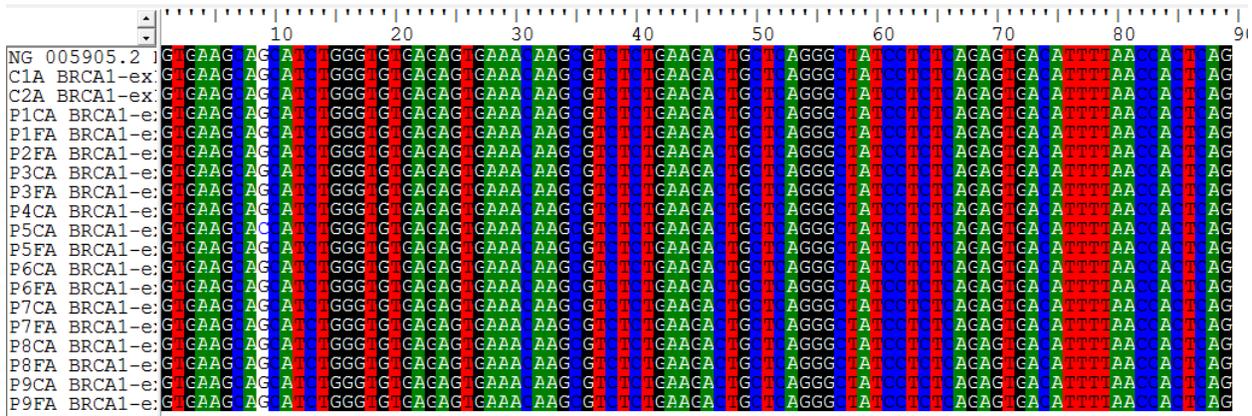


Figura 7. Alineamiento de las secuencias Forward resultado para el exón 11. Fuente: esta investigación

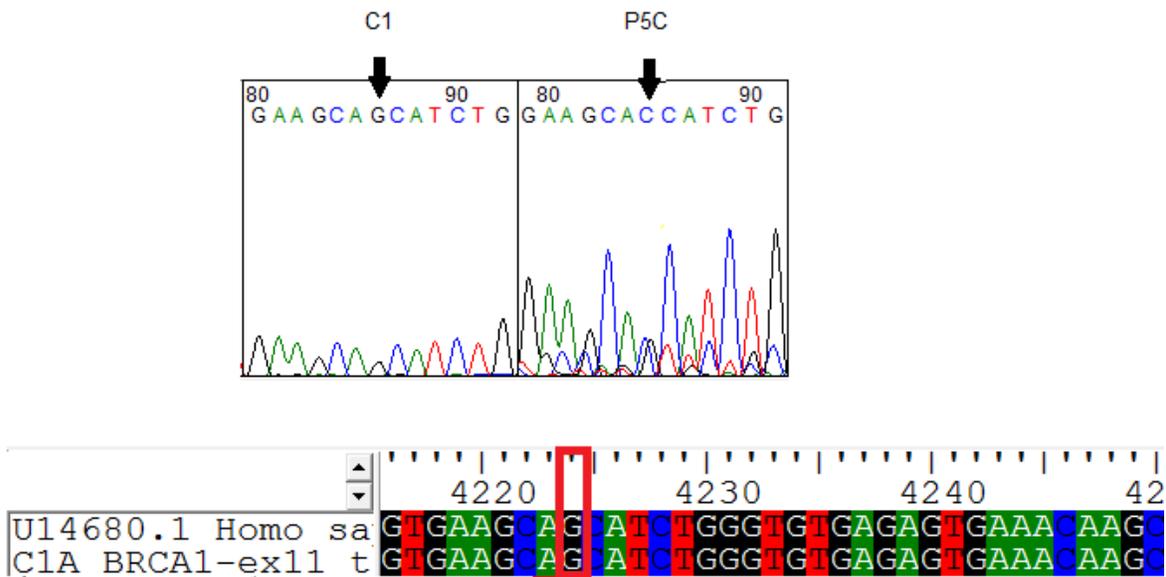


Figura 8. Variación encontrada en la secuencia de la muestra P5C para el exón 11. C1 es la secuencia control que no presenta variaciones frente a la secuencia original (Abajo, alineamiento de C1 con la secuencia reportada). Fuente: esta investigación

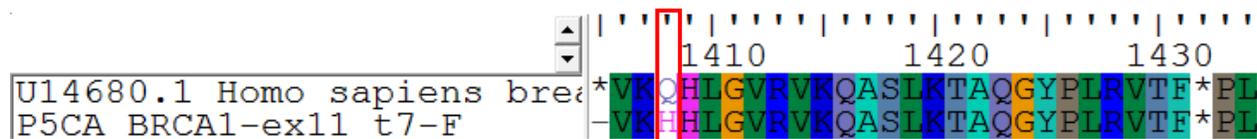


Figura 9. Secuencia peptídica de la mutación encontrada en la muestra P5C para el exón 11. Fuente: esta investigación

Según la traducción a proteínas realizado *in silico*, usando el programa BioEdit (Hall T. A., 1999) para ambos fragmentos amplificados, se observó que ninguna de las dos mutaciones descritas resultaron en el cambio del marco de lectura del gen *BRCA1*, por esto, se debe realizar un análisis específico para la determinación de la presencia de mutaciones genéticas biológicamente relevantes, como el Test de Proteína Truncada, que ayuda a determinar

variaciones que conllevan a la prematura terminación de la síntesis proteica (Hogervorst, et al., 1995).

Por el tamaño muestral, no se puede determinar frecuencia, ni la penetrancia de las mutaciones en la población.

7. DISCUSIÓN

Las muestras presentaron valores para la relación 280/260, varían entre 1.13 y 1.74, que están por debajo de los valores considerados como ideales en la cuantificación de ácidos nucleicos, sin embargo, la cualificación por electroforesis y cuantificación por espectrofotometría indicaron que las muestras tenían una integridad adecuada y la concentración requerida por los laboratorios de Macrogen Corea para el análisis (Macrogen International Sales Team, s.f.), (Figura 3); la determinación de la calidad de las muestras por geles de agarosa puede estar afectada por las condiciones de corrida, los reactivos usados, los métodos de extracción de ADN, la presencia de sales o etanoles (Lee, McCord, & Bruel, 2014), hechos que probablemente explican los resultados observados en la figura 1. Sin embargo, en la figura 3 se puede apreciar una alta especificidad y definición de las bandas obtenidas en la electroforesis de los productos amplificados y en el anexo 4 muy pocas variaciones en las amplitudes de las curvas de cada nucleótido, la poca cantidad de ruidos que indiquen contaminación por ARN y proteínas, e identidades claras para cada una de las secuencias en los cromatogramas; esto evidencia que las muestras obtenidas poseían una calidad adecuada para la realización de la secuenciación (Center for Gene Research & Biotechnology, 2005; COMAV Institute, s.f.). La presencia de algunos residuos de sales o etanoles son propios del proceso de extracción de ADN pueden provocar en un cambio de pH que explicaría el origen de los bajos valores en la cuantificación (Desjardins & Conklin, 2010).

En este estudio se describieron las mutaciones encontradas en un grupo de 9 pacientes con cáncer de seno familiar del municipio de Pasto, Nariño, y 8 familiares (dos de las pacientes están relacionadas en primer grado de consanguinidad, y se tomaron como un solo grupo

familiar) en primer grado de consanguinidad, además de dos controles. Si bien ya se han realizado estudios anteriores en Colombia referentes al gen *BRCA1* (Torres, et al., 2007; Torres, et al., 2009; Ortiz, et al., 2012), éste es, para nuestro conocimiento, el primero realizado para la zona andina del departamento de Nariño.

El exón 10 es el de mayor tamaño en el gen *BRCA1*, y uno de los más grandes en todo el genoma humano; comprende 3426 pares de bases, y, por esto, y por el efecto que se cree posee en localización de mRNA y propiedades proteicas pro-oncogénicas, es en éste exón en el que se enfocan la mayoría de estudios que describen mutaciones que afecten el desarrollo temprano del cáncer de mama, los cuales, generalmente, son pequeños cambios nulos que inactivan el gen (Rohlf, et al., 2000; Lalloo & Evans, 2012; Raponi, et al., 2014).

El exón 11, de 115 pares de bases, está ubicado en la posición 126877-127155 del gen (en la secuencia con código de acceso en GenBank NG_005905) y se considera también como de importancia, pues al igual que en exón 10, posee dominios de unión a proteína y está asociado a un alto número de vías celulares, (Clark, Rodríguez, Snyder, Hankins, & Boehning, 2012; Raponi, et al., 2014). En este estudio, el exón 11 completo fue amplificado y analizado, pero no se encontró ninguna de las mutaciones reportadas en la base de datos BIC (Breast Cancer Information Core, 2012).

Se encontraron dos mutaciones: 1186A>G (ubicada en el exón 10) y 4224G>C (ubicada en el exón 11) (Figuras 5 y 7 respectivamente); de éstas, sólo 1186A>G, ha sido reportada con anterioridad en una población griega y se describió que no presenta una importancia biológica determinada (Friedman, et al., 1994; Ladoupulou, et al., 2002), éste es el primer reporte de esta variante en un país latino y al obtener la secuencia aminoacídica *in silico* se corrobora que se no genera variación en la cadena polipeptídica coincidiendo con los reportes previos. Esta variante

se presentó en la misma familia, en dos hermanas diagnosticadas con cáncer de seno a los 50 y 51 años, por ello sería interesante realizar un análisis más profundo en la genealogía familiar de estas dos pacientes.

La segunda mutación, 4224G>C, se presentó en una mujer (P5C) diagnosticada de cáncer de mama a los 39 años, con una tía paterna que también fue diagnosticada con la misma enfermedad; si bien no hay un cambio en el aminoácido resultante en el codón 1408, que se mantiene como Glutamina (Gln; Q), no se conoce su verdadera importancia clínica, pues, aunque el marco de lectura de la síntesis de proteínas no fue afectado, es necesario realizar un análisis que indique la relevancia biológica de la misma.

Cabe resaltar los casos de la paciente 2 (P2C) y del control 3 (C3), en cuyas muestras no fue posible obtener la amplificación del exón 11, para el primer caso, ni de ninguno de los dos exones, para el segundo. Esto pudo ser ocasionado por las condiciones de PCR que se utilizaron, en las que se estandarizó la temperatura de anillamiento para todas las muestras a 60°C; en muestras con menor concentración y pureza la amplificación posiblemente no se dio de manera correcta, y las cantidades obtenidas no fueron las adecuadas para una secuenciación que brindara resultados observables.

Este es un estudio preliminar, cuyo objetivo principal era la descripción de mutaciones propias de pacientes del departamento de Nariño. Las mutaciones 3450delCAAG y 3034delACAA, reportadas como fundadoras y propias de poblaciones colombianas en estudios anteriores se encuentran en posiciones del gen diferentes a las analizadas en este estudio (Torres, et al., 2007; Torres, et al., 2009; Ortiz, et al., 2012). En el estudio de Torres et al. (2007) los exones 10 y 11 fueron secuenciados en su totalidad para su análisis, pero no se observaron mutaciones similares a las encontradas en el presente estudio. De manera similar, ninguna de las

mutaciones encontradas en este análisis coincide con otras reportadas para Colombia o Latinoamérica (Ossa & Torres, 2016).

El hecho que en esta investigación, con un número limitado de casos, se hayan encontrado mutaciones diferentes a las ya descritas para el país, e incluso, una mutación sin previo registro, resalta la necesidad incrementar estudios con población del departamento de Nariño ya que como se mencionó previamente, el mestizaje regional es diferente al del resto del país presentando un gran aporte genético indígena (entre 43-52%) mientras en otras regiones se observan mayores aportes de genotipo caucásico y africano (Sanabria, Muñoz, & Vargas, 2009).

La eficiencia de un análisis epidemiológico está determinada por la cantidad de pacientes y la calidad de los datos obtenidos (WHO 2011), debido al tamaño reducido de la muestra no se pudo determinar frecuencia, ni la penetrancia de las mutaciones en la población, aunque se pudo observar una incidencia poblacional de 2/9 pacientes para la mutación 1186A>G y de 1/9 pacientes para la mutación 4224A>G coincidiendo con los valores de porcentajes de incidencia de mutaciones reportados para el gen que están en un rango del 15 al 20% (Venkitamaran, 2002; Venkitamaran, 2009; Narod & Rodríguez, 2011; Preventive Services Task Force Recommendation, 2013; Harris, Lippman, Morrow, & Osborn, 2014). Por ello es necesario continuar con este tipo de estudios incrementado el número de participantes para obtener resultados que podrían contribuir al desarrollo de pruebas específicas que faciliten la detección de mutaciones en individuos que se califican como de riesgo dentro de la población nariñense, y de esa manera contribuir al conocimiento en mutaciones del gen *BRCA1* en poblaciones latinoamericanas.

CONCLUSIONES

1. A pesar del reducido tamaño de muestra es importante resaltar que se encontraron dos mutaciones nuevas para los exones 10 y 11 del gen BRCA1, que no habían sido reportadas para Colombia ni Latinoamérica, La mutación del exón 10 había sido reportada previamente para poblaciones griegas y la mutación para el exón 11 no había sido reportada previamente.
2. La incidencia poblacional es de 2/9 pacientes para la mutación 1186A>G y de 1/9 pacientes para la mutación 4224A>G, coincidiendo con los valores de porcentajes de incidencia reportados en estudios previos (15-20%) para este gen.
3. Debido al gran aporte indígena en poblaciones nariñenses, el mestizaje regional es diferente al del resto del país; por ello es necesario continuar profundizando en este tipo de estudios que permitan conocer las mutaciones más frecuentes propias de la población del sur-occidente colombiano.

RECOMENDACIONES

Los hallazgos indicativos de este estudio hacen evidente la necesidad de la ampliación de la muestra y de los análisis que describan las mutaciones asociadas a una población particular; no sólo para aumentar el conocimiento existente respecto a variaciones en los genes dentro de las poblaciones latinas, sino porque la determinación de mutaciones fundadoras comunes a la región, su frecuencia y prevalencia, permitiría centrar el análisis en éstas, reduciendo los costos y aumentando la accesibilidad de los exámenes genéticos para más pacientes y sus familias.

LITERATURA CITADA

- Allred, C. (2010). Ductal Carcinoma In Situ: Terminology, Classification, and Natural History. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 41, pp.134-138.
- Althuis, M., Fergenbaum, J., García-Closas, M., Brinton , L., Madigan, P., & Sherman, M. (2004). Etiology of Hormone Receptor–Defined Breast Cancer: A Systematic Review of the Literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(10), pp. 1558-1568.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol*, 15(3), Pp.: 403-410.
- American Joint Committee on Cancer. (2014). *Breast Cancer Staging: 7th edition*. Recuperado el 4 de Abril de 2016, de AJCC - American Joint Committee on Cancer: <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/Documents/BreastMedium.pdf>
- Andriolo, A., Lacerda, A., Venancio, I., Mendes , M., Massakazu, N., Romano, P., . . . Moraes, U. (2010). *Recomendaciones de la Sociedad Brasileña de Patología Clínica/Medicina Laboratorial para la extracción de sangre venosa*. Barueri, Brasil: Editorial Manole Ltda.
- Anton-Culver, H., Cohen, P., Gildea, M., & Ziogas, A. (2000). Characteristics of BRCA1 mutations in a population-based case series of breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer*, 36, pp. 1200-1208.
- Asociación Médica Mundial. (19 de Octubre de 2013). *Declaración de Helsinki de la AMM - Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos*. Recuperado el 17 de Junio de 2017, de Asociación Médica Mundial: <https://www.wma.net/es/policies->

post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-
medicas-en-seres-humanos/

- Badve, S., Dabbs, D., Schnitt, S., Baehner, F., Decker, T., Eusebi, V., . . . Reis-Filho, J. (2011). Review: Basal-like and triplenegative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*, 24, pp. 157-167.
- Bradley, C., Given, C., & Roberts, C. (2002). Race, Socioeconomic Status and Breast Cancer Treatment and Survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 94(7), pp. 490-496.
- Breast Cancer Information Core. (2012, Noviembre 6). *BRCA1 Mutation Database*. Retrieved Agosto 10, 2016, from National Human Genome Research Institute: https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/brca1_mutation_database.shtml
- Breastcancer.org. (2015). *Stages of Breast Cancer*. Recuperado el 22 de Diciembre de 2015, de <http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/staging>
- Center for Gene Research & Biotechnology. (20 de Julio de 2005). *Center for Gene Research & Biotechnology*. Recuperado el 10 de Julio de 2017, de DNA Sequencing Troubleshooting: <https://corefac.imcb.a-star.edu.sg/imcbdsf/protocols/Troubleshooting/CGRBcsllabtroubleshoot.pdf>
- Centro de Estudios en Salud Universidad de Nariño. (2017). Tasas de Incidencia de Cáncer de Mama período 2008-20012. *Registro Poblacional del Municipio de Pasto*. Pasto, Colombia: Udenar. Recuperado el 23 de Agosto de 2017
- Clark, S., Rodríguez, A., Snyder, R., Hankins, G., & Boehning, D. (2012). Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J*, 1(1), pp. 1-8. doi:e201204005

- COMAV Institute. (s.f.). *Secuenciación de Sanger*. Recuperado el 5 de Agosto de 2017, de Bioinformatics at COMAV: https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/sanger.html
- Couch, F. J., & Weber, B. L. (1996). Mutations and Polymorphisms in the Familial Early-Onset Breast Cancer (BRCA1) Gene. *Hum Mutat*, 8(1), Pp: 8-18.
- Deschka, M. (2010). *La extracción de sangre en la práctica: Guía para extractores de sangre*. Valldoriolf, Barcelona, España: Editorial Sarstedt.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J. Vis. Exp.*(45). doi:10.3791/2565
- Dumitrescu, R., & Cotarla, I. (2005). Understanding Breast Cancer Risk - Where do we stand in 2005? *J. Cell. Mol. Med*, 9(1), pp. 208-221.
- Dutil, J., Golubeva, V., Pacheco-Torres, A., Diaz-Zabala, H., Matta, J., & Monteiro, A. (2015). The spectrum of BRCA1 and BRCA2 alleles in Latin America and the Caribbean: a clinical perspective. *Breast Cancer Res Treat*, 154, pp. 441-453.
- Easton, D. F., Bishop, D. T., Ford, G. P., Crockford, G. P., & Breast Cancer Linkage Consortium. (1993). Genetic Linkage Analysis in Familial Breast and Ovarian Cancer: Results from 214 Families. *Am. J. Hum. Genet*, 52, pp. 678-701.
- Edge, S., & Compton, C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17, pp. 1471-1474.
- Fleming, M., Potter, J., Ramirez, C., Ostrander, G., & Ostrander, E. (2003). Understanding missense mutations in the BRCA1 gene: An evolutionary approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, pp. 1151-1156.

- Friedman, L. S., Ostermeyer, E. A., Szabo, C. I., Dowd, P., Lynch, E. D., Rowell, S. E., & King, M.-C. (1994). Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nature Genet*, 8, Pp.: 399-404.
- Gilmore, B. L., Liang, Y., Winton, C. E., Patel, K., Karageorge, V., Varano, A. C., . . . Kelly, D. F. (2017). Molecular Analysis of BRCA1 in Human Breast Cancer Cells Under Oxidative Stress. *Scientific Reports*, 7(43435). doi:10.1038/srep43435
- Globocan. (2012). *Fact sheets by Cancer*. Retrieved Diciembre 24, 2015, from Globocan: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- Gorodetska, I., Serga, S., Levkovich, N., Lahuta, T., Ostapchenko, L., Demydoy, S., . . . Kozeretska, I. (2015). The frequency of BRCA1 founder mutation c.5266dupC (5382insC) in breast cancer patients from Ukraine. *Hereditary Cancer Clin Pract*, 13(19). doi:10.1186/s13053-015-0040-3
- Grushko, T., Blackwood, A., Schumm, P., Hagos, F., Adeyanju, M., Feldman, M., . . . Olopade, O. (2002). Molecular-Cytogenetic Analysis of HER-2/neu Gene in BCRA1-associated Breast Cancers. *Cancer Res*, 62, pp. 1481-1488.
- Hall, J., Lee, M., Newman, B., Morrow, J., Anderson, L., Huey, B., & King, M. (1990). Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science*, 250, pp. 1684-1689.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*(41), Pp.: 95-98.
- Harris, J., Lippman, E., Morrow, M., & Osborn, K. (2014). *Diseases of the breast*. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health.

- Hassiotou, F., & Geddes, D. (2012). Anatomy of the Human Mammary Gland: Current Status of Knowledge. *Clinical Anatomy*. 0:1-20. *Clin. Anat*, 26, pp. 29-48. doi:10.1002/ca.22165
- Hernández, J., Llacuanchaqui, M., Palacio, G., Figueroa, J., Marid, J., Lema, M., . . . Narod, S. (2014). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from Medellín, Colombia. *Hereditary Cancer Clin Pract*, 12(1). doi:10.1186/1897-4287-12-11
- Hernández-Ávila, M., Garrido-Latorre, F., & López-Moreno, S. (2000). Diseño de estudios epidemiológicos. *Salud Publica Mex*, 42(5), pp. 438-446.
- Hogervorst, F. B., Cornelis, R. S., Bout, M., van Vliet, M., Oosterwijk, J. C., Olmer, R., . . . van Ommen, G.-J. B. (1995). Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nature Genet*, 10, Pp: 208-212.
- Kelsey, J. (1979). A review of the epidemiology of human breast cancer. *Epidemiol Rev*, 1, pp. 74-109.
- Kobayashi, H., Ohno, S., Sasaki, Y., & Matsuura, M. (2013). Hereditary Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Genes (Review). *Oncol Rep*, 30, pp. 1019-1029.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 7(33), Pp.: 1870–1874.
- Ladoupulou, A., Kroupis, C., Konstantopoulou, I., Ioannidou-Mouzaka, L., Schofield, A. C., Pantazidis, A., . . . Yannoukakos, D. (2002). Germ line BRCA1 & BRCA2 mutations in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed. *Cancer Lett*, 185, Pp.: 61-70.
- Laloo, F., & Evans, D. (2012). Familial Breast Cancer. *Clinical Genetics*, 82(2), Pp.: 105-114.

- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., . . . Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*, pp. 2947-2948.
- Lee, S. B., McCord, B., & Bruel, E. (2014). Advances in Forensic DNA Quantification: A Review. *Electrophoresis*, *35*(21-22), Pp.: 3044-3052.
- Lou, D., McBee, R., Le, U., Stone, A., Wilkerson, G., Demogines, A., & Sawyer, S. (2014). Rapid evolution of BRCA1 and BRCA2 in humans and other primates. *BMC Evol Biol*, *14*, 155. doi:10.1186/1471-2148-14-155
- Macéa, J., & Tavares, J. (2006). Anatomy of the Thoracic Wall, Axilla and Breast | Anatomía de la Pared Torácica, Axila y Mama. *Int. J. Morphol*, *24*(4), pp. 691-704.
- Macrogen International Sales Team. (s.f.). *Order Guideline*. Recuperado el 5 de Agosto de 2017, de Macrogen Online Sequencing Order System: https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/order_guide.jsp
- McPherson, K., Steel, C., & Dixon, J. (2000). ABC of Breast Diseases: Breast Cancer - Epidemiology, Risk Factors and Genetics. *Br Med J*, *321*, pp. 624-628.
- Miao, H., Verkooijen, H., Chia, K., Bouchardy, C., Pukkala, E., Larønningen, S., . . . Hartman, M. (2011). Incidence and Outcome of Male Cancer: An International Population-Based Study. *J Clin Oncol*, *29*(33), pp. 4381-4386.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, A., Harshman, K., Tavtigian, S., . . . Skolnick, M. (1994). A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science*, *266*, pp. 66-71.
- Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, *16*(3), p. 1215.

- Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16(3), P.: 1215.
doi:10.1093/nar/16.3.1215
- Ministerio de Salud de Colombia. (23 de Enero de 2013). *Resolución No. 8430 del 4 de octubre 1993*. Recuperado el 17 de Junio de 2017, de INVIMA:
https://www.invima.gov.co/images/pdf/medicamentos/resoluciones/etica_res_8430_1993.pdf
- Narod, S., & Rodríguez, A. (2011). Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. *Salud Publica Mex*, 53(5), pp. 420-429.
- National Cancer Institute. (2001). *SEER Summary Staging Manual-200: Codes and Coding Instructions*. (J. Young, S. Roffers, L. Gloeckler, A. Fritz, & A. Hurlbut, Eds.) Bethesda, USA: NIH Pub.
- Neuhausen, S., Gilewski, T., Norton, L., Tran, T., McGuire, P., Swensen, J., . . . Offit, K. (1996). Recurrent BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer. *Nature Genet*, 13, pp. 126-128.
- Neuhausen, S., Mazoyer, S., Friedman, L., Stratton, M., Offit, K., Caligo, A., . . . Golgar, D. (1996). . Haplotype and Phenotype Analysis of Six Recurrent BRCA1 Mutations in 61 Families: Results of an International Study. *Am J Hum Genet*, 58, pp. 271-280.
- Ortiz, A., Llacuanchaqui, M., Guevara, G., Royer, R., Larson, G., Weitzel, J., & Narod, S. (2012). BRCA1 and BRCA2 Mutations Among Ovarian Cancer Patients From Colombia. *Gynecol Oncol*, 124, pp. 236-243.

- Ossa, C. A., & Torres, D. (2016). Founder and Recurrent Mutations in BRCA1 an BRCA2 Genes in Latin American Countries: State of the Art and Literature Review. *Oncologist*, 21, Pp.: 1-8.
- Preventive Services Task Force Recommendation. (2013). *Risk Assesment, Genetic Counseling, and Genetic Testing for BRCA-Related Cancer: Systematic Review to Update the U.S.* (H. Nelson, R. Fu, K. Goddard, J. Mitchell, L. Okinaka-Hu, M. Pappas, & B. Zakher, Eds.) Rockville, USA: Agency for Healrthcare Research and Quality.
- Raponi, M., Smith, L., Silipo, M., Stuani, C., Buratti, E., & Baralle, D. (2014). BRCA1 exon 11 a model of long exon splicing regulation. *RNA Biology*, 11(4), pp. 1-9.
- Rohlfs, E. M., Puget, N., Graham, M. L., Weber, B. L., Garber, J. E., Skrzynia, C., . . . Mazoyer, S. (2000). An Alu-Mediated 7.1 kb Deletion of BRCA1 Exons 8 and 9 in Breast and Ovarian Cancer Families That Results in Alternative Splicing of Exon 10. *Genes Chromosomes and Cancer*, 28(3), Pp.: 300-307.
- Rondón, F., Osorio, J., Peña, A., Garcés, H., & Barreto, G. (2008). Diversidad genética en poblaciones humanas de dos regiones colombianas. *Colomb Med*, 39, pp. 52-60.
- Roy, R., Chun, J., & Powell, S. (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature*, 12, pp.. 68-78.
- Sanabria, M., Muñoz, G., & Vargas, C. (2009). Análisis de las mutaciones más frecuentes del gen BRCA1 en mujeres con cáncer de mama en Bucaramanga. *Biomedica*, 29, pp. 61-72.
- Sandoval, C., de la Hoz, A., & Yunis, E. (1993). Estructura Genética de la Población Colombiana. *Rev. Fac. Med*, 41, pp. 3-14.
- Schreer, I., & Lüttges, J. (2005). Precursor Lesions of Invasive Breast Cancer. *Eur J Radiol*, 54, pp. 62-71.

- Slavin, T., Niell-Swiler, M., Solomon, I., Nehoray, B., Rybak, C., Blazer, K., & Weitzel, J. (2012). Clinical application of multigene panels: challenges of next-generation counseling and cancer risk management. *Front Oncol*, *5*. doi:10.3389/fonc.2015.00208
- Struewing, J., Abeliovich, D., Peretz, T., Avishai, N., Kaback, M., Collins, F., & Brody, L. (1995). The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nature Gen*, *11*, pp. 198-200.
- Sun, C., Li, N., Ding, D., Weng, D., Meng, L., Chen, G., & Ma, D. (2014). The Role of BRCA Status in the Prognosis of Patients with Epithelial Ovarian Cancer: A Systematic Review of the Literature with a Meta-Analysis. *PLoS ONE*, *9*(5). doi:10.1371/journal.pone.0095285
- Torres, D., Umaña, A., Robledo, J., Caicedo, J., Quintero, E., Orozco, E., . . . Briceño, I. (2009). Estudio de Factores Genéticos para Cáncer de Mama en Colombia. *Univ Med Bogota*, *50*(3), pp. 297-301.
- Torres, D., Usman, M., Gil, F., Umaña, A., Ramelli, G., Robledo, J., . . . Hamman, U. (2007). High Proportion of BRCA1/2 Founder Mutations in Hispanic Breast/Ovarian Cancer Families from Colombia. *Breast Cancer Res Treat*, *103*, pp.225-232. doi:10.1007/s10549-006-9370-1
- Venkitamaran, A. (2002). Cancer Susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, *108*, pp. 171-182.
- Venkitamaran, A. (2009). Linking the Cellular Functions of BRCA Genes to Cancer Pathogenesis and Treatment. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, *4*, pp. 461-487.

- Wang, L., Hirayasu, K., Ishizawa, M., & Kobayashi, Y. (1994). Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acid Res*, 22(9), Pp.: 1774-1775.
- Weigelt, B., Geyer, F., & Reis-Filho, J. (2010). Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol. Onc.*, 4, pp. 192-208.
- Whittemore, A., Gong, G., & Itnyre, J. (1997). Prevalence and Contribution of BRCA1 Mutations in Breast Cancer and Ovarian Cancer: Results from Three U.S. Population-Based Case-Control Studies of Ovarian Cancer. *Am. J. Hum. Genet*, 60, pp. 496-504.
- Wooster, R., Neuhausen, S., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., . . . Stratton, M. (1994). Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene, BRCA2, to Chromosome 13q12-13. *Science*, 265, pp. 2088-2090.
- World Health Organization. (2003). *Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. (F. Trivasolli, & P. Devilee, Eds.) Lyon, Francia: IARC Press.
- World Health Organization. (2011). *Molecular Epidemiology: Principles and Practices*. (N. Rothman, P. Hainaut, P. Schulte, M. Smith, P. Boffetta, & F. Perera, Edits.) Lyon, Francia: IARC Press.
- World Health Organization. (2014). *Cancer Country Profiles: Colombia*. Recuperado el 10 de Enero de 2016, de World Health Organization - Official Site: http://www.who.int/cancer/country-profiles/col_es.pdf
- World Health Organization. (2015). *Breast Cancer: Prevention and control*. Recuperado el 20 de Junio de 2016, de World Health Organization - Official Site: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>

Yépez-Chamorro, M., Bravo-Ocaña, L., Hidalgo-Troya, L., Jurado-Fajardo, D., & Bravo-Goyes, L. (2012). *Incidencia y mortalidad por Cáncer Municipio de Pasto 2003-2007*. Pasto, Colombia: Editorial Universitaria Universidad de Nariño.

ANEXOS

Anexo 1: Formato de autorización institucional

San Juan de Pasto, Fecha_____

Yo _____ mayor de edad, identificado (a) con C.C. No._____ de _____, declaro que conociendo los objetivos de la investigación “DESCRIPCIÓN DE MUTACIONES PRESENTES EN EL GEN *BRCA1* EN PACIENTES CON CÁNCER DE SENO FAMILIAR EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO” y en mi calidad de _____ del _____, doy mi autorización para que Valeria Paz Figueroa, identificada con C.C. No. 1085299584 de Pasto; estudiante de Biología de la Universidad de Nariño y miembro del grupo de investigación de Salud Pública de la Universidad de Nariño; con la asesoría de la docente Jaqueline Mena, lleven a cabo el proceso investigativo con la comunidad del _____.

Firma. _____

Cédula. _____

Cargo. _____

Anexo 2: Resumen ejecutivo presentado a los pacientes.

INFORMACIÓN SOBRE LA INVESTIGACIÓN

INVESTIGADOR PRINCIPAL: **VALERIA PAZ FIGUEROA**

ASESOR DE INVESTIGACIÓN: **PHD. JAQUELINE MENA HUERTAS**

DRA. MARÍA CLARA YÉPEZ

ÁREA DE INVESTIGACIÓN: ESTUDIOS GENÉTICOS DE CÁNCER DE MAMA FAMILIAR EN EL MUNICIPIO DE PASTO.

INSTITUCIÓN PARTICIPANTE: UNIVERSIDAD DE NARIÑO

Estudio aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Nariño, mediante acta No. XXXX.

El cáncer de seno es una enfermedad relativamente común, asociado a múltiples factores de riesgo, como el género, la edad de la primera menstruación y de la menopausia, e incluso hábitos de vida. Se ha determinado que existe también un riesgo asociado a la herencia de mutaciones en un grupo de genes supresores de tumores, conocidos como los genes *BRCA*, que pueden

aumentar de manera considerable el riesgo a presentar cáncer de mama y ovario de forma temprana y más agresiva, y que varían entre poblaciones humanas.

La determinación de este tipo de mutaciones resultaría beneficiosa no sólo para los pacientes afectados, sino también para sus familias y la población en general, pues resultaría en un manejo más adecuado al cáncer de mama, y la ejecución de tratamientos preventivos para reducir el riesgo de aparición cuando se conocen antecedentes.

Esta investigación pretende describir las mutaciones presentes en el gen *BRCA1* en pacientes afectados con cáncer de seno familiar diagnosticadas en el municipio de Pasto, y será coordinada por la Profesora Jaqueline Mena Huertas, adscrita al programa de Biología, y por María Clara Yépez, Master en ciencias Biomédicas, directora de la Línea de investigación sobre prevención del cáncer de la Universidad de Nariño.

Con el fin de desarrollar el proyecto, solicitamos su colaboración para acceder a su historia clínica, además de responder una encuesta con preguntas relacionadas con factores asociados a la aparición de la enfermedad. Si usted acepta participar se le solicitará permitir la toma de muestras de sangre que se utilizarán únicamente para este estudio, y se le solicitará acudir nuevamente al lugar de investigación o ser contactado por el investigador una o dos veces.

Según la resolución 008430 de 1993 vigente en Colombia, ésta es una investigación con riesgo mínimo, pues se le tomarán muestras de cerca de 5mL de sangre una o dos veces, las cuales serán tomadas por personal experto, con un riesgo mínimo para su salud, salvo en los casos en los cuales se pueden presentar pequeños hematomas (moretones en el sitio de punción, que desaparecen espontáneamente), de las cuales se extraerá el material genético (ADN) necesario para la investigación.

Es posible que en el estudio se revelen hallazgos que tengan aplicaciones clínicas; de suceder esto, le pediremos autorización para informar a su médico tratante al respecto.

Su participación es voluntaria. Si usted decide no participar o retirarse del estudio en cualquier momento, aun cuando haya iniciado su participación del estudio puede hacerlo sin que esto ocasione una sanción o castigo para usted. Si acepta, garantizamos que toda la información suministrada será manejada con absoluta confidencialidad, sus datos personales no serán publicados ni revelados, y el investigador principal se hace responsable de la custodia y privacidad de los mismos.

Por favor, no dude en contactarnos si desea más información, o quiere discutir cualquiera de los aspectos relacionados con su participación en el estudio, y con el uso de las muestras que usted donará. Nos puede contactar en el departamento de Biología de la Universidad de Nariño al teléfono 7311449 Ext. 263 o al 7312283, o al correo electrónico de la investigadora principal del proyecto (valeria_920928@yahoo.es) o de la asesora de la investigación (jmenahuertas@ymail.com).

Muchas gracias por su colaboración, y estaremos atentos a sus comentarios.

Dra. María Clara Yépez	PhD. Jaqueline Mena Huertas	Valeria Paz Figueroa
Asesor Proyecto	Asesor Proyecto	Investigador principal
Directora CESUN	Profesora Dpto. de Biología	Estudiante Biología
Universidad de Nariño	Universidad de Nariño	Universidad de Nariño

Anexo 3: Formato de consentimiento informado presentado a los pacientes que cumplen los criterios de inclusión.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Departamento de Biología

Descripción De Mutaciones Presentes En El Gen *BRCA1* En Pacientes Con Cáncer

De Seno Familiar En El Municipio Departamento de Nariño

CONSENTIMIENTO INFORMADO O AUTORIZACIÓN PARA REVISIÓN DE

MI HISTORIA CLÍNICA Y ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Yo, _____ mayor de edad, identificado (a) con
 C.C. _____ de _____, actuando en nombre propio o como representante
 legal de _____ identificado (a) con _____ No.

DECLARO:

Que he recibido toda la información clara y concreta por parte de Valeria Paz Figueroa, estudiante de Biología de la Universidad de Nariño, el día ____ del mes de _____ del año _____, sobre el trabajo de investigación “**Descripción De Mutaciones Presentes En El Gen BRCA1 En Pacientes Con Cáncer De Seno Familiar En El Departamento de Nariño**” realizará a su cargo y con la docente Jaqueline Mena Huertas, para revisar historias clínicas y para participar en el trabajo de investigación mediante la extracción de una pequeña muestra (hasta 5mL) de sangre periférica realizado por un profesional de la salud. Esta es un procedimiento de bajo riesgo, con pocas complicaciones.

Me ha advertido que, en la revisión de mi historia clínica, o en la investigación en la que participo, en ningún momento se hará público mi nombre y/o documento de identificación, como tampoco saldrán a la luz pública hechos relacionados que puedan identificarme y sobre los cuales se guardarán siempre y en todo momento del estudio, todas las reservas y discrecionalidades correspondientes.

Me ha explicado y he comprendido satisfactoriamente la naturaleza y propósito del estudio aludido y de las posibles implicaciones que podría tener. He podido preguntar mis inquietudes al respecto y recibido las respuestas y explicaciones en forma satisfactoria.

También se me ha informado de mi derecho a rechazar esta autorización o revocarla cuando así yo lo requiera.

He sido interrogado (a) sobre la aceptación o no, de esta autorización para este estudio,
por lo tanto,

AUTORIZO

Para que Valeria Paz Figueroa y Jaqueline Huertas del grupo de investigación de Salud Pública de la Universidad de Nariño, revise mi historia clínica y extraiga una pequeña muestra de sangre periférica por venopunción en un máximo de dos ocasiones.

Se firma el presente documento a los ____ días de _____ del _____.

Nombre: _____

Cédula: _____

Investigador

Nombre: _____

Cédula: _____

Testigo

Nombre: _____

Cédula: _____

