

Artículo Original
Original Article

DESARROLLO DE CEBADORES PARA AMPLIFICACIÓN DE VARIANTES PATOGENICAS DE GENES BRCA1 Y BRCA2 ASOCIADAS A CÁNCER DE MAMA

DEVELOPING OF PRIMERS FOR AMPLIFICATION OF PATHOGENIC VARIANTS ASSOCIATED WITH BREAST CANCER

Mónica María González

Universidad Nacional de Itapúa, Facultad de Medicina, Laboratorio de Bioquímica y Microbiología. Ciudad, Paraguay

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7692-9751>

Diana Paola Dressler

Universidad Nacional de Itapúa, Facultad de Medicina, Dirección de investigación. Ciudad, Paraguay

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-9298-358X>

Liliana Noelia Talavera

Universidad Nacional de Itapúa, Facultad de Ciencias y Tecnologías, Laboratorio de Biología Molecular. Ciudad, Paraguay

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-3249-2930>

Autor correspondal: Mónica María González: mmgonzalez@medicina.uni.edu.py

Cómo citar este artículo:

González MM, Dressler DP, Talavera LN. Desarrollo de cebadores para amplificación de variantes patogénicas de genes BRCA1 y BRCA2 asociadas a cáncer de mama. Rev. Soc. cient. Parag. 2024;29(2):37-42.

RESUMEN

Entre el 5-10 % de los casos de cáncer de mama (CM) son atribuidos a mutaciones genéticas hereditarias. Los genes BCRA 1 y BCRA 2, presentan variantes asociadas a CM de alta prevalencia y penetrancia. La prevalencia de dichas variantes difiere de acuerdo con las poblaciones estudiadas dependiendo de factores como ser etnia y distribución geográfica. El objetivo del trabajo se basó en desarrollar ensayos para la amplificación de regiones que han sido reportadas como portadoras de variantes genéticas asociadas a CM en estudios regionales. Se realizaron selección de regiones blanco, diseño de cebadores a través de la herramienta Primer3, amplificación por PCR de las regiones a partir de ADN genómico extraído de sangre entera de un paciente voluntario al azar y chequeo de los fragmentos amplificados en geles de agarosa. Se diseñaron dos pares de cebadores para amplificar regiones que contienen tres variantes observadas en mujeres de ascendencia paraguaya y de otros países que puedan estar representados en la población itapuense: c.5351_5352insA; c.5681_5682insA y c.4035delA. Los resultados de la amplificación utilizando los cebadores diseñados dieron fragmentos de tamaños esperados. Los cebadores diseñados permitirán evaluar en mujeres itapuenses variantes asociadas a cáncer de mama hereditario encontradas en estudios latinoamericanos previos.

Palabras claves: cáncer de mama; gen BCRA1; gen BRCA2; cebadores, variantes genéticas.

ABSTRACT

Between 5-10% of cases of breast cancer (BC) are attributed to hereditary genetic mutations. The BCRA 1 and BCRA 2 genes present variants associated with BC with high prevalence and penetrance. The prevalence of these variants differs according to the populations studied, depending on factors such as ethnicity and geographic distribution. Objective: To develop assays for the amplification of regions that have been reported as carriers of genetic variants associated with breast cancer in regional studies. Target regions were selected, primers were designed using the Primer3 tool, PCR amplification of the regions was performed using genomic DNA extracted from a randomly chosen volunteer patient's whole blood and the amplified fragments were checked on agarose gels. Two primers were designed to amplify regions containing three variants observed in Paraguayan descent women and other countries that may be represented in the Itapuense population: c.5351_5352insA; c.5681_5682insA and c.4035delA. The results of the PCR amplification using the designed primers gave fragments of the expected sizes. The primers designed in this study will allow the evaluation of three variants found in women of Paraguayan descent in Latin American studies.

Keywords: breast cancer; gen BCRA1; gen BRCA2; primers, genetic variants.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) corresponde a un conjunto diverso de enfermedades⁽¹⁾, caracterizado por la proliferación rápida, descontrolada y desordenada de las células mamarias como consecuencia de alteraciones a nivel de los mecanismos de la división y muerte celular⁽²⁾. Representa un 30,7% entre los diferentes tipos de cáncer que son diagnosticados a nivel mundial⁽³⁾.

En Paraguay, aproximadamente 1.747 personas fueron diagnosticadas con cáncer de mama en el año 2019, observándose una prevalencia de 25 por cada 100.000 habitantes⁽⁴⁾. Particularmente, en el departamento de Itapúa, se cuenta con un Hospital que atiende exclusivamente a pacientes oncológicos, el "Hospital Día Oncológico de Itapúa" sin embargo no se encontraron reportes oficiales del Ministerio de Salud sobre la cantidad exacta de mujeres afectadas con cáncer de mama.

Muchos factores están implicados en el desarrollo de esta patología, no encontrándose una causa identificable en mucho de los casos; sin embargo, el 5-10 % son atribuidos a mutaciones genéticas hereditarias^(4,5). Con la introducción de las pruebas genéticas se ha logrado la detección de varios genes relacionados con la susceptibilidad de padecer cáncer de mama y muchos otros que aún se siguen estudiando, los primeros en evidenciarse fueron los genes BRCA 1 y BRCA 2, dos genes de alta penetrancia y prevalencia. La distribución de variantes en tales genes varía de acuerdo a ciertas características demográficas como ser la raza y la situación geográfica⁽⁶⁾.

Desde el descubrimiento de los genes de susceptibilidad al cáncer de mama, BRCA1 y BRCA2, diversos estudios han concluido que el 5% de los casos se explican por la existencia de mutaciones patogénicas en dichos genes, los cuales tienen una predisposición genética de tipo autosómico dominante de alta penetrancia, en donde la herencia de una única mutación patogénica en alguno de estos dos genes confiere un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad a lo largo de la vida^(7,8,9,10).

La Base de Datos de Secuencias Genéticas (GenBank)⁽¹¹⁾ y la Base de Datos de Variantes Genéticas Humanas Asociadas a Genotipos (ClinVar)⁽¹²⁾ permiten identificar regiones y variantes asociadas con la predisposición a padecer cáncer de mama en la región. En ese sentido, ClinVar reporta múltiples variantes de diferentes tipos y significancias clínicas reportadas para los genes mencionados, 12759 variantes en el gen BRCA1 y 15018 en BRCA2. Por otro lado, Cerretini et al.⁽¹³⁾ identificó una frecuencia del 6,3% de variantes patogénicas en los genes BRCA en una población argentina de mujeres con cáncer de mama.

De esta manera, esta investigación tuvo el propósito de desarrollar cebadores para amplificación de variantes patogénicas que se encuentran en los genes BRCA 1 y 2 asociadas a cáncer de mama, con la finalidad de contar con un método accesible y económico para realizar un primer screening en la población de mujeres itapuenses con cáncer de mama, donde aún no se cuenta con información sobre las variantes genéticas asociadas a cáncer de mama circulantes.

METODOLOGIA

Diseño del estudio: Se realizó un estudio experimental para el desarrollo de cebadores para amplificación de variantes patogénicas asociadas a cáncer de mama.

Selección de variantes: Se llevó a cabo la revisión de artículos que analizaban variantes hereditarias asociadas a cáncer de mama en América Latina^(14,15,16,17,18,19,20,21). Fueron seleccionadas las variantes reportadas por Cerretini et al⁽¹³⁾ en los genes BRCA1 y BRCA2, identificadas en mujeres con la ascendencia indígena/española, alemana/paraguaya, rusa/ucraniana, que puedan estar representadas en la población itapuense.

Ensayo laboratorio: Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional de Itapúa.

Diseño de Cebadores: Una vez que se identificó la zona de interés para la amplificación en la secuencia, se procedió a diseñar y ensayar cebadores (oligonucleótidos que permiten la amplificación de regiones y que actúan en la etapa de hibridación a través de la técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena de punto final (PCR). Se utilizaron las accesiones NM_000059.4, NM_024675.4 y NM_007294.4, luego de descargar las secuencias en formato fasta se procedió al diseño de cebadores específicos para la amplificación de las mutaciones de interés. Para el diseño in silico se empleó el software primer 3 versión 0.4.0⁽¹⁴⁾. Se solicitó la síntesis de los cebadores diseñados a la empresa Macrogen-Korea.

Para la validación de los cebadores mediante PCR convencional, se empleó una muestra de ADN de un paciente voluntario al azar.

Extracción del ADN genómico: se le realizó la extracción de ADN a partir de sangre periférica con EDTA para la puesta a punto de la técnica, utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA)⁽¹⁵⁾ siguiendo las condiciones sugeridas por el fabricante para muestras de sangre.

Condiciones de la PCR: Las amplificaciones de las regiones seleccionadas fueron realizadas en un termociclador de la marca BOECO, en un volumen final de 50uL de reacción, con los siguientes reactivos: 1X de Buffer (PCR Buffer, -Mg), 1,5 mM MgCl₂, 1 unidad de taq (DNA Polimerasa, Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTPs (Promega), 0,5 µM de cada uno de los cebadores y aproximadamente 100ng de ADN templado. En cuanto a las condiciones de ciclado, se utilizaron condiciones estándares, desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos que incluyeron, desnaturalización a 94°C por 45 s, hibridación a TM (Temperatura de melting) específica de cada cebador por 45 s, elongación a 72°C por 1 min, elongación final a 72°C por 10 min. Para la verificación de las PCR fue realizada una electroforesis (5V/cm) en geles de agarosa al 2% (p/v), utilizando como buffer de corrida TBE al 0,5 X, los geles fueron teñidos con Diamond™ Nucleic Acid Dye (1:10.000), las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz azul. El marcador de peso molecular utilizado como referencia fue el 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Entre las variables que se manipularon para la puesta a punto de la PCR, se encuentran la TM y la concentración de MgCl₂.

Secuenciación: posterior a esto los fragmentos fueron enviados para su secuenciación a la empresa Macrogen-Korea, para la verificación de las posiciones de interés, se revisó la calidad de las secuencias recibidas y se generó una secuencia consenso por medio del programa Bioedit, se comprobó la identidad de las secuencias obtenidas utilizando la herramienta Blastn⁽²⁴⁾.

Asuntos éticos: Se respetaron los principios básicos de la bioética. El protocolo de investigación fue aceptado por el Comité de ética de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Itapúa.

RESULTADOS

Se diseñaron un total de 7 pares de cebadores con el programa Primer 3.0. Cumpliendo con los criterios de selección de cebadores, se seleccionaron un total de dos pares de cebadores, uno para el gen BRCA1 y otro para el gen BRCA2 (Tabla 1), todos candidatos válidos para ser sintetizados.

Gen	Exon	Cebadores	Mutación	pb	TM
BRCA2	11	BRCA2_11F: TGGTATTGAGCCAGTATTGAAGA	c.5351_5352insA c.5681_5682insA	599	58
		BRCA2_11R: AGACTGACTTATGAAGCTTCCCT			
BRCA1	10	BRCA1_10F: ACAAACACCCAGGATCCTTTC BRCA1_10R: TCCATGCTTTGCTCTTCTGA	c.4035delA	158	60

Tabla 1. Regiones y cebadores para la amplificación de las mutaciones asociadas a BRCA1 y BRCA2
pb: pares de base, TM: temperatura de hibridación

En los ensayos realizados, utilizando las TM presentadas en la tabla 2, se observó la amplificación de un único fragmento para cada uno de los pares de cebadores diseñados, correspondiendo los tamaños a los esperados, 599 pb para BRCA2 (Figura 1, Dentro de este fragmento se encuentran las posiciones correspondientes a las mutaciones 5351_5352insA y c.5681_5682insA) y 158 pb para (fragmento que incluye la mutación c.4035delA) BRCA1. La secuencia obtenida para la región parcial del exón 11 de BRCA2 fue de buena calidad, consiguiéndose finalmente una secuencia consenso de 585 pb, en la cual no se identificaron las inserciones patológicas en las posiciones de interés. En el caso de la región parcial del exón 10 del gen BRCA1, no fue posible obtener secuencias de buena calidad.

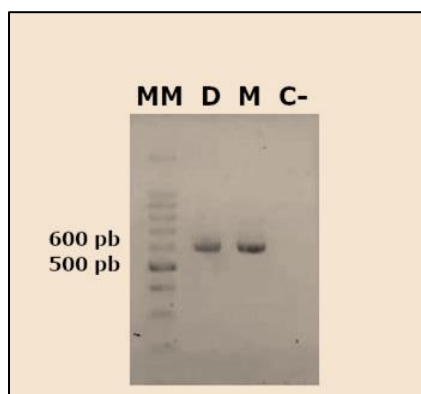


Figura 1. Electroforesis de la región parcial del gen BRCA2; tamaño de amplicón CG1: 599pb. MM: marcador de peso molecular de 100 pb. D: dilución 1:10 de la muestra. M: muestra. C-: control negativo.

DISCUSIÓN

A pesar de que no existen estudios poblacionales de variantes genéticas asociadas a CM en Paraguay, la revisión bibliográfica realizada permitió seleccionar variantes específicas en los genes BRCA 1 y BRCA2 identificadas en mujeres con ascendencia paraguaya y de otros países que puedan estar representados en la población itapuense.

Los estudios genéticos más recientes sobre cáncer de mama hereditario en Latinoamérica han sido publicados en Chile⁽²⁵⁾, Brasil⁽²⁵⁾, México⁽²⁷⁾ y Argentina⁽¹³⁾. En todas ellas, las variantes fueron identificadas mediante secuenciación de próxima generación y validadas mediante secuenciación de Sanger o amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiple. Si bien las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) tienen la ventaja de realizar un screening de gran parte del genoma, con grandes beneficios en cuanto a la cobertura que brindan, el costo de la mayoría de los paneles excede los 1000USD⁽²⁷⁾, un costo aun elevado para nuestra población. De esta manera, realizar el screening de variantes a través de PCR y secuenciación por la tecnología de SANGER es una opción interesante, aunque de menor cobertura en cuanto a la cantidad de variantes a analizar.

El presente trabajo, constituye la etapa inicial de un proyecto que pretende realizar un primer screening de variantes genéticas asociadas a cáncer de mama en mujeres Itapuenses. En el mismo, se han desarrollado cebadores que podrán ser utilizados en la segunda fase del trabajo. Para la selección de las variantes se tuvieron en cuenta la ascendencia y frecuencia a partir de los hallazgos de Cerretini y colaboradores⁽¹³⁾.

La especificidad de los cebadores es una de las características más importantes para tener en cuenta en el diseño, esta depende de la longitud y de la TM, si los cebadores son muy pequeños y la TM es muy baja, se generan uniones inespecíficas⁽²⁸⁾. En nuestros cebadores se ha encontrado que la longitud de los pares de cebadores se encuentra entre 19 y 23 bp y la TM esta entre 39–47 °C. Con este resultado, se debe tener en cuenta que, para el diseño de cebadores para una PCR, el rango de la TM óptima se encuentra entre 60 y 64°C con una temperatura ideal de 62°C⁽²⁹⁾.

Los cebadores desarrollados amplificaron fragmentos únicos. La secuencia resultante de la región parcial del gen BRCA1 no fue de buena calidad, probablemente debido al tamaño del fragmento; en cambio, el resultado obtenido de la secuenciación de la región parcial del gen BRCA2 permitió obtener una clara secuencia consenso de 585 pb, incluyendo dentro de la misma las dos posiciones de interés.

De este modo, este es el primer estudio que permite el desarrollo de cebadores en Itapúa para la amplificación de la región parcial del gen BRCA2. Estos cebadores podrán ser utilizados en estudios epidemiológicos para caracterizar a la población de interés en cuanto a la presencia de las dos variantes mencionadas, o de alguna otra que pueda ser encontrada de nuevo a lo largo de la región analizada.

Partiendo del hecho de que fueron incluidos únicamente los genes BRCA1 y BRCA2 y si bien son genes de alta penetrancia y prevalencia no son los únicos genes asociados a predisposición a cáncer de mama hereditario, existen muchas otras variantes e incluso otros genes que se han asociado a la predisposición de desarrollar cáncer de mama²², una limitación importante es que las variantes seleccionadas en el trabajo no son suficientes para realizar un screening representativo, puesto que, las mismas podrían no hallarse en la población a ser estudiada ya que la diversidad genética entre poblaciones es un factor relevante, por otra parte, considerando que al no existir antecedentes en la población paraguaya el trabajo se basa en un estudio realizado en una población de la región. Sin embargo, podría generar antecedentes y ser un puntapié inicial que permitirá obtener un primer screening, a partir del cual se podría ampliar el rastillaje a otras variantes y regiones que permitan la identificación de variantes asociadas a cáncer de mama, considerando que estas pruebas son fundamentales para la toma de decisiones sobre el tratamiento, la implementación sobre estrategias preventivas y la detección temprana.

CONCLUSION

Esta investigación es el primer estudio que permite el desarrollo de cebadores en Itapúa para la secuenciación de las variantes seleccionadas del gen BRCA2, no así del gen BRCA1, a fin de poder usarlos en estudios epidemiológicos para la caracterización de poblaciones de interés.

Para complementar el estudio se deberían realizar pruebas en una PCR convencional usando muestras de ADN humano con pacientes diagnosticados con cáncer de mama y probar los productos de la PCR mediante electroforesis.

Declaración de financiamiento:	El presente trabajo fue financiado por el Rectorado de la Universidad Nacional de Itapúa.
Declaración de conflicto de intereses:	Los autores declaran no tener conflicto de interés.
Declaración de autores:	Los autores aprueban la versión final.
Contribución de autores:	Las investigadoras DD y MG se encargaron de la escritura del manuscrito y extracción del ADN y la investigadora LT del desarrollo de los cebadores y puesta a punto de la técnica de PCR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Cáncer de mama. 2023. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
2. Infobae. Cáncer de mama: El riesgo de la falta de controles en la más jóvenes [Internet]. Buenos Aires: Sociedad Argentina de Mastología; 2021. Disponible en: <https://www.samam.org.ar/index.php/blog-infosam/420-cancer-de-mama-en-pandemia-el-riesgo-de-la-falta-de-controles-en-las-mas-jovenes>
3. Organización Panamericana de la Salud. Cáncer. 2022. Disponible en: [https://www.paho.org/es/temas/cancer#:~:text=Los%20tipos%20de%20c%C3%A1ncer%20diagnosticados%20con%20mayor%20frecuencia%20en%20las,uterino%20\(6%2C4%20%25\)](https://www.paho.org/es/temas/cancer#:~:text=Los%20tipos%20de%20c%C3%A1ncer%20diagnosticados%20con%20mayor%20frecuencia%20en%20las,uterino%20(6%2C4%20%25))
4. Dirección de Vigilancia de Enfermedades no Transmisibles. Más de 1.700 pacientes diagnosticados con cáncer mamario en el 2019. Asunción: Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social; 2020. Disponible en: <https://dvent.mspbs.gov.py/mas-de-1-700-pacientes-diagnosticados-con-cancer-mamario-en-el-2019/#:~:text=Datos%20parciales%20revelan%20que%20la,de%20mama%2C%20durante%20ese%20a%C3%B1o>
5. Fernández TA, Reigosa YA. Cáncer de mama hereditario. Comunidad y Salud. 2016;14(1):52-60. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1690-32932016000100008&script=sci_abstract
6. Narod S, Rodríguez A. Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. Salud Pública de México. 2011;53(5). Disponible en: <https://www.scielosp.org/pdf/spm/v53n5/a10v53n5.pdf>

7. Easton D, Ford D, Bishop D. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1995;56(1):265-71. Disponible en: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7825587/#:~:text=Under%20the%20assumption%20of%20no,CI%208%25%2D47%25\).](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7825587/#:~:text=Under%20the%20assumption%20of%20no,CI%208%25%2D47%25).)
8. Landrum M, Chitipiralla S, Brown G, Chen C, Gu B, Hart J, et al. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D835-D845. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31777943/>
9. Jara JH, Genc B, Stanford M, Pytel P, Roos R, Weintraub S, et al. Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *Journal of Neuroinflammation.* 2017;14(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5485686/>
10. Instituto Nacional del Cáncer. Mutaciones en el gen BRCA: el riesgo de cáncer y las pruebas genéticas. EEUU: NIH; 2020. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica/hoja-informativa-brca>
11. National Library of Medicine. GenBank Overview. Rockville, EEUU: NIH; 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
12. National Library of Medicine. ClinVar. Rockville, EEUU: NIH; 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
13. Cerretini R, Mercado G, Morganstein J, Schiaffi J, Reynoso M, Montoya D, et al. Germline pathogenic variants in BRCA1, BRCA2, PALB2 and RAD51C in breast cancer women from Argentina. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;178:629-636. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-019-05411-9>
14. Martínez J, Muñoz M, Corriols Molina M, Silva Arrechavala J. Mutaciones genéticas asociadas a cáncer de mama hereditario en mujeres nicaragüenses. *Revista Torreón Universitario.* 2021;10(29). Disponible en: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/387/3872515007/3872515007.pdf>
15. Chavarri-Guerra Y, Blazer K, Weitzel J. Genetic Cancer Risk Assessment for Breast Cancer in Latin America. *Rev Invest Clin.* 2017;69(2):94-102. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28453507/>
16. Da Costa E Silva Carvalho S, Cury NM, Brotto DB, De Araujo LF, Alves Rosa RC, Texeira LA, et al. Germline variants in DNA repair genes associated with hereditary breast and ovarian cancer syndrome: analysis of a 21 gene panel in the Brazilian population. *BMC Med Genomics.* 2020;13(1):21. Disponible en: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-019-0652-y>
17. Valle AD, Acevedo C, Esperón P, Neffa F, Artagaveytia N, Santander G, et al. Cáncer de mama y ovario hereditario en Uruguay: resultados del screening para mutaciones en genes de susceptibilidad por secuenciación de nueva generación. *Revista Médica del Uruguay.* 2017;33(2):102-107. Disponible en: <https://revista.rmu.org.uy/index.php/rmu/article/view/112>
18. Buleje J, Guevara-Fujita M, Acosta O, Huaman FDP, Danos P, Murillo A, et al. Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Peruvian families with hereditary breast and ovarian cancer. *Mol Genet Genomic Med.* 2017;5(5):481-494. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mgg3.301>
19. Solano AR, Aceto GM, Delettieres D, Veschi S, Neuman MI, Alonso E, et al. BRCA1 and BRCA2 analysis of Argentinean breast/ovarian cancer patients selected for age and family history highlights a role for novel mutations of putative south-American origin. *SpringerPlus.* 2012;1:20. Disponible en: <https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-1-20>
20. Jara L, Morales S, De Mayo T, Gonzalez-Hormazabal P, Carrasco V, Godoy R. Mutations in BRCA1, BRCA2 and other breast and ovarian cancer susceptibility genes in Central and South American populations. *Biological Research.* 2017;50(1):35. Disponible en: <http://biolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40659-017-0139-2>
21. Tan O, Shrestha M, Cunich M, Schofield DJ. Application of next-generation sequencing to improve cancer management: A review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness. *Clinical Genetics.* 2018;93(3):533-544. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.13199>
22. Primer3 web. Primer3 web version 4.1.0. Disponible en: <https://primer3.ut.ee/>
23. Promega. Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual. Promega; 2023. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>
24. Software informer. BioEdit 7.7. Software informer; 2022. Disponible en: <https://bioedit.software.informer.com/>
25. Adaniel C, Salinas F, Donaire J, Bravo M, Peralta O, Paredes H, et al. Non-BRCA1/2 Variants Detected in a High-Risk Chilean Cohort With a History of Breast and/or Ovarian Cancer. *J Glob Oncol.* 2019; 5:1-14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31125277/>
26. Zayas-Villanueva OA, Campos-Acevedo LD, Lugo-Trampe JDJ, Hernández-Barajas D, González-Guerrero JF, Noriega-Iriondo MF, et al. Analysis of the pathogenic variants of BRCA1 and BRCA2 using next-generation sequencing in women with familial breast cancer: a case-control study. *BMC Cáncer.* 2019;19(1):722. Disponible en: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5950-4>
27. Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (Ngs) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Univ Med.* 2020;61(2). Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/vnimedica/article/view/27461>
28. SantaLucia J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(4):1460-1465. Disponible en: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.95.4.1460>
29. Syamsidi A, Aanisah N, Fiqam R, Jultri IA. Primer design and analysis for detection of mecA gene. *J Trop Pharm Chem.* 2021;5(3):245-253. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/353001074_Primer_Design_and_Analysis_for_Detection_of_mecA_gene