

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



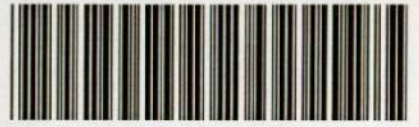
**IDENTIFICACION DE MUTACIONES EN LOS GENES  
BRCA1 Y BRCA2 EN PACIENTES DEL NORESTE  
DE MEXICO CON CANCER DE MAMA.**

**Por  
PABLO RUIZ FLORES**

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

**Junio, 2001**

TD  
RC280  
.B8  
R8  
c.1



1080113116

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA



IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES BRCA1 Y  
BRCA2 EN PACIENTES DEL NORESTE DE MÉXICO CON  
CÁNCER DE MAMA.

Por

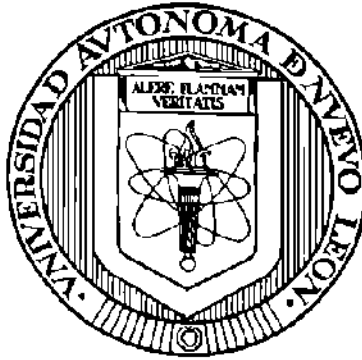
Por  
PABLO RUIZ FLORES  
PABLO RUIZ FLORES

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

Junio, 2001  
Junio, 2001

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES BRCA1 Y  
BRCA2 EN PACIENTES DEL NORESTE DE MÉXICO CON  
CÁNCER DE MAMA.**

**Por**

**PABLO RUIZ FLORES**

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

**Junio, 2001**

RC 280

.B8

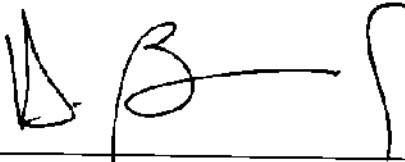
R8

C.1



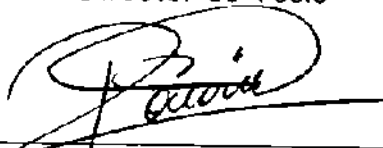
**IDENTIFICACION DE MUTACIONES EN LOS GENES BRCA1 Y BRCA2  
EN PACIENTES DEL NORESTE DE MEXICO CON  
CANCER DE MAMA**

**Aprobación de la Tesis:**



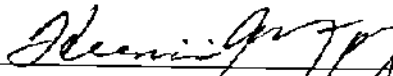
---

**DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA**  
Director de Tesis



---

**DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ**  
Co-Director de Tesis



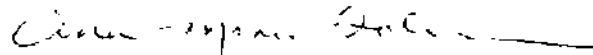
---

**DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ**  
Comisión de Tesis



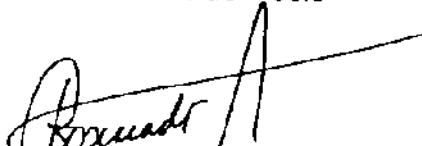
---

**DR. JUAN FRANCISCO GONZALEZ GUERRERO**  
Comisión de Tesis



---

**DRA. ANA MARIA SALINAS MARTINEZ**  
Comisión de Tesis



---

**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

**...y la ciencia pasará... y ahora permanecen la Fé, la Esperanza y el Amor, estos tres; pero el mayor de ellos es el Amor.**

**1ª. Cor:13**



## **DEDICATORIA**

**A DIOS.**

**A mi madre María Elena, a mi esposa María Cecilia y a mis hijas Areli y Cecilia con todo mi amor.**

**A la memoria de mi padre Lorenzo, de mis abuelos Antonio, Rosario y Carmen, de mi tía Lupita, y de mis bisabuelitas Catalina y Juanita.**

**A mis hermanos José Luis, María del Carmen, Araceli, Sandra Elizabeth, María Guadalupe, José Eduardo y María Elena, a todos mis sobrinos y sobrinas y a mi sobrina nieta con mucho cariño.**

**Al resto de mi familia, especialmente a mis primos María de Jesús Olivares de Bravo, Miguel Bravo y Miguel Olivares Hernández y a mis entrañables amigos Ester Miranda de V. y Jorge Villarreal.**

## AGRADECIMIENTOS

- **A mi asesor el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña** por su ejemplo de constancia, objetividad y gran capacidad de trabajo.
- **A mi co-asesora la Dra. Rocío Ortíz López** por su gran disposición de ayuda y su calidad humana.
- **A los doctores Herminia Martínez, Agnès Revol y Augusto Rojas** por su amistad y enseñanzas.
- **Al personal de la ULIEG** por toda la ayuda que me brindaron.
- **A mis compañeros estudiantes y mis compañeros de laboratorio** por lo que aprendí de todos ellos y por su invaluable amistad.
- **Al Dr. Juan Francisco González** y a los Departamentos de Enfermería y Trabajo Social del Centro Universitario Contra el Cáncer.
- **A la Dra. Ana Laura Calderón Garcidueñas** y a los Departamentos de Patología y Archivo de la Clínica 25 del Seguro Social.
- **A la Dra. Ana María Salinas** por su valiosa revisión de la tesis.
- **A los doctores David Goldgar, Olga Sinilnikova Michael Badzioch, Csilla Szabo y Gilbert Lenoir** por su entrenamiento y asesoría durante mi estancia en la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer.
- **A las Universidades Autónomas de Coahuila y Nuevo León, al programa PROMEP de la SEP y al CONACYT** por haberme permitido realizar el doctorado en las mejores condiciones.
- **A las pacientes** por habernos autorizado a realizar el estudio con sus muestras y sus datos y porque beneficiarlas a ellas es el propósito último de este trabajo.

# TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>I INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	1
1.1.1. Generalidades.....	1
1.1.2. Factores de riesgo.....	2
1.1.3. Factores de riesgo en la población mexicana.....	4
1.2 GENÉTICA.....	4
1.2.1. El gen BRCA1.....	6
1.2.1.1.Epidemiología de las mutaciones del gen BRCA1.....	7
1.2.1.2.Funciones del gen BRCA1.....	10
1.2.2. El gen BRCA2.....	14
1.2.2.1.Epidemiología de las mutaciones del gen BRCA2.....	15
1.2.2.2.Funciones del gen BRCA2.....	17
1.2.3. Distribución poblacional de las mutaciones.....	19
1.3. MANEJO CLÍNICO Y ASPECTOS ÉTICOS.....	23
1.3.1. Manejo clínico.....	23
1.3.2. Aspectos éticos.....	28
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	32
<b>II HIPÓTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>III OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>IV MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1. ÁREA DE TRABAJO, REACTIVOS Y EQUIPO.....	36
4.1.1. Área de trabajo.....	36
4.1.2. Material biológico.....	36
4.1.3. Reactivos químicos.....	36
4.1.4. Materiales.....	37
4.1.5. Equipo.....	38
4.1.6. Apoyo computacional.....	39
4.2. MÉTODOS.....	39
4.2.1. Pacientes.....	39
4.2.2. Investigación experimental.....	41
4.2.2.1. Manejo de la muestra.....	41

	4.2.2.2.	Extracción de DNA.....	41
	4.2.2.3.	Reacción en cadena de la polimerasa.....	43
	4.2.2.4.	Análisis de heteroduplex.....	45
	4.2.2.5.	Secuenciación.....	47
<b>V</b>	<b>RESULTADOS</b> .....		<b>50</b>
	5.1	LA MUESTRA DE ESTUDIO.....	50
	5.2	ANÁLISIS DE HETERODUPLEX.....	51
	5.3	SECUENCIACIÓN.....	52
	5.3.1.	Análisis de secuencias en el gen BRCA1.....	55
	5.3.1.1.	Descripción de las mutaciones en BRCA1.....	56
	5.3.2.	Análisis de secuencias en el gen BRCA2.....	58
	5.3.2.1.	Descripción de las mutaciones en BRCA2.....	59
	5.3.2.2.	Polimorfismos en el gen BRCA2.....	63
	5.3.3.	Correlación entre el estadio clínico y la presencia de mutaciones..	64
	5.3.4.	Resumen de los hallazgos.....	65
<b>VI</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....		<b>66</b>
	6.1.	POBLACIÓN ANALIZADA, FRECUENCIA Y TIPOS DE MUTACIONES.....	66
	6.2.	EFFECTOS DE LAS MUTACIONES.....	67
	6.3.	COMPARACIÓN CON LOS GENES <i>brca1</i> Y <i>brca2</i> DE RATÓN Y CAMBIOS AMINOACÍDICOS PROVOCADOS POR LAS MUTACIONES.....	69
	6.4.	COMPARACIÓN CON OTRAS POBLACIONES.....	71
	6.5.	ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS.....	73
	6.6.	PERSPECTIVAS Y BENEFICIOS DERIVADOS DEL PROYECTO..	74
	6.6.1.	Utilidad clínica.....	74
	6.6.2.	Diagnóstico molecular.....	75
	6.6.3.	Transferencia tecnológica.....	75
	6.6.4.	Formación de la red latinoamericana de genética molecular contra el cáncer.....	75
<b>VII</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....		<b>77</b>
<b>IX</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....		<b>81</b>
<b>X</b>	<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b> .....		<b>91</b>

## **APÉNDICE**

- Anexo 1.- Cuestionario.
- Anexo 2.- Carta de consentimiento informado.
- Anexo 3.- Oligonucleótidos utilizados.

## Anexo 4.- Árboles genealógicos.

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Frecuencias de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en familias con cáncer de mama/ovario de varios países.....	20
2. Mutaciones mas comunes en los genes BRCA1 y BRCA2 y países donde han sido descritas con mayor frecuencia.....	20
3. Mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 descritas en Hispanoamérica.....	22
4. Forma de preparación de las reacciones de PCR.....	43
5. Ejemplo de PCR para iniciadores que hibridan a 50°C.....	44
6. Forma de preparar los geles para heteroduplex.....	44
7. Preparación de la mezcla de la reacción de secuenciación.....	47
8. Clasificación de las pacientes del estudio por grupo, de acuerdo a la edad de presentación de la enfermedad y a los antecedentes familiares.....	50
9. Variantes de heteroduplex encontradas en los genes BRCA1 y BRCA2 en este estudio.....	50
10. Frecuencias de las mutaciones encontradas en este estudio en ambos genes por grupo analizado.....	53

11. Mutaciones identificadas en este estudio en el gen BRCA1 después de la secuenciación.....	54
12. Mutaciones identificadas en este estudio en el gen BRCA2 después de la secuenciación.....	58
13. Polimorfismos identificados en este estudio en el gen BRCA2 después de la secuenciación.....	62
14. Correlación entre la etapa clínica y la presencia o ausencia de mutaciones y polimorfismos en los genes BRCA1 y BRCA2.....	64
15. Frecuencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en estudios de familias con riesgo moderado de desarrollar cáncer de mama.....	71
16. Frecuencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en estudios de pacientes con cáncer de mama de inicio temprano.....	71
17. Poblaciones en donde han sido descritos los polimorfismos encontrados en este estudio.....	73

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Mutaciones más frecuentes en el gen BRCA1.....	7
2. Dominios funcionales identificados en la proteína BRCA1.....	13
3. Mutaciones más frecuentes en el gen BRCA2.....	16
4. Dominios funcionales identificados en la proteína BRCA2.....	18
5. Estrategia General.....	34
6. Ejemplos de los heteroduplex encontrados.....	51
7. Imágenes de secuenciación de los fragmentos analizados.....	53
8. Mutaciones encontradas en el gen BRCA1.....	55
9. Mutaciones encontradas en el gen BRCA2.....	58
10. Polimorfismos encontrados en el gen BRCA2.....	63
11. Cambios aminoacídicos provocados por las mutaciones de cambio de sentido.....	69
12. Colaboraciones con otros países latinoamericanos.....	75



## NOMENCLATURA

ATM	Ataxia Telangiectasia
BAP 1	Proteína activadora de la proteína BRCA1
BARD1	Proteína de unión a la proteína BRCA1
BIC	Breast Cancer Information Core database
BRCA1	Gen del cáncer de mama 1 (humano)
BRCA2	Gen del cáncer de mama 2 (humano)
brca1	Gen de ratón homólogo de BRCA1
brca2	Gen de ratón homólogo de BRCA2
BRCT	Región C terminal de la proteína BRCA1
°C	Grados centígrados
Ca-125	Marcador tumoral para cáncer de ovario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
g	Gramos
h	Horas
HDA	Análisis de heteroduplex
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HRAS1	Gen Hras 1
IARC	International Agency for Research on Cancer
IgM	Inmunoglobulina M
JNK	Cinasa Jun N-terminal
Kb	Kilobase
mA	Miliampers
MAGIC	Mutation Atlas of Genes in Inherited Cancer

MDE	Solución patentada para geles de poliacrilamida de concentración desconocida
min	Minutos
ml	Mililitro
$\mu$ l	Microlitro
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
ng	Nanogramo
OCCR	Región de predisposición al cáncer de ovario
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAD 50 y 51	Proteínas reparadoras del DNA
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Riesgo Relativo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSCP	Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla
TBE	Buffer compuesto de trisma base, ácido bórico y EDTA
TE	Buffer compuesto de trisma base y EDTA
TEMED	Catalizador de polimerización de acrilamida
V	Volts
W	Watts
13q12-13	Región entre las sub-bandas 2 y 3 de la banda 1 del brazo largo del cromosoma 13
17q21	Sub-banda 1 de la banda 2, del brazo largo del cromosoma 17

## RESUMEN

**Pablo Ruiz Flores**

**Fecha de graduación: mayo del 2001**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del estudio: IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES BRCA1 Y BRCA2 EN FAMILIAS DEL NORESTE DE MÉXICO CON PREDISPOSICIÓN AL CÁNCER DE MAMA.**

**Número de páginas: 90**

**Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

**Área de Estudio: Oncología Molecular.**

**INTRODUCCIÓN:** El cáncer de mama (CM) es un importante problema de salud pública en el mundo. En México es la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, siguiéndole al cáncer cervicouterino. En 1990 y 1994 fueron identificados los dos principales genes de susceptibilidad al CM, llamados BRCA1 y BRCA2, respectivamente. Las proteínas codificadas por estos genes actúan como supresoras de tumores, reguladores del ciclo celular y participan en la reparación del DNA. Se han descrito varias mutaciones en estos genes en Europa, Estados Unidos y Australia, pero la frecuencia y tipo de mutaciones son desconocidas en Latinoamérica, África y Asia.

**OBJETIVO:** Identificar y establecer la frecuencia y tipos de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en familias del Noreste de México con predisposición al CM.

**MÉTODO:** Previa selección, un total de 55 mujeres diagnosticadas antes de los 35 años y/o con una historia familiar de CM u ovario fueron reclutadas del Centro Universitario Contra el Cáncer del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" y de la Clínica 25 del Seguro Social. A cada una se le llenó un cuestionario y se le tomaron 10 ml de sangre periférica. A las muestras se les extrajo el DNA por la técnica de salado. Se amplificaron los 24 exones de BRCA1 y los 27 de BRCA2 y se les realizó un análisis de heteroduplex en búsqueda de bandas variantes que posteriormente fueron secuenciadas.

**RESULTADOS:** Fueron encontrados 16 heteroduplex en BRCA1 y 44 en BRCA2. De ellos, 41 fueron positivos para algún cambio en la secuencia y 19 presentaron una secuencia normal. 24% de los casos tuvieron mutaciones en alguno de los dos genes. Fueron identificadas cuatro mutaciones en el gen BRCA1 y 17 en BRCA2: Dos de ellas producen proteínas truncadas que son causales de enfermedad. Adicionalmente, se encontraron siete mutaciones de cambio de sentido de efecto desconocido, pero que muy probablemente tienen incidencia sobre el desarrollo de la enfermedad. Además, se encontró una mutación que produce un codón prematuro de terminación de la traducción, ocho polimorfismos exónicos, dos polimorfismos intrónicos y una mutación en la región 3' no traducible del gen BRCA1.

**CONCLUSIONES:** Fueron mas frecuentes las mutaciones en el gen BRCA2 (18%) que en el gen BRCA1 (6%). De las mutaciones identificadas, seis no han sido descritas, y podrían ser exclusivas de México. Dos de las mutaciones han sido descritas en otras poblaciones y otra más ha sido descrita en una familia mexicana residente en E. U. A. Sólo el 5.5% de mujeres jóvenes presentaron mutaciones en el gen BRCA1, lo cual es semejante a la frecuencia descrita en otras poblaciones en estudios semejantes a éste; mientras que el 12.5% de los casos con historia de cáncer de mama en la familia y el 22.2% de mujeres jóvenes sin historia familiar positiva, presentaron mutaciones en el gen BRCA2. Nuestros resultados muestran que la frecuencia de mutaciones en estos genes en nuestra población es semejante a las descritas para familias europeas, incluyendo las españolas, pero la mayoría de los tipos de mutaciones son diferentes, sugiriendo que pueden ser características de nuestro país.

Un análisis de mayor cantidad de pacientes, buscando las mutaciones encontradas específicamente en este estudio, servirá para determinar la frecuencia de estas alteraciones en los casos de cáncer de mama de nuestra población y para la identificación de pacientes en riesgo. Será de gran interés continuar con esos estudios tanto en México como en otros países latinoamericanos, en series de pacientes en las cuales se colecte tanto la historia familiar como la exposición a factores de riesgo, con el propósito de identificar interacciones genético-ambientales que puedan aumentar el riesgo conferido por estos genes de susceptibilidad al CM.

**FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS**



**Prof. Dr. Hugo A Barrera Saldaña**

**FIRMA DEL CO-DIRECTOR DE TESIS**



**Dra. Rocío Ortiz López**

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. EPIDEMIOLOGÍA

#### 1.1.1. Generalidades

El cáncer de mama (CM) se encuentra entre los cánceres humanos más comunes, con cerca de trescientas mil mujeres muriendo por esta enfermedad cada año en el mundo (1). En los Estados Unidos de América (E.U.A.) esta neoplasia se incrementó de una manera sostenida desde 1930, con un aumento promedio de 1.2% por año, según fue descrito por The Connecticut Tumor Registry (2). En años recientes, más de 180,000 mujeres son diagnosticadas cada año con CM, representando el 32% de todos los cánceres incidentes en aquella nación (3). De estas mujeres, 50,000 mueren anualmente como consecuencia de la enfermedad.

Aunque se piensa que el aumento en la frecuencia del CM es debido a la mayor expectativa de vida de la población y al advenimiento de mejores métodos de diagnóstico (especialmente la mamografía), también se reconoce el papel que pueden

jugar cambios en el medio ambiente y en el estilo de vida, para incrementar la frecuencia del CM. Estos mismos factores y la aparición de mejores alternativas de tratamiento, se han postulado como responsables de la disminución en la mortalidad. (4).

Bondy y cols., encontraron en 1992 una menor frecuencia de CM en la población hispana, al compararla con las poblaciones caucásica y afroamericana. Este hallazgo fue atribuido a una menor nuliparidad y a un mayor número de hijos entre las hispanas (5). La tendencia de la mortalidad por CM en los últimos 15 años se ha triplicado y se prevé que esta tendencia continúe en el futuro (6). En nuestro país, el CM es la segunda causa de mortalidad femenina debida a cáncer, después del cáncer cervicouterino (7). Parte de la explicación de este incremento se encuentra en cambios en el estilo de vida de la población y en cambios en los patrones reproductivos (6).

### **1.1.2. Factores de Riesgo**

La etiología del CM es multifactorial, ya que intervienen en ella factores genéticos, endocrinos y fisiopatológicos, entre otros. Los factores de riesgo para CM han sido investigados desde hace tiempo con el propósito de hacer modificaciones a diferentes aspectos socioculturales del estilo de vida que permitan disminuir el riesgo de padecer esta neoplasia (8). Los factores de riesgo más importantes son:

*A) Historia familiar positiva.* Este es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de CM y los genes BRCA1 y BRCA2 son los principales genes de susceptibilidad para la enfermedad (9, 10, 11).

*B) Edad.* El riesgo relacionado con la edad va desde 1 en 20,000 para mujeres menores de 25 años, hasta 1 en 9 para aquellas de 85 años y mayores (12).

*C) Factores reproductivos.* Entre tales factores están una menarca antes de los 12 años (con un riesgo relativo o RR de 1.2), la nuliparidad (RR: 2), y una menopausia después de los 50 años (RR: 2 a 5) (13, 14).

*D) Radiaciones ionizantes.* La radiación es también un factor de riesgo para CM, lo cual fue observado entre las mujeres supervivientes a la bomba atómica (RR: 13) (15) y en las mujeres que han recibido radiación por enfermedad de Hodgkin (RR: 75.3) (16).

*E) Lactancia.* Diversos investigadores han postulado que la lactancia ejerce un efecto protector contra el CM, debido a que como consecuencia del estado hormonal prevaleciente se retrasa la menstruación en dicha etapa, mientras que el tiempo de exposición a los estrógenos se ve reducido (17).

*F) Dietas altas en grasa y obesidad.* Diferentes evidencias sustentan la relación entre obesidad y CM, destacando los estudios epidemiológicos en grupos de asiáticos, que al emigrar a Occidente experimentaron cambios en sus costumbres alimenticias, con un consecuente aumento en la tasa de incidencia y mortalidad por CM en las generaciones subsecuentes (18).

Factores adicionales que se han propuesto como de riesgo para CM en algunos pero no en todos los estudios son: aborto (19), patología mamaria previa (20), ingesta de alcohol (21), falta de ejercicio (22), y terapia estrogénica de reemplazo (23).

### **1.1.3. Factores de riesgo en la población mexicana**

Los principales factores de riesgo para CM entre mujeres mexicanas según un estudio realizado por López-Carrillo y cols., fueron: La ausencia de hijos, una baja paridad, tener el primer parto a edades tardías y una historia positiva de CM en la familia; mientras que amamantar a los hijos mostró un efecto protector en las mujeres premenopáusicas (8). Romieu y cols. evidenciaron una relación inversa entre la duración de la lactancia y el riesgo de padecer CM, encontrando, tanto en mujeres pre- como posmenopáusicas, un mayor efecto protector con el mayor tiempo de amamantamiento del primer hijo (24). Paredes-López y cols. encontraron relación del CM con la obesidad, la ausencia de lactancia, el uso de anticonceptivos y la presencia de diabetes mellitus (25). Calderón-Garcidueñas y cols. por su parte, encontraron más abortos entre las pacientes con CM que en sus controles (26).

## **1.2. GENÉTICA**

El CM es una enfermedad compleja y heterogénea causada por la interacción de factores genéticos y no genéticos. La mayoría de los casos de CM son de tipo esporádico, es decir, que no existen en la familia antecedentes de otros familiares afectados. Sin embargo, una historia familiar de CM ha sido reconocida desde hace mucho tiempo como un factor de riesgo (27). El CM de tipo hereditario es aquel en el cual la historia familiar muestra la presencia de varios familiares afectados con CM. En estas familias la edad de aparición de la enfermedad es considerablemente menor que en



los casos esporádicos, los casos de CM bilateral son mas frecuentes, y en algunas familias ocurre la presencia de otros tipos de cáncer en los individuos afectados. De éstos, entre los más comunes están: el cáncer de ovario, el de colon, el de próstata, el de endometrio y los sarcomas (4, 28). Se piensa que el tipo hereditario representa del 3 al 10% de todos los CM y que factores hereditarios son responsables del 25 al 35% de todos los casos diagnosticados antes de los 30 años. Cuando una mujer tiene un familiar de primer grado (madre, hermana o hija) que desarrolló CM antes de los 40 años, su riesgo de desarrollar el padecimiento es tres veces mayor que el de la población general. Este riesgo es 5 veces mayor cuando el CM es bilateral y 9 veces mayor cuando es bilateral y de inicio temprano (29). Existe controversia en cuanto al riesgo para los familiares de segundo y tercer grado, ya que mientras algunos estudios les asignan el mismo riesgo que para la población general (30), otros autores refieren un RR de 1.8 para los primeros y de 1.4 para los segundos (31).

Existen casos que no son hereditarios en los que dos o más familiares de primer grado han tenido CM. En éstos, se piensa que algunos factores ambientales a los que la familia está expuesta subyacen a la enfermedad (32). Tales factores incluyen la exposición a carcinógenos en un área geográfica determinada (pudiendo afectar a varios miembros de la familia que vivan en el mismo lugar), factores étnicos y culturales que afectan el estilo y las costumbres de vida (como por ejemplo la edad a la que se tiene el primer parto), el uso de anticonceptivos y el nivel socioeconómico (dada su influencia en el tipo de dieta y demás hábitos que los individuos tienen).

En 1984 Williams y Anderson haciendo un análisis de segregación, fueron los

primeros en proveer evidencias de la existencia de un gen autosómico dominante de susceptibilidad al cáncer de mama, con penetrancia relacionada con la edad (33). Actualmente han sido identificados dos genes de alta penetrancia de susceptibilidad al CM; los genes BRCA1 y BRCA2 (9, 10, 11, 34, 35, 36). Adicionalmente, mutaciones en otros genes, como el gen del receptor de andrógenos (37), el gen p53 en familias con Síndrome de Li-Fraumeni (38), el gen de la enfermedad de Cowden (Síndrome de múltiples hamartomas) (39) y el gen de la enfermedad de Muir, caracterizada por múltiples neoplasias de la piel y del tracto gastrointestinal (40), han sido identificados como causas menos comunes del CM hereditario. Finalmente, existen otros genes más, también de baja penetrancia, como el gen de la Ataxia Telangiectasia (ATM) (41), un raro alelo de un locus minisatélite adyacente a HRAS1 y localizado en el cromosoma 11 (42), y quizá otros aún no identificados, que son responsables del incremento en la susceptibilidad al CM en familias en las cuales existe agregación familiar, más no se les ha podido demostrar un patrón de herencia mendeliano.

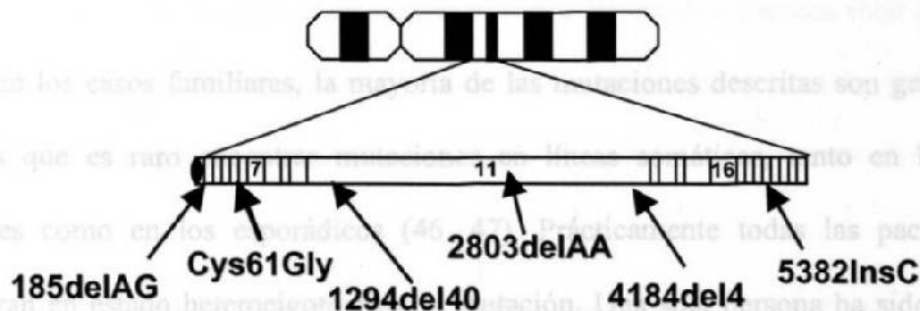
### **1.2.1. El gen BRCA1**

En 1990 se identificó en el cromosoma 17 en 17q21 la región dentro de la cual se encuentra el primer gen de susceptibilidad al CM (Fig. 1), llamado BRCA1 (34, 35). El gen fue clonado y secuenciado por Miki y cols. en 1994 (9), ocupa compuesto de aproximadamente 100 kb del DNA genómico y tiene 24 exones de los que 22 son traducidos. Su estructura es inusual, con la mayoría de los exones en el rango esperado (de 100-500 pb), pero con el exón 11 constituyendo aproximadamente el 60% (alrededor de 3500 pb) de la región codificante. La transcripción del gen origina un RNAm de 7.8

kb de longitud del cual se traducen 5592 nucleótidos, produciendo una proteína de 1863 aminoácidos (9). de ovario, la probabilidad de encontrar mutaciones en este gen es del 92% (30).

### 1.2.1.1. Epidemiología de las mutaciones del gen BRCA1

En un estudio realizado en 214 familias con historia de CM se detectó que sólo el 45% de ellas presentaban ligamiento a este gen. Sin embargo, el porcentaje de familias con mutaciones en BRCA1 se elevó al 70% cuando la edad de diagnóstico del CM en las familias fue de menos de 45 años (43). La frecuencia estimada de mutaciones en el gen BRCA1 en la población general, según ese estudio, es de aproximadamente 1 en 2000. Los judíos ashkenazis son la excepción, ya que la frecuencia en ellos se ha estimado en 1 en 100 (44).



**Figura 1. Mutaciones más frecuentes en el gen BRCA1.** La mutación *185 del AG* en el exón 2 es la más común de todas las mutaciones descritas en este gen y es, junto con la mutación *5382 Ins C*, la más frecuente en judíos. *Cys 61 Gly* ha sido descrita en E.U.A., *1294 del 40* y *4184 del 4* en Gran Bretaña y *2803 del AA* en Holanda y Bélgica.

Frecuentemente, en la mayoría de las familias con menos de 4 casos de CM o cáncer de ovario, la causa no se encuentra relacionada con mutaciones en el gen BRCA1, incluyendo el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla

BRCA1. Sin embargo, cuando existen 2 o más casos de inicio temprano y dos o más casos de cáncer de ovario, la probabilidad de encontrar mutaciones en este gen es del 92% (30).

Estudios iniciales estimaron que las portadoras de mutaciones en el gen BRCA1 tienen un riesgo del 87% de desarrollar CM y del 40 al 60% de desarrollar cáncer de ovario en algún momento de su vida (43). Sin embargo, en estudios posteriores realizados por Struewing y cols. en mujeres y hombres judíos, el riesgo de desarrollar CM fue del 56%, el de cáncer de ovario del 16% y el de cáncer de próstata fue del 6% (44). La explicación de esta diferencia estriba en el sesgo que probablemente tuvieron los primeros estudios, debido a que en ellos fueron seleccionadas las familias con mayor número de casos, tanto de CM como de ovario y con mayor cantidad de mujeres jóvenes. El riesgo de desarrollar formas bilaterales de CM es también mucho más alto en portadoras (45).

En los casos familiares, la mayoría de las mutaciones descritas son germinales, mientras que es raro encontrar mutaciones en líneas somáticas, tanto en los casos familiares como en los esporádicos (46, 47). Prácticamente todas las pacientes se encuentran en estado heterocigoto para la mutación. Una sola persona ha sido descrita con los dos alelos mutados para este gen, habiendo heredado un alelo mutado de cada uno de los padres. Esta persona heterocigota compuesta presentó CM a la edad de 32 años (48).

Se han utilizado una gran variedad de técnicas para detectar mutaciones en el gen BRCA1, incluyendo el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla

(SSCP), la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (49), el ensayo de la proteína truncada (PTT) (50, 51), el análisis de heteroduplex (HDA) (52) y la secuenciación directa. Los trabajos que describieron las primeras mutaciones en el gen BRCA1 mostraron que el 55% se encuentran localizadas en el exón 11, lo cual no es sorprendente, debido a que éste contiene el 62% de la secuencia codificante (53). Del total de mutaciones, el 52% han sido detectadas una sola vez y el 87% de ellas dan como producto proteínas truncadas o ausencia de la proteína. La mayoría provocan cambios en el marco de lectura, con la aparición de codones prematuros de terminación. Han sido identificadas también variantes de corte y empalme ("splicing"). Las mutaciones restantes provocan un cambio de aminoácido, mas no producen una proteína truncada.

Se ha descrito que mutaciones en el extremo 5' del gen predisponen a CM y ovario, mientras que mutaciones en el extremo 3' están asociadas de manera específica a CM (54). Mutaciones localizadas en las dos regiones terminales, parecen estar asociadas a un fenotipo más grave (55), sugiriendo que esas dos regiones pueden ser importantes en el control del desarrollo celular de la glándula mamaria.

El riesgo para otros tipos de cáncer también puede estar incrementado a causa de mutaciones en el gen BRCA1. Un estudio realizado en 1993 en familias numerosas de Islandia, demostró un incremento en la frecuencia de cáncer de próstata (56). Estudios posteriores confirmaron que mutaciones en BRCA1 resultan en un riesgo de 4.11% de padecer cáncer de colon y de 3.33% de padecer cáncer de próstata (57). Sin embargo, mutaciones en este gen raramente se asocian con el CM en varones (58).

Entre el grupo de mujeres jóvenes con CM son más frecuentes las mutaciones en el gen BRCA1 que en el gen BRCA2, por lo cual se piensa que mutaciones en BRCA1 favorecen el inicio temprano de la enfermedad (59).

### 1.2.1.2. Funciones del gen BRCA1

El gen BRCA1 es transcrito en todos los tejidos (60) y aunque se conoce poco acerca de su regulación transcripcional (61, 62), se ha demostrado que los niveles de su RNAm y proteína son alterados por algunas hormonas esteroideas (63, 64). Los estrógenos y una mezcla de estrógenos y progesterona incrementan el RNAm y la proteína en líneas celulares humanas, mientras que en las glándulas mamarias de ratones, la expresión del gen *brca1* (58% de similitud con su homólogo humano BRCA1) se incrementa durante la pubertad y nuevamente durante el embarazo (65).

Estudios de hibridación de RNA del tipo "Northern Blot" en RNAs aislados de glándulas mamarias de ratón, corroboraron que el gen *Brca1* es expresado fuertemente en la glándula mamaria durante el embarazo, permaneciendo los niveles elevados al menos cuatro semanas después de la regresión postlactación del epitelio mamario (60). Así pues, se cree que el gen BRCA1 está implicado en la proliferación de las células epiteliales de la mama y que es regulado al menos de manera secundaria por cambios en las hormonas ováricas durante el embarazo.

Estudios por fraccionamiento celular e inmunofluorescencia han mostrado que la proteína BRCA1 tiene localización intranuclear en células normales, mientras que en

células cancerosas se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma (66), sugiriendo que la localización celular inadecuada de esta proteína pudiera ser un mecanismo por el cual juegue un papel en la patogénesis de los tumores mamarios.

Una región del gen BRCA1 tiene similitud con una secuencia consenso de las graninas (67). Las graninas son proteínas secretadas y modificadas para formar péptidos bioactivos que actúan en la superficie celular. Si la proteína BRCA1 fuera secretada, este sería un hecho inusual para un gen supresor de tumores. Sin embargo, existen evidencias que demuestran que los anticuerpos usados en los experimentos descritos tienen reacción cruzada con el factor de crecimiento epidérmico, una molécula expresada en la superficie celular, por lo cual es posible que lo que se encontró como producto de secreción sea el factor de crecimiento epidérmico y no la proteína BRCA1. Adicionalmente, se sabe que esta secuencia consenso de las graninas no está altamente conservada de manera evolutiva, lo cual sugiere que probablemente no es importante para la función del gen (68).

Aún antes de que se aislara el gen BRCA1, se predijo que tenía una función supresora de tumores. Estas predicciones se basaron en el hecho de que las mujeres heterocigotas en línea germinal para este gen, presentan pérdida de la heterocigocidad cuando se analizan las células tumorales (69). Estudios experimentales donde se hace transferencia retroviral del gen BRCA1 tipo silvestre a líneas celulares tumorales de mama y ovario, demuestran que se inhibe el desarrollo del tumor (70). Lo mismo ha sido demostrado en el ratón desnudo, en el cual el desarrollo de tumores es inhibido en presencia de BRCA1 tipo silvestre, aún cuando exista el gen endógeno mutado,

reforzando la idea de su función como supresor de tumores (71). Shao y cols., han sugerido que este gen también podría jugar un papel en el desarrollo de la apoptosis o muerte celular programada (72). Hakem y cols., suprimiendo la expresión de p53 y de p21, lograron aumentar la sobrevivencia de embriones mutados en los dos alelos de BRCA1 (73), sugiriendo que la mortalidad de los embriones es debida a un arresto del ciclo celular por daño al DNA.

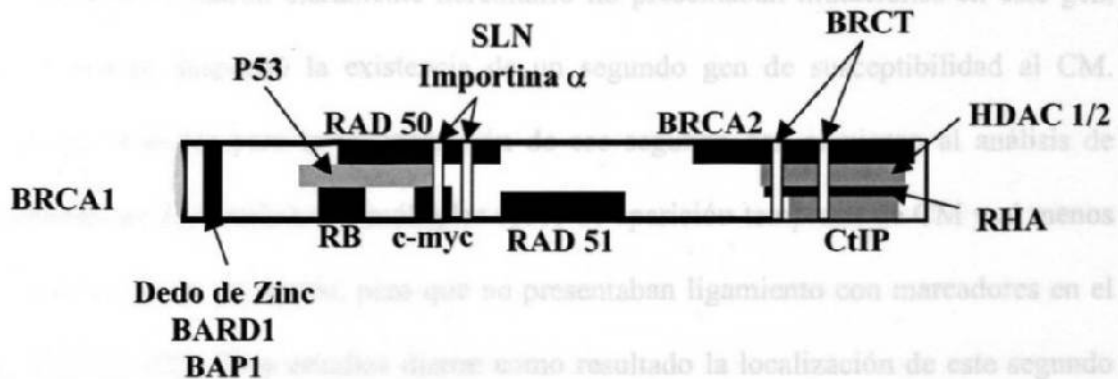
En el extremo 5' del gen existe una región de 126 pb que codifica para un dominio del tipo "dedos de zinc" (9), sugiriendo que la proteína BRCA1 puede funcionar como un factor de transcripción. Aproximadamente el 1% de todos los genes humanos incluyen secuencias para este tipo de estructura. En general, parece que estos dominios habilitan a las proteínas para interactuar con otras moléculas, en algunos casos proteínas y en otras RNA o DNA (74). Recientemente se ha encontrado que la región de dedos de zinc de BRCA1 interactúa con el dedo de zinc cercano al extremo N terminal de la proteína BARD1 (Fig. 2) creando un heterodímero en el cual los dedos de zinc se encuentran en unión estrecha (75). Probablemente BRCA1 y BARD1 cooperan en el reconocimiento de secuencias específicas del DNA, ya que como es sabido, muchos factores de transcripción se unen al DNA sólo después de formar heterodímeros (76).

Estudios recientes han mostrado la existencia de una proteína BAP1 (proteína-1 activadora de BRCA1), a través de la cual la proteína BRCA1 podría actuar como coactivador de la transcripción (77). En la región C terminal el gen BRCA1 tiene un dominio BRCT (BRCA1 C Terminal) similar al que existe en proteínas de mamífero que se unen a p53 (78), sugiriendo que BRCA1 pudiera interactuar con esta proteína para



activar la transcripción de una gran variedad de genes.

Se sabe también que la proteína BRCA1 posee tres secuencias señal de localización nuclear, que permiten a la proteína pasar del citoplasma al núcleo (79). Dichas señales capacitan a la proteína para unirse a un complejo receptor citosólico consistente de una importina alfa y una beta. En el poro nuclear una proteína de unión a GTP supe la energía necesaria para que el complejo importinas-BRCA1 pase a través del poro nuclear (80). En el núcleo la importina beta se disocia, pero la importina alfa acompaña al sustrato al sitio nuclear de acción. La evidencia más reciente de que BRCA1 tiene función en el núcleo es su capacidad para unirse a RAD51, una proteína que se encuentra involucrada tanto en el proceso de recombinación meiótica como en la reparación de rompimientos cromosómicos (81).



**Figura 2. Dominios funcionales identificados en la proteína BRCA1.** Se ilustran los tipos y ubicaciones de los dominios funcionales. BARD1 = Proteína de unión al anillo de Zinc de BRCA1; BAP1 = Proteína 1 asociada a BRCA1; SLN = Señales de localización nuclear; BRCT = Dominio BRCA1 C-Terminal; HDAC 1/2 = Histona-deacetilasas 1 y 2; RHA = RNA elicasa A; CtIP = Proteína interactuante con la proteína de unión C-Terminal.

La proteína BRCA1 es fosforilada de manera dependiente del ciclo celular (82).

Su máxima expresión y fosforilación se observan en la fase S y durante la mitosis. La cinasa 2 dependiente de ciclina y las cinasas asociadas a las ciclinas D y A son capaces de unirse a la proteína BRCA1 y fosforilarla *in vitro*, sugiriendo que la proteína puede ser regulada *in vivo* a través de su fosforilación por estas cinasas. Estudios subsecuentes han mostrado que los niveles del RNA<sup>m</sup> y de la proteína BRCA1 son mas altos en células en rápido crecimiento y disminuyen después de que los factores de crecimiento descenden, elevándose entre G1 y S (64), sugiriendo que puede jugar un papel en el mecanismo de control del ciclo celular a nivel del paso de la fase G1 a la fase S.

### **1.2.2. El gen BRCA2**

Después del descubrimiento del gen BRCA1 se observó que muchas de las familias con un patrón claramente hereditario no presentaban mutaciones en este gen, por lo que se sospechó la existencia de un segundo gen de susceptibilidad al CM. Progresos iniciales para la identificación de ese segundo gen siguieron al análisis de ligamiento de 22 familias con múltiples casos de aparición temprana de CM y al menos un caso de cáncer de ovario, pero que no presentaban ligamiento con marcadores en el gen BRCA1 (83). Esos estudios dieron como resultado la localización de este segundo gen en el cromosoma 13 en las bandas 13q12-13 (Fig. 3); mas específicamente en una región flanqueada por los marcadores D13S289 y D13S267 (84).

El gen BRCA2 fue descubierto por análisis de ligamiento en 1994 (84) y clonado y secuenciado en 1995 (10). Está compuesto de aproximadamente 70 kb de DNA genómico y tiene 27 exones, de los cuales 26 son transcritos. Al igual que para BRCA1,

la mayoría de los exones están en el rango esperado de 100-500 pb, pero con un exón 11 constituyendo aproximadamente la mitad de la región codificante. Origina un RNAm de 14.5 kb de longitud que es traducido en una proteína de 3418 aminoácidos (36).

### **1.2.2.1. Epidemiología de las mutaciones del gen BRCA2**

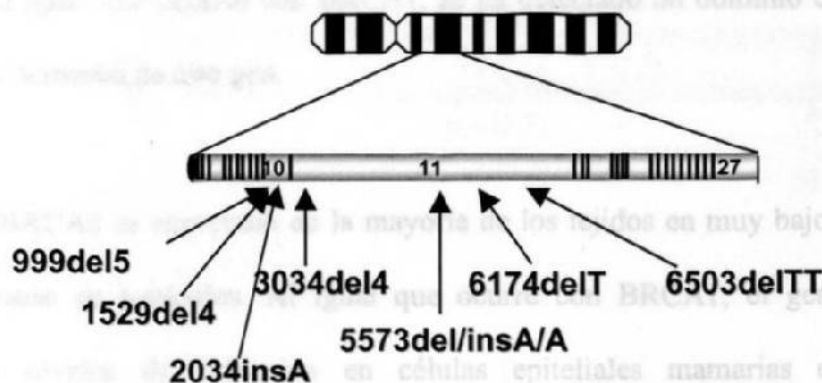
Este gen tiene un perfil de riesgo similar pero no idéntico al del gen BRCA1. Según Neuhausen y cols., el riesgo de padecer CM para las portadoras de mutaciones en BRCA2 es del 85% y del 10 al 20% de padecer cáncer de ovario. Mientras que el riesgo de padecer cáncer de ovario es 20 veces mayor que para la población general, cuyo riesgo es del 1%, es menor que el riesgo de 40 a 60% asociado a BRCA1 (85). Sin embargo, el estudio de Strewing y cols. en hombres y mujeres judíos, mostró un riesgo menor de desarrollar CM que el descrito en los estudios iniciales (56%) (44).

También en contraste con BRCA1, mutaciones en BRCA2 se encuentran asociadas con un riesgo del 6% de padecer CM en varones, lo cual es raro en portadores de mutaciones en BRCA1 (86). Aunque en términos absolutos este riesgo es significativamente menor para varones que para mujeres, el riesgo relativo está incrementado 100 veces con respecto a los varones de la población general. Además, riesgos elevados para el desarrollo de cáncer de próstata, pancreático, de colon y otros han sido asociados a portadores de mutaciones en el gen BRCA2 (36). Las familias que presentan mutaciones en una región de 3.3 kb dentro del exón 11 presentan una frecuencia mas elevada de cáncer de ovario. Por tal razón, a dicha región se le conoce como OCCR (ovarian cancer cluster region) (85), sugiriendo que esta región es

importante para la regulación tejido específica en el ovario. La figura 3 muestra las mutaciones mas frecuentes en este gen.

### 1.2.2.2. Funciones del gen BRCA2

El espectro mutacional del gen BRCA2 cada vez es mejor conocido; mas de 300 mutaciones han sido definidas a la fecha. Estas se expanden a lo largo de la secuencia codificante y no han sido detectados puntos calientes. La mayoría producen proteínas truncadas, principalmente debido a inserciones y deleciones (87, 88), aunque a semejanza de lo que ocurre con BRCA1, también se han encontrado mutaciones que producen codones prematuros de terminación, variantes de corte y empalme y cambios de un aminoácido por otro (89).



**Figura 3. Mutaciones más frecuentes en el gen BRCA2.** La mutación *999del5* ha sido descrita principalmente en Islandia, *1529del4* y *2034insA* en Gran Bretaña y EUA, *3034del4* en Inglaterra y Canadá, *5573del/insA/A* en Gran Bretaña y Francia, *6174delT* en Israel y EUA y *6503delTT* en Gran Bretaña.

Una paciente descrita con mutaciones en línea germinal, tanto en BRCA1 como en BRCA2, presentó CM a los 48 años y cáncer de ovario hasta los 50 años (90).

### 1.2.2.2. Funciones del gen BRCA2

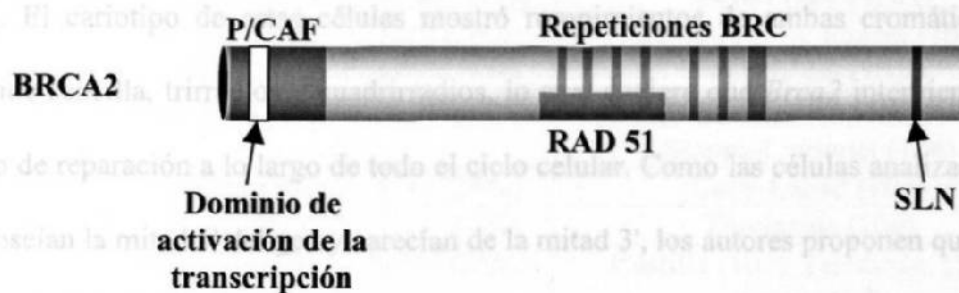
El DNAc de BRCA2 no tiene una similitud significativa con genes descritos previamente y la proteína no contiene algún dominio funcional previamente definido (36). Aunque el gen BRCA2 humano es sólo 59% idéntico al Brca2 del ratón, las estructuras primarias de ambos incluyen 8 repeticiones casi idénticas de una secuencia de 20 a 30 aminoácidos, separadas entre sí por fragmentos no repetitivos de tamaño variable (91). El significado de esa multiplicidad de dominios es que éstos pueden ser importantes para su función. Sin embargo, algunas de esas repeticiones podrían ser redundantes. Al igual que ocurrió con BRCA1, se ha detectado un dominio de granina en el extremo C terminal de este gen.

El gen BRCA2 es expresado en la mayoría de los tejidos en muy bajos niveles, con alta expresión en testículos. Al igual que ocurre con BRCA1, el gen BRCA2 presenta altos niveles de expresión en células epiteliales mamarias en rápida proliferación. También dicha expresión es mas elevada alrededor del paso de G1-S (92). Además, su expresión es incrementada por los glucocorticoides y disminuida por la privación de factores de crecimiento. Finalmente, la proteína BRCA2 también posee señales de localización nuclear (93).

Milner y cols. han demostrado que BRCA2 puede ser un factor de transcripción, ya que el dominio codificado en el exón 3 es capaz de activar la transcripción y muestra

similitud con el dominio de activación de c-Jun, un factor de transcripción conocido (94). Dicha similitud corresponde con el sitio de unión para la cinasa Jun N-terminal (JNK). Esos mismos experimentos sugieren que la activación de la transcripción está bajo el control negativo de secuencias inhibitorias y que las vías de transducción de señales culminan en la estimulación de cinasas semejantes a JNK, las cuales podrían regular la actividad de BRCA2.

La proteína BRCA2 parece interactuar también con RAD51 (Fig 4) a través de dos sitios de unión, uno en el centro y otro en la región BRC terminal de la proteína, sugiriendo una función en la recombinación y en la reparación de rompimientos de doble cadena del DNA, procesos en los cuales participa RAD51 (95).



**Figura 4. Dominios funcionales identificados en la proteína BRCA2.** Se ilustran los tipos y ubicaciones de los dominios funcionales. P/CAF = Factor asociado a la proteína p300/CBP; Repeticiones BCR = Secuencias repetitivas en BRCA2; SLN = señales de localización nuclear.

Aunque las secuencias de los genes BRCA1 y BRCA2 son muy distintas, ambos Shara y cols. han mostrado que los blastocistos deficientes en *Brca2* muestran graves alteraciones en su estructura y función, por lo cual, se ha observado una sensibilidad incrementada a la exposición a rayos X (96). Investigaciones recientes realizadas por Patel y cols. con ratones en cuya línea germinal se ha deletado (Knockout) la región 3' del gen *Brca2*, han implicado al producto del mismo en el proceso de reparación del DNA. Ellos encontraron un deterioro progresivo en la proliferación

celular de fibroblastos de embriones de ratones mutados en ambos alelos del gen *Brca2* (*Brca2tr/tr*). Las células fueron arrestadas en las fases G1 y G2/M del ciclo celular y dicho arresto se acompañó de un incremento en la expresión de p53 y p21 (97). También encontraron que las células analizadas tenían una marcada sensibilidad a varios agentes genotóxicos, pero los mecanismos de apoptosis y regulación del ciclo celular se mantenían inalterados. La reparación de rompimientos de doble cadena durante el proceso de recombinación V(D)J de la cadena pesada de la IgM en células linfoides también permaneció intacta. En estas células también se presentó una moderada sensibilidad a la radiación gama, típica de una reparación defectuosa de rompimientos de doble cadena en el DNA. La sensibilidad a las radiaciones ionizantes podría significar que *Brca2* está implicado en otras vías de reparación diferentes a la reparación de doble cadena. El cariotipo de estas células mostró rompimientos de ambas cromátides, de cromátide sencilla, trirradios y cuadrirradios, lo cual sugiere que *Brca2* interviene en el proceso de reparación a lo largo de todo el ciclo celular. Como las células analizadas por ellos poseían la mitad 5' del gen y carecían de la mitad 3', los autores proponen que no se puede descartar que la región 5' participe en la apoptosis o en la regulación del ciclo celular.

Aunque las secuencias de los genes BRCA1 y BRCA2 son muy distintas, ambos genes presentan grandes similitudes en su estructura y función, por lo cual, se ha propuesto que quizá ambos genes tengan una función celular conjunta o coordinada (98).

### 1.2.3. Distribución poblacional de las mutaciones.

Szabo y King han hecho una excelente revisión de los tipos y frecuencias de las mutaciones en estos genes (99). La proporción de familias de alto riesgo para CM y de ovario debido a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 varía ampliamente entre distintas poblaciones, según puede verse en las tablas 1 y 2.

**Tabla 1. Frecuencias de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en familias con cáncer de mama/ovario de varios países.**

País	BRCA1*	BRCA2*	Referencia
Gran Bretaña	71/339 (21%)	25/290 (9%)	Gayter (52, 54, 87)
Canadá	12/30 (40%)	8/49 (16%)	Simard (100); Phelan (101)
Finlandia	6/88 (7%)	8/100 (8%)	Vehmanen (102)
Francia	38/160 (24%)	14/77 (18%)	Similnikova (103) Stoppa-Lyonnet (104)
Israel	16/34 (47%)	8/34 (24%)	Levy-Lahad (105)
Islandia	1/11 (9%)	7/11 (64%)	Thorlacius (106)
Estados Unidos	69/179 (39%)	24/94 (25%)	Castilla (107); Friedman, (58); Arena (108)
Japón	2/20 (10%)		Inoue (109)
Rusia	25/19 (79%)		Gayther (110)
Holanda y Bélgica	71/517 (14%)		Hogervorst, 1995; Peelen, 1997.
Italia	21/73 (29%)		Montagna (111)
Alemania	9/49 (18%)		Jandrig (112)
Noruega	3/25 (12%)		Andersen (113)

Tomado de Szabo y King (120).

\* Familias con mutaciones/familias examinadas



**Tabla 2. Mutaciones prevalentes por país.**

BRCA1	PAÍS	BRCA2	PAÍS
5382insC	Israel, Rusia	6503delTT	Gran Bretaña
4184del4	Gran Bretaña	3034del4	Gran Bretaña
3875del4	Gran Bretaña	6174delT	Israel, Estados Unidos
185delAG	Israel	999del5	Islandia
2803delAA	Holanda y Bélgica		
Cys61Gly	Estados Unidos		

Fuente: Breast Cancer Information Core.

[http://www.nhgri.nih.gov/Intramural\\_research/Lab\\_transfer/Bic/](http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/).

La antigüedad de la mutación 185delAG ha sido estimada en alrededor de 46 generaciones, o 1000-1500 años. Se ha postulado que la mutación 5382insC tiene un origen Báltico y se originó hace 38 generaciones (99).

Szabo y King postulan que el análisis de mutaciones comunes entre la población africana y otras podría ser informativo acerca del origen y la biología de esos genes y la influencia de factores no genéticos sobre la penetrancia de los alelos mutantes (99). En este sentido los estudios hechos en BRCA1 y BRCA2 entre familias afroamericanas (103) y afrofrancesas (108) podrían ser importantes.

Al parecer existe un efecto de fundadores para la mutación T8555G en BRCA2 en la población Finlandesa (102) y de 999del5 en Islandia (106). Los húngaros por su parte, no parecen mostrar un efecto de fundadores, aunque presentan la más alta mortalidad por CM en varones en Europa (114). Mutaciones en BRCA2 son más frecuentes que mutaciones en BRCA1 entre familias Islandesas (106).

En aproximadamente el 30% de las familias de alto riesgo no han sido detectadas

mutaciones ni en BRCA1 ni en BRCA2, lo que sugiere la existencia de otros genes de susceptibilidad para CM.

El perfil epidemiológico de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en los países en vías de desarrollo es prácticamente desconocido. En Latinoamérica existen muy pocos reportes, sin embargo, es posible que varias de las mutaciones descritas en España sean comunes a nuestra población (Tabla 3)

**Tabla 3. Mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 descritas en Hispanoamérica.**

<b>ESPAÑA</b> Dies y cols., Osorio y cols.		<b>BRASIL</b> Corvello y cols.	<b>MÉXICO</b> Calderón-Garcidueñas y cols.
<b>BRCA1</b>	<b>BRCA2</b>	<b>BRCA1</b>	<b>BRCA1</b>
IVS20+12	936delAAAC	649G>T	IVS20+12
185delAG	2222delAA	1534G>A	
189insTGTC	2370delAA		
330A>G	3009del15		
5625G>T			

Fuente Referencias 115-122.

Actualmente se encuentra en curso el programa MAGIC coordinado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), cuyo propósito es analizar el perfil epidemiológico del CM en poblaciones étnica y geográficamente diversas, para evaluar el efecto que los distintos factores ambientales, socioculturales, dietéticos, y otros, tienen sobre el riesgo de desarrollar CM. Otro propósito del programa MAGIC es conocer la distribución de mutaciones en estos genes en poblaciones aún no analizadas como las de Asia, Africa y Latinoamérica. Los países latinoamericanos participantes hasta este momento en ese programa son Brasil, Argentina, Cuba y México.

Los estudios ya realizados para describir las diferentes mutaciones en BRCA1 y

BRCA2, así como los que se encuentran en curso, permitirán detectar factores ambientales que modifican el riesgo y dilucidar la distribución que han tenido tales mutaciones a lo largo de la historia, acorde con las migraciones y estructuras poblacionales

### **1.3. MANEJO CLÍNICO Y ASPECTOS ÉTICOS**

En virtud de que la investigación aquí propuesta implica acceder información hereditaria de pacientes y la información desprendida de ella es de gran relevancia para los mismos, la presente sección aborda las tendencias actuales sobre el manejo de estos aspectos.

#### **1.3.1. Manejo Clínico.**

No todas las mujeres con CM son candidatas a un estudio genético. En general, la prueba debe ser considerada en primer término en mujeres afectadas con CM y que pertenecen a familias de alto riesgo, es decir, aquellas que han tenido al menos tres familiares de primer grado afectados de CM y/u ovario. Estos casos frecuentemente son de inicio temprano, de tipo bilateral y/o de presentación en varones. No es adecuado el estudio inicial en personas no afectadas con historia familiar positiva, debido a que un resultado negativo en ellas, no descarta que los miembros afectados sí tengan una mutación.

La decisión para proceder con la prueba de detección de mutaciones en BRCA1 y BRCA2 es compleja. Para establecer el riesgo en una paciente, es necesaria la obtención

precisa y detallada de la historia familiar. Shattuck-Eidens y cols., analizando un total de 1086 mujeres con CM y/u ovario, publicaron estimaciones de probabilidad de tener mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, basados en la edad e historia personal y familiar (123).

La historia familiar debe ser lo más detallada posible en cuanto a casos de cáncer, tanto por rama paterna como por rama materna, así como detallando la posición de los familiares afectados dentro del árbol genealógico; los familiares no afectados deben también ser incluidos, dado que la distribución de afectados y no afectados en el árbol genealógico sugiere el modo de herencia. La información debe incluir un mínimo de tres generaciones cuando sea posible. Los datos de la historia familiar deberían ser confirmados por obtención de los reportes histopatológicos para asegurar la exactitud del diagnóstico. También podría ser útil obtener la historia familiar de mas de un miembro de la familia para cotejar la información obtenida. Deben ser obtenidos también detalles tales como la edad de diagnóstico, edades de los individuos no afectados, tipo histológico, sitio del tumor primario y presencia de metástasis. Es importante también tomar nota de la presencia de algunas enfermedades hereditarias que predisponen a los individuos a una gran variedad de neoplasias, como el Síndrome de Li-Frameni, la Anemia de Fanconi y la Ataxia Telangiectasia. Una vez que se detecta una mutación en una mujer afectada, se puede realizar la búsqueda específica de esa mutación en el resto de los miembros de la familia para la detección de posibles portadores(27).

Sin embargo, la gran mayoría de mujeres con historia familiar positiva, caen en la categoría de riesgo moderado. Estas familias se caracterizan por una historia familiar

de CM con pocos casos (tres o menos), la ausencia de casos de cáncer de ovario y diagnóstico de la enfermedad a edades avanzadas. Las bases moleculares para explicar el riesgo de CM en estas familias son menos conocidas que para las familias de alto riesgo, pero frecuentemente no se deben a mutaciones en un gen autosómico dominante. La historia familiar en esas situaciones, típicamente revela la presencia de uno o dos familiares con CM (frecuentemente en etapa posmenopáusica) y no existen antecedentes de otros tipos de tumores. Las causas de agregación familiar en este grupo pueden deberse a: 1) El efecto combinado de múltiples componentes genéticos y agentes ambientales; 2) La presencia de un gen dominante de baja penetrancia; 3) La presencia de un gen autosómico dominante, pero que debido a una historia clínica incompleta no puede ser determinado por el análisis del árbol genealógico y 4) la aparición de dos casos o más de CM por azar, debido a que cada mujer tiene un riesgo de por vida del 10% de desarrollar la enfermedad (124).

Existe un acuerdo general entre los investigadores del área y consejeros genéticos de que las mujeres en familias de alto riesgo deben tener la oportunidad de decidir individualmente si se les realiza o no la prueba para detección de mutaciones en los genes BRCA. Sin embargo, actualmente existen algunas incertidumbres con respecto a la prueba: la distinción entre los positivos verdaderos y los falsos es difícil, debido a que cuando los resultados son negativos, las mutaciones podrían encontrarse en los intrones o en la región regulatoria del gen, o bien, podría haber susceptibilidad genética por otros genes distintos a BRCA1 y BRCA2. Un resultado negativo es más útil cuando ha sido detectada previamente una mutación en un familiar de primer grado. Sin embargo, una mujer en esta situación, aún tiene el mismo riesgo de desarrollar CM y de ovario que la

población general. Por otro lado, el hallazgo de una variante genética puede no representar una verdadera mutación. No está demostrado que todos los alelos "anormales" confieran susceptibilidad al cáncer, incluso mutaciones conocidas proporcionan riesgos distintos en diferentes familias; así, asignar un riesgo preciso para cada mutación es muy difícil. El gran tamaño de los genes y la gran cantidad de mutaciones que han sido descritas a lo largo de ellos, hacen la prueba difícil de realizar y ponerla a disposición de los laboratorios en la práctica clínica diaria. También existe siempre algún riesgo de no interpretar los resultados adecuadamente y de colocar a una familia en una categoría inadecuada de riesgo (125).

Aunque existe cierta controversia acerca de las medidas diagnósticas y terapéuticas a tomar y acerca de la conveniencia de la participación de las familias con alto riesgo de padecer CM (como aquellas que presentan mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2) en protocolos de investigación, se ha establecido un consenso entre los expertos para el manejo de este tipo de pacientes (125).

En portadoras o posibles portadoras de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 se recomiendan las siguientes medidas: autoexamen mamario cada mes después de los 18 años; examen mamario por expertos clínicos cada 6 meses a un año, iniciando entre los 25 y 35 años; practicarse una mamografía anual iniciando entre los 25 y 35 años; realización de un ultrasonido transvaginal cada 6 meses a un año, para descartar neoplasia ovárica, así como determinación de niveles de CA-125 en suero. El CA-125 (una glucoproteína de la superficie celular) es un marcador tumoral que se encuentra elevado en la mayoría de los cánceres de ovario asintomáticos; el ultrasonido

transabdominal estima correctamente el volumen ovárico, pero no es adecuado para distinguir entre lesiones malignas y benignas; en varones el examen rectal y la determinación del antígeno prostático seroespecífico deberían ser hechos cuando menos cada año, iniciando a los 50 años. El examen colorrectal debería ser realizado tanto en varones como en mujeres iniciando a la edad de 50 años (125).

La mastectomía profiláctica como una opción para la prevención de CM debe ser puesta en consideración en este tipo de pacientes. Las indicaciones específicas para una mastectomía profiláctica incluyen una historia familiar y personal de CM, múltiples biopsias previas, resultados no confiables a la exploración física debido a mamas nodulares, hallazgos de tejido mamario denso en la mamografía, mastodinia y cancerofobia. Aunque hasta hace poco tiempo no existía evidencia suficiente de que la mastectomía profiláctica eliminara el riesgo de padecer CM en posibles portadoras, Hatmann y cols., en un estudio retrospectivo en mujeres con historia familiar de CM, compararon aquellas posibles portadoras que habían optado por la mastectomía bilateral con las que no habían recibido tal procedimiento. En este estudio, la mastectomía profiláctica fue asociada a una reducción en la incidencia de CM del 90%(126). La ovariectomía debe también ser puesta en consideración como otra alternativa para disminuir el riesgo de padecer cáncer de ovario, aunque el riesgo nunca es de cero, ya que se han descrito algunos casos que posteriormente desarrollan cáncer peritoneal.

No existe evidencia suficiente para recomendar el abandono del uso de anticonceptivos orales. Por otro lado, el tamoxifeno es recomendado como agente antiestrogénico en mujeres con CM, ya que reduce el riesgo de recurrencia de cáncer

contralateral. (127) El tamoxifeno como agente profiláctico parece adecuado en mujeres de alto riesgo pero no en mujeres de la población general (128).

El raloxifeno es otro modulador selectivo del receptor de estrógenos que también ha sido implicado en la reducción del riesgo de desarrollar CM. Cummings y cols., analizando 7,705 mujeres posmenopáusicas de 180 centros clínicos de 25 países, no seleccionadas por riesgo, encontraron 4 veces menos frecuencia de CM entre el grupo tratado con raloxifeno en comparación con el grupo control (129).

Aunque no existen datos suficientes disponibles acerca del beneficio de modificaciones al estilo de vida, es recomendable el uso de dietas bajas en grasa y altas en fibra, adecuada ingesta de frutas y vegetales, realizar ejercicio regularmente y evitar carcinógenos potenciales como el cigarro (125).

### **1.3.2. Aspectos Éticos**

El manejo de estos pacientes debe ser hecho por un equipo multidisciplinario compuesto de genetistas, oncólogos, enfermeras oncólogas, psicólogos y/o psiquiatras y trabajadores sociales. En estas familias es necesario el asesoramiento genético acerca de riesgos estimados y la vigilancia de los individuos susceptibles. Aspectos como la calidad de vida, y otras consideraciones personales deben ser tomados en cuenta. Debido a que las recomendaciones están basadas en beneficios potenciales, pero aún no probados, las decisiones deben ser compartidas entre el paciente y el equipo médico que lo supervisa, después de revisar la evidencia disponible (130, 131).



El aspecto psicológico en pacientes y portadores debe también ser tomado en cuenta, por lo cual el equipo debe incluir psicólogos y/o psiquiatras, ya que la respuesta a un resultado positivo de la prueba es incierta, pudiendo generar ansiedad, depresión o incluso alteraciones más severas. Por otro lado, un resultado negativo podría no ser necesariamente tranquilizador para la paciente, ya que podría generar angustia al no saber cual o cuales factores están incrementando el riesgo en su familia. Por lo tanto, es responsabilidad del equipo salvaguardar hasta donde sea posible la integridad del paciente en este aspecto. Es recomendable que el resultado no sea dado a los portadores menores de 18 años directamente, sino a sus padres o tutores. Los resultados deben ser confidenciales, protegiendo la privacidad de los pacientes y asegurando que cada miembro de la familia participe y reciba el resultado por su propia voluntad y no influenciado por presiones familiares (125, 130, 131).

Una razón frecuentemente argüida por las pacientes para rechazar hacerse la prueba de identificación de mutaciones, es el temor de que si los resultados son positivos, ésto pueda causar discriminación, tanto para la obtención de empleos, como para la obtención de seguros o que representa en el costo de las primas de los mismos. La razón mas frecuentemente manifestada por las pacientes para aceptar realizarse la prueba, es conocer el riesgo de desarrollar CM en su familia, principalmente en las hijas (132). Con el propósito de evitar la posibilidad de que la información genética sea mal utilizada, dos leyes han sido promulgadas en E.U.A.: "The American with Disabilities Act" promulgada en 1990, que protege contra diferentes tipos de discriminación a todos los individuos que poseen alguna discapacidad, condición en la cual podrían ser considerados los portadores de predisposición a algún padecimiento genético(133); y la

“Health Insurance and Portability and Accountability Act (HIPAA)”, promulgada en 1996, la cual es popularmente conocida como la legislación de Kassebaum-Kennedy; ésta tiene como uno de sus principales objetivos proveer la accesibilidad a seguros para individuos con condiciones médicas preexistentes(134).

La disponibilidad de pruebas genéticas presintomáticas y de predisposición a enfermedades ha generado la necesidad de una legislación prohibiendo la discriminación en los seguros médicos. Un comité de profesionales de la Universidad del estado de Carolina del Sur, convino en desarrollar una legislación que proteja la privacidad genética en ese estado, la cual posteriormente ha sido extendida a otros estados de la Unión Americana. Dicha legislación impide a las compañías de seguros negarse a cubrir seguros en base a información genética. Esta ley protege también la privacidad de la información genética y prohíbe el desarrollo de pruebas genéticas sin el consentimiento informado específico de la persona en cuestión. La definición de información genética incluye tanto los resultados de las pruebas, como la historia familiar de enfermedades genéticas(135).

El manejo de las pacientes de alto riesgo idealmente debe ser realizado en clínicas especializadas en atender casos familiares de cáncer, tal como ocurre en Inglaterra, donde las clínicas de cáncer familiar fueron establecidas en 1946 y actualmente están organizadas de una manera regional. Las clínicas familiares proveen especialistas clínicos experimentados en genética, oncología, psicología y consejería. En Francia, la “French Cooperative Group Network” ha sido formada para coordinar la colección de datos de tales clínicas y ha sido altamente eficiente en identificar familias

con ciertos fenotipos de cáncer para estudios colaborativos internacionales. Estas clínicas aseguran un manejo mas adecuado de las pacientes y sus familias, debido a que existe la interacción de diversos expertos que se encuentran en una misma área, a los cuales puede ser canalizada la familia (136). En países donde estas clínicas no existen, los médicos deben contar con guías adecuadas para la evaluación e interpretación de la historia familiar; establecer los mecanismos que permitan la interacción entre genetistas y aquellos que proporcionen la ayuda primaria a los pacientes y el establecimiento de un sistema de vigilancia y manejo sistemático de estos pacientes (137).

## 1.4. JUSTIFICACIÓN

Hasta la fecha, nuestro conocimiento acerca de los genes de susceptibilidad al CM y otros tipos de cáncer, BRCA1 y BRCA2, ha permanecido limitado a Europa, Norteamérica y Australia, mientras que la frecuencia y tipo de mutaciones consideradas como de alto riesgo en Asia, Africa y Latinoamérica permanecen inexploradas. Dada la gran variación en las proporciones de incidencia de los diferentes tipos de cáncer en diferentes partes del mundo, es importante conocer la frecuencia y tipo de mutaciones en nuestra población y saber si el riesgo conferido por mutaciones en estos genes en nuestra población, varía con los factores étnicos específicos o es independiente de ellos, ya que se sabe que diversos factores, además del genético, influyen en la incidencia del CM. El análisis de mutaciones y su correlación con distintas variables clínicas en nuestra población, nos permitirá conocer la epidemiología molecular de los genes mencionados, analizar la exposición a diferentes factores de riesgo en mujeres jóvenes y casos familiares y compararla con la descrita para otras poblaciones. Además, se podrá implementar esta prueba para uso clínico, siendo útil para predicción de riesgo y de diagnóstico temprano, lo cual eventualmente permitirá la toma de medidas preventivas y terapéuticas en etapas más tempranas, esperando que esto eleve las expectativas de vida de las personas con predisposición al CM en nuestro país.

## **CAPÍTULO II**

### **2. HIPÓTESIS**

La frecuencia y tipos de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en la muestra en estudio serán diferentes a las descritas para familias europeas, anglosajonas y afroamericanas de Estados Unidos, pero semejantes a las de familias españolas.

## **CAPÍTULO III**

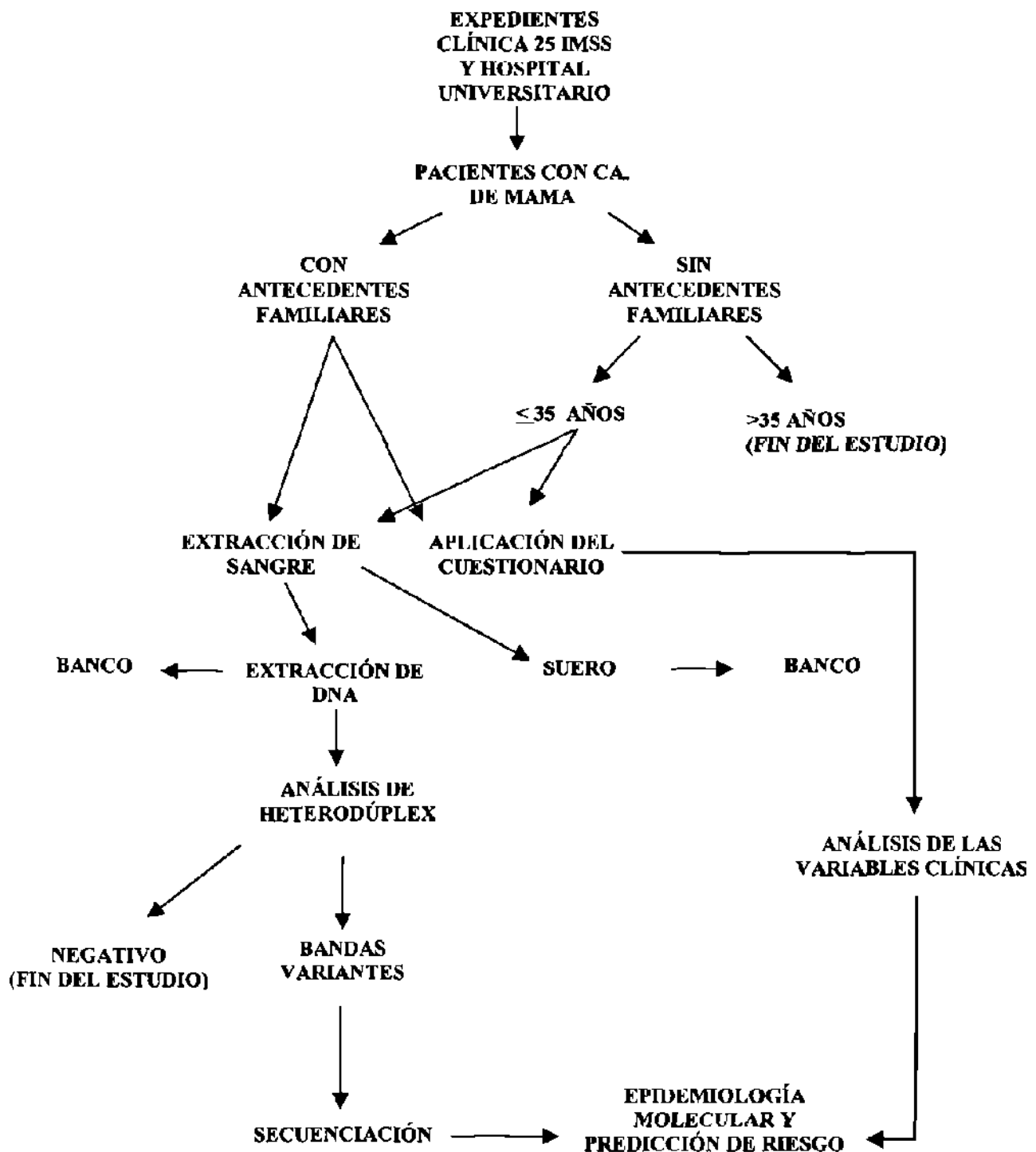
### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer la frecuencia y tipos de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en pacientes del Noroeste de México con cáncer de mama.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer la frecuencia y tipos de mutaciones en el gen BRCA1
2. Establecer la frecuencia y tipos de mutaciones en el gen BRCA2.
3. Comparar los resultados del estudio con los descritos en otras poblaciones.
4. Analizar y correlacionar los datos clínicos con los resultados moleculares.

**ESTRATEGIA GENERAL**

**Figura 5. Estrategia seguida para el desarrollo del proyecto de investigación.** Fueron colectadas muestras de sangre de las pacientes seleccionadas; con la sangre se hizo extracción de DNA; con éste se realizaron PCRs; con los productos de amplificación se hicieron heteroduplex; finalmente, las muestras positivas para heteroduplex fueron secuenciadas y correlacionadas con las variables clínicas.

## CAPÍTULO IV

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. ÁREA DE TRABAJO, REACTIVOS Y EQUIPO

**4.1.1. Área de trabajo:** El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L y en el Departamento de Epidemiología Genética de The International Agency for Research on Cancer.

**4.1.2. Material Biológico:** Sangre periférica de las pacientes, utilizando EDTA como anticoagulante.

**4.1.3 Reactivos químicos:** Para el aislamiento de DNA se utilizó EDTA, SDS, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, NaHCO<sub>3</sub>, y trizma base, adquiridos de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA), así como etanol, de la compañía Merk (México, D.F).

Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo utilizando el estuche comercial de Polimerasa Taq Platino (Platinum aqPCR<sub>x</sub> DNA Polymerase, GIBCO-



BRL, Life Tech, Gaithersburg MD, EUA) y dNTPs y dATP<sup>33</sup>P (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA). Para las electroforesis en geles de agarosa se utilizó agarosa, trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol y bromuro de etidio y para las electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizó MDE (FMC Cat 50620, Rockland Maine, EUA), TEMED (BioRad, CA, EUA), EDTA y trizma base (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA), glicerol anhidro bidestilado (Eurobio, London, Eng), persulfato de amonio (Biorad, CA, EUA) y SIGMACOTE (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA). Como patrones de referencia de tamaño en las electroforesis de agarosa, se utilizó el marcador de peso molecular "100 pb DNA ladder" (Gibco BRL, Life Tech, Gaithersburg MD, EUA). Fueron utilizados además: Formamida (MERK, México, D.F.), NaOH (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA)) para la solución de parada. El TBE 10X para heteroduplex estuvo constituido de Tris, ácido bórico y EDTA.

Para la purificación de los productos amplificados fueron utilizadas dos enzimas: la fosfatasa alcalina (1.2 U) y la exonucleasa I (6 U) (PCR Product Pre-Sequencing Kit, Gibco-BRL, Life Tech, Gaithersburg MD, EUA). La reacción de secuenciación fue llevada a cabo utilizando el estuche comercial T7. Sequenase 2.0 (Gibco-BRL, Life Tech, Gaithersburg MD, EUA) y para los geles se utilizaron además: acrilamida y N,N-metilenbisacrilamida (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) y urea (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA)).

**4.1.4 Materiales:** Los tubos de microcentrífuga (de 0.2, 0.5, 1.5 y 2.0 ml), las puntillas (de 0.01, 0.2 y 1.0 ml) para las micropipetas de precisión, los tubos cónicos de

polipropileno (de 15 y 50 ml) y los guantes de látex fueron adquiridos de Cell Associates (Houston, TX, EUA). Las micropipetas de precisión de volumen variable de 2, 10, 20 200 y 1000 µl fueron obtenidos de Rainin Instruments (Woburn, MA, EUA). Parte de las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo en una microplaca de 96 pozos (Microtest III Flexible Assay Plate, 96U-Buttom Wells, Polylabo). Para desprender los geles de heteroduplex y secuenciación fue utilizado papel Whatman 3 MM (Millipore, Bedford, MA, EUA) y para revelarlos se usaron Films Kodak Bio Max MR (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA).

**4.1.5 Equipo:** En el aislamiento de DNA se utilizó una centrífuga clínica de mesa Beckman TJ6, un vórtex modelo 37600 de Thermolyne (Dubuque, IA, EUA), una balanza granataria Sartorius modelo 1206 MP (Cambh, Göttingen, Ger) y una microcentrífuga Eppendorf modelo 5412 (Hamburg, Ger). Para valorar la cantidad y calidad del DNA se utilizó un espectrofotómetro DU-70 (BECKMAN). El termociclador utilizado fue: Perkin Elmer Cetus 9600 de 96 pozos (Norwalk, CT, EUA).

Para analizar los productos amplificados por la PCR, se utilizaron cámaras de electroforesis horizontal Fotodyne (Hartland, WI, EUA). Para correr los geles de heteroduplex y secuenciación se utilizó un sistema de electroforesis vertical con vidrios de 40 X 40, cámara modelo S2, y fuente poder de 3000V (Life Tech, Gaithersburg MD, EUA).

Para analizar los geles de agarosa, se utilizó el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 y el programa molecular Analyst de Bio Rad (Hercules, CA, EUA).

**4.1.6 Apoyo computacional:** El procesamiento de datos fue realizado en una computadora modelo Acer Power P75 y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BioRad, CA, EUA). El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word 97* (Microsoft Corporation), Procesadores gráficos *Microsoft Power Point 97* (Microsoft Corporation), Adobe Photoshop *Limited Edition 2.5.1* (Adobe System Incorporated) y UMAX Scan (UMAX Scanner Driver, Impact Research, Inc).

Se utilizó el programa computacional Molecular Analyst (BioRad, CA, EUA). Los programas utilizados por vía INTERNET fueron: *Entrez* (National Center for Biotechnology Information (NCBI); BLAST Network Service (Blaster); *Gen Bank* (Icebeg, Trieste, Italia). El programa utilizado para comunicación en la red fue el *Microsoft Internet Explorer* versión 4.0

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1. Pacientes**

De la revisión de los casos de CM en los archivos de la Clínica 25 del IMSS en el período correspondiente del 1° de enero de 1998 al 30 de abril de 1999 se seleccionaron pacientes candidatas para formar parte del estudio. Lo mismo fue hecho

con los casos presentados en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León (período correspondiente del 1° de enero de 1993 al 30 de abril de 1999). A las candidatas a participar que fueron localizadas a través de los departamentos de trabajo social de ambos hospitales se les invitó a participar en el estudio.

Las pacientes fueron seleccionadas en función de: A) una edad de diagnóstico igual o menor a 35 años y/o B) sus antecedentes familiares; definiendo como pacientes con antecedentes familiares positivos aquellas que reúnen cualquiera de los siguientes criterios: 1) Dos casos diagnosticados antes de los 50 años en familiares de primer grado. 2) Un caso diagnosticado antes de los 50 años y un caso de cáncer de ovario diagnosticado a cualquier edad en familiares de primer grado. 3) Un caso diagnosticado antes de los 50 años y otro en un varón diagnosticado a cualquier edad en familiares de primer grado. 4) Cuatro casos diagnosticados antes de los 60 años en familiares de segundo grado. 5) Cinco casos o más diagnosticados antes de los 60 años en familiares de segundo y tercer grado.

En la investigación epidemiológica se diseñó el cuestionario que incluyó datos clínicos, patológicos, historia familiar y factores de riesgo (ver anexo 1 en el apéndice). Todas las pacientes fueron informadas del estudio y se recabó su anuencia mediante una carta de consentimiento informado (Anexo 2), que incluyó la autorización de las pacientes para contestar el cuestionario y la donación voluntaria de 10 ml de sangre venosa.

#### **4.2.2. Investigación Experimental**

El proyecto fue aprobado por los comités de ética de ambos hospitales. A cada paciente se le extrajeron 10 ml de sangre venosa periférica, a la cual se le hizo extracción de DNA(138). Con las muestras de DNA se realizaron ampliificaciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCRs), de diferentes fragmentos de DNA correspondientes a los exones y parte de los intrones de los genes BRCA1 y BRCA2. Con los productos de PCR, se realizó análisis de heteroduplex (74, 168) para detección de variantes en estos genes. Las variantes encontradas fueron secuenciadas (168) para identificar las mutaciones específicas.

##### **4.2.2.1. Manejo de la muestra**

La sangre se depositó en un tubo de vidrio con EDTA facilitada por el sistema de aspiración por vacío y se mezcló de manera inmediata pero suavemente con el anticoagulante. Las muestras se mantuvieron a 4° C hasta por un máximo de tres días antes de su procesamiento.

##### **4.2.2.2. Extracción de DNA**

El plasma fue congelado a -20° C para estudios futuros, mientras que del paquete globular se obtuvo DNA por la técnica de salado (167).

**Técnica de Salado:**

1. El paquete celular obtenido fue colocado en un tubo de 50 ml Se agregaron 20 ml de solución de lisis para eritrocitos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155mM,  $\text{NaHCO}_3$  10mM, EDTA 0.1mM pH 7.4).
2. Se incubó la muestra en hielo durante 15 min, mezclando ocasionalmente de manera suave. El tubo se centrifugó por 10 min a 5,000 rpm.
3. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de leucocitos en 10 ml de buffer de lisis para eritrocitos, se dejó 5 min en hielo y posteriormente se centrifugó como en el paso anterior.
4. Se eliminó el sobrenadante y se lavó suavemente la pastilla con solución de lisis para eritrocitos, sin desprenderla. La pastilla se resuspendió en 3 ml de buffer de lisis para leucocitos (Tris-HCl 10mM, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM pH 8.2).
5. Se agregaron 0.2 ml de SDS al 10% y 60  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (10 mg/ml). Posteriormente se incubó a 37° C durante toda la noche.
6. Todo el contenido fue transferido a un tubo de 15 ml Se agregó 1 ml de NaCl 6M. Se agitó vigorosamente por 15 min
7. Se centrifugó por 15 min a 5,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de 15 ml y se volvió a centrifugar como en el paso anterior.
8. El sobrenadante fue transferido a otro tubo de 15 ml y se precipitó con dos volúmenes de etanol al 100%, mezclando suavemente hasta que desapareció la interfase formada y apareció la hebra de DNA.
9. La hebra de DNA fue transferida a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, el cual se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min

10. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugo a 14,000 RPM por 5 min
11. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue secada, manteniéndola cerca del mechero en una campana de extracción por una h aproximadamente, para luego diluir la pastilla en 200 a 500  $\mu$ l de TE (EDTA 1mM y Tris-HCl 10mM).
12. La integridad del DNA fue valorada por electroforesis en gel de agarosa al 1% y su pureza fue medida en un espectrofotómetro DU-70 (Beckman) con la relación 260/280 nm. Se hizo cuantificación por densitometría utilizando un marcador de peso molecular de concentración conocida en el aparato Gel Doc 1000, de BioRad. El DNA resuspendido se almacenó a 4° C.

#### **4.2.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo utilizando un estuche comercial de DNA Polimerasa Taq Platino (Gibco-BRL, Life Tech, Gawthesbourg MD, EUA).

1. Se colocaron 50 ng del DNA a estudiar en cada uno de los tubos eppendorf de 200  $\mu$ l apropiadamente marcados, incluyendo los controles y un tubo adicional con 2  $\mu$ l de agua que sirvió como control negativo de la reacción. Se colocaron los tubos con DNA sobre hielo (4° C) mientras se preparaba la mezcla de la reacción.
2. Se procedió a preparar la reacción necesaria para el número de muestras. Toda la manipulación y distribución se llevó a cabo a 4°C. La mezcla de reacción estuvo constituida de: 2  $\mu$ l de DNA genómico a 25 ng/ $\mu$ l, 1.5  $\mu$ l del amortiguador (10X

Life Tech), 0.45  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (50 mM, Life-Tech), 0.4  $\mu$ l de dNTPs (5 mM, Pharmacia), 0.75  $\mu$ l de cada iniciador (10  $\mu$ M), 0.06  $\mu$ l de DNA Taq Platinum polimerasa (5U/ $\mu$ l, Life Tech), 0.05  $\mu$ l de  $dATP^{33}P$  (Amersham) y 9.04  $\mu$ l de agua, para un volumen final de 15  $\mu$ l por tubo. Se preparó suficiente volumen de la mezcla de reacción como tubos se tuvieron.

3. Se transfirieron 13  $\mu$ l de la mezcla de reacción a cada uno de los tubos con el DNA. Se mezclaron los componentes asegurándose que toda la mezcla quedaba en el fondo de tubo.
4. Se programó el termociclador (Perkin Elmer Cetus 9600) para llevar a cabo la amplificación utilizando las condiciones requeridas de acuerdo a los iniciadores seleccionados.

La tablas 4 y 5 son un ejemplo de una de las reacciones de PCR utilizadas, con un juego de iniciadores con temperaturas de alineamiento de 50°C y una concentración de 1.5 mM de  $MgCl_2$ .

**Tabla 4. Forma de preparación de las reacciones de PCR.**

REACTIVO	Cantidad $\mu$ l	Concentración Final
Agua Estéril	9.04	
Buffer de la Enzima 10X	1.5 0	1X
$MgCl_2$ (50 mM)	0.45	1.5 mM
DNTPs (5 mM)	0.4	0.25 mM
Iniciador A (10 $\mu$ M)	0.75	0.5 $\mu$ M
Iniciador B (10 $\mu$ M)	0.75	0.5 $\mu$ M
$dATP^{33}P$	0.05	
Taq Platino	0.06	0.3 U
DNA	2.0	10-100 ng
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>15.0</b>	

Tomado de Sinilnikova y cols., 1999 (165).



**Tabla 5. Ejemplo de PCR para iniciadores que hibridan a 50°C.**

PARÁMETROS	Fragmentos cortos (≤ 500 pb)	Fragmentos largos (> 500 pb)
Desnaturalización inicial	2 min a 94° C	5 min a 94° C
Desnaturalización	30 seg a 94° C	30 seg a 94° C
Apareamiento	30 seg a 50° C	30 seg a 50° C
Extensión	40 seg a 72° C	1 min a 72° C
Extensión final	3 min a 72° C	5 min a 72° C

Sinilnikova y cols., 1999 (139). La lista completa de los iniciadores utilizados, sus tamaños, temperaturas de apareamiento y concentración de magnesio, pueden ser vistas en el anexo 3 del apéndice.

#### 4.2.2.4. Análisis de heteroduplex

1. Una vez terminada la amplificación, se desnaturalizaron las muestras a 96°C por 10 min y se dejaron reposar por 45 min a temperatura ambiente (24°C) para permitir una renaturalización lenta para la formación de heteroduplex.
2. Se adicionaron 10 µl de solución para detener la reacción [formamida 95%, NaOH 10 mM, azul de bromofenol (AB) 0.05%, Xilene Cianol (XC) 0.05%].
3. Se preparó un gel de MDE (FMC Cat 50620) de la siguiente manera:

La tabla 6 muestra la forma como fueron preparados los geles para el análisis de heterodúplex.

**Tabla 6. Forma de preparar los geles para heteroduplex.**

REACTIVO	FRAGMENTOS CORTOS (≤500 PB)	FRAGMENTOS LARGOS (≥500 PB)
Agua	36.4 ml	49.5 ml
Solución MDE	28.0 ml	15.6 ml
TBE 10X para heteroduplex (Tris 0.9 M, ácido bórico 0.9 M, EDTA 2 mM).	4.5 ml	4.0 ml
Glicerol anhidro bidestilado (EUROBIO).	5.6 ml	5.6 ml
PSA (Biorad) al 10%.	400 µl	268 µl
TEMED (Biorad).	40 µl	40 µl
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>75 ml</b>	<b>75 ml</b>

Sinilnikova y cols., 1999 (139).

4. El gel fue preparado en vidrios de 40 X 40 cms para sistema de electroforesis vertical (modelo S2, Life Tech). Antes de la preparación, una cara de uno de los vidrios fue cubierto con una capa de SIGMACOTE (SIGMA) para que el gel permaneciera adherido únicamente a uno de ellos. El tiempo de polimerización fue de una h a temperatura ambiente.
5. Una vez colocado el gel en el sistema, las cámaras superior e inferior se llenaron con buffier para heteroduplex al 0.6%. Antes de correr el gel, se enjuagaron los carriles para remover los restos de poliacrilamida de los pozos. Se depositaron 10 µl de cada muestra por carril.
6. Se corrió el gel por 12 a 18 h dependiendo del tamaño del fragmento. Se ajustó el poder a 1000 V, 10 W y 15 mA durante la electroforesis, y se procuró mantener la temperatura entre 25 y 30°C.
7. La electroforesis duró 12 h para fragmentos de entre 200 y 400 pb, y 18 h para fragmentos entre 500 y 1000 pb. En un gel de este tipo, el XC equivale a una banda de 300 pb. Cuando se corren fragmentos menores de 500 pb, este marcador debe estar al menos a la mitad de la longitud de los vidrios. Para fragmentos largos, debe permitirse que salgan ambos marcadores (XC y AB).
8. Se detuvo la electroforesis y se removió el gel del aparato, se colocó sobre la mesa y se separaron los vidrios cuidadosamente, utilizando una espátula de metal. La parte adherida del gel quedaba hacia abajo.
9. El gel fue retirado del vidrio por adherencia a una hoja de papel Whatman 3 MM y se puso a secar por 45 min a 80°C en un secador de geles (BioRad).
10. Posteriormente fue obtenida una autorradiografía por exposición de un Film Kodak (Bio Max MR Amersham) al gel en un cassette de rayos X a temperatura

ambiente exponiendo de 6 a 12 h dependiendo de como se estimaba que el radioisótopo tuviera actividad.

11. Finalmente, la autorradiografía se reveló y se interpretaron los resultados.

#### **4.2.2.5. Secuenciación**

Para realizar esta técnica fue utilizado el estuche comercial T7 Sequenase 2.0 (USB, UK).

1. Una vez identificadas las variantes de heteroduplex, a las regiones del gen que resultaron positivas mediante ese análisis, se les volvió a efectuar una amplificación de DNA por PCR en un volumen final de 30  $\mu$ l.
2. Se revisó la concentración poniendo 5  $\mu$ l del producto amplificado en un gel de agarosa al 2%, utilizando un marcador de peso molecular “100 pb DNA ladder” (GIBCO, BRL, Gaithersburg MD, EUA), se corrió por media h a 100 V. Se tiñó con bromuro de etidio y fue cuantificado en el analizador de imágenes.
3. A 7  $\mu$ l de producto de PCR, se añadieron 1.2  $\mu$ l de una mezcla a volúmenes iguales de dos enzimas: la fosfatasa alcalina (1.2 U) y la exonucleasa I (6 U) (PCR Product Pre-Sequencing Kit, USB cat US70995).
4. Se centrifugaron los tubos, se añadió 1  $\mu$ l del iniciador para secuenciación 10  $\mu$ M, se sometió a ebullición por 3 min, se centrifugó muy rápidamente (un pulso) y se cubrieron los tubos con hielo por 5 min. A los tubos preparados de esta manera se les llamó tubos 1.
5. Una nueva serie de tubos, llamados tubos 2, fueron preparados utilizando el estuche T7 Sequenase 2.0, según se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Preparación de la mezcla de la reacción de secuenciación.**

REACTIVO	X1 ( $\mu$ l)	X10
Buffer de <u>reacción</u> de la enzima	2	20
DTT	1	10
Deasa Labeling Mix dGTP	0.4	4
dATP <sup>α33</sup>	0.4	4
Agua ultrapura	2.5	25
Secuenasa 0.16 $\mu$ l + Buffer de <u>dilución</u> de la enzima 1.04 $\mu$ l.	1.2	12
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>7.5</b>	<b>75</b>

Sinilnikova y cols., 1999 (139).

6. Se colocaron los tubos en hielo.
7. En una microplaca de 96 pozos (Microtest III Flexible Assay Plate, 96U-Buttom Wells, Polylabo), se repartieron 2.5  $\mu$ l de deasa ddATP por pozo, e igual se hizo para ddCTP, ddGTP y ddTTP.
8. Se añadieron 7.5  $\mu$ l de la mezcla de cada tubo 2 dentro de cada tubo 1 y se dejó a temperatura ambiente. En ese momento daba inicio la reacción de la secuenasa.
9. Se sirvieron 3.5  $\mu$ l de la mezcla precedente a cada deasa ddNTP y después 4  $\mu$ l de solución de parada de la reacción (La composición de esta solución es semejante a la usada en el método de Análisis de Heteroduplex).
10. Si las muestras no eran corridas inmediatamente, se conservaban a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
11. Las muestras fueron corridas en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 6% y 7% de urea en vidrios de 40x40 cms. Se utilizó el mismo sistema de electroforesis que para los heteroduplex.
12. La preparación del gel para secuenciación fue de la siguiente manera:

48 g de urea

10 ml de TBE 10 X para secuenciación (TRIS 1.3 M, Ácido Bórico 400 mM y EDTA 25 mM).

15 ml de una solución de acrilamida/bisacrilamida 29/1 al 40%.

El volumen se ajustó a 100 ml y se calentó a 65° C para disolver la urea.

Se dejó enfriar, para luego agregar 240 µl de PSA al 10% y 60 µl de TEMED.

13. Las reacciones de secuenciación se desnaturalizaron durante 5 min a 96°C y se colocaron rápidamente en hielo a fin de conservar la conformación de hebra simple.
14. El gel fue corrido previamente por 10-15 min, se detuvo y se limpiaron los pozuelos, antes de cargar las muestras, las cuales fueron depositadas a razón de 3.5 µl por pozuelo. Cada base correspondió a una línea del gel.
15. La migración electroforética se efectuó en condiciones desnaturalizantes a 45 mA, 70 W y 3000 V. Esta se hizo larga (4 h) o corta (2 h) dependiendo de la distancia de lectura deseada después del iniciador.
16. Al terminar la migración se despegaron los vidrios, teniendo cuidado de no romper el gel. Este se cubrió con papel Whatman 3 MM, se recuperó adherido a éste y una película radiográfica fue expuesta a él, de la misma manera que como se hizo para los geles de heteroduplex.
17. Se expuso el film a temperatura ambiente entre 12 y 24 h, dependiendo de la actividad del radioisótopo.
18. Finalmente, se reveló la película radiográfica y se leyeron los resultados.

## **CAPÍTULO V**

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1. LA MUESTRA DE ESTUDIO**

De la revisión de los casos de CM en los archivos de la Clínica 25 del IMSS en el período correspondiente del 1° de enero de 1998 al 30 de abril de 1999 se seleccionaron 82 familias candidatas para formar parte del estudio, mientras que de los casos presentados en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León (período correspondiente del 1° de enero de 1993 al 30 de abril de 1999), se identificaron 85 familias candidatas. Por diversas razones como: cambio de domicilio, fallecimiento, teléfono y domicilio equivocados, nombre incorrecto, etc., de las 167 familias, fue posible contactar solo a 86 pacientes, y de éstas, finalmente solo 66 aceptaron participar en el estudio. Veintiseis de las pacientes pertenecen al Hospital Universitario y cuarenta a la Clínica 25 del IMSS.

A todas las pacientes se les se les dió preasesoramiento genético y se les llenaron cuestionarios que incluyeron: los árboles genealógicos y variables epidemiológicas, clínicas y de exposición a factores medio ambientales (anexo 1). Cuatro de las pacientes (6 %) no aceptaron donar sangre, y en siete no fue posible hacer el estudio molecular, debido a la escasa cantidad del DNA recuperado o a la degradación del mismo. A las 55

restantes se les realizó el estudio, y la tabla 8 muestra la manera como fueron agrupadas las pacientes.

**Tabla 8. Clasificación de las pacientes del estudio por grupo, de acuerdo a la edad de presentación de la enfermedad y a los antecedentes familiares.**

GRUPO	N	PROMEDIO DE CASOS POR FAMILIA
Mujeres < 35 años	36	1
Casos familiares de CM*	16	2.7
Casos familiares de CM/CO	2	1
Casos con CM en Varones	1	2
<b>Total</b>	<b>55</b>	

\*CM = Cáncer de mama; CM/CO = Cáncer de mama y Ovario

## 5.2. ANÁLISIS DE HETERODUPLEX

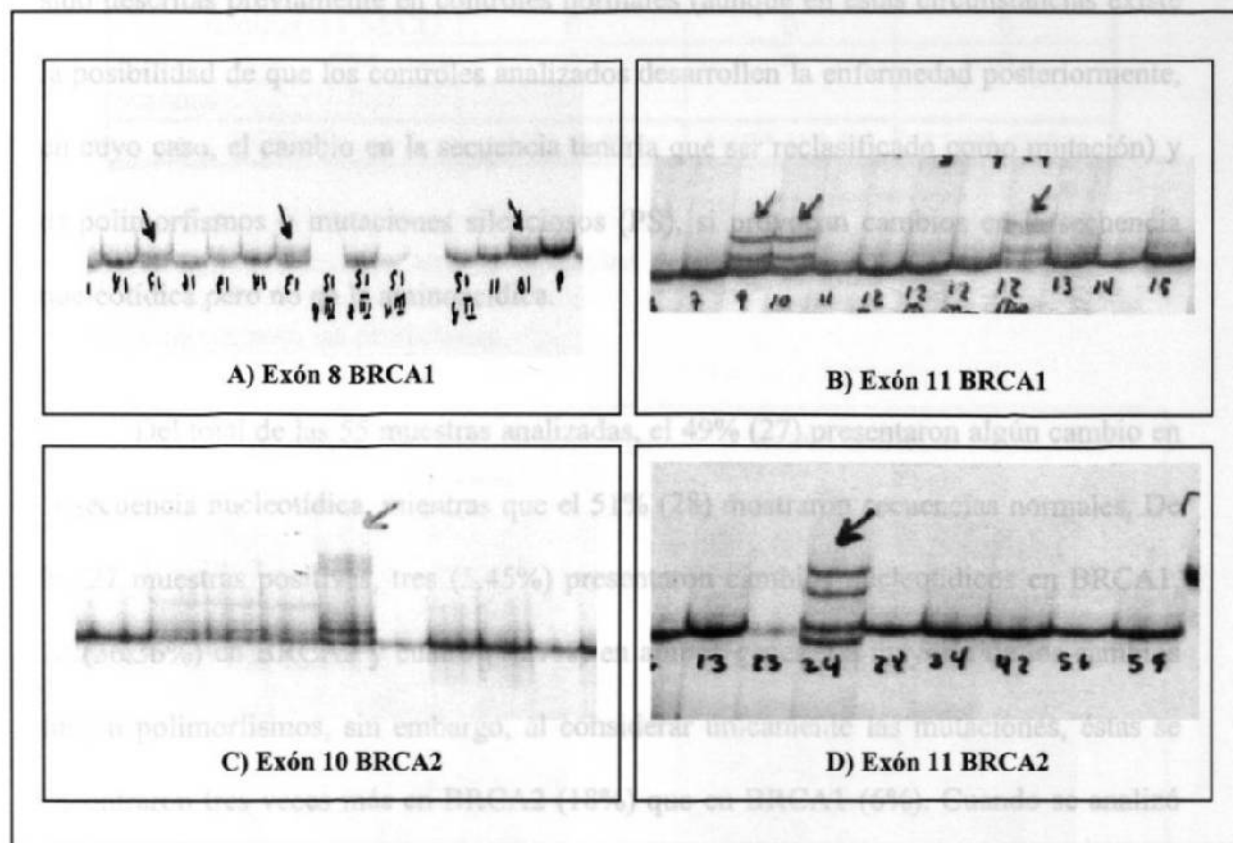
Se realizó el análisis de heteroduplex en ambos genes, habiendo obtenido 16 variantes en BRCA1 y 44 en BRCA2, según se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9. Variantes de heteroduplex encontradas en los genes BRCA1 Y BRCA2 en este estudio.**

BRCA1		BRCA2	
EXÓN	VARIANTES	EXÓN	VARIANTES
1	1	3	1
5	1	10	6
8	4	11	19
11	6	12	1
18	1	19	2
20	2	22	4
24	1	27	11
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>TOTAL</b>	<b>44</b>

Como puede observarse, se encontraron más variantes en BRCA2 que en BRCA1, en una relación de casi 3:1. Las regiones génicas en las que más variantes se encontraron fueron los exones 11 de ambos genes. Esto era de esperarse, pues estos exones representan aproximadamente el 50% de la secuencia codificante en cada gen.

Otro hallazgo que llamó la atención es la gran cantidad de variantes encontradas en el exón 27 de BRCA2. En la figura 6 se muestran algunos ejemplos de los heteroduplex encontrados:



**Figura 6. Ejemplos de los heteroduplex encontrados.** Las figuras corresponden a geles de MDE en condiciones no desnaturalizantes, donde se muestran resultados del análisis de heteroduplex practicado a los productos de amplificación de las zonas génicas rastreadas en busca de mutaciones. Las flechas indican los patrones anormales de migración.

### 5.3. SECUENCIACIÓN

Las variantes de heteroduplex encontradas en los productos de amplificación por PCR, fueron sometidas a secuenciación para definir con precisión los tipos de mutaciones. Las alteraciones encontradas en las secuencias de ambos genes fueron clasificadas como: a) mutaciones, si producen una proteína truncada o alteran la función



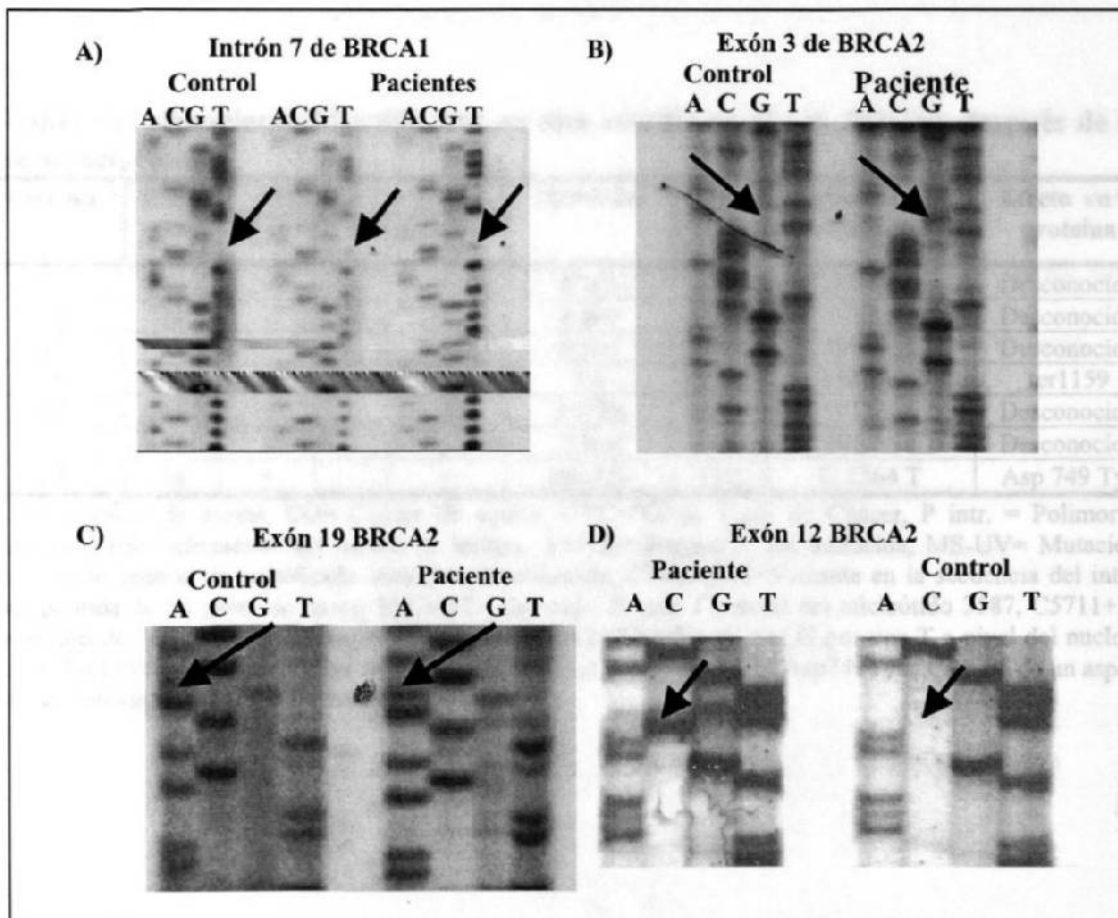
o expresión de la proteína; b) mutaciones de efecto desconocido (MS-UV), si producen cambio de un aminoácido por otro y no han sido observadas en controles normales; c) polimorfismos (MS-P), si a pesar de provocar el cambio de un aminoácido por otro, han sido descritas previamente en controles normales (aunque en estas circunstancias existe la posibilidad de que los controles analizados desarrollen la enfermedad posteriormente, en cuyo caso, el cambio en la secuencia tendría que ser reclasificado como mutación) y d) polimorfismos o mutaciones silenciosos (PS), si provocan cambios en la secuencia nucleotídica pero no en la aminoacídica.

Del total de las 55 muestras analizadas, el 49% (27) presentaron algún cambio en la secuencia nucleotídica, mientras que el 51% (28) mostraron secuencias normales. De las 27 muestras positivas, tres (5.45%) presentaron cambios nucleotídicos en BRCA1, 20 (36.36%) en BRCA2 y cuatro (7.27%) en ambos genes. La mayoría de los cambios fueron polimorfismos, sin embargo, al considerar únicamente las mutaciones, éstas se encontraron tres veces más en BRCA2 (18%) que en BRCA1 (6%). Cuando se analizó por grupo clínico, la mayoría (el 18%) fueron encontradas en el grupo de mujeres jóvenes (4% en BRCA1 y 14% en BRCA2), mientras que en los casos familiares se encontró el 6% de las mutaciones (2% en BRCA1 y el 4% en BRCA2) (Tabla 6). En total, once de las pacientes presentaron mutaciones que presumiblemente causan enfermedad (la paciente de la familia 27 presentó dos mutaciones) y dieciséis presentaron polimorfismos. No fueron encontradas mutaciones entre las pacientes con historia familiar de cáncer de ovario ni en BRCA1 ni en BRCA2. La tabla 10 resume estos resultados.

**Tabla 10. Frecuencias de las mutaciones encontradas en este estudio en ambos genes por grupo analizado.**

GRUPO CLÍNICO	MUTACIONES		
	BRCA1	BRCA2	TOTAL
Mujeres $\leq$ 35 años	2/36 (6 %)	8/36 (22 %)	10/36 (28%)
Casos familiares CM	1/16 (6 %)	2/16 (12 %)	3/16 (18%)
Casos familiares CM/CO	0	0	0
Casos con CM en varones	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>3/55 (6 %)</b>	<b>10/55 (18 %)</b>	<b>12/55 (24%)</b>

La figura 7 muestra algunos ejemplos de las secuencias analizadas y los sitios donde se localizaron las mutaciones.



**Figura 7. Imágenes de secuenciación de los fragmentos analizados.** Las imágenes corresponden a geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. A). Polimorfismo en el intrón 7 de BRCA1, C /VS7-34 T; B). Mutación en el exón 3 de BRCA2, Tyr 52 Cys (A 353 G); C). Mutación en el exón 19 de BRCA2, Gly 2793 Arg (G 8605 A); D). Mutación en el exón 12 de BRCA2, Phe 2293 Leu (T 7105 C).

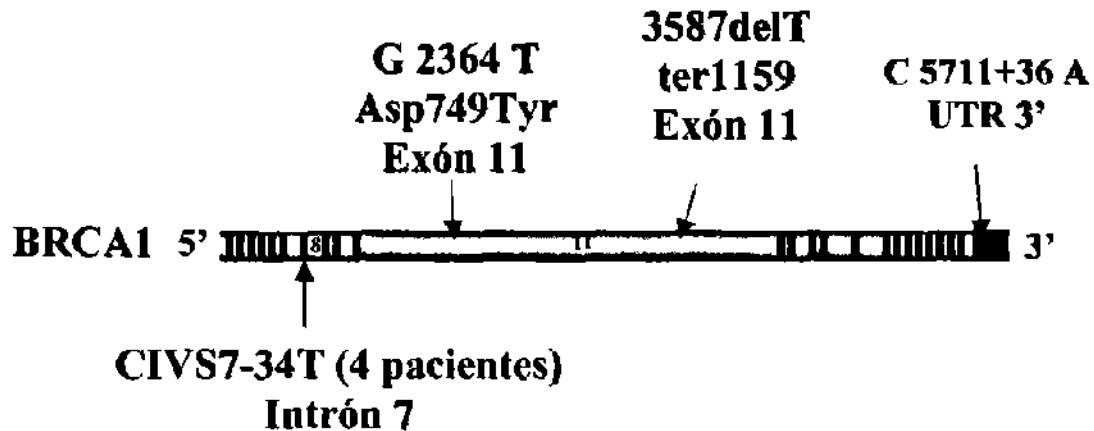
### 5.3.1. Análisis de secuencias en el gen BRCA1

De las 16 variantes secuenciadas En este gen, nueve de ellas mostraron secuencias normales, cuatro presentaron un polimorfismo en el intrón 7, dos presentaron mutaciones en el exón 11 (una que produce una proteína truncada y otra que cambia una asparagina por una tirosina) y por último, una mutación se ubicó en la región 3' no traducible. Las tres mutaciones encontradas en BRCA1 no habían sido descritas previamente. Entre los familiares de estas pacientes, cuatro tienen antecedentes de CM y seis tienen antecedentes de otros tipos de cáncer (Tabla 11 y figura 8).

**Tabla 11. Mutaciones identificadas en este estudio en el gen BRCA1 después de la secuenciación.**

Paciente	Edad DX	Historia familiar			Mutación	Exón	Alteración de la secuencia	Efecto en la proteína
		CM	CO	OTC				
10	66	+	-	+	P Intr	IVS7	C IVS7-34 T	Desconocido
13	34	-	-	+	P Intr	IVS7	C IVS7-34 T	Desconocido
17	33	-	-	+	P Intr	IVS7	C IVS7-34 T	Desconocido
19	27	+	-	+	FS	11E	3587delT	ter1159
22	44	+	-	+	3'UTR	24	C 5711+36 A	Desconocido
53	34	-	-	-	P Intr	IVS7	C IVS7-34 T	Desconocido
62	34	+	-	+	MS-UV	11C	G 2364 T	Asp 749 Tyr

CM= Cáncer de mama, CO= Cáncer de ovario, OTC= Otros Tipos de Cáncer, P intr. = Polimorfismo intrónico, FS= Alteración del marco de lectura, 3'UTR= Región 3' no traducida, MS-UV= Mutación de cambio de sentido de significado biológico desconocido, CIVS7-34T= Variante en la secuencia del intrón 7 con pérdida de 34 pares de bases, 3587delT= Delección de una T a nivel del nucleótido 3587, C5711+36A= Inserción de 36A a partir del nucleótido 5711, G2364T= Cambio de una G por una T a nivel del nucleótido 2364, Ter1159= Señal prematura de terminación a nivel del codón 1159, Asp749Tyr= Cambio de un aspartato por una tirosina en el aminoácido 749.



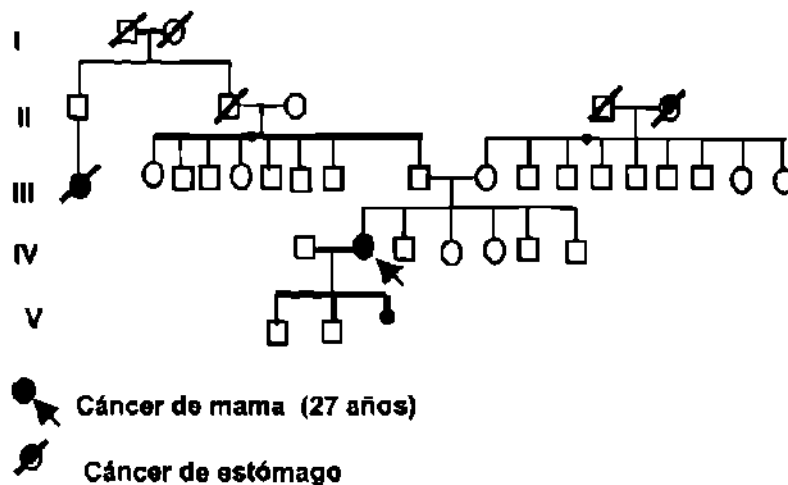
**Figura 8. Mutaciones encontradas en el gen BRCA1.** Las tres mutaciones indicadas en la parte superior de la figura no han sido descritas con anterioridad, mientras que el polimorfismo de la parte inferior ha sido descrito previamente en Italia, Bélgica, España y E.U.A.

### 5.3.1.1. Descripción de las mutaciones en BRCA1.

1. *Ter 1159 (3587 del T)* en el exón 11. Esta mutación genera un codón prematuro de terminación y una proteína truncada. Fue encontrada en la paciente perteneciente a la familia 19, quien desarrolló el CM a los 27 años. Una prima suya cuatro grados aparte, desarrolló CM a los 23 años y su abuela materna falleció por cáncer de estómago.

#### FAMILIA 19

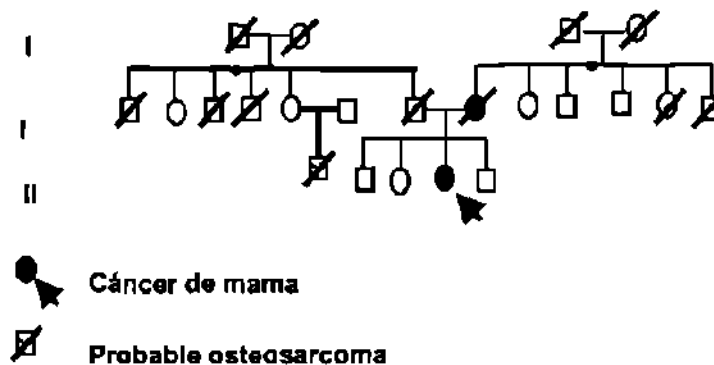
*Mutación en el gen BRCA1: Exón 11E, ter1159 (3587delT)*



2. 3'UTR C 5711 + 35 A. Esta se localiza en la región 3' no traducible del gen BRCA1 y se encontró en la paciente de la familia 22, quien desarrolló el CM a los 44 años de edad. La madre también presentó CM y un primo paterno desarrolló un probable osteosarcoma. En esta paciente fue encontrado además el polimorfismo silencioso *val* 2171 *val* (C 6741 G) en el exón 11 de BRCA2.

#### FAMILIA 22

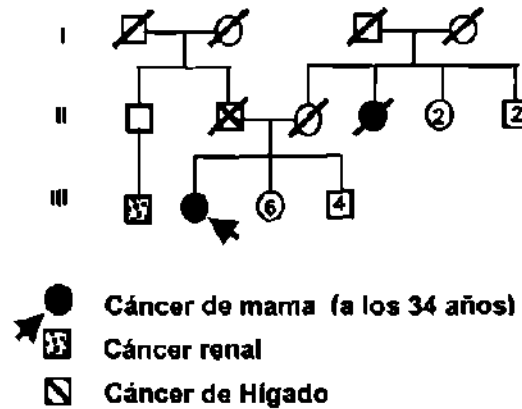
**Mutación en el gen BRCA1: Exón 24, 3'UTR (C 5711+36 A)**  
**Polimorfismo en el gen BRCA2: PS Exón 11G, *val* 2171 *val* (C 6741 G)**



3. *Asp* 749 *Tyr* (G 2364 T) en el exón 11. Esta fue encontrada en la familia 62 en una paciente que desarrolló el CM a los 34 años, cuya tía materna presentó el CM a los 35 años, su padre falleció por cáncer de hígado, y un tío paterno por cáncer renal. Además de la mutación referida, en esta muestra se encontró el polimorfismo *Ile* 3412 *Val* (A 10462 T) en el exón 27 de BRCA2.

## FAMILIA 62

**Mutación en el gen BRCA1: MS-UV, Exón 11C Asp 749 Tyr (G 2364 T)**  
**Polimorfismo en el gen BRCA2: MS-P Exón 27C, Ile 3412 Val (A 10462 T)**



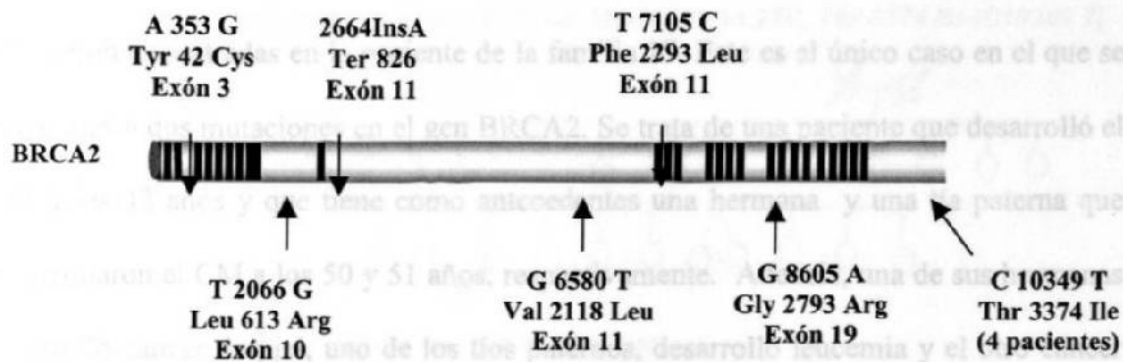
## 5.3.2. Análisis de secuencias en el gen BRCA2.

En este gen se secuenciaron 44 fragmentos que presentaron formación de heteroduplex, de los cuales, nueve mostraron secuencias normales y 35 resultaron positivos para alguna mutación o polimorfismo. De estos 35 positivos, 10 fueron mutaciones y 25 fueron polimorfismos. Fueron identificadas siete distintas mutaciones en nueve pacientes (La mutación *C 10349 T* fue identificada en cuatro pacientes y la paciente 27 presentó dos mutaciones). Tres de las mutaciones ya han sido descritas y cuatro son nuevas (Tabla 12 y figura 9). Además, se encontraron, nueve polimorfismos en 15 de las pacientes (algunas de las pacientes tienen dos o tres polimorfismos). De éstos, ocho han sido descritos en otras poblaciones. La única excepción fue *Ala 3246 Ala (C 9966 T)* en el exón 27, el cual es descrito aquí por primera vez (tabla 9 y figura 10).

**Tabla 12. Mutaciones identificadas en este estudio en el gen BRCA2 después de la secuenciación.**

Paciente	Edad DX	Historia Familiar			Mutación	Exón	Alteración de la secuencia	Efecto en la proteína
		CM	CO	OTC				
24	32	-	-	+	Ins	11A	2664insA	Ter 826
26	37	-	-	+	MS-UV	27C	C 10349 T	Thr 3374 Ile
27	51	+	-	+	MS-UV	10B	T 2066 G	Leu 613 Arg
					MS-UV	27C	C 10349 T	Thr 3374 Ile
31	30	-	-	+	MS-UV	27C	C 10349 T	Thr 3374 Ile
41	27	-	-	-	MS-UV	11G	G 6580 T	Val 2118 Leu
47	35	-	-	-	MS-UV	12	T 7105 C	Phe 2293 Leu
52	35	-	-	-	MS-UV	3	A 353 G	Tyr 42 Cys
59	34	-	-	-	MS-UV	27C	C 10349 T	Thr 3374 Ile
64	31	-	-	-	MS-UV	19	G 8605 A	Gly 2793 Arg

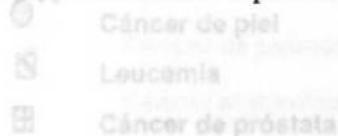
Ins= Inserción, MS-P= Polimorfismo de cambio de sentido, NS-P= Codón de terminación, PS= Polimorfismo silencioso. Las abreviaturas explicadas en la tabla 11 pueden ser utilizadas también para interpretar esta tabla.



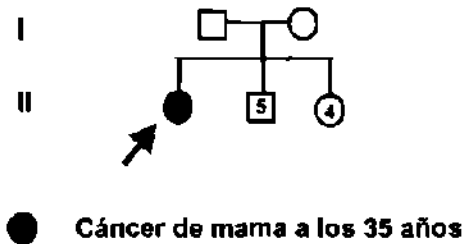
**Figura 9. Mutaciones encontradas en el gen BRCA2.** Se indican los tipos y sitios de las mutaciones encontradas. La mutación *A353G* ha sido descrita previamente en judíos, en Europa y en el Caribe; *T7105C* ha sido descrita antes en una familia mexicana residente en E.U.A. y *C10349T* en Europa del Este. El resto de las mutaciones señaladas en la figura son descritas por primera ocasión en este trabajo.

### 5.3.2.1. Descripción de las mutaciones en BRCA2.

1. *Tyr 42 Cys (A 353 G)* se ubica en el exón 3 y fue encontrada en la paciente de la familia 52, quien carece de antecedentes familiares pero desarrolló el CM a los 35 años. En ella se encontró además el polimorfismo silencioso *Val 1269 Val (T 4035 C)*.



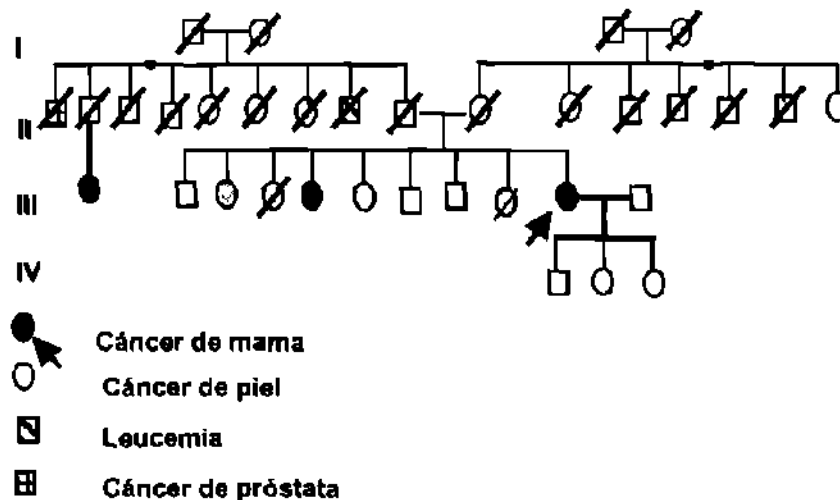
**FAMILIA 52** *Mutación en el gen BRCA2: MS-UV, exón 3 Tyr 42 Cys (A 353 G)*  
*Polimorfismo en BRCA2: PS, Exón 11C, Val 1269 Val (T 4035 C)*



2. *Leu 613 Arg (T2066G)* en el exón 10 y *Thr 3374 Ile (C 10349 T)* en el exón 27, fueron encontradas en la paciente de la familia 27. Este es el único caso en el que se encontraron dos mutaciones en el gen BRCA2. Se trata de una paciente que desarrolló el CM a los 43 años y que tiene como antecedentes una hermana y una tía paterna que desarrollaron el CM a los 50 y 51 años, respectivamente. Además, una de sus hermanas desarrolló cáncer de piel, uno de los tíos paternos, desarrolló leucemia y el otro cáncer de próstata.

**FAMILIA 27**

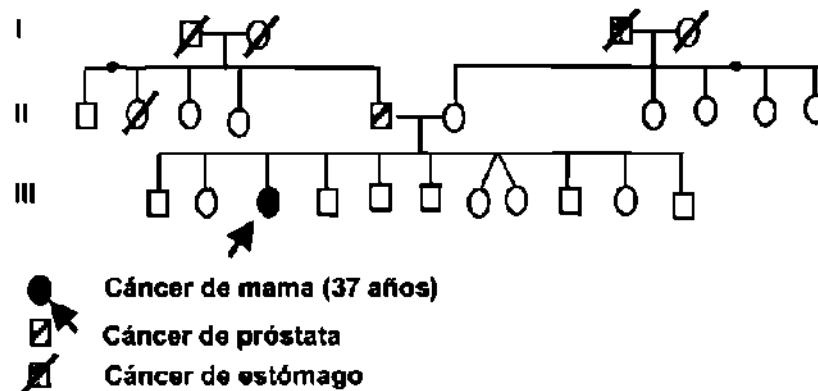
**Dos mutaciones en BRCA2: MS-UV Exón 10B, *Leu 613 Arg (T 2066 G)*.  
 MS-UV, exón 27C, *Thr 3374 Ile (C 10349 T)*.**



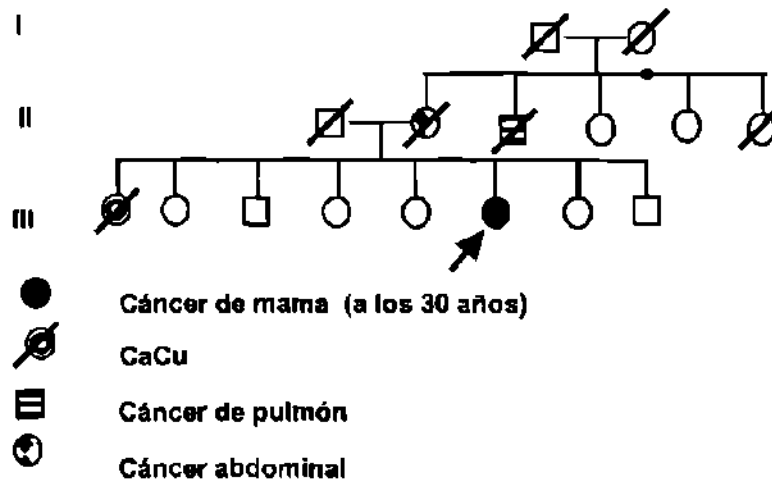


3. *Thr 3374 Ile (C 10349 T)* fue encontrada, en las pacientes de las familias 26, 31 y 59. La paciente de la familia 26 desarrolló el CM a los 37 años. Esta paciente tiene como antecedentes de importancia que su padre presentó cáncer de próstata y su abuelo materno desarrolló cáncer de estómago. La paciente perteneciente a la familia 31 desarrolló el CM a los 30 años. Una hermana de ella presentó cáncer cérvico-uterino (CaCu), su madre falleció de cáncer abdominal y un tío materno presentó cáncer de pulmón. Por su parte, la paciente de la familia 59 (árbol genealógico no disponible) desarrolló el CM a los 34 años, aunque no existen otros antecedentes de cáncer en la familia.

**FAMILIA 26** *Mutación en el gen BRCA2: MS-UV Exón 27C, Thr 3374 Ile (C10349 T)*



**FAMILIA 31** *Mutación en el gen BRCA2: MS-UV Exón 27C, Thr 3374 Ile (C 10349 T)*

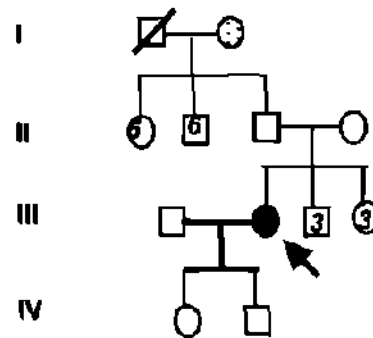


6. *Val 2118 Leu (G 6580 T)* en el exón 11, *Phe 2293 Leu (T 7105 C)* en el exón 12 y *Gly 2793 Arg (G 8605 A)* en el exón 27. Estas mutaciones fueron encontradas en mujeres jóvenes sin antecedentes familiares, pero que desarrollaron el CM a los 28, 35 y 31 años, respectivamente.

7. *Ter 826 (2664 Ins A)* en el exón 11, fue encontrada en una paciente que desarrolló el CM a los 32 años y cuyo único antecedente familiar es que su abuela paterna desarrolló cáncer ocular.

**FAMILIA 24**

**Mutación en el gen BRCA2: FS\*, Exón 11A, *Ter 826 (2664 Ins A)***



**Cáncer de mama (32 años)**



**Cáncer ocular**

\*FS = Alteración del marco de lectura

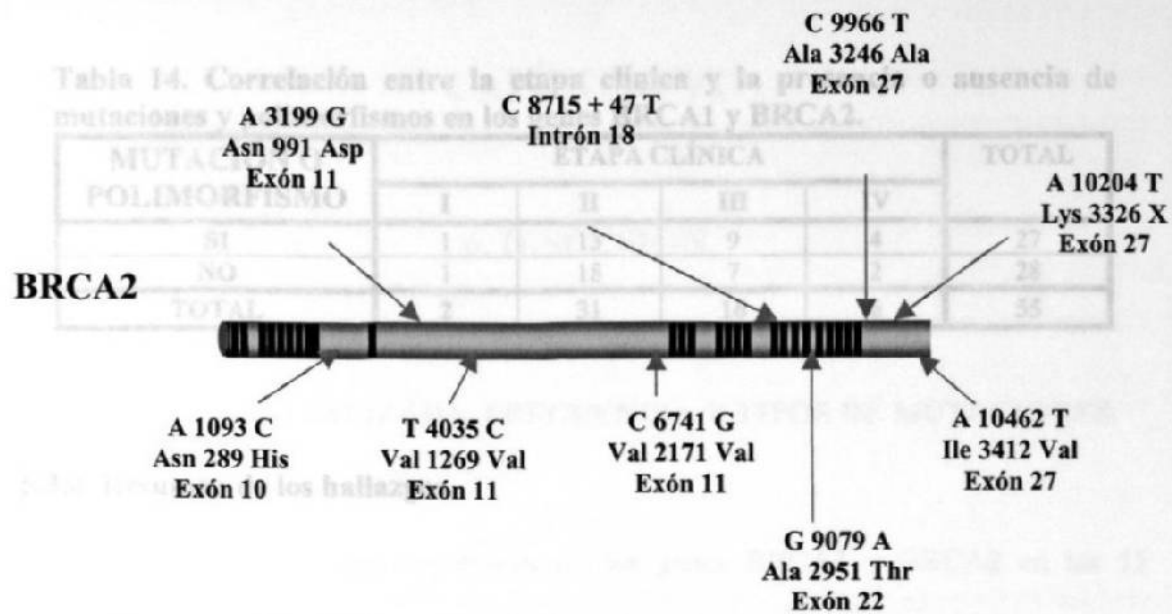
### 5.3.2.2. Polimorfismos en el gen BRCA2

En la tabla 13 y la figura 10 pueden observarse los polimorfismos encontrados en BRCA2, mientras que los árboles genealógicos de las pacientes que presentaron estos polimorfismos, así como los de las pacientes que resultaron negativas para cambios en las secuencias de ambos genes, pueden ser observados en el anexo 4.

**Tabla 13. Polimorfismos identificados en este estudio en el gen BRCA2 después de la secuenciación.**

Paciente	Edad de DX	Hist. Fam. de CM	Hist. Fam. de CO	Otro cáncer en la Fam.	Mutación	Exón	Alteración de la secuencia	Efecto en la proteína
1	47	+	-	+	MS-P	27C	A 10462 T	Ile 3412 Val
6	57	+	-	-	MS-P	10 A	A 1093 C	Asn 289 His
					MS-P	11 B	A 3199 G	Asn 991 Asp
					MS-P	22	G 9079 A	Ala 2951 Thr
7	33	-	-	+	MS-P	27C	A 10462 T	Ile 3412 Val
13	34	-	-	+	MS-P	10 A	A 1093 C	Asn 289 His
					MS-P	11 B	A 3199 G	Asn 991 Asp
14	24	-	-	-	MS-P	27C	A 10462 T	Ile 3412 Val
16	33	-	-	-	PS	27A	C 9966 T	Ala 3246 Ala
17	33	-	-	+	P Intr	19	C8715+47T	desconocido
					NS-P	27B	A 10204 T	Lys 3326 X
22	44	+	-	+	PS	11G	C 6741 G	Val 2171 Val
23	34	-	-	+	MS-P	22	G 9079 A	Ala 2951 Thr
29	35	-	-	-	PS	11C	T 4035 C	Val 1269 Val
34	55	-	-	+	MS-P	10 A	A 1093 C	Asn 289 His
					MS-P	11 B	A 3199 G	Asn 991 Asp
42	35	-	-	-	MS-P	10 A	A 1093 C	Asn 289 His
					MS-P	11 B	A 3199 G	Asn 991 Asp
					MS-P	22	G 9079 A	Ala 2951 Thr
45	74	-	+	+	PS	27A	C 9966 T	Ala 3246 Ala
56	34	-	-	+	MS-P	10 A	A 1093 C	Asn 289 His
					MS-P	11 B	A 3199 G	Asn 991 Asp
					MS-P	22	G 9079 A	Ala 2951 Thr
62	34	+	-	+	MS-P	27C	A 10462 T	Ile 3412 Val

CM= Cáncer de mama, CO= Cáncer de ovario, MS-P= Polimorfismo de cambio de sentido, NS-P= Codón de terminación, PS= Polimorfismo silencioso. Las abreviaturas explicadas en la tabla 11 se aplican también aquí.



**Figura 10.** Polimorfismos encontrados en el gen BRCA2. Todos los polimorfismos han sido descritos antes en diferentes poblaciones, excepto Ala 3246 Ala (C 9966 T) en el exón 27.

Los polimorfismos más frecuentes en este estudio fueron: *Asn 289 His* (A 1093 C) y *Asn 991 Asp* (A 3199 G), de los cuales cada uno se presentó en el 9% de los casos. Tres polimorfismos más tuvieron una frecuencia del 7%. Estos fueron: *Ala 2951 Thr* (G 9079 A), *Ile 3412 Val* (A 10462 T) y el polimorfismo intrónico C IVS7-34T. El resto de los polimorfismos presentaron frecuencias menores.

### 5.3.3. Correlación entre el estadio clínico y la presencia de mutaciones.

La tabla 14 muestra la correlación entre el estadio clínico y la presencia o ausencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. Como puede observarse, en la etapa II existe mayor cantidad de pacientes que no presentan mutaciones, mientras que en las etapas III y IV es mayor la cantidad de pacientes con mutaciones. Sin embargo, dichas diferencias no fueron significativas ( $\chi^2_{3 g.l.}, P > 0.9$ ).

**Tabla 14. Correlación entre la etapa clínica y la presencia o ausencia de mutaciones y polimorfismos en los genes BRCA1 y BRCA2.**

MUTACIÓN O POLIMORFISMO	ETAPA CLÍNICA				TOTAL
	I	II	III	IV	
SI	1	13	9	4	27
NO	1	18	7	2	28
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>31</b>	<b>16</b>	<b>6</b>	<b>55</b>

**5.3.4. Resumen de los hallazgos**

Una vez realizadas las secuenciaciones de todas las muestras que dieron patrones de bandas anormales en el análisis de heteroduplex, las mutaciones identificadas fueron las siguientes: cuatro mutaciones en el gen BRCA1 y 16 en el gen BRCA2. De ellas, 10 fueron polimorfismos y 10 son mutaciones. De las mutaciones, dos producen proteínas truncadas, una se ubica en la región 3' no traducible del gen BRCA1 y siete mas corresponden a cambios de sentido de significado biológico desconocido.

De los 10 polimorfismos detectados, uno produce un codón de terminación (que ha sido demostrado en controles normales (BIC), cuatro producen cambio de un aminoácido por otro, tres son polimorfismos silenciosos que alteran la secuencia de DNA (pero que conservan el mismo residuo aminoacídico) y dos son intrónicos.

## CAPÍTULO VI

### 6. DISCUSIÓN

#### 6.1. POBLACIÓN ANALIZADA, FRECUENCIA Y TIPOS DE MUTACIONES.

Se analizaron todos los exones de los genes BRCA1 y BRCA2 en las 55 pacientes mexicanas con CM que conformaron este estudio. Todas las familias resultaron ser de origen mestizo, con al menos las cuatro últimas generaciones sin mezcla con otras poblaciones.

Fueron identificadas dos mutaciones que producen proteínas truncadas, una en BRCA1, otra en BRCA2, además de ocho mutaciones de efecto biológico desconocido. De las mutaciones identificadas en esta serie de pacientes, seis no habían sido encontradas a la fecha en The Breast Cancer Information Core (BIC), ([http://www.nhgri.nih.gov/Intramural\\_research/Lab\\_transfer/Bic/](http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/)). Esas mutaciones son: *Asp 749 Tyr (G2364T)* y *ter1159 (3587 del T)* en BRCA1 y *Leu 613 Arg (T 2066 G)*, *ter826 (2664 ins A)*, *Val 2118 Leu (G 6580 T)* y *Gly 2793 Arg (G 8605 A)* en BRCA2. Ninguna de estas mutaciones fue encontrada en dos o más de las pacientes.

Las mutaciones encontradas en esta serie de pacientes y que ya se conocían incluyen: *Tyr42Cys (A353G)*, que se ha descrito en judíos, Europa y el Caribe (BIC), y

*Thr3374Ile (C10349T)*, que fue la única encontrada en cuatro (7%) de nuestras pacientes y que ya ha sido descrita antes en Europa del este (sugiriendo que estas mutaciones pueden tener una distribución universal). La mutación *Phe2293Leu (T7105C)* descrita sólo una vez previamente en una paciente mexicana (BIC), sugiere que puede tratarse de una mutación específica de nuestra población.

## 6.2. EFECTOS DE LAS MUTACIONES.

Las dos mutaciones (6%) que producen proteínas truncadas, una en BRCA1 y la otra en BRCA2, fueron identificadas en el grupo de 36 pacientes con CM de inicio temprano ( $\leq 35$ ) y sin antecedentes familiares de CM u ovario. De ellas, la mutación *FS 3587 del T* parece estar asociada particularmente al inicio temprano de la enfermedad, ya que la paciente desarrolló el CM a los 27 años y una familiar emparentada con ella, a través de 3 varones, desarrolló el CM al los 23 años. Lo mismo podría suponerse para la mutación *2664 ins A* que también produce una proteína truncada y que se encontró en una paciente que desarrolló el CM a los 32 años. Sin embargo, en este caso no tenemos evidencia de mas afectados con CM.

Aunque los árboles genealógicos de esas pacientes no muestran otros miembros afectados con CM u ovario, si existen antecedentes que sugieren la posible contribución de esas mutaciones a otros tipos de cáncer. La abuela paterna de la paciente con la mutación *2664 Ins A* desarrolló cáncer ocular. No sería sorprendente si este tumor fuera un melanoma, dada la alta frecuencia con que esta neoplasia se asocia a mutaciones en BRCA2 (139). Como ninguna de estas mutaciones ha sido descrita con anterioridad, no

existen estudios que demuestren su efecto en la fisiología celular.

No fueron encontradas mutaciones que producen una proteína truncada entre los casos familiares. Esto puede deberse a que la mayoría de ellas pertenecen a familias de riesgo moderado (2.7 casos de CM por familia con una edad media de presentación de la enfermedad de 47.3 años). Solo dos familias adicionales incluyen tanto CM como cáncer de ovario y una familia con CM en un varón.

La ausencia de mutaciones que producen una proteína truncada entre los casos familiares es consistente con los hallazgos en series de pacientes de moderado riesgo de Europa y Norteamérica, captadas a través de las clínicas de cáncer (86, 99, 103, 104, 140). Adicionalmente, nuestra frecuencia de mutaciones es muy similar a aquellas obtenidas en estudios de tamaño semejante al nuestro en familias españolas. Osorio *et al.*, en el 2000 (141), identificaron dos mutaciones que alteran el marco de lectura entre 18 familias con CM que tenían entre 3 y 5 casos. De igual manera, Díez *et al.*, en 1999, al analizar 41 familias con al menos 3 casos de CM y 15 familias con CM y ovario, no encontraron ninguna mutación que producen una proteína truncada (119).

De las ocho mutaciones de significado biológico desconocido (seis en el gen BRCA2 y dos en BRCA1), la mayoría (7/36:20%) fueron en el grupo de mujeres jóvenes. De los casos familiares, 3 (18%) tuvieron este tipo de mutaciones. Para nuestra sorpresa, no encontramos mutaciones en los dos casos que tienen antecedentes de cáncer de ovario (familias 46 y 55) y que desarrollaron el CM antes de los 35 años de edad. En ambos casos una abuela fue afectada con cancer de ovario. Al no contar con el análisis



de un grupo más numeroso de familias con cáncer de ovario, no podemos hacer conclusiones acerca de la frecuencia de mutaciones en ese grupo de pacientes en nuestra población.

Con excepción de la mutación *Tyr 42 Cys*, la cual ha sido descrita 38 veces (BIC), las otras mutaciones de significado biológico desconocido han sido descritas muy pocas o ninguna vez en otras poblaciones. Sin embargo, aún cuando permanece pendiente establecer si esta última clase de alteraciones genéticas representan mutaciones deletéreas o variantes normales, éstas no han sido observadas en cromosomas de mujeres controles sanas.

### **6.3. Comparación con los genes *brca1* y *brca2* de ratón y cambios aminoacídicos provocados por las mutaciones.**

La comparación de las regiones analizadas con las correspondientes de los genes *brca1* y *brca2* de ratón, mostró que sólo la región donde se encontró la mutación *Thr3374* parece ser idéntica entre el gen humano BRCA2 y el de ratón *brca2* (Gen-Bank). Las comparaciones de las secuencias entre las dos especies son importantes, debido a que como se sabe, las regiones génicas muy conservadas sugieren su importancia en la función de la proteína codificada por éstos. Sin embargo, aunque el resto de las mutaciones de cambio de sentido no se encuentran en regiones conservadas entre estas dos especies, algunas de ellas resultan en un cambio del tipo de aminoácido, lo cual probablemente cambie las propiedades fisico-químicas del área mutada y la estructura y función de la proteína (Fig 11).

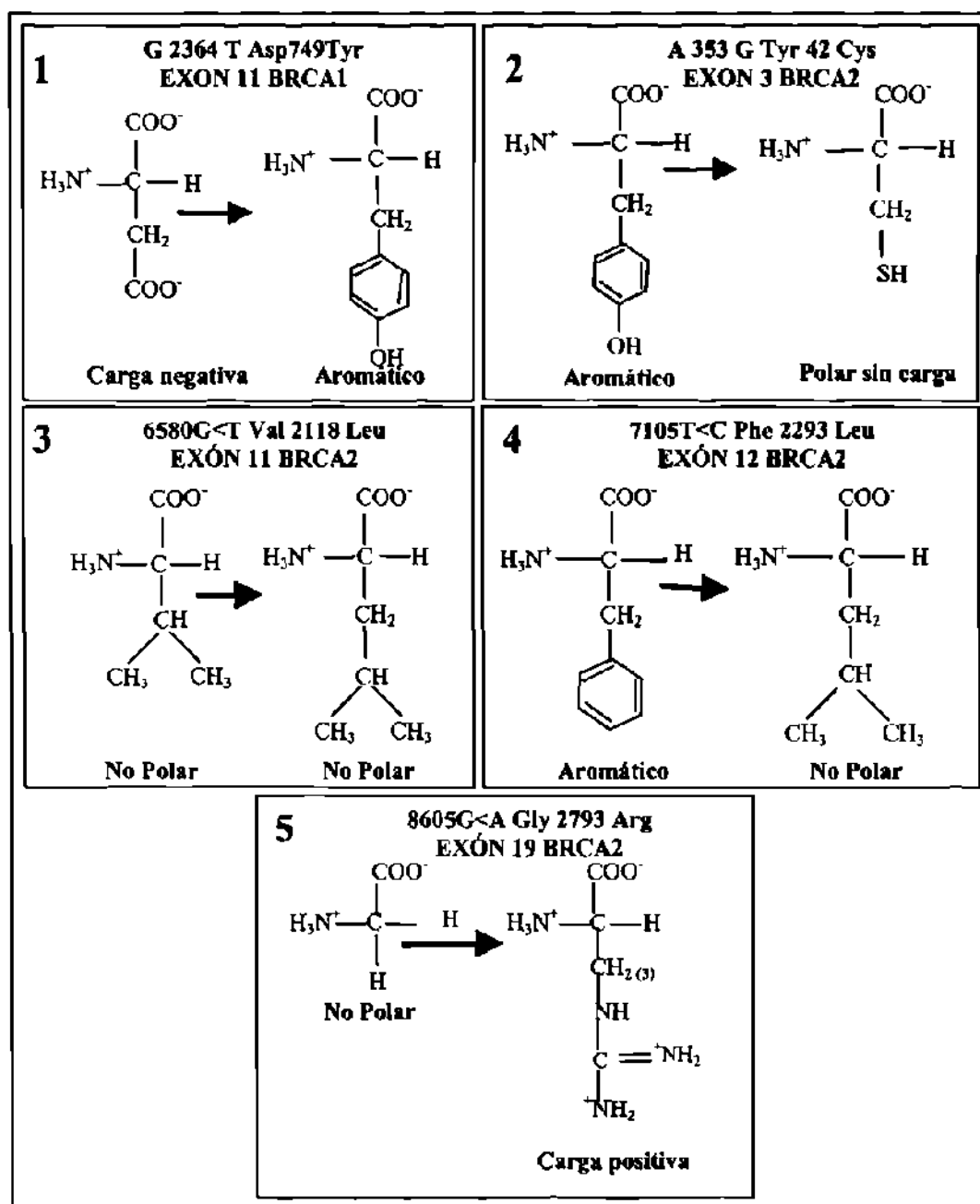


Figura 11. Cambios aminoacídicos provocados por las mutaciones de cambio de sentido. Como puede observarse, todas las mutaciones ilustradas producen el cambio de un aminoácido por otro. Sin embargo, los cambios más importantes son causados por G 2364 T Asp 749 Tyr y 8605 G<A Gly 2793 Arg, que dan como resultado el cambio por un aminoácido de carga diferente.

Milner y cols en 1997 describieron que la mutación Tyr42Cys (Fig. 11)

disminuye severamente el potencial de activación transcripcional de BRCA2, sin embargo, también observaron que no cosegrega con la enfermedad, al menos en la familia que ellos analizaron (94).

No podemos descartar que la mutación 5711+36 C>A encontrada en la región 3' no traducible de BRCA1, pudiera tener algún efecto sobre la estabilidad del RNAm. Esta aseveración se ve reforzada por el hecho de que una mutación similar (5711+31 G>A) ha sido descrita en un estudio realizado en Singapur (142) y la misma no fue encontrada en 100 controles sanos. Un efecto en la alteración de los sitios de corte y empalme o de afección de regiones reguladoras dentro del gen podría ser posible para los polimorfismos CIVS7-34 T en BRCA1 y C 8715+ 47 T en BRCA2.

#### **6.4. COMPARACIÓN CON OTRAS POBLACIONES.**

La frecuencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en nuestra población, parece ser semejante de la descrita para familias europeas y de Estados Unidos, identificadas a través de una investigación clínica de historia familiar positiva de CM (86, 99, 103,104, 140), (Tabla 15), o en series de pacientes con CM de inicio temprano (59, 143, 144) (Tabla 16). Sin embargo, la mayoría de las mutaciones encontradas en este estudio son distintas a las descritas en otros países, incluido España (117); desafortunadamente no es posible comparar nuestros hallazgos con los de otras poblaciones relacionadas con la nuestra, debido a la ausencia de tales estudios en las poblaciones latinoamericanas.

**Tabla 15. Frecuencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en estudios de familias con riesgo moderado de desarrollar cáncer de mama.**

PAIS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	BRCA1	BRCA2	AUTOR
CANADA	CM/OV (3 casos, 1<40)	21.73%		Durocher 1996
EUA	CM/OV (2 casos)		7.7%	Couch 1996
VARIOS PAISES	CM/OV (2 casos)		11.3%	Wagner 1999
INGLATERRA	CM/OV (2 casos)	5.5%	5.5%	Peto 1996
EUA	CM/OV (2 casos)	7.1%	4.9%	Malone 2000
MEXICO	CM/OV (2 casos)	5.0%	16%	Este estudio

**Tabla 16. Frecuencia de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en estudios de pacientes con cáncer de mama de inicio temprano.**

PAIS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	BRCA1	BRCA2	AUTOR
INGLATERRA	< 36	3.5%	2.4%	Peto 1999
AUSTRALIA	<40 (análisis parcial)	2.83%	2.83%	Hopper 1999
EUA	<36	5.9%	3.4%	Malone 2000
ESPAÑA	<40 (análisis parcial)	2.0%		Diez 1999
MEXICO	<36	6.0%	22.0%	Este estudio

En adición al CM y al de ovario, varias de las familias examinadas en este estudio y que resultaron con mutaciones, tienen una historia de múltiples tipos de cáncer, incluyendo cérvix, colon, próstata, páncreas, pulmón, esófago, estómago, hígado, cerebro, testículos, ojo y leucemias, confirmando la contribución de mutaciones en estos genes a distintos tipos de neoplasias (28). Desafortunadamente, aunque el tamaño de la muestra es bueno, considerando que es el primer estudio completo de ambos genes BRCA1 y BRCA2 en Latinoamérica, aún es pequeño para que nos permita realizar un análisis estadístico formal de asociaciones específicas entre los tipos de cánceres y las mutaciones.

Por otro lado, también varias de las familias de las pacientes que no presentaron

mutaciones, tienen una historia importante de otros tipos de cáncer. Esta agregación de casos en la familia, podría ser el resultado de la predisposición genética conferida por otros genes distintos a BRCA1 y BRCA2, o de influencias ambientales.

## 6.5. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS.

Las frecuencias de los polimorfismos encontrados en este estudio (Tabla 17), son similares a las descritas en Europa del Este, en U.S.A. y en otras (53, 145, 146, 147). Aunque los polimorfismos *CIVS7-34T* en BRCA1 y *Asn289His (A1093C)* en BRCA2 han sido descritos previamente en España, también han sido referidos en otros países. Los polimorfismos *Val2171Val (G6741G)* y *C8715+47T* han sido descritos anteriormente sólo en la población africana, lo que probablemente refleja la mezcla de genes africanos en nuestra población, ya que es bien sabido que grupos africanos arribaron a las costas del Este de México después de la conquista española.

El polimorfismo *9966 C>T* en BRCA2, el cual no produce substitución aminoacídica es interesante, tanto porque no ha sido descrito antes, como porque fue encontrado en la única familia que tiene el antecedente de CM en un varón. El haber encontrado este polimorfismo en la familia referida puede deberse al azar. Sin embargo, si en estudios posteriores se demuestra que segrega con la enfermedad y que no se presenta en controles, se podría postular un posible efecto sobre algunos de los sitios de corte y empalme del gen. Este último polimorfismo, así como la mutación *Thr 3374 Ile* fueron observadas en más de una ocasión. Sin embargo, dado que los sitios donde se localizan estos cambios no se encuentran conservados entre las especies (Consulta en

línea al Gen Bank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB>), y que ambos se encuentran hacia el extremo 3' de un cambio de un polimorfismo que no produce efecto en el desarrollo del CM (148), es poco probable que predispongan a la enfermedad. Desafortunadamente no fue posible para nosotros disponer del RNA de las pacientes que presentaron las mutaciones referidas para verificar si producen o no proteínas truncadas.

**Tabla 17. Frecuencias con las que han sido descritos los polimorfismos encontrados en este estudio.**

POLIMORFISMO	EXON	FRECUENCIA EN ESTE ESTUDIO	# DE REFERENCIAS EN BIC
A 1093 C	10	5/55 (9%)	8
A 3199 G	11	5/55 (9%)	2
G 9079 A	22	4/55 (7%)	38
A 10462 T	27	4/55 (7%)	82
C IVS7-34T*	Intr. 7	4/55 (7%)	6
T 4035 C	11	2/55 (4%)	3
C 9066 T	27	2/55 (4%)	NO
C 8715+47T	19	1/55 (2%)	2
A 10204 T	27	1/55 (2%)	156
C 6741 G	11	1/55 (2%)	1

\*Único polimorfismo encontrado en BRCA1

## 6.6. PERSPECTIVAS Y BENEFICIOS DERIVADOS DEL PROYECTO

### 6.6.1. Utilidad clínica

Los resultados obtenidos fueron canalizados a la clínica 25 del IMSS y al Centro Universitario Contra el Cáncer, con el propósito de que sean tomadas las medidas de asesoramiento y vigilancia apropiadas, tanto para las pacientes como para sus familias.

### **6.6.2. Diagnóstico molecular**

La prueba ha sido completamente estandarizada y puede ser puesta a disposición de los servicios clínicos del país para el análisis de familias de alto y moderado riesgo, para pacientes con CM de inicio temprano y para la detección de posibles portadoras.

### **6.6.3. Transferencia tecnológica**

Mediante este proyecto se logró transferir de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer a este Departamento de Bioquímica la técnica de análisis de heteroduplex. También se adquirió la técnica de secuenciación manual mediante la secuenciación, aunque esta no fue implementada debido a que ya se contaba en dicho Departamento con otras técnicas de secuenciación tanto manual como automática.

### **6.6.4. Formación de la red latinoamericana de genética molecular contra el cáncer.**

Se estableció contacto con investigadores de diversos países latinoamericanos (Ver la figura 12). Con la mayoría de los investigadores se han formalizando las condiciones en las cuales se desarrollarán las colaboraciones. Actualmente se encuentra en curso un proyecto de colaboración con investigadores de Venezuela y Perú y habiendo realizado ya el análisis de heteroduplex se encontraron 49 variantes, las cuales están siendo secuenciadas.



**Figura 12. Colaboraciones con otros países latinoamericanos** En el mapa se señalan los países con los cuales se ha establecido contacto. Actualmente se está colaborando con investigadores de Venezuela y Perú, mientras que con los otros países se están estableciendo las condiciones de colaboración.

BRCA2 a los casos familiares de CM de riesgo alto y a los casos de inicio temprano, no varía significativamente entre las distintas poblaciones. En nuestra serie, sólo cuatro familias refinen los criterios para ser consideradas como de alto riesgo (tres o más casos de CM y/u ovario diagnosticados antes de los 60 años entre familiares de primer grado), y entre ellas sólo en una (25%) se encontró una mutación. Esta proporción de mutaciones en familias de alto riesgo es muy baja, comparada con los reportes previos para familias europeas y de Estados Unidos (88), pero debe considerarse que la muestra es pequeña para llegar a alguna conclusión, con respecto a la frecuencia de mutaciones en familias latinoamericanas de alto riesgo.



## CAPÍTULO VII

### 7. CONCLUSIONES

En la muestra de nuestra población resultaron más frecuentes las mutaciones en el gen BRCA2 que en el BRCA1, con una alta proporción en los casos de CM de inicio temprano. Estos hallazgos son congruentes con los descritos en otras poblaciones como la islandesa, donde las mutaciones en BRCA2 son mucho más frecuentes que las mutaciones en BRCA1 (99).

Nuestros datos, comparados con aquellos descritos previamente en otras poblaciones, indican que la contribución general de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 a los casos familiares de CM de mediano riesgo y a los casos de inicio temprano, no varía significativamente entre las distintas poblaciones. En nuestra serie, solo cuatro familias reúnen los criterios para ser consideradas como de alto riesgo (tres o más casos de CM y /u ovario diagnosticados antes de los 60 años entre familiares de primer grado), y entre ellas sólo en una (25%) se encontró una mutación. Esta proporción de mutaciones en familias de alto riesgo es muy baja, comparada con los reportes previos para familias europeas y de Estados Unidos (88), pero debe considerarse que la muestra es pequeña para llegar a alguna conclusión, con respecto a la frecuencia de mutaciones en familias mexicanas de alto riesgo.

La frecuencia en nuestro estudio que es similar a la encontrada en mujeres jóvenes y familias de mediano riesgo sugiere que la penetrancia de estos genes no difiere entre las poblaciones, incluida la nuestra. Por otro lado, la frecuencia de mutaciones en el gen BRCA2 en familias con CM de inicio temprano es mayor en nuestra población, sugiriendo la utilidad de indicar la prueba en este grupo de pacientes.

En este estudio se han analizado tanto la secuencias codificantes como las regiones intrónicas adyacentes a los exones de ambos genes BRCA1 y BRCA2. Sin embargo es posible que algunas mutaciones no hayan sido detectadas debido al método utilizado. La técnica de análisis de heteroduplex tiene una sensibilidad del 90% y particularmente puede dejar de detectar algunas mutaciones puntuales. Así mismo, grandes rearrreglos genómicos, que pueden representar hasta el 15% de las mutaciones en el BRCA1 [ Puget *et al.* 1999 (149)] y que también ocurren en el BRCA2 [ Wang *et al.* 2001 (150) ], no pueden ser detectadas por esta técnica, pues para lograrlo, se requiere de la utilización de PCRs largos y la posterior secuenciación de estos fragmentos grandes.

La proporción de CM de inicio temprano atribuible a mutaciones germinales que producen proteínas truncadas en BRCA1 y BRCA2 en nuestro estudio (2/36: 6%) es consistente con los estimados obtenidos en grandes series de pacientes estudiadas en Inglaterra, Australia y E.U.A. [ Peto *et al.*, 1999 (151); Hopper *et al.*, 1999 (152); Malone *et al.*, 2000 (153) ].

Aún cuando permanece pendiente establecer si las siete mutaciones de cambio de sentido de efecto biológico desconocido representan mutaciones deletéreas o variantes

normales, éstas no han sido observadas en cromosomas de mujeres controles sin CM analizadas en estudios realizados en diversas partes del mundo y que son referidos en The Breast Cancer Information Core (BIC). Las once pacientes que resultaron aquí portadoras de mutaciones de significado biológico desconocido, representan la mayoría de las mutaciones encontradas en este estudio y podrían por lo tanto, ser responsables de la susceptibilidad al CM en la mayoría de las pacientes jóvenes y casos familiares de nuestra población. Para poder establecer ésto con certeza, es indispensable conocer su relevancia clínica y funcional, así como estimar los riesgos asociados a ellas.

Las dos mutaciones que producen una proteína truncada, así como las seis mutaciones que no han sido descritas antes, junto con la mutación *Phe2293Leu* en *BRCA2* descrita previamente en una paciente mexicana (BIC), posiblemente sean exclusivas de nuestro país y de algunas otras poblaciones latinoamericanas. Parecido a lo encontrado en estudios españoles (154, 155, 141), la mayoría de las mutaciones son únicas, con solo una pocas de ellas siendo observadas en más de una familia, sugiriendo que ni en esa población, ni en la nuestra, existe un efecto de fundadores. Sin embargo, se hace necesario el análisis de una mayor cantidad de pacientes mexicanas con CM, buscándoles las mutaciones encontradas específicamente en este estudio, con el propósito de determinar la proporción de todos los casos atribuibles a estas mutaciones en nuestra población, así como para la identificación de pacientes y familias con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad y establecer con certeza si existe o no algún efecto de fundadores en nuestro país.

Será de gran interés continuar estos estudios en una mayor cantidad de pacientes

con características semejantes a las de este estudio, obteniendo la historia familiar y la información acerca de exposición a factores de riesgo, con el fin de identificar potenciales interacciones genético-ambientales que puedan influir en el riesgo de CM conferido por estos genes.

## CAPÍTULO IX

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J Estimates of the Worldwide Mortality from Cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999 Sep 24;83(1):18-29.
2. Holford TR, Roush GC, McKay LA Trends in Female Breast Cancer in Connecticut and the United States. *J Clin Epidemiol* 1991; 44(1):29-39.
3. Chu KC, Tarone RE, Kessler LG, Ries LA, Hankey BF, Miller BA, et al. Recent Trends in U.S. Breast Cancer Incidence, Survival, and Mortality Rates. *J Natl Cancer Inst* 1996 Nov 6;88(21):1571-9
4. Couch FJ., Weber BL. Chapter: Breast Cancer. In *The Genetic Basis of Human Cancer*, Vogelstein B, Kinsler KW, McGraw-Hill, Mexico, D.F., 1998; 30:537-63.
5. Bondy ML, Spitz MR, Halabi S, Fueger JJ, Vogel VJ Low Incidence of Familial Breast Cancer Among Hispanic Women. *Cancer Causes and Control* 1992, 3:377-82
6. López-Ríos O, Lazcano-Ponce E, et al. La Epidemia de Cáncer de Mama en México ¿Consecuencia de la Transición Demográfica?. *Salud Pública de México*, 1997; 39:1-7
7. Estadísticas Vitales de la Secretaría de Salud. 1996.
8. López-Carrillo L, Bravo-Alvarado J, Poblano-Verastegui O, Ortega-Altamirano D Reproductive Determinants of Breast Cancer in Mexican Women. *Annals New York Academy of Science* 1997 Dec 26; 837:537-50.
9. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal A, Harshman K, Tavtigian S, et al A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science* 1994; 266:66-71.
10. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al Identification of the Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789-92
11. Seitz S, Rohde K, Bender E, Nothnagel A, Kolble K, Schlag PM, et al Strong Indication for a Breast Cancer Susceptibility Gene on Chromosome 8p12-p22: Linkage Analysis in German Breast Cancer Families. *Oncogene* 1997; 14(6):741-43.
12. Price MA, Tennant CC, Smith RC, Kennedy SJ, Butow PN, Kossoff MB, et al Predictors of Breast Cancer in Women Recalled Following Screening. *Aust N Z J Surg* 1999 Sep; 69(9):639-46.
13. Trichopoulos D, Macmahom B, Cole P Menopause and Breast Cancer Risk. *JNCI* 1972; 48:605,
14. Pike MC, Spicer DV, Dahmouh L, Press MF: Estrogens, Progesterones, Normal Breast Cell Proliferation, and Breast Cancer Risk. *Epidemiol Rev* 1993; 15(1):17-35.
15. Tokunaga M, Land CE, Tokuoka S, Nishimori I, Soda M, Akiba S Incidence of Female Breast Cancer Among Atomic Bomb Survivors, 1950-1985. *Radiat Res*

- 1994 May; 138(2):209-23.
16. Bhatia S, Robinson LL, Oberlin O, Greenberg M, et al Breast Cancer and Other Second Neoplasm After Childhood Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 1996 Mar 21; 334(12):745-51.
  17. Metierran A, Thomas DB. Evidence for a Protective Effect of Lactation on Risk of Breast Cancer in Younger Women: Results from a Case-Control Study. *Am J Epidemiol.* 1986; 124:353-58.
  18. Buell P Changing Incidence of Breast Cancer in Japanese-American Women *J Natl Cancer Inst* 1973; 51(5):1479- 83.
  19. Palmer JR, Rosenberg L, Rao RS, Zauber A, Strom BL, Warshauer ME, et al Induced and Spontaneous Abortion in Relation to Risk of Breast Cancer (United States) *Cancer Causes Control* 1997 Nov; 8(6):841-49.
  20. Gertig DM, Stillman IE, Byrne C, Spiegelman D, Schnitt SJ, Connolly JL, et al Association of Age and Reproductive Factors with Benign Breast Tissue Composition *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999 Oct; 8(10):873-79
  21. Tseng M, Weinberg CR, Umbach DM, Longnecker MP Calculation of Population Attributable Risk for Alcohol and Breast Cancer (United States) *Cancer Causes Control* 1999 Apr; 10(2):119-23
  22. Carpenter CL, Ross RK, Paganini-Hill A, Bernstein L Lifetime Exercise Activity and Breast Cancer Risk Among Post-Menopausal Women *Br J Cancer* 1999 Aug; 80(11):1852-58.
  23. Chiechi LM, Secreto G Breast Cancer and Replacement Therapy: Which Women are at Risk? 1999; 26(2):105-08.
  24. Romeu I, Hernandez-Avila M., Lazcano E, López L, Romero-Jaime R Breast Cancer and Lactation History in Mexican Women. *Am J Epidemiol* 1996; 143(6):543-52.
  25. Paredes-López A. Factores de Riesgo en Cáncer Mamario. Análisis Prospectivo de 414 Pacientes. *Gin Obst Méx* 1991; 59: 41-45.
  26. Calderon-Garcidueñas AL, Parás-Barrientos FU, Cárdenas-Ibarra L, González-Guerrero JF, Villarreal Ríos E, Staines Boone T, et al. Risk Factors of Breast Cancer and Family History in Mexican Womens. *Sal Púb Méx.* 2000; 42(1):26-33.
  27. Warmuth MA, Sutton LM, Winer EP A Review of Hereditary Breast Cancer: from Screening to Risk Factor Modification. *Am J Med* 1997 Apr; 102:407-15.
  28. Anderson DE, Badzioch MD: Familial Breast Cancer Risk: Effects of Prostate and Other Cancers . *Cancer* 1993; 72(1):114-119.
  29. Greene MH. Genetics of Breast Cancer. *Mayo Clin Proc* 1997; 72:54-65
  30. Claus EB, Schildkrut JM, Thompson WD, Risch NJ The Genetic Attributable Risk of Breast and Ovarian Cancer. *Cancer* 1996 Jun 1; 77(11):2318-24.
  31. Hill ADK, Doyle JM, McDermott EW, O'Higgins NJ Hereditary Breast Cancer. *B J Surg* 1997; 84:1334-39.
  32. Adebarnowo CA, Adekunle OO Case-Controlled Study of the Epidemiological Risk Factors for Breast Cancer in Nigeria *Br J Surg* 1999 May; 86(5):665-68
  33. Williams WR, Anderson DE: Genetic Epidemiology of Breast Cancer. Segregation and Analysis of 200 Danish Pedigrees. *Genet Epidemiol* 1984; 1(1):7-20.
  34. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al Linkage of Early Onset Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science* 1990; 250(4988):1684-89.

35. Narod SA, Feuteun J, Lynch HT, Watson P, Conway T, Lynch J, et al: Familial Breast-Ovarian Cancer Locus on Chromosome 17q21-21. *Lancet* 1991 Jul 13; 338(8759):82-83.
36. Tavtigian SV, Simard J, Romens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neunhausen S, et al: The Complete BRCA2 Gene and Mutations in Chromosome 13q-linked Kindreds. *Nat Genet* 1996 12(3):333-37.
37. Zhu X, Daffada AA, Chan CM, Dowsett M Identification of an Exon 3 Deletion Splice Variant Androgen Receptor mRNA in Human Breast Cancer. *Int J Cancer* 1997 Aug 7; 72(4):574-80.
38. Santibañez-Koref MF, Bich JM, Harley AL, Morris Jones PH, Crash AH, Eden T, et al p53 Germline Mutations in Li Fraumeni Syndrome. *Lancet* 1991; 338(8781):1490-91.
39. FitzGerald MG, Marsh DJ, Wahrer D, Bell D, Caron S, Shannon KE, et al Germline Mutations in PTEN are an Infrequent Cause of Genetic Predisposition to Breast Cancer. *Oncogene* 1998 Aug 13; 17(6):727-31.
40. Graham R, McKee P, McGibbon D, Heyderman E Torre-Muir Syndrome. An Association with Isolated Sebaceous Carcinoma. *Cancer* 1985 Jun 15; 55(12):2868-73.
41. Bishop T and Hopper J. AT-Atributable Risk?. *Nat Genet* 1997 mar; 15(3):226.
42. Phelan C, Rebbeck T. Ovarian Cancer Risk in BRCA1 Carriers is Modified by the Hras1 Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Locus *Nat Genet*. 1996 Mar; 12(3):309-11.
43. Easton DE, Bishop DT, Ford D, Crockford GP and The Breast Cancer Linkage Consortium: Genetic Linkage Analysis in Familial Breast and Ovarian Cancer. Results from 214 Families. *Am J Hum Genet* 1993; 52(4): 678-701.
44. Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, Mc Adams M, et al. The Rsk of Cancer Associated with Specific Mutations of BRCA1 and BRCA2 Among Ashkenazi Jews. *New Eng J Med* 1997; 336(20):1401-08.
45. Easton DF, Ford D, Bishop DT Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1995 Jan; 56(1):265-71.
46. Merajver SD, Pham TM, Caduff RF, Chen M, Poy EL, Cooney KA, et al Somatic Mutations in the BRCA1 Gene in Sporadic Ovarian Tumors. *Nat Genet* 1995; 9(4):439-43.
47. Matsushima M, Kobayashi K, Emi M, Saito H, Saito J, Suzumori K, et al Mutation Analysis of the BRCA1 Gene in 76 Japanese Ovarian Cancer Patients: Four Germline Mutations, but no Evidence of Somatic Mutation. *Hum Mol Genet* 1995; 4(10):1953-56.
48. Boyd M, Harris F, McFarlane R, Davidson R, Black DM: A Human BRCA1 Gene Knockout. *Nature* 1995; 375(6532): 541-42.
49. Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M A Comparison of BRCA1 Mutation Analysis by Direct Sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 1999 Jul-Aug; 105(1-2):72-78.
50. Hogervorst FBL, Cornelis RS, Bout M, Van Bliet M, Oosterwik JC, Olmer R, et al: Rapid Detection of BRCA1 Mutations by the Protein Truncation Test. *Nat Genet* 1995; 10(2):208-12.
51. Plummer SJ, Anton-Culver H, Webster L, Noble B, Liao S, Kennedy A, et al

- Detection of BRCA1 Mutations by the Protein Truncation Test. *Hum Mol Genet* 1995; 4(10):1989-91.
52. Gayther SA, Harrington P, Russell P, Kharkevich G, Garkatseva RF, Ponder BA UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group: Rapid Detection of Regionally Clustered Germ-line BRCA1 Mutations by Multiplex Heteroduplex Analysis. *Am J Hum Genet* 1996; 58(3):451-56.
  53. Couch FJ, Weber BI: Breast Cancer Information Core: Mutations and Polimorphisms in the Familial Early-Onset Breast Cancer (BRCA1) Gene. *Hum Mutat* 1996; 8(1):8-18.
  54. Gayther SA, Warren W, Mazoyer S, Russel PA, Harrington PA, Chiano M, et al: Germ-Line Mutations of the BRCA1 Gene in Breast-Ovarian Cancer Families Provide Evidence for a Genotype/Fenotype Correlation. *Nat Genet* 1995; 11(4):428-33.
  55. Sobol H, Stoppa Lyonnet D, Bressac DE, Paillerets B, Peyrat JP, et al: Truncation at Conserved Terminal Regions of BRCA1 Protein is Associated with Highling Proliferating Hereditary Breast Cancers. *Cancer Res* 1996; 56(14):3216-9.
  56. Arason A, Barkardottir RB, Egilsson V: Linkage Analysis of Chromosome 17 Markers and Breast-Ovarian Cancer in Iceland Families and Possible Relationship to Prostatic Cancer. *Am J Hum Genet* 1993; 52(4):711-17.
  57. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE: Breast Cancer Linkage Consortium: Risk of Cancer in BRCA1 Mutation Carriers. *Lancet* 1994; 343(8899):692-95.
  58. Friedman LS, Gayther SA, Kurosaki T, Gordon D, Nobile B, Casey G, et al. Mutation Analysis of BRCA1 and BRCA2 in Male Breast Cancer Population. *Am J Hum Genet* 1997; 60(2):313-319.
  59. Krainer M, Silva-Arrieta S, FitzGerald MJ, Shimada A, Ishioka C, Kanamuru, R, et al. Differential Contributions of BRCA1 and BRCA2 to Early-Onset Breast Cancer. *N Eng J Med* 1997; 336(20):1416-21.
  60. Marquis ST, Rajan JV, Wynsjaw-Boris A, Xu J, Yin GY, Abel KJ, et al: The Developmental Pattern of BRCA1 Expression and Modulation by Ovarian Hormones Implmes a Role in Differentiation of the Breast and Other Tissues. *Nat Genet* 1995; 11(1):17-26.
  61. Chapman MS, Verma IM: Transcriptional Activation by BRCA1, *Nature* 1996; 382(6593):678-79.
  62. Brown MA, Nicolai H, Xu CE, Griffiths BL, Jones KA, Solomon E, et al Regulation of BRCA1. *Nature* 1994; 372(6508):733.
  63. Gudas JM, Neguyen H, Li T, Cowan KH: Hormone-Dependent Regulation of BRCA1 in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 1995; 55(20):4561-65.
  64. Gudas JM, Li T, Neguyen H, Jensen D, Raucher FJ, Cowan KH: Cell Cycle Regulation of BRCA1 Messeger RNA in Human Breast Epitelial Cells. *Cell Growth Diff* 1996; 7(6):717-23,.
  65. Marquis ST, Rajan JV, Wynshaw-Boris A, Xu J, Yin GY, Abel KJ, et al The Developmental Pattern of BRCA1 Expression Implies a Role in Differentiation of the Breast and Other Tissues *Nat Genet* 1995 Sep;11(1):17-26.
  66. Chen Y, Chen CF, Riley DJ, Allred DC, Chen PI, Conhoff D, et al Aberrant Subcellular Localization of BRCA1 in Breast Cancer. *Science* 1995; 270(5237):789-91.



67. Jensen RA, Thompson ME, Jetton TI, Szabo CI, Van der Meer R, Helon B, et al BRCA1 is Secreted and Exhibits Properties of a Granina. *Nat Genet* 1996; 12(3):303-08.
68. Diamandis EP Letter Comments: Comments on Nat Genet 1996, mar; 12(3):303-8. ...and Secreted Tumour Suppressors. *Nat Genet* 1996 jul;13(3):268.
69. Smith SA, Easton DF, Evans DGR, Ponder BAJ. Allele Losses in the Region 17q12-q21 in Familial Breast and Ovarian Cancer non-Randomly Involve the Wild Type Chromosome. *Nat Genet* 1992; 2:128-131.
70. Holt JT, Thompson ME, Szabo C, Robinson-Benion C, Arteaga CL, King MC et al Growth Retardation and Tumour Inhibition by BRCA1. *Nat Genet* 1996; 12(3) 298-302.
71. Rao VN, Shao N, Ahmad M, Shyam E, Reddy P: Antisense RNA to the putative tumor supressor gene BRCA1 transforms mouse fibroblasts, *Oncogene*, 1996; 12: 523-28.
72. Shao N, Chai YI, Shyam F, Reddy P, Rao VN: Induction of Apoptosis by the Tumor Suppressor Protein BRCA1. *Oncogene* 1996; 13(1):1-7.
73. Hakem R, de la Pompa JL, Elia A, Potter J, Mak TW Partial Rescue of Brcal (5-6) Early Embryonic Lethality by p53 or p21 Null Mutation. *Nat Genet* 1997 Jul;16(3):298-302.
74. Saurin AJ, Borden KL, Boddy MN, Freemont PS. Does This Have a Familial Ring?. *Trends Biochem Sci* 1996; 21:208-14.
75. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, et al. Identification of a RING Protein that Can Interact in Vivo with BRCA1 Gene Product. *Nat Genet* 1996; 14(4):430-40.
76. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. Control of Gene Expression in: *Molecular Biology of the Cell*. Garland, New York. 1994; 3rd Ed. 401-474.
77. Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, Gardner HP, Ha SI, Chodosh LA, et al BAP1: A Novel Ubiquitin Hydrolase Which Binds to the BRCA1 RING Finger and Enhances BRCA1-Mediated Cell Growth Suppression. *Oncogene* 1998 Mar 5; 16(9):1097-112.
78. Koonin EV, Altschul SF, Bork P. BRCA1 Protein Products: Functional Motifs. *Nat Genet* 1996; 13:266-267.
79. Thakur S, Zhang HB, Peng Y, Le H, Carroll B, Ward T, et al Localization of BRCA1 and a Splice Variant Identifies the Nuclear Localization Signal. *Mol Cell Biol* 1997 Jan; 17(1):444-52
80. Chen CF, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH The Nuclear Localization Sequences of the BRCA1 Protein Interact with the Importin-Alpha Subunit of the Nuclear Transport Signal Receptor. *J Biol Chem* 1996 Dec 20; 271(51):32863-8
81. Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, et al Association of BRCA1 with Rad51 in Mitotic and Meiotic Cells. *Cell* 1997 Jan 24; 88(2):265-75
82. Chen Y, Farmer AA, Jones DC, Chen PI, Lee WH: BRCA1 is a 220 Kda Nuclear Phosphoprotein that is Expressed and Phosphorylated in a Cell Cycle Dependent Manner. *Cancer Res* 1996; 56(14): 3168-72.
83. Stratton MR, Ford D, Heuhausen S, Wooster R, Friedman LS, King MC, et al Familial Male Breast Cancer is not Linked to the BRCA1 Locus on Chromosome 17q. *Nat Genet* 1994; 7(1):103-107.

84. Wooster R, Neuhausen S, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al: Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA2 to Chromosome 13q 12-13. *Science* 1994; 265(5181):2088-90.
85. Neuhausen SL, Godwin AK, Gershoni-Baruch R, Schubert E, Garber J, Stoppa-Lyonnet D, et al. Haplotype and Phenotype Analysis of Nine Recurrent BRCA2 Mutations in 111 Families: Results of an International Study. *Am J Hum Genet* 1998; 62(6):1381-88.
86. Couch FJ, Farid LM, Deshano ML, Tavtigian SV, Calzone KA, Campeau L, et al: BRCA2 Germline Mutations in Male Breast Cancer Cases and Breast Cancer Families. *Nat Genet* 1996; 13(1):123-25.
87. Gayther SA, Mangion J, Russell P, Seal S, Barfoot R, Ponder BA, et al. Variation of Risk of Breast and Ovarian Cancer Associated with Different Germline Mutations of the BRCA2 Gene. *Nat Genet* 1997; 15(1):103-05.
88. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. *Am J Hum Genet* 1998; 62(3):676-689.
89. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards S. Ashkenazi Jewish Population Frequencies for Common Mutation in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet* 1996 oct; 14(2):185-87.
90. Ramus SJ, Friedman LS. A Breast/Ovarian Cancer Patient with Germline Mutations in Both BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet* 1997; 15(1):14-15.
91. Bignell G, Micklem G, Stratton MR, Ashworth A, Wooster R. The BRC Repeats are Conserved in Mammalian BRCA2 Proteins. *Hum Mol Gen* 1997; 6:53-58.
92. Vaughn JP, Cirisano FD, Huper G, Berchuck A, Futreal PA, Marks JR, et al Cell Cycle Control of BRCA2. *Cancer Res* 1998; 56(20):4590-94.
93. Bertwistle D, Swift S, Marston NJ, Jackson LE, Crossland S, Crompton MR, et al. Nuclear Location and Cell Cycle Regulation of the BRCA2 Protein. *Cancer Res* 1997; 57(24):5485-88.
94. Milner J, Ponder B, Hugues-Davies L, Seltnman M, Kouzarides T Transcriptional Activation Functions in BRCA2. *Nature* 1997; 386(6627):772-73.
95. Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PA. RAD51 Interacts with the Evolutionary Conserved BRC Motifs in the Human Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA2. *J Biol Chem* 1997; 272:31941-44.
96. Shara SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, Dinh C, et al. Embryonic Lethality and Radiation Hypersensitivity Mediated by RAD51 in Mice Lacking BRCA2. *Nature* 1997; 386(6627):804-10.
97. Patel KJ, Yu VP, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, et al Involvement of BRCA2 in DNA Repair. *Molecular Cell* 1998; 1(3):347-57.
98. Zhang H, Tomblin G, Weber BL. BRCA1/ BRCA2, and DNA Damage Response: Collision or Collusion?. *Cell* 1998; 92:433-436.
99. Szabo CI, King MC. Invited Editorial. Population Genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1013-20.
100. Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S, et al. Common Origin of BRCA1 Mutations in Canadian Breast and Ovarian Cancer Families. *Nat Genet* 1994; 8(4):392-98.
101. Phelan CM, Lancaster JM, Tonin P, Gums C, Cochran C, Carter R, et al. Mutation Analysis of the BRCA2 Gene in 49 Site Specific Breast Cancer Families. *Nat Genet*

- 1996; 13 (1):120-22
102. Vehmanen P, Friedman LS, Eerola H, Sarantaus L, Pylhonen S, Ponder BA, et al. A Low Proportion of BRCA2 Founder Mutations in Finnish Breast Cancer Families. *Am J Hum Genet* 1997; 60(5):1050-58.
  103. Serova-Sinilnikova OM, Boutrand L, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de-Paillerets B, Dubois V, Lasset C, et al. BRCA2 Mutations in Hereditary Breast and Ovarian Cancer in France. *Am J Hum Genet* 1997; 60(5):1236-39.
  104. Stoppa-Lyonnet D, Laurent-Puig P, Essioux L, Pages S, Ithier G, Ligot L, et al. BRCA1 sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. Institut Curie Breast Cancer Group. *Am J Hum Genet.* 1997 May;60(5):1021-30.
  105. Levy-Lahad E, Catane R, Eisenberg S, Kaufman B, Hornreich G, Lishinsky E, et al. Founder BRCA1 and BRCA2 Mutations in Ashkenazi Jews in Israel: Frequency and Differential Penetrance in Ovarian Cancer and in Breast-Ovarian Cancer Families. *Am J Hum Genet* 1997; 60(5):1059-67.
  106. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavgian SV, et al. A Single BRCA2 Mutation in Male and Female Breast Cancer Families from Iceland with Varied Cancer Phenotypes. *Nat Genet* 1996; 13(1):117-19.
  107. Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, et al. Mutations in the BRCA1 Gene in Families with Early-Onset Breast and Ovarian Cancer. *Nat Genet* 1994; 8(4):387-91.
  108. Arena JF, Smith S, Plewinska M, Gayol L, et al. BRCA1 Mutations in African-American Women. *Am J Hum Genet Suppl* 1996; 59:A34.
  109. Inoue R, Fukutomi T, Ushijima T, Matsumoto Y, Sugimura T, Nagao M Germiline Mutations of BRCA1 in Japanese Breast Cancer Families. *Cancer Res* 1995; 55(16):3521-24.
  110. Gayther SA, Harrington P, Russell P, Kharkevich G, Garkavtseva RF, Ponder BA Frequently Occurring Germline Mutations of the BRCA1 Gene in Ovarian Cancer Families from Russia. *Am J Hum Genet* 60(5):1239-42.
  111. Montagna M, Santacatterina M, Corneo B, Menin C, Serova O, Lenoir GM, et al. Identification of Seven New BRCA1 Germline Mutations in Italian Breast and Breast/Ovarian Cancer Families. *Cancer Res* 1996; 56(23):5466-69.
  112. Jandrig B, Grade K, Seitz S, Waandzoch B, Muller M, Bender E, et al. BRCA1 Mutations in German Breast-Cancer Families. *Int J Cancer* 1996; 68(2):188-92.
  113. Andersen TI, Borrensens AL, Moller P. A common BRCA1 Mutation in Norwegian Breast and Ovarian Cancer Families. *Am J Hum Genet* 1996; 59:486-487.
  114. Ramus SJ, Kote-Jarai Z, Friedman LS, van der Looij M, Gayther SA, Csokay B, et al Analysis of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Hungarian Families with Breast or Breast-Ovarian Cancer. *Am J Hum Genet* 1997; 60(5):1242-1246.
  115. Robledo M, Osorio A, Sentis C, Albertos J, Estevez L, Benitez J The 12 Base Pair Duplication/insertion Alteration Could be a Regulatory Mutation. *J Med Genet* 1997; 34:592-93.
  116. Osorio A, Robledo M, Albertos J, Diez O, Alonso C, Baiget M et al Molecular Analysis of the Six Most Recurrent Mutations in the BRCA1 Gene in 87 Spanish Breast/Ovarian Cancer Families. *Cancer Letters* 1998; 123:153-58.
  117. Diez O, del Rio E, Domènech M, Hernández EM, Sanz J, et al Mutaciones en el Gen BRCA1 en Mujeres Españolas Jóvenes con Cáncer de Mama. *Med Clin (Barc)*

- 1999; 112:51-54.
118. Osorio A, Robledo M, Martínez B, Cebrián A, San Román JM, et al Molecular Analysis of the BRCA2 Gene in 16 Breast/Ovarian Cancer Spanish Families. *Clin Genet* 1998, 54:142-147.
  119. Díez O, del Río E, Domènech M, Sanz J, Cortés J, et al Identificación de una Nueva Mutación en el Gen BRCA2 Mediante Análisis de la Proteína Truncada en Una Familia Española con Cáncer de Mama Hereditario. *Med Clin (Barc)* 1999, 112:179-181.
  120. Corvello CM, Duarte APM, Mourao-Neto M, Simpson AJG BRCA1, BRCA2 and Tp53 Germline Mutations in Brazilian Breast Cancer Families: In the 21th San Antonio Breast Cancer Symposium. *Breast Cancer Res Treat* 1998: 50(3)297.
  121. Calderón-Garcidueñas A, Parás-Barrientos U, Cárdenas-Ibarra L, González Guerrero J, Staines T, Barrera-Saldaña HA Risk Factors Analysis in Breast Carcinoma and Search of Mutations in BRCA1 Gene, in Mexican Patients: In the 21th San Antonio Breast Cancer Symposium. *Breast Cancer Res Treat* 1998: 50(3)298.
  122. Trincado P, Fardella C, Mayerson D, Montero L, O'Brien A, et al Prevalencia de la Delección 185AG del Gen BRCA1 en Mujeres Chilenas con Cáncer de Mama. *Rev Med Chile* 1999; 127:19-22.
  123. Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, Labrie F, Narod S, Couch F, et al A Collaborative Survey of 80 Mutations in the BRCA1 Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene. *JAMA* 1995; 273(7):535-4.
  124. Biesecker BB, Boehnke M, Calzone K, Markel DS, Garber JE, Collins FS, et al. Genetic Counseling for Families with Inherited Susceptibility to Breast and Ovarian Cancer. *JAMA*, 1993, 269(15):1970-74.
  125. Burke W, Daly M, Garber J, Botkin J, Kahn MJ, Lynch P, et al. Consensus Statment. Recommendations for Follow-up Care of Individuals with an Inherited Predisposition to Cancer. BRCA1 and BRCA2. *JAMA*. 1997; 277(12):997-1003.
  126. Hartmann LC, Schaid DJ, Wodds JE, Crotty TP, Myers JL, Arnold PG, et al Efficacy of Bilateral Prophylactic Mastectomy in Women with a Family History of Breast Cancer. *N Eng J Med* 1999; 340(2):77-84.
  127. Pilot Trial to Evaluate the Acute Toxicity and Feasibility of Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer. *Br J Cancer* 1989; 60:126-31.
  128. Fisher B, Constantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(18):1371-88.
  129. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, et al The Effect of Raloxifene on Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women: Results from the MORE Randomized Trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA* 1999; 281(23):2189-97.
  130. Biesecker BB, Boehnke M, Calzone K, Markel DS, Garber JE, Collins FS, et al. Genetic Counseling for Families with Inherited Susceptibility to Breast and Ovarian Cancer. *JAMA*, 1993, 269(15):1970-74.
  131. Hoskins KF, Stopfer JE, Calzone KA, Merajver SD, Rebbeck TR, Garber JE, et al. Assessment and Counseling for Women with a Family History of Breast Cancer. A Guide for Clinicians. *JAMA*, 1995; 273(7):577-85.

132. Cockburn J, Redman S, and Kricker A. Should Women Take Part in Clinical Trials in Breast Cancer? Issues and Some Solutions. *J Clin Oncol* 1998; 16(1):354-362.
133. Orentlicher D. Rationing and the Americans with Disabilities Act. *JAMA* 1994; 271(4):308-314.
134. Blumberg LJ, Nichols LM The Health Insurance Portability and Accountability Act of 1996: Summary of Provisions and Anticipated Effects. *J Med Pract Manage* 1998; 14(1):13-8.
135. Edwards JG, Young SR, Brooks KA, Aiken JH, Patterson ED, Pritchett ST Developing Genetic Privacy Legislation: The South Carolina Experience. *Genet Test* 1998; 2(1):37-41.
136. Eeles RA, Murday BA. The Cancer Family Clinic: In Genetic Predisposition to Cancer. Chapman (Hall, London, 1996; 357-371.
137. Burke W, Press Nn, Pinsky L Workshop on Heritable Cancer Syndromes and Genetic Testing. Breast Carcinoma Genetics from a Primary Care Perspective.
138. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF A Simple Salting Out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic Acid Res* 1988, 16(3):1215.
139. Sinilnikova OM, Egan KM, Quinn JL, Boutrand L, Lenoir GM, Stoppa-Lyonnet D, et al. Germline brca2 sequence variants in patients with ocular melanoma. *Int J Cancer* 1999 Jul 30;82(3):325-8
140. Bergthorsson JT, Jonasdottir A, Johannesdottir G, Arason A, Egilsson V, et al., Identification of a novel splice-site mutation of the BRCA1 gene in two breast cancer families: screening reveals low frequency in Icelandic breast cancer patients. *Hum Mutat.* 1998;Suppl 1:S195-7.
141. Osorio A, Barroso A, Martínez B, Cebrian A, San Roman JM, Lobo F, et al., Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families. *Br J Cancer.* 2000 Apr;82(7):1266-70.
142. Ho GH, Phang BH, Ng IS, Law HY, Soo KC, Ng EG. Novel germline BRCA1 mutations detected in women in singapore who developed breast carcinoma before the age of 36 years. *Cancer.* 2000 Aug 15;89(4):811-6.
143. Langston AA, Malone KE, Thompson JD, Daling JR, Ostrander EA BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med.* 1996 Jan 18;334(3):137-42.
144. FitzGerald MG, MacDonald DJ, Kraitner M, Hoover I, O'Neil E, Unsal H, et al., Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer. *N Engl J Med.* 1996 Jan 18;334(3):143-9.
145. Durocher F, Shattuck-Eidens D, McClure M, Labrie F, Skolnick MH, Goldgar DE, Simard J. Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. *Hum Mol Genet.* 1996 Jun;5(6):835-42.
146. Dunning AM, Chiano M, Smith NR, Dearden J, Gore M, Oakes S, et al., Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Hum Mol Genet.* 1997 Feb;6(2):285-9.
147. Wagner TM, Moslinger RA, Muhr D, Langbauer G, Hittenlener K, Concin H, et al., BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics. *Int J Cancer.* 1998 Jul 29;77(3):354-60.

148. Mazoyer S, Puget N, Perrin-Vidoz L, Lynch HT, Serova-Sinilnikova OM, Lenoir GM. A BRCA1 nonsense mutation causes exon skipping. *Am J Hum Genet.* 1998 Mar;62(3):713-5.
149. Puget N, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM, Pages S, Lynch HT, Lenoir GM, Mazoyer S. Screening for germ-line rearrangements and regulatory mutations in BRCA1 led to the identification of four new deletions. *Cancer Res.* 1999 Jan 15;59(2):455-61.
150. Wang T, Lerer I, Gueta Z, Sagi M, Kadouri L, Peretz T, Abeliovich D. A deletion/insertion mutation in the BRCA2 gene in a breast cancer family: A possible role of the Alu-polyA tail in the evolution of the deletion. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001 May;31(1):91-5.
151. Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jun 2;91(11):943-9.
152. Hopper JL, Southey MC, Dite GS, Jolley DJ, Giles GG, McCredie MR, et al. Population-based estimate of the average age-specific cumulative risk of breast cancer for a defined set of protein-truncating mutations in BRCA1 and BRCA2. Australian Breast Cancer Family Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Sep;8(9):741-7.
153. Malone KE, Daling JR, Neal C, Suter NM, O'Brien C, Cushing-Haugen K, et al. Frequency of BRCA1/BRCA2 mutations in a population-based sample of young breast carcinoma cases. *Cancer.* 2000 Mar 15;88(6):1393-402.
154. Diez O, Cortes J, Domenech M, Brunet J, Del Rio E, Pericay C, et al. BRCA1 mutation analysis in 83 Spanish breast and breast/ovarian cancer families. *Int J Cancer.* 1999 Nov 12;83(4):465-9.
155. Blesa JR, Garcia JA, Ochoa E. Frequency of germ-line BRCA1 mutations among Spanish families from a Mediterranean area. *Hum Mutat.* 2000 Apr;15(4):381-2.

## CAPÍTULO X

### 10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

#### ARTÍCULOS ORIGINALES

##### Enviados:

1. **Ruiz-Flores P**, Sinilnikova OM, Badzioch M, Calderón-Garcidueñas AL, Chopin S, González-Guerrero JF, Szabo C, Lenoir G, Goldgar D, Barrera-Saldaña HA. BRCA1 and BRCA2 Mutation Analysis of Early-Onset and Familial Breast Cancer Cases in Mexico. Enviado a *Int J Cancer*.
2. Goldgar D, Szabo C, Badzioch M, Sinilnikova O, Lenoir G, and the MAGIC Collaborative Group: Koifman S, Llerena J, **Ruiz-Flores P**, Barrera-Saldaña HA, Zhi H, Saxena S, Medhipour P, Ruisanchez N, Pimmiswatt P. Mutational profile of BRCA1/2 mutations in worldwide populations. The MAGIC project. Enviado a *Int J Cancer*.

##### En Preparación:

3. **Ruiz-Flores P**, Ortiz-López R, Sinilnikova O, González-Guerrero JF, Calderón-Garcidueñas AL, Szabo C, Goldgar D, Lenoir G, Barrera Saldaña HA. BRCA1 and BRCA2 Polimorphisms in Early-Onset and Familial Breast Cancer Cases in Mexico.
4. **Ruiz-Flores P**, Lazcano-Ponce E, Ortiz-López R, González-Guerrero JF, Calderón-Garcidueñas AL, Barrera-Saldaña HA. Análisis de Sobrevida en Pacientes Mexicanas con Cáncer de Mama Familiar y de Inicio Temprano.
5. **Ruiz-Flores P**, Ortiz-López R, Rojas-Atencio A, Taquía E, Esquivel-Escobedo D, Cab-Barrera EL, Barrera-Saldaña HA. BRCA1 and BRCA2 Mutation Analysis of Early-onset and Familial Breast Cancer Cases in Three Latin American Countries.

#### ARTÍCULO DE REVISIÓN

6. **Ruiz-Flores P**, Calderón-Garcidueñas AL, Barrera-Saldaña HA. Genética del Cáncer de Mama. BRCA1 y BRCA2. Los Principales Genes de Predisposición a la Enfermedad. *Rev Invest Clin* 2001, 53(1):50-58.

#### ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN

7. **Ruiz-Flores P**, Barrera-Saldaña HA. Conceptos Actuales en Cáncer de Mama. *Ciencia UANL* 2000, II(3):281-290.
8. **Ruiz-Flores P**, Ortiz-López R, Barrera-Saldaña HA. El Cáncer de Mama Hereditario. Aceptado para publicación. *Salud Pública y Nutrición* de la UANL

# **ANEXOS**



# ANEXO 1

**PROTOCOLO: Identificación de Mutaciones en los Genes BRCA1 y BRCA2 en Familias del Noreste de México con Predisposición al Cáncer de Mama.**

No. de paciente: \_\_\_\_\_

Elaboró: \_\_\_\_\_

## DATOS GENERALES:

Nombre: \_\_\_\_\_

Hospital: \_\_\_\_\_ 1 IMSS 25 2. HU

Cédula o No. de Expediente: \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Estado Civil \_\_\_\_\_ Ocupación: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

## ANTECEDENTES PERSONALES:

### HÁBITOS

Tabaquismo: No. de años \_\_\_\_\_ No. de cigarrillos al día \_\_\_\_\_

Alcoholismo: No. de años \_\_\_\_\_ No. de conas por semana \_\_\_\_\_

## ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS

Menarca \_\_\_\_\_ IVSA \_\_\_\_\_ Edad de primera gesta \_\_\_\_\_

Gestas \_\_\_\_\_ Abortos \_\_\_\_\_ Para \_\_\_\_\_ Cesárea \_\_\_\_\_

Meses de lactancia por niño \_\_\_\_\_ Métodos anticonceptivos \_\_\_\_\_

Tiempo de uso \_\_\_\_\_

## MORFOMETRÍA

Peso \_\_\_\_\_ Talla \_\_\_\_\_

**PATOLOGÍA CRÓNICA NO NEOPLÁSICA**

1. Diabetes 2. Hipertensión Arterial 3. Obesidad 4. Artritis Reumatoide  
5. Cardiopatía Isquémica 6. Infecciones tipo \_\_\_\_\_  
Otras \_\_\_\_\_

**PATOLOGÍA NEOPLÁSICA PREVIA**

Sitio \_\_\_\_\_ Diagnóstico \_\_\_\_\_  
Edad al diagnóstico Estado Actual

**PATOLOGÍA MAMARIA PREVIA**

1. Fibroadenoma 2. Mastopatía Fibroquística 3. Mastitis Aguda (con o sin absceso)  
4. Mastitis Crónica 5. Adenomas 6. Papiloma 7. Otros  
Especificar \_\_\_\_\_  
Lado de presentación \_\_\_\_\_ Edad de Presentación \_\_\_\_\_

**NEOPLASIA MAMARIA ACTUAL**

Tiempo de haberse detectado el  
tumor \_\_\_\_\_  
Lado \_\_\_\_\_ Cuadrante \_\_\_\_\_ Diámetro en cms. \_\_\_\_\_  
Paget positivo? \_\_\_\_\_  
Piel: 1. Ulceración 2. Retracción 3. De Naranja 4. \_\_\_\_\_  
Inflamación

**GANGLIOS POSITIVOS:**

Localización \_\_\_\_\_ Número \_\_\_\_\_ Diámetro Máximo \_\_\_\_\_

**LABORATORIO DE PATOLOGÍA**

Citología: No. de estudio \_\_\_\_\_ Diagnóstico \_\_\_\_\_  
Biopsia: No. de estudio \_\_\_\_\_ Diagnóstico \_\_\_\_\_  
Pieza quirúrgica: 1. Cuadrantectomía 2. Mastectomía simple  
3. Mastectomía radical modi 4. Otra \_\_\_\_\_  
Tipo Celular: 1. Ductal 2. Lobulillar 3. Otro \_\_\_\_\_  
Grado de Diferenciación 1. Buena 2. Moderada 3. Pobre 4. Indiferenciada

**CIRUGÍA MAMARIA INICIAL**

**Fecha:** \_\_\_\_\_ **Indicación:** 1. Terapéutica      2. Limpieza

**TRATAMIENTO NO QUIRÚRGICO PREOPERATORIO**

**1. Quimioterapia**

**2. Radiación**

**3. Inmunoterapia**

**Quimioterapia**

**Droga**

**Dosis/m<sup>2</sup>**

**Ciclos**

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

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

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

**Radioterapia**

**Sitio** \_\_\_\_\_ **Dosis total** \_\_\_\_\_ **No. de sesiones** \_\_\_\_\_

**Inmunoterapia**

**Tipo** \_\_\_\_\_ **Dosis total** \_\_\_\_\_ **No. de sesiones** \_\_\_\_\_

**TRATAMIENTO NO QUIRÚRGICO POSTOPERATORIO**

**1. Quimioterapia**

**2. Radiación**

**3. Inmunoterapia**

**Quimioterapia**

**Droga**

**Dosis/m<sup>2</sup>**

**Ciclos**

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

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

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

**Radioterapia**

**Sitio** \_\_\_\_\_ **Dosis total** \_\_\_\_\_ **No. de sesiones** \_\_\_\_\_

**Inmunoterapia**

**Tipo** \_\_\_\_\_ **Dosis total** \_\_\_\_\_ **No. de sesiones** \_\_\_\_\_







**OTROS FAMILIARES PATERNOS**

<b>Nombre</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tipo tumor</b>	<b>Sitio</b>	<b>Edad al Dx</b>	<b>Edad al n</b>

**ARBOL GENEALÓGICO**

## **ANEXO 2**

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

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Por medio de la presente hago constar que estoy informada(o) de la realización del proyecto **Identificación de Mutaciones en los Genes BRCA1 y BRCA2 en familias del Noreste de México con Predisposición al Cáncer de Mama** y que servirá para identificar alteraciones en mi material hereditario que puedan aumentar el riesgo de padecer cáncer de seno, por lo cual accedo de manera voluntaria a contestar el cuestionario que me será hecho y a donar 10 ml de mi sangre.

Así mismo, autorizo a las personas que realizan este proyecto a que utilicen los datos proporcionados por mí y mi sangre, para realizar las investigaciones que consideren necesarias en el entendido de que tanto los resultados y mi identidad serán mantenidos en absoluta confidencialidad.

He sido informada(o) también que los resultados obtenidos de mi sangre, me serán dados a conocer a través del servicio de consultoría médica apropiada y me serán proporcionados sólo a mí o a la o las personas que yo autorice.

---

FIRMA

---

NOMBRE DEL(A) PACIENTE



## ANEXO 3

### PRIMERS UTILIZADOS

#### Primers utilizados en el análisis del gen BRCA1

Exon	Primer Sentido	SECUENCIA 5'-----3'	Primer antisentido	SECUENCIA 5'-----3'	Tm (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Tamaño del fragmento (pb)
1	1A	tagcccttggttccggtg	1B	tcacaacgccttacgcctc	60	1.5	315
2	2A	gaagttgtcatttataaaccttt	2B	tgtctttcttcctagtatgt	58	1.5	258
3	3A	tectgacagcagacattta	3B	tggattttcgttctcactta	60	1.5	339
5	5A	ctcttaagggcagttgtgag	5B	ttcctactgttggttctcc	60	1.5	233
6	6A	cttatfttagtgccttaaaagg	6B	tttcattggacagcacttgagtg	58	3	206
7	7A	cacaacaagagcatacataggg	7Bin	ggactgctctagcctggg	58	1.5	346
8	8A	tgttagctgactgatgatggt	N8B	atccagcaattattattaatac	55	1.5	269
9	9A	ccacagttagatgctcagtaaata	9B	taggaaaataccagctcataga	58	1.5	211
10	10A	tggtcagctttctgtaatcg	10B	gtatctaccaccctctctcttcag	58	3	241
11A	11 A1F	ggaattlaaatgaaagagtatgagc	11 B2R	gccagtaagctctattttctctgaaagaacc	60	1.5	800
11B	11 CF	ggttctgatgactcacatgatggg	11 ER	cccatgaaatgctctggtagaag	60	1.5	597
11C	11 E2F	tcagggaactaaccaaacggag	11 GR	ccctgagtgccataatcagtaccagg	60	1.5	743
11D	11 H2F	aagtgcttaataatgctgaagacccc	11 JR	cgttgctctgaaactgagatgatag	60	1.5	669
11E	11 KF	tgcaggctttctgtggttg	11 MR	gacgcttttgcataaacagcag	60	1.5	766
11F	11 NF	gtttgttctgagacacctgatgacc	11 PiR	gtgctcccaaaagcataaa	60	1.5	740
12	12A	gtctgccaatgagaagaaa	12B	tgtcagcaaacctaagaatgt	55	1.5	265
13	13A	aatggaagcttctcaaagta	13B	atgttgagctaggtctctac	55	1.5	330
14	14A	ctaacctgaattactactatca	14B	gtggataaatggctgtatgca	58	1.5	314
15	15A	tggctgcccaggaaagtatg	15B	aaaaaacagaaatctttatgtagga	58	1.5	346
16	16A	aattcttaacagagaccagaac	16B	aaaactcttccagaatgttgt	58	1.5	464
17	17A	gtgtagaacgtgcaggattg	17B	tcgcctcatgtggttta	58	3	264
18	18A	ggctgttttagcttcttaggac	18B	gagaccattttccagcgtc	58	1.5	351
19	19A	ctgcatcttctctgtctc	19B	cattgtaaggaaagtgggtgc	58	1.5	251
20	20A	atatgacgtgtctgtctccac	20B	gggaatccaaattacacagc	58	1.5	400
21	21A	aagctcttctctttttaaagt	21B	gtagagaaatagaatagcctct	58	1.5	300
22	22A	tcccattgagaggcttctgct	22B	gagaagactctgaggctac	58	1.5	300
23	N 23A	tgatgaagtgcagctccag	23B	Actgtgctactcaagcacca	55	1.5	218
24	N 24A	tacaaccaggaccttgaggt	N 24B	aaaggccactttgtaagctca	58	1.5	275

### Primers utilizados en el análisis del gen BRCA2

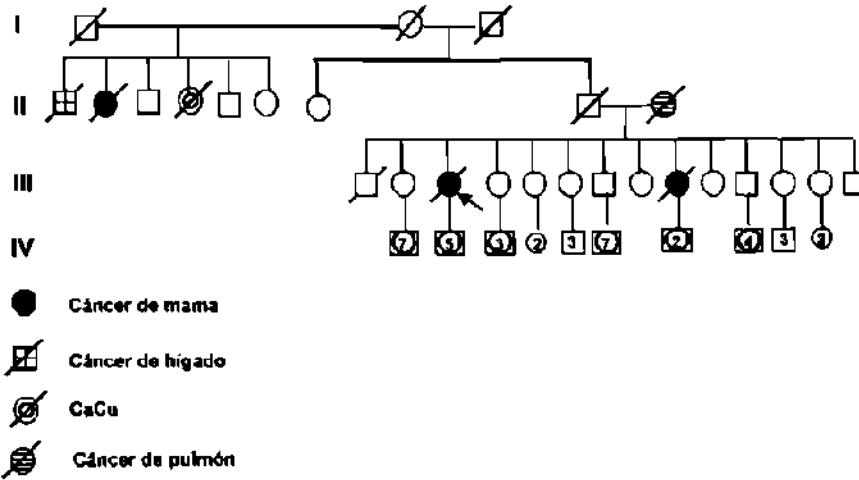
Exon	Primer Sentido		Primer Antisentido		Tm (° C)	MgCl <sub>2</sub> (Mm)	Tamaño del fragmento (pb)
2	2A	ctcagtcacataataaggaat	2B	acactgtgacgtactgggttt	52	2	256
3	3A	tctgggtcacaattgtctgca	N3B	ttcctagttgtagttcctcccagtc	55	1.5	356
4	4A	agaatgcaaatitataatccagagta	4B	aatcagattcctctttatagaacaaa	50	1.5	249
5	5A	aacaatttatatgaatgagaatc	5B	aattgttaagttttatttttaata	50	1.5	220
6	6A	ccacaagagataagtcaggtta	6B	tgtaaatctcaggggcaaggtta	55	1.5	234
7	7A	taagtgaataaagaggtgaa	7B	aacgaaagtattagagatgac	50	1.5	275
8	N8A	aatagtagatgtgcttttga	8B	acatataggaccagggttagagac	60	3	285
9	9A	ctagtgttttaactataattttg	9B	gttcaactaaacagaggact	50	1.5	164
10A	N10AF	tgccaagtactcagaataacc	10CR	cttttgatacctgaaatgaaag	60	1.5	863
10B	10CF	tttcagaaaagacctattagaca	PTTER	aaacacagaaggaatcgtcatc	60	1.5	688
11A	116 F	atttagtgaatgtgattgatgg	11 DR	tcattgtctgagaaaagttc	52	1.5	808
11B	11 DF	tctagaggcaaaagaatcata	11 GR	cctgcttgaaaataacatctg	52	1.5	930
11C	11 GF	acaaaatgggcaggactcttagg	11 JR	tatcagttggcatttatttttt	58	1.5	907
11D	11 KF	cttcaagttaatgcatgattctgtt	PTTBR	cattgatggctaaaactgggtg	58	1.5	906
11E	11 PF	tcatacagctagcgggaaaaa	11 SR	tcctcaacgcaaatatcttcat	60	1.5	883
11F	11 TF	tttccaaagtaataccaatgta	11 VR	ttgggatattaatgtctgagta	55	1.5	776
11G	11 WF	aaagttaacgaacattcagaccag	PTTDR	agcataccaagctcactgaataaac	55	1.5	840
12	N12A	aggtcactattgtgttaag	12B	agtgctcatgtctgtaat	54	3	358
13	13A=32 F	taaagcctataattgtctca	13B=32R	cttcttaacgttagtgcatt	50	1.5	271
14	14A-N 33F	tgcacaagaagcataatctct	14B=35R	caaagggggaaaaccatcag	55	2	591
15	15A	gcccaggggtgtgctttt	N15B	aggatactagttaatgaata	50	1.5	314
16	16A	tttggtaaatcagtttggutt	N16B	aacacacaatcttttgcataga	55	1.5	330
17	17A	cagagaatagttgtgtgtgaa	17B	agaaaacctaaaccatactgc	55	1.5	306
18	N18AF	gtgactgttttaaacagtgga	N18BR	attgagcctccttagtaagca	48	2	500
19	19A	aagtgaataatlttaagcagtt	N19B	tatatggtaagttcaagaat	50	1.5	296
20	20A	cactgtgcttggcctgatac	20B	atgttaattcaagctctcta	55	2	350
21	N21A	gggtgtttatgcttggtct	21B	catttcaacataatctctctg	60	2	304
22	22A	ttttgtctgattgcttttattc	22B	aatcattttgtagtaaggcat	50	1.5	314
23	N 23A	ccactactaatgccacaaa	23B	aaaacaaaacaaaattcaacata	55	1.5	290
24	24A	cagttttgataagtcctgtt	24B	agctccaactaatcataaga	50	1.5	290
25	N25AF	ttagagtctcttcttgcac	N25BR	aagctatttcttgatactgga	55	2	470
26	26A	aaggaaatacttttgaacataa	26B	tttactaggtatacaacagaa	50	1.5	299
27A	27AF	taggagttaggggaggagactgtg	N27AR=112R	caaggctcttctctttttgc	55	1.5	300
27B	N27BF =113F	ctgtctcagccagatgact	N27BR=113R	tgtgaaccagacaaaagagc	58	1.5	350
27C	N27CF =114F	tcaatgaaattctcttttga	N27CR=114R	tgtgtggttgaaattataatc	50	2	300

## ANEXO 4

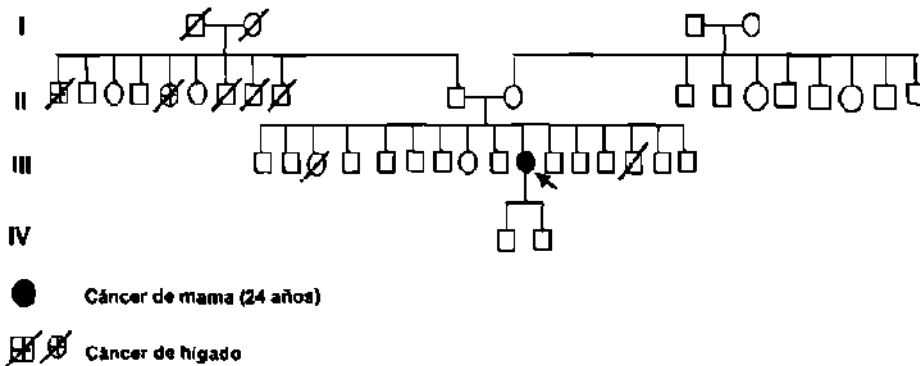
**Árboles genealógicos de las familias que presentaron polimorfismos o que fueron negativas para cambios en las secuencias nucleotídicas en los genes BRCA1 Y BRCA2**

**FAMILIA 1.**

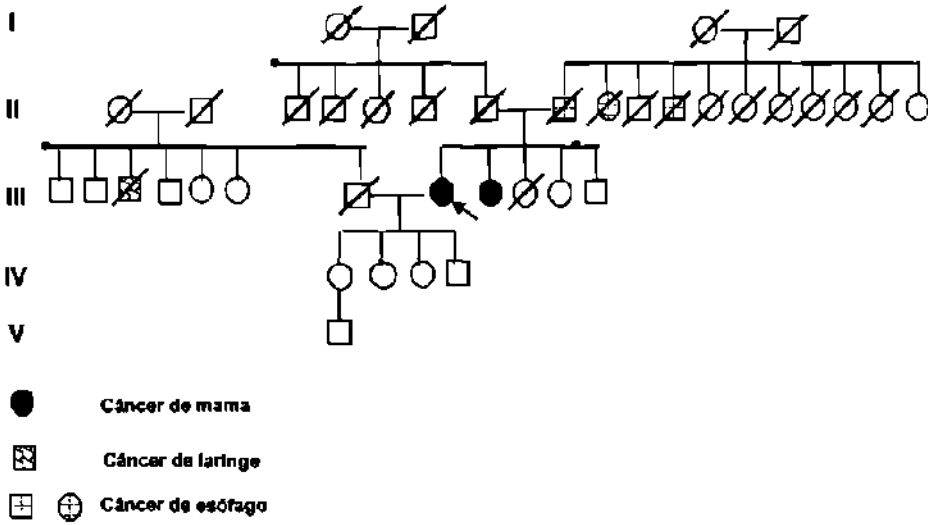
*Polimorfismo en el axón 27C de BRCA2, lle 3412 Val (A 10462 T)*



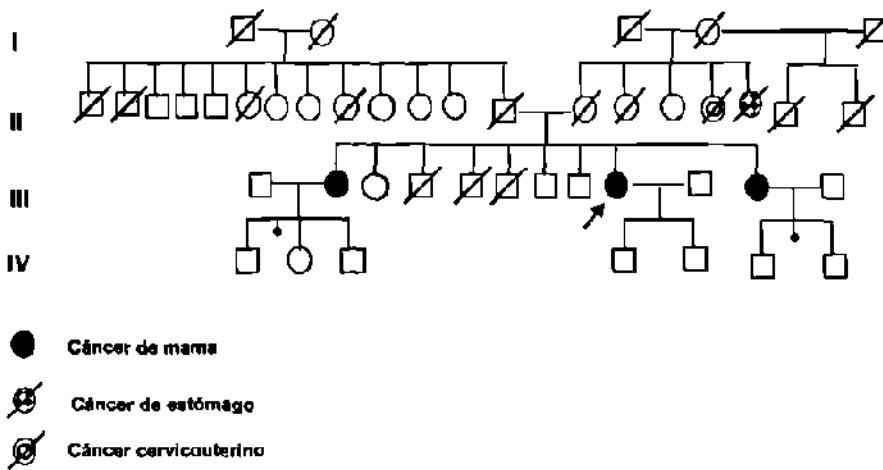
**FAMILIA 2**



**FAMILIA 3**

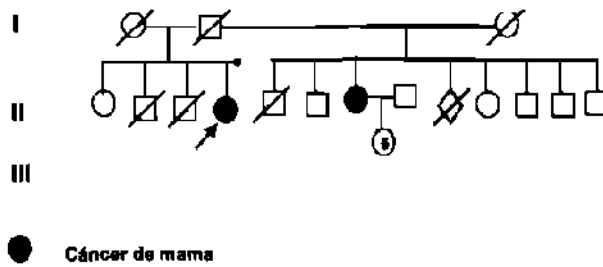


**FAMILIA 5**



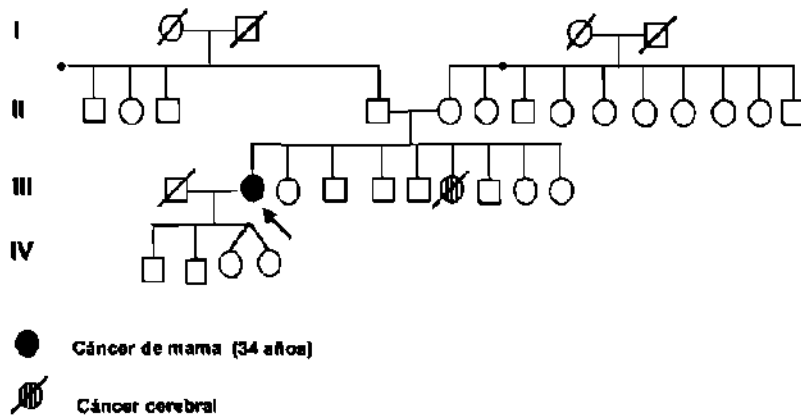
**FAMILIA 6**

*Polimorfismo en el exón 10A de BRCA2, Asn 249 His (A 1093 G)*  
*Polimorfismo en el exón 11B de BRCA2, Asn 991 Asp (A 3199 G)*  
*Polimorfismo en el exón 22 de BRCA2, Ala 2951 Thr (G 9078 A)*

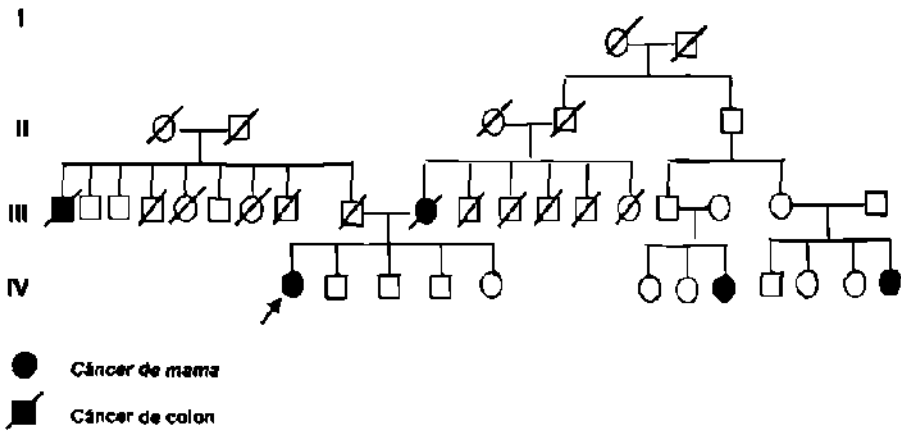


**FAMILIA 7**

*Polimorfismo en el exón 27C de BRCA2, Ile 3412 Val (A 10462 T)*

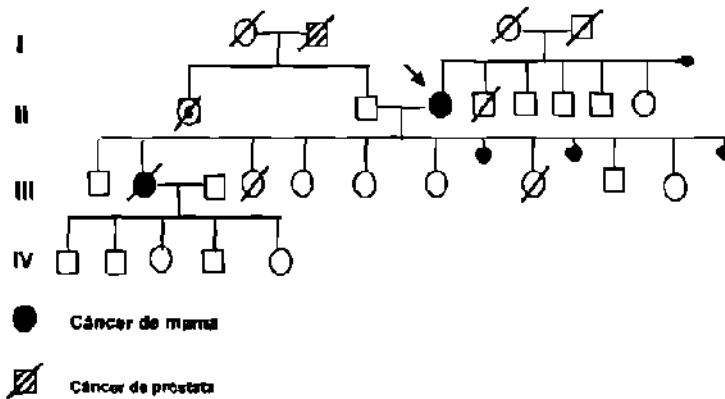


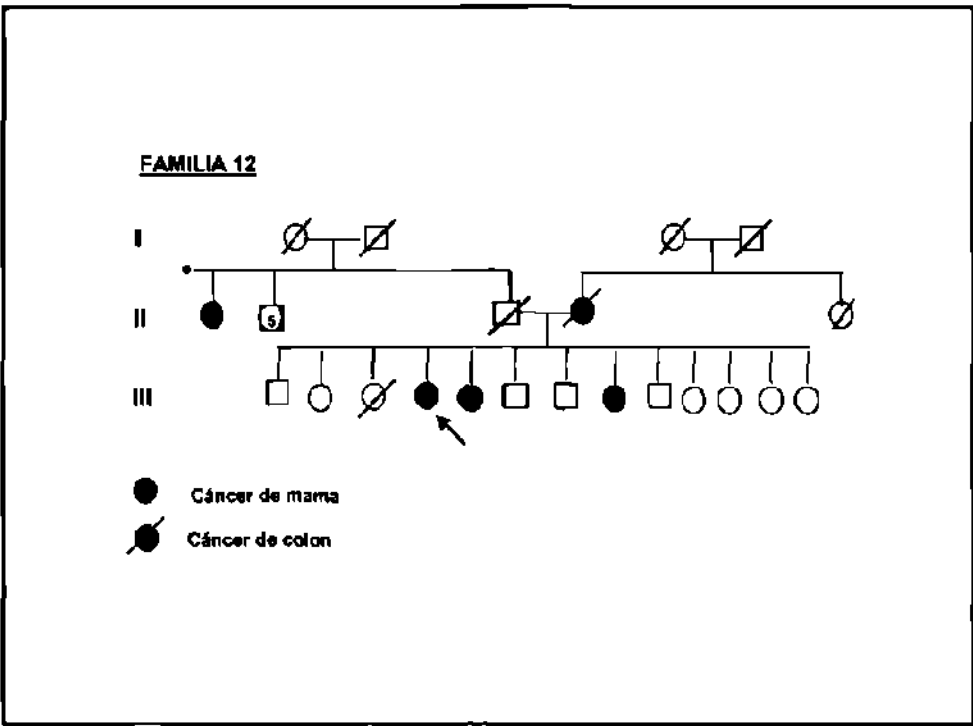
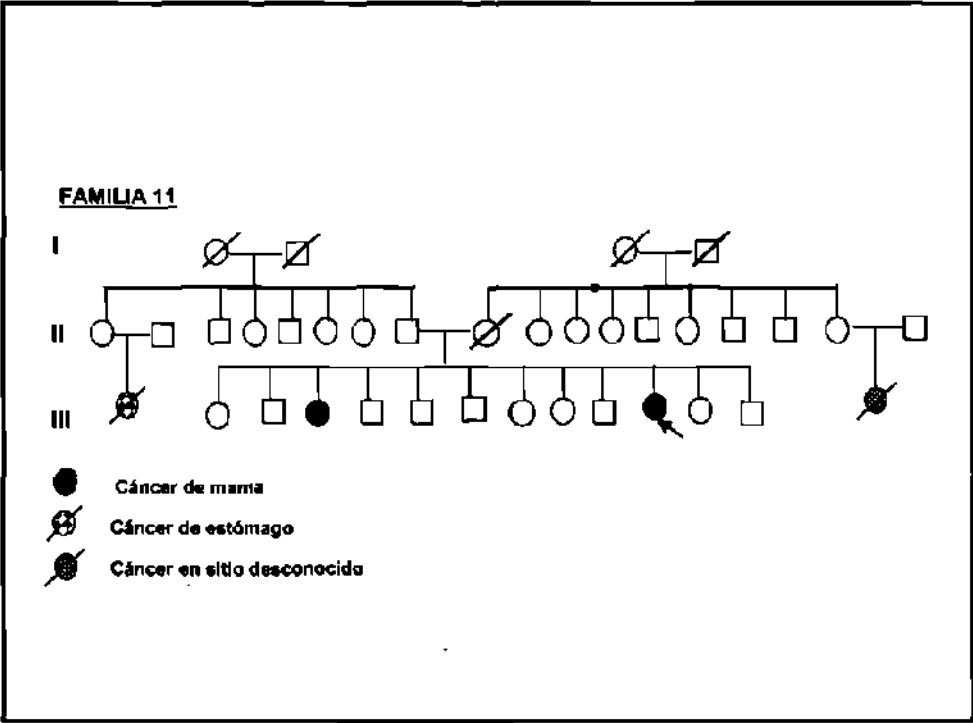
**FAMILIA 9**



**FAMILIA 10**

*Polimorfismo en BRCA1, delección de 34 pares de bases en el intrón 7*





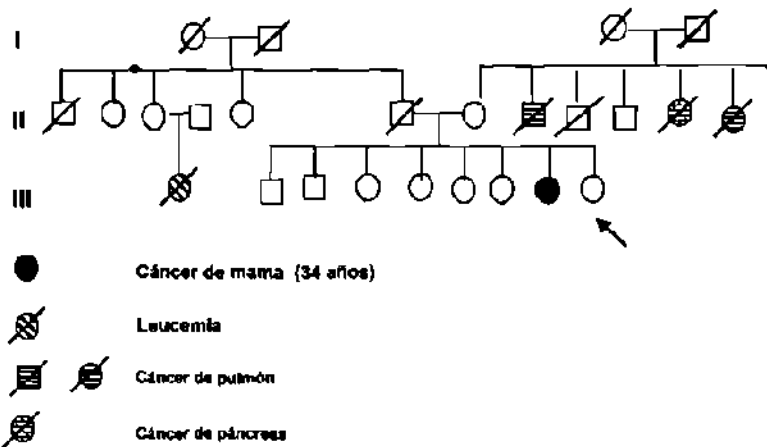


**FAMILIA 13**

*Polimorfismo en BRCA1, deleción de 34 pares de bases en el intrón 7*

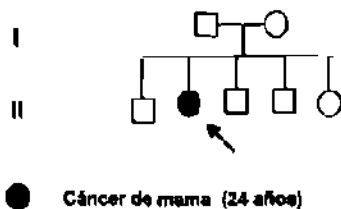
*Polimorfismo en el exón 10A de BRCA2, Asn 289 His (A 1093 C)*

*Polimorfismo en el exón 11B de BRCA2 Asn 991 Asp (A 3199 G)*

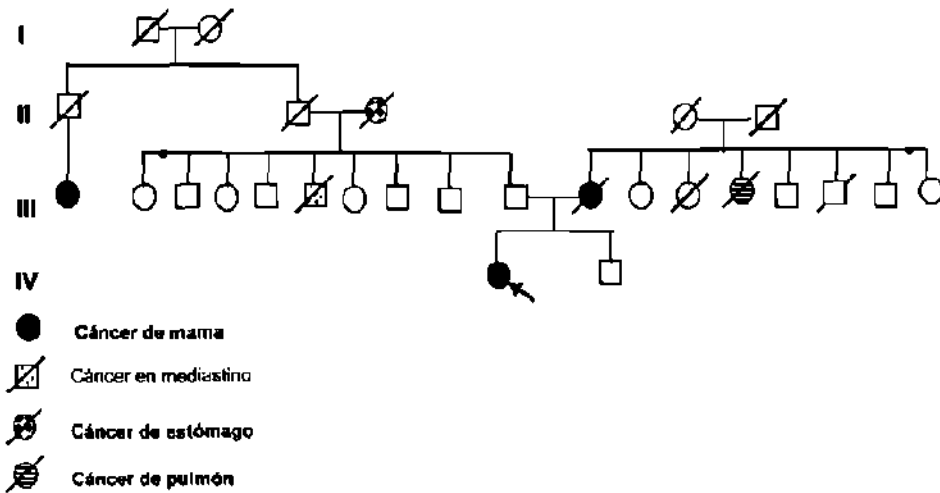


**FAMILIA 14**

*Polimorfismo en el exón 27C de BRCA2, Ile 3412 Val (A 10462 T)*

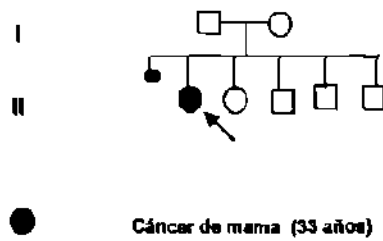


**FAMILIA 15**



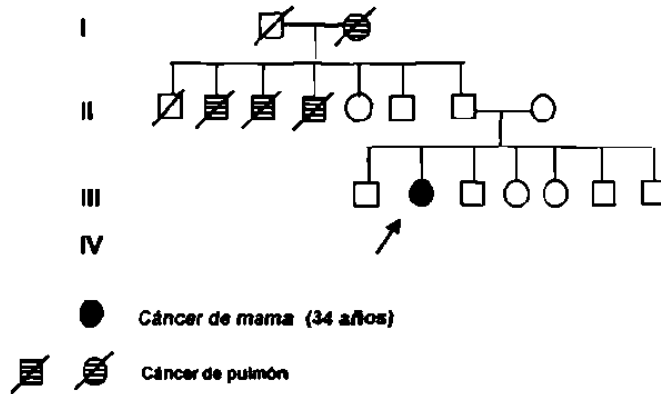
**FAMILIA 16**

*Polimorfismo silencioso en el exón 27A de BRCA2, Ala 3246 Ala (C 9986 T)*

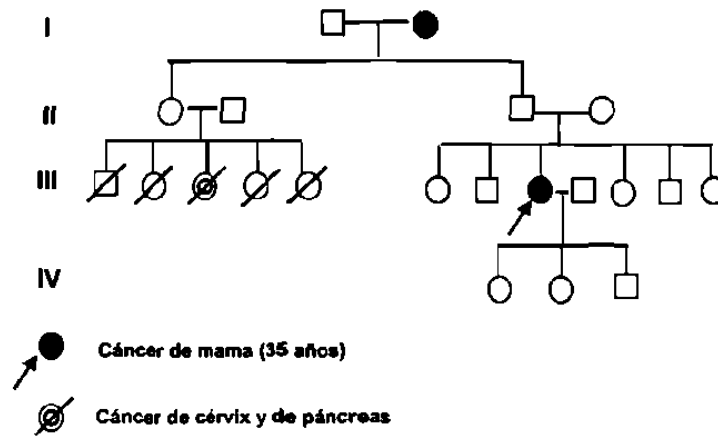


**FAMILIA 17**

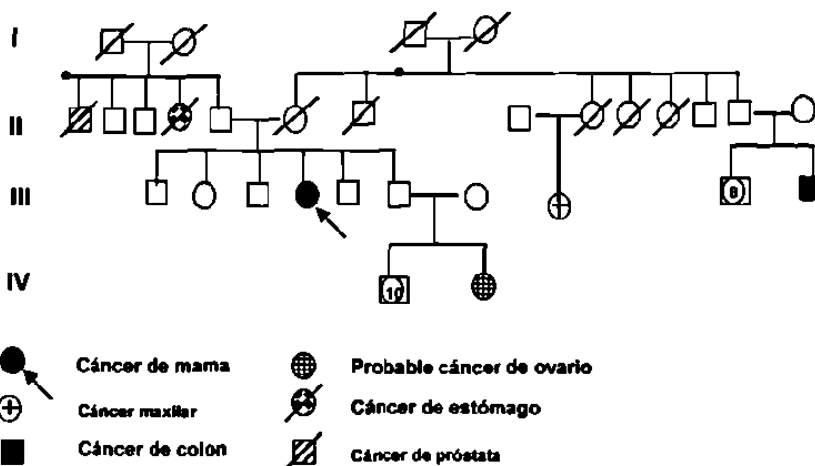
*Polimorfismo en BRCA1, delección de 34 pares de bases en el intrón 7  
Polimorfismo inserción de 47 pares de bases en el intrón 19 de BRCA2  
Polimorfismo en el exón 27B de BRCA2, Lys 3326 Stop (A102047)*



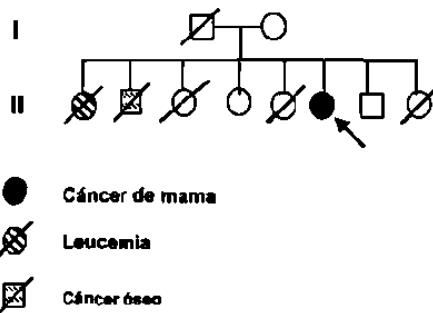
**FAMILIA 18**



**FAMILIA 20**

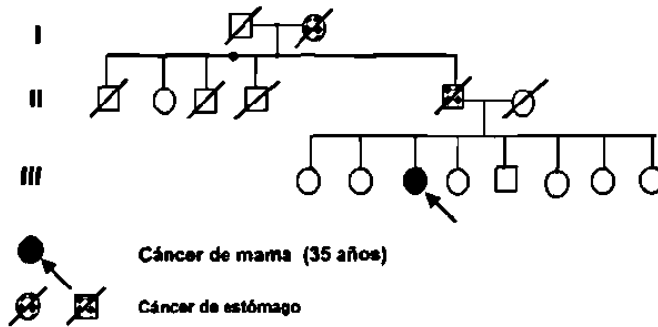


**FAMILIA 21**

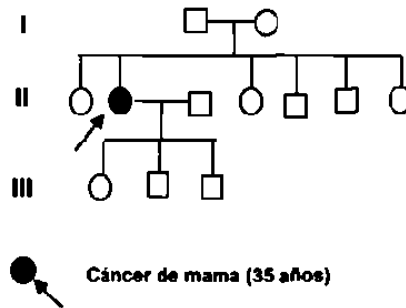


**FAMILIA 23**

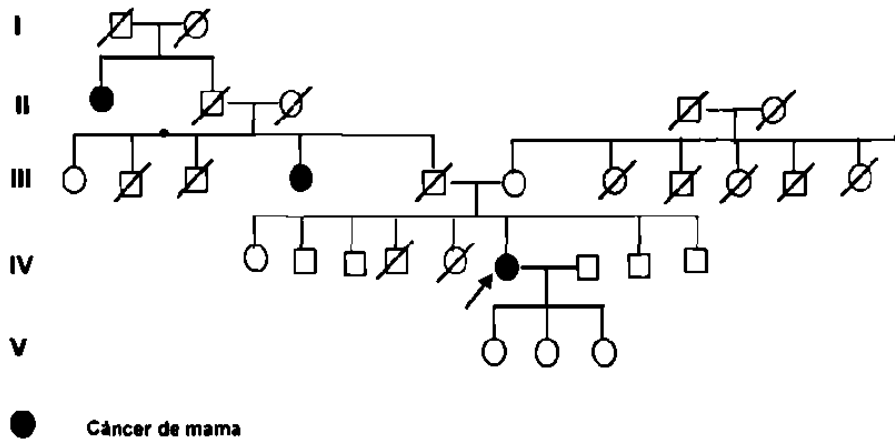
*Polimorfismo en el exón 22 de BRCA2, Ala 2951 Thr (G 9079 A)*



**FAMILIA 25**

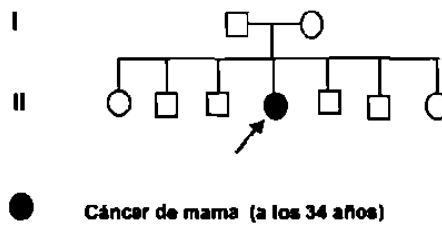


**FAMILIA 28**

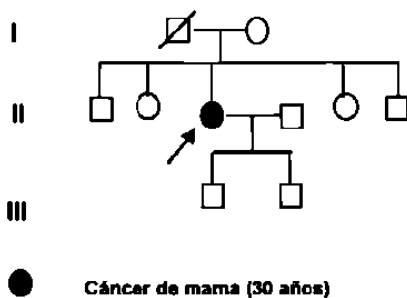


**FAMILIA 29**

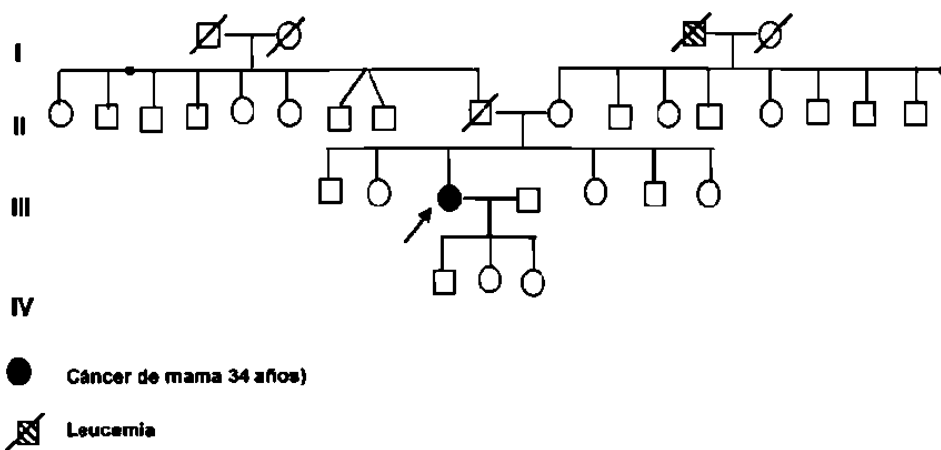
*Polimorfismo silencioso en el exón 11C de BRCA2, Val 1269 Val (T 4035 C)*



**FAMILIA 30**

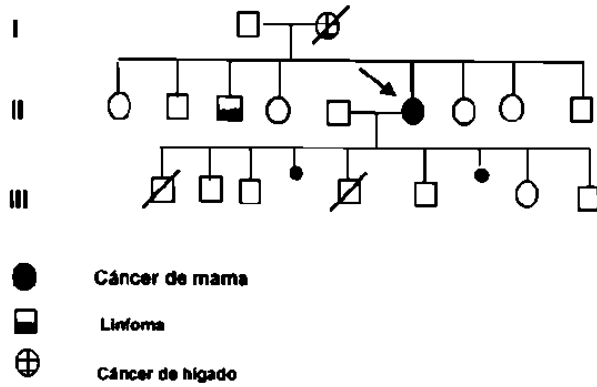


**FAMILIA 32**

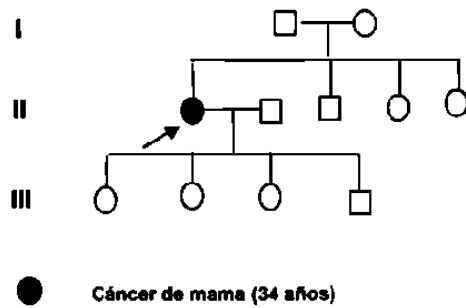


**FAMILIA 34**

*Polimorfismo en el exón 10A de BRCA2, Asn 289 His (A 1093 C)*  
*Polimorfismo en el exón 11B de BRCA2, Asn 991 Asp (A 3199 G)*



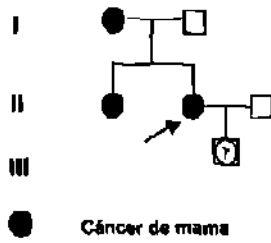
**FAMILIA 35**



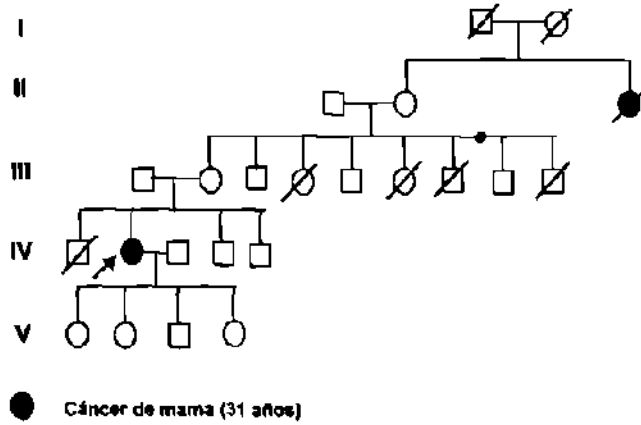


**FAMILIA 36**

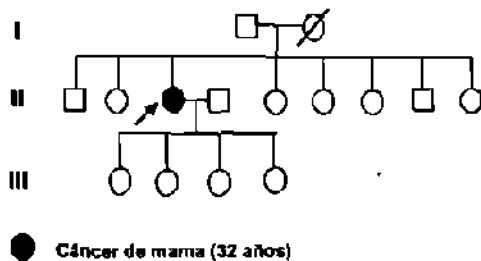
**INCOMPLETO**



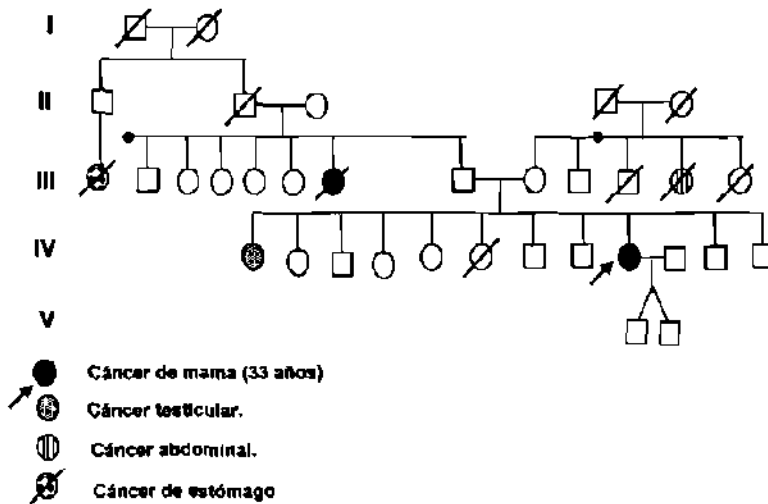
**FAMILIA 37**



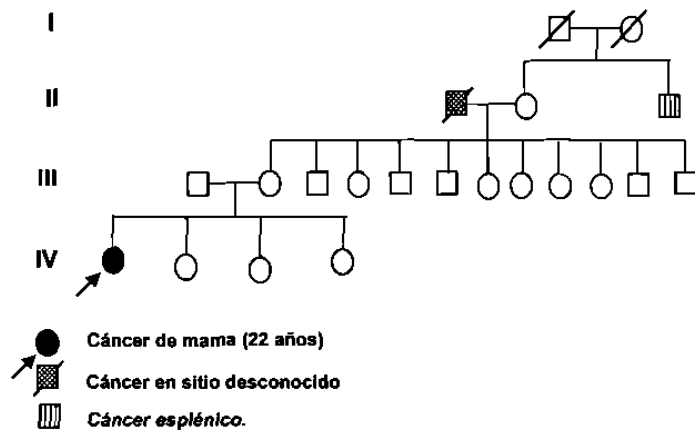
**FAMILIA 38**



**FAMILIA 39**

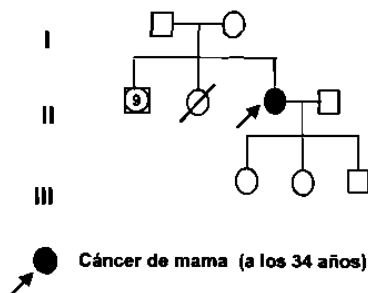


**FAMILIA 40**



**FAMILIA 42**

Polimorfismo en el exón 10A de BRCA2, Asn 289 His (A 1093 C)  
 Polimorfismo en el exón 11B de BRCA2, Asn 991 Asp (A 3199 G)  
 Polimorfismo en el exón 22 de BRCA2, Ala 2951 Thr (G 9079 A)



**FAMILIA 44**

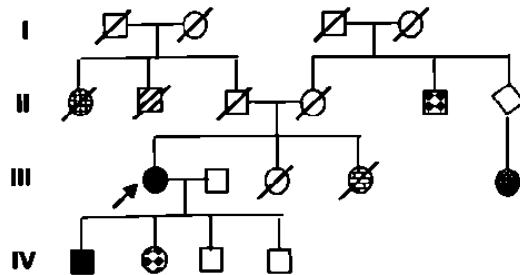
**Árbol genealógico no disponible**

Sin antecedentes familiares, sólo la paciente con cáncer de mama a los 22 años

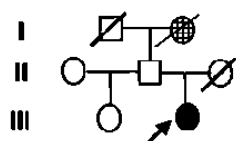
**FAMILIA 45**

*Polimorfismo silencioso en el exón 27A de BRCA2, Ala 3246 Ala (C 9986 T)*

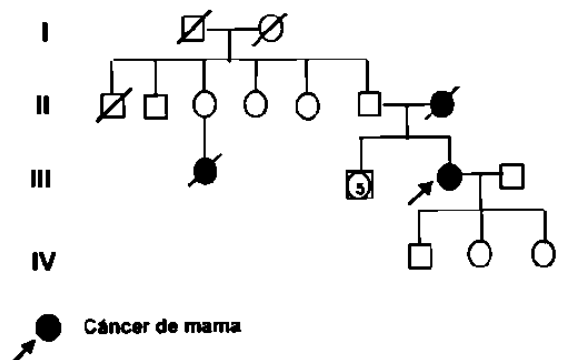
- Cáncer de mama
- ↗ ● Cáncer de páncreas
- ⊕ ● Cáncer de estómago
- ⊙ ● Probable cáncer de ovario
- ▨ ● Cáncer de próstata
- Cáncer en sitio desconocido



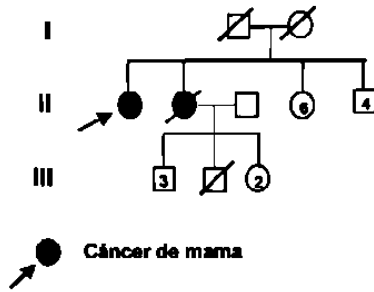
**FAMILIA 46**



**FAMILIA 48**



**FAMILIA 51**



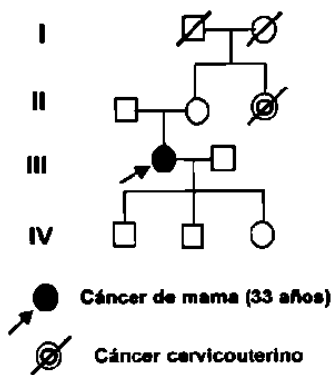
**FAMILIA 53**

*Polimorfismo en el gen BRCA1, deleción de 34 pares de bases en el intrón 7*

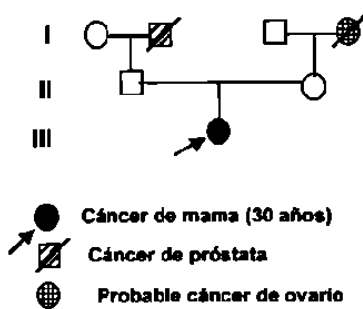
Árbol genealógico no disponible

Sin antecedentes familiares, sólo la paciente afectada con cáncer de mama a los 34 años

**FAMILIA 54**

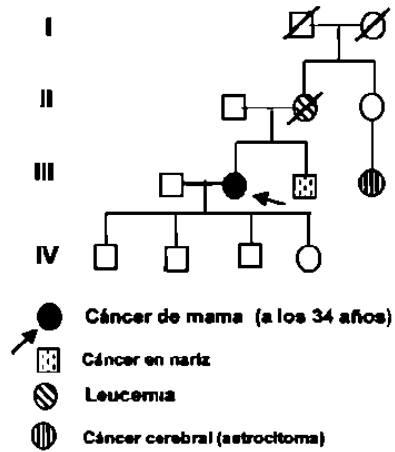


**FAMILIA 55**

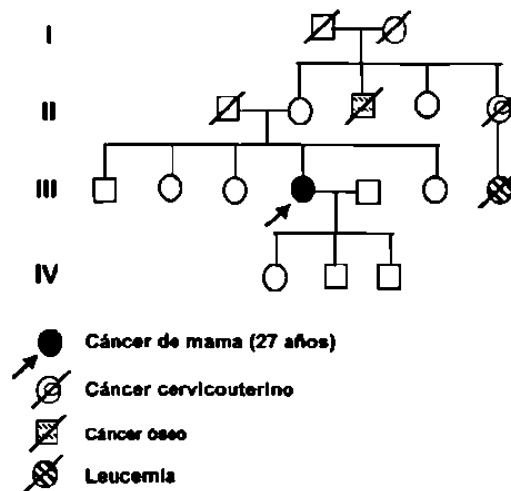


**FAMILIA 56**

*Polimorfismo en el exón 10A de BRCA2, Asn 289 His (A 1093 C)*  
*Polimorfismo en el exón 11B de BRCA2, Asn 991 Asp (A 3199 G)*  
*Polimorfismo en el exón 22 de BRCA2, Ala 2951 Thr (G 9079 A)*

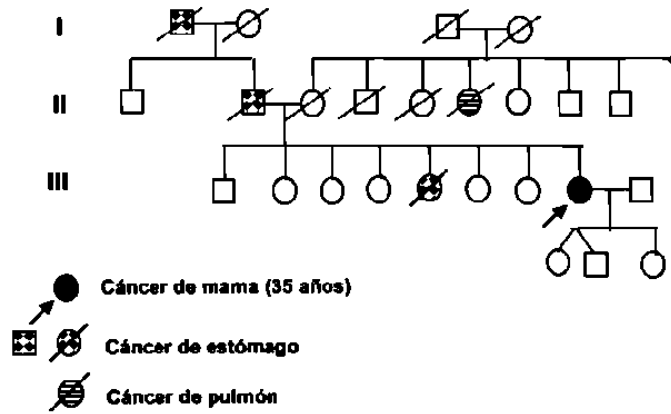


**FAMILIA 63**

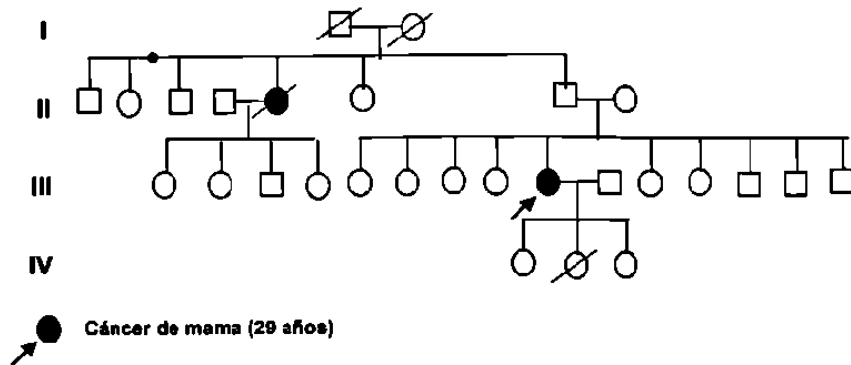



























**FAMILIA 65**



**FAMILIA 66**



	Cáncer de mama		Cáncer de estómago
	Cáncer de hígado		Cáncer óseo
	CaCu		Cáncer de piel
	Cáncer de pulmón		Linfoma
	Cáncer cerebral		Probable cáncer de ovario
	Cáncer de próstata		Cáncer en sitio desconocido
	Leucemia		Cáncer en nariz
	Cáncer de páncreas		Cáncer renal
	Cáncer de esófago		Cáncer de colon
	Cáncer en mediastino		Cáncer maxilar
	Cáncer testicular		Cáncer abdominal
	Cáncer esplénico		

