

Chequeo de mutaciones en el gen BRCA1 en mujeres con cáncer de mama familiar y esporádico precoz, de la Comunidad Autónoma Vasca.

Mutational screening in BRCA1 gene in females with family breast cancer and with early breast cancer in The Basque Country.

Martínez-Bouzas Cristina (1), Guerra I (2), Beristain E (1), Gorostiaga J (2), Mendizabal J.L (2), de Pablo I.L (2), García-Alegría E (1), Sanz-Parra A (1) y Tejada M.I (1).

(1). Laboratorio de Genética Molecular. Hospital de Cruces. Barakaldo. Bizkaia. España UE.

(2). Unidad de Patología Mamaria. Hospital de Txagorritxu. Vitoria-Gasteiz. España UE.

Resumen.

El cáncer de mama hereditario supone un 5-10% del total de cánceres de mama. Hace más de dos años iniciamos el estudio del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama familiar y esporádico precoz en nuestra Comunidad Autónoma.

El objetivo de este estudio es averiguar las mutaciones del gen BRCA1 en nuestra población, así como determinar si la alta incidencia de este cáncer se debe a factores hereditarios.

Pacientes y métodos: 149 pacientes con cáncer de mama esporádico precoz (40 años) y familiar (50 años). Se estudiaron los 21 exones codificantes del gen BRCA1, por medio de PCR, CSGE y secuenciación.

Resultados: Se han encontrado nueve mutaciones: dos de estas mutaciones no producen cambio de aminoácido, otra se sitúa en el intron 20, lo que en principio no debería afectar al procesamiento de la proteína, y las otras seis son mutaciones "missence".

Conclusiones: Estos primeros resultados muestran un 6.04% de mutación porcentaje similar a otros reportados.

Palabras clave: BRCA1; cáncer de mama; cáncer de ovario; población vasca; CSGE.

Summary.

Familial breast cancer represents 5 to 10% of the total of breast cancer. Three years ago, we undertook the study of the BRCA1 gene in females with early breast cancer and with familial breast cancer in our Autonomous Community.

The Objectives of this study were first to find out what kind of BRCA1 mutations exist in our population, and second to determine if the high prevalence of this cancer in The Basque Population could be due to these mutations.

Patients and methods: 149 patients with early breast cancer (40 years) and with familial cancer (50 years) were studied. The 21 ancoding BRCA1 exons were studied by PCR, CSGE and sequencing.

Results: Nine mutations were found: two of them don't produce an amino acid change, a third one lies in the 20 intron and consequently, it shouldn't affect the protein processing, and six mutations were missence mutations.

Conclusions: These preliminary results show a 6.04% frequency of mutations in our Community, which is similar to that reported by other authors.

Key words: BRCA1, Breast cancer, ovarian cancer, Basque population, CSGE.

Laburpena

Herentziako ugatz-minbizia mota honetako minbizi guztien %5-10 da. Duela bi urte baino gehiago BRCA1 genea aztertzen hasi ginen familiako eta noizbehinkako ugatz-minbizi goiztiarra zuten gaixoengan, gure Autonomia Erkidegoan.

Helburua BRCA1 geneak gure herritarren artean zein mutazio dituen jakitea da, baita minbizi mota honen eragin handia herentziako faktoreei zor zaien ere.

Gaixoak eta metodoak: noizbehinkako ugatz-minbizi goiztiarra duten 149 gaixo (40 urte) eta familiakoa (50 urte). BRCA1 genearen 21 exon kodifikatzaileak aztertu ziren, PCR, CSGE eta sekuentziazio bidez.

Emaitzak: Bederatzi mutazio aurkitu dira: mutazio horietako bik ez dute aminoazido-aldaketarik eragiten; beste bat 20 intronean kokatzen da, lehen batean proteinen prozesatzean eraginik izan behar ez lukeena, eta beste seiak "missence" mutazioak dira.

Ondorioak: Lehen emaitza horiek %6,04ko mutazioa agertzen dute, beste kasu batzuen antzeko ehunekoa.

Hitz giltzarriak:

BRCA1; ugatz-minbizia; obario-minbizia; euskal herritarrak; CSGE.

Correspondencia:

Dra. M^ª Isabel Tejada-Mínguez

Laboratorio de Genética Molecular.

Hospital de Cruces. Plaza de Cruces s/n.

48903 Barakaldo. Bizkaia. España UE.

Tel: +34 946 006 514

Fax: +34 946 006 532

Correo electrónico: itejada@hcru.osakidetza.net

Enviado: 16/02/05 Aceptado: 04/04/05

Introducción.

En el País Vasco, el cáncer más frecuente en mujeres es el de mama, representando el 28% de los casos, con una tasa de incidencia de 88,73 por 100.000 (solo el 3% son diagnosticados In Situ) y una tasa de mortalidad del 26,9 por 100.000 (1) (2). Se estima que el cáncer de mama hereditario es aproximadamente un 5-10% del total de cánceres de mama diagnosticados, o lo que es lo mismo, el 5-10% de los casos de cáncer de mama y ovario se producen como resultado de una mutación en la línea germinal en genes de predisposición al cáncer con alta penetrancia (3). Entre estos genes, uno de los más importantes es el gen BRCA1 (4). La mayoría de los estudios realizados han mostrado una prevalencia de las mutaciones de BRCA1 en familias de alto riesgo del 12.8% al 16% (5) (6). Recientes estudios realizados en población española estiman que la prevalencia en esta población está entre el 6 (7) y el 14% (8).

El gen BRCA1 fue identificado en 1994 por métodos de clonaje posicional en el intervalo 17q21. Tiene 24 exones y codifica para una proteína de 1.863 aminoácidos (9). BRCA1 se caracteriza además por tener un exón 11 extremadamente grande y el inicio de traducción en el exón 2.

Entre las características clínicas del cáncer de mama con predisposición hereditaria destacan: (a) la edad de inicio más temprana que en los casos esporádicos; (b) el aumento del riesgo de cáncer de ovario y de otros cánceres, (c) la producción de dos o más cánceres primarios en el mismo individuo que pueden ser tanto del mismo tipo (cáncer de mama bilateral), como en diferentes localizaciones, p.e. cáncer de mama y ovario en la misma mujer.

Presentamos en este artículo el trabajo realizado en el gen BRCA1 en una población de pacientes mayoritariamente del Hospital Txagorritxu con cáncer de mama, escogidas siguiendo las características clínicas antes mencionadas y teniendo como objetivo el conocer la prevalencia de mutaciones del gen BRCA1 en la población del País Vasco y compararla con similares estudios en el resto del Estado Español y Europa.

Material y métodos.

Sujetos a estudio: Se han estudiado 149 mujeres no emparentadas con Carcinoma Ductal Infiltrante de mama que cumplían los criterios de inclusión siguientes:(a) £50 años con antecedentes familiares de cáncer de mama y/o ovario, (b) £50 años con afectación bilateral, (c) las pacientes de edad £40 años independientemente de

presentaron un patrón alterado fueron secuenciadas mediante un secuenciador automático de capilar.

Resultados.

Hemos hallado nueve mutaciones en las 149 mujeres de nuestro estudio. La **Tabla 2** las detalla. Dos de estas mutaciones, E1282E del exón 11 y W1622W del exón 16, no producen cambio de aminoácido por lo que, al no afectar a la proteína, no se pueden considerar relacionadas con la enfermedad. Una tercera mutación, no descrita con anterioridad, se ha detectado dentro del intrón 20 a 10 pb de distancia del inicio del exón, y su relación con el cáncer está por averiguar (**Figura 1**). Las otras 6 mutaciones son mutaciones de cambio de aminoácido y están descritas en la BIC database (The Breast Cancer Information Core Database) como "mis-sense", de efecto desconocido. Tres de estas mutaciones (R841W, S1101N ambas dentro del exon 11, y M1652I dentro del exon 16), han sido encontradas cada una de ellas en dos mujeres no emparentadas por lo que el total de mujeres con alteraciones en el ADN se eleva a 12 (12/149= 8.05%).

Además, se han observado variaciones consideradas polimorfismos, porque se ha podido demostrar que no son causa directa de la enfermedad. En nuestra población los polimorfismos que se han observado se muestran en la **Tabla 3**.

Discusión.

Los estudios comparativos entre los diferentes métodos de cribado de mutaciones en el gen BRCA1 habían mostrado que el método de CSGE aquí empleado, presentaba un 80% de fiabilidad en la detección de mutaciones en la línea germinal. Esta técnica de CSGE ha sido considerada muy sensible y específica (13), y además es un método que detecta sustituciones de una sola base, razones todas ellas por las que escogimos esta técnica.

Figura 1: Mutación en el intrón 20, visualizado mediante la técnica de formación de heteroduplex y tinción de plata.

sus antecedentes familiares o de la bilateralidad. Estas pacientes fueron seleccionadas prospectiva y retrospectivamente a lo largo de dos años en los hospitales de Txagorritxu (138) y Basurto (11). La **Tabla 1** resume la distribución de estos casos en función de los criterios de inclusión.

El ADN fue extraído de sangre periférica por el método "salting out" (10). Posteriormente se llevó a cabo la amplificación múltiple de los 21 exones del gen BRCA1 utilizando cebadores y condiciones de PCR ya publicados previamente (11). Los exones 1 y 4 no se analizaron por no ser codificantes, mientras el exón 7 no se estudia en ningún Centro debido a dificultades intrínsecas a su secuenciación. Tras la formación de heteroduplex las muestras se migraron en un gel sensible a la conformación con técnicas CSGE (12). Las muestras que

Tabla 1.: Distribución de las 149 pacientes estudiadas según los criterios de selección empleados.

EDAD DE DIAGNOSTICO	ANTECEDENTES FAMILIARES		BILATERALIDAD		TOTAL
	Si	No	Si	No	
30 años	9	6	2	13	15
Entre 31 y 40 años	38	51	5	84	89
Entre 41 y 50 años	45	0	1	44	45
Total	92	57	8	141	149

Tabla 2.: Mutaciones encontradas en nuestras pacientes. UV="Unknown variation".

EXÓN	CODÓN	NUCLEÓTIDO	AMINOÁCIDO	NOMBRE	TIPO	NºCASOS
11	841	2640	CGG(Arg)>TGG(Trp)	R841W	Missence (UV)	2
11	1101	3421	AGT(Ser)> AAT(Asn)	S1101N	Missence (UV)	2
11	1282	3966	GAA(Glu)> GAG(Glu)	E1282E	No cambio aminoácido	1
15	1512	4654	AGT(Ser)> ATT(Ile)	S1512I	Missence (UV)	1
15	1534	4719	GTG(Val)> ATG(Met)	V1534M	Missence (UV)	1
16	1622	4985	ACT(Thr)>ACC(Thr)	W1622W	No cambio aminoácido	1
16	1652	5074	ATG(Met)> ATA(Ile)	M1652I	Missence (UV)	2
18	1706	5236	GGA(Gly)> GAA(Glu)	G1706A	Missence (UV)	1
20	Intron 20		C/A	ISV20+10 C/A	-	1

Los resultados de nuestro estudio demuestran la validez de lo afirmado, habiendo detectado 12 casos con alteraciones en el ADN perfectamente caracterizadas, que pasamos a comentar a continuación.

En el caso de la mutación en el intrón 20, no podemos determinar con nuestras técnicas, si esta variación puede influir en el "splicing" de dicho intrón y por tanto hacer que se produzca una proteína anómala, pudiendo ser la causa del cáncer de mama o no. En la BIC database aparecen descritas mutaciones dentro de los intrones en las que se desconoce su efecto, al igual que sucede con nuestro caso. Un análisis de segregación dentro de la familia afectada ya en curso, intentará clarificar si los casos con enfermedad están asociados a la presencia o no de esta variación.

Si consideramos esta alteración dentro del intron como una mutación, el porcentaje de mutaciones diferentes en nuestro estudio sería de 9/149= 6.04%. Estos datos coinciden con los hallados por otros autores (7) que obtienen un 6% de mutaciones

Tabla 3.: Polimorfismos encontrados en nuestras pacientes.

EXON	POLIMORFISMOS	Nº CASOS	%
Intron 1	IVS1-115T	55	37.2
Exon 11	E1308G	71	47.97
Exon 13	S1436S	58	39.2
Intron 14	ISV14-63 C/G	57	38.5
Exon 16	S1613G	57	38.5
Intron 17	ISV17-10T/G	6	4.05
Intron 18	ISV18+66G/A	34	22.97
Intron 7	ISV7-34C/T	26	17.6
Intron 8	ISV8-58delT	55	37.2

en población española, pero se alejan de otros estudios que presentan hasta un 14% (5) (6) (8). La diferencia con estos últimos autores es debida muy probablemente al criterio de selección de las pacientes, al haber incluido nosotros, pacientes con cáncer de mama esporádico precoz sin antecedentes familiares, y otros autores sólo incluyen los casos familiares. Con respecto a las seis diferentes mutaciones "missense", la mutación M1652I aunque es considerada en el BIC como mutación no clasificada, aparece en otros estudios con una frecuencia de 4.08 % en población control (14), lo que nos hace pensar en su poco efecto patognomónico. Igualmente, la mutación S1512I del exón 15, considerada también un missence sin clasificar, es observada en población control en un 2.04% (14). En ambos casos por lo tanto, no se puede establecer que la mutación provoque directamente cáncer de mama y, debido a su elevada presencia en la población control parece que estos autores (14) (15) las consideran más como polimorfismos. Sin embargo, para corroborar estos estudios, hemos cogido 130 muestras de ADN de nuestro laboratorio, de población sin cáncer y no hemos encontrado en ningún caso esas mutaciones, lo que nos haría pensar que no son polimorfismos al menos en nuestra población. También la mutación R841W se encuentra descrita en el BIC en 114 casos y es considerada por algunos autores (16) como una mutación neutra que no tiene ningún efecto sobre la proteína. Los estudios de segregación en curso en estas familias nos permitirán aclarar el alcance etiológico de estas mutaciones.

Las otras tres mutaciones están descritas en un menor número de casos, así V1534M aparece en el BIC en 19 casos y S1101N en 11 casos. Finalmente, la mutación G1706A está presente en muy baja

frecuencia al haber sido descrita sólo en cuatro ocasiones en el BIC, siendo por lo tanto nuestro caso, el 5º en el mundo descrito. Esto nos inclina a pensar en este caso, que si parece haber un efecto directo de esta mutación sobre la aparición del cáncer de mama en esta paciente.

Nuevamente, como en los casos anteriores, los estudios de co-segregación mutación-enfermedad que llevamos en curso en las familias halladas, nos permitirán aclarar el alcance etiológico de estas mutaciones. Esto será el objeto de un posterior artículo. Como conclusión podemos afirmar que de momento en nuestra población y en el gen BRCA1, no hemos encontrado las mutaciones que más directamente predisponen al cáncer de mama, que son las que alteran el cuadro de lectura del ADN o truncan la proteína. Las mutaciones "missense" encontradas se consideran por la mayoría de los autores de efecto desconocido y son de actual objeto permanente de estudio y seguimiento, tal y como lo estamos haciendo.

Agradecimientos

A Mercedes Duran y a todo el equipo del Centro de Biología Molecular de la Universidad de Valladolid por su ayuda y apoyo técnico al inicio de este trabajo, y en diversas ocasiones a lo largo del mismo. Este trabajo a estado subvencionado por el Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco con fondos de ayudas a Proyectos de Investigación Sanitaria (Expediente nº 200112034).

Bibliografía

- 1- Registro de cáncer de la comunidad autónoma del País Vasco, 1994.
- 2- Izarzugaza MI, Audicana Uriarte C, Esparza Muñoz H, Natividad Muñoz J. Aspectos epidemiológicos del cáncer de mama en la comunidad autóctona del País Vasco. Gac. Med. Bilbao 2000. 97: 37-40.
- 3- Kiechle M, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Gerber WD, et al. Ten novel BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and/or ovarian cancer families from northern Germany. Hum Mutat. 2000 Dec;16(6):529-30.
- 4- 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: 676-689.
- 5- Shattuck-Eidens D, Oliphant A, McClure M, McBride C, Gupte J, Rubano T, et al. BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations. Risk factor analysis and implications for genetic testing. JAMA. 1997 Oct 15;278(15):1242-50.
- 6- Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA, Calzone K, Stopfer J, Campeau L, et al. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. N Engl J Med. 1997 May 15;336(20):1409-15.

- 7- 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. 83: 465-469.
- 8- Blesa JR, Garcia JA, Ochoa E. Frequency of germ-line BRCA1 mutations among Spanish families from a Mediterranean area. *Hum. Mutat* 2000. 15: 381-382.
- 9- Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Breast cancer linkage consortium (1993) Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *Am. J. Hum. Genet* 52: 678-701.
- 10- Miller SA, Dykes DD, and Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated. *Cells. Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- 11- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. The polymerase chain reaction. p.15.1.1-15.1.4. In K.Janseen (Ed) *Current Protocols in Molecular Biology* 1994; vol 2. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York.
- 12- Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Confirmation sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single base differences in double stranded PCR products and DNA fragments evidence for solvent induced bends in DNA heteroduplex. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1993. 90: 10325-10329.
- 13- Markoff A, Sornbroen H, Bogdanova N, Preisler-Adams S, Ganev V, Dworniczak B, Horst J. Comparison of conformation-sensitive gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism analysis for detection of mutations in the BRCA1 gene using optimized conformation analysis protocols. *Eur. J. Hum. Genet* 1998. 6: 145-150.
- 14- Deffenbaugh AM, Frank TS, Hoffman M, Cannon-Albright L, Neuhausen SL. Characterization of common BRCA1 and BRCA2 variants. *Genet Test*. 2002 Summer;6(2):119-21.
- 15- Arnold N, Peper H, Bandick K, Kreikemeier M, Karow D, Teegen B, Jonat W. Establishing a control population to screen for the occurrence of nineteen unclassified variants in the BRCA1 gene by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002 Dec 25;782(1-2):99-104.
- 16- Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, Monteiro AN, Tavtigian SV and Couch FJ. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet*. 2004 Oct; 75 (4): 535-544.