

Isabel Pajares Bernad

Asociación entre mutaciones
germinales en BRCA1 y cáncer de
mama triple negativo
diagnosticado antes de los 50
años y sin historia familiar

Departamento
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es

Andrés Conejero, Raquel
Tres Sánchez, Alejandro

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ASOCIACIÓN ENTRE MUTACIONES GERMINALES
EN BRCA1 Y CÁNCER DE MAMA TRIPLE
NEGATIVO DIAGNOSTICADO ANTES DE LOS 50
AÑOS Y SIN HISTORIA FAMILIAR

Autor

Isabel Pajares Bernad

Director/es

Andrés Conejero, Raquel
Tres Sánchez, Alejandro

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Medicina, Psiquiatría y Dermatología

2013

Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza



**Universidad
Zaragoza**

ASOCIACION ENTRE MUTACIONES
GERMINALES EN BRCA1 Y CÁNCER DE
MAMA TRIPLE NEGATIVO
DIAGNOSTICADO ANTES DE LOS 50 AÑOS
Y SIN HISTORIA FAMILIAR

Memoria Presentada por:

Dña. Isabel Pajares Bernad

Para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Dirigida por:

Dra. Dña. Raquel Andrés Conejero. Profesora Asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Facultativo Especialista de Área del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

Profesor D. Alejandro Tres Sánchez. Catedrático de Oncología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

Ser un río que fluye es ser silencioso dentro de la noche, capaz de reflejar la felicidad como las estrellas del cielo y de sumergir sin amargura las tinieblas a lo más profundo, porque de otra forma intuyo, que no podría seguir fluyendo.

(M. Bandeira)

AGRADECIMIENTOS

*Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo
diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar*

- A la Dra. Raquel Andrés Conejero, por su ayuda, consejo y apoyo en todos los momentos de la realización de esta tesis doctoral.
- Al Prof. D. Alejandro Tres Sánchez por su confianza en la realización de este trabajo.
- A la Dra. Judith Balmaña, Dra. Gemma Llort, Dra. Teresa Ramón y Cajal, Dra Isabel Chirivella, Dra. Elena Aguirre, Dr. Luis Robles, Dr. Enrique Lastra y al Dr. Pedro Pérez-Segura por su trabajo en la inclusión de pacientes.
- Al Dr. Javier Godino, a la Dra. Berta Sáez y a todo el equipo del Laboratorio de Biología Molecular del H.C.U. Lozano Blesa de Zaragoza por su trabajo realizado en el estudio genético de las muestras de ADN.
- Al Dr. Manuel Moros y al personal del servicio de Anatomía Patológica del H. C.U. Lozano Blesa de Zaragoza por su trabajo en el estudio de la inmunohistoquímica de las muestras tumorales.
- A la Dra. María Dolores Miramar del servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet, por su trabajo realizado en el estudio MLPA.
- A la Dra. Dolores Isla, Dr. Alberto Sáenz- Cussi, Dra. Pilar Escudero, Dr. Eduardo Pujol, Dr. Julio Lambea y Dra. Laura Murillo por su ayuda en mi desarrollo como oncóloga, por su experiencia y por sus consejos en la realización de este trabajo.
- A mis residentes por su compañerismo en los momentos de desaliento.

- A todo el personal de enfermería, auxiliares y secretaría del servicio de Oncología médica del H.C.U. Lozano Blesa de Zaragoza por su apoyo.
- A todas las pacientes que han participado libremente en este proyecto, por su colaboración en la recogida de datos.
- A mi familia, en especial a mis padres, por darme su apoyo de forma incondicional y por su estímulo en mi formación como médico.
- A mis amig@s, siempre capaces de encontrar una palabra de ánimo y apoyo en los momentos difíciles.
- A todos aquellos que han contribuido de alguna manera en la realización de esta tesis doctoral, de corazón, mi más sentido agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL

*Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo
diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar*

1. INTRODUCCIÓN 25

1.1-	<u>Generalidades del Cáncer de Mama</u>	27
1.1-1.	Epidemiología	27
1.1-2.	Factores de riesgo.....	29
1.1-3.	Carcinogenesis.....	31
1.1-4.	Tipos Histológicos.....	33
1.1-5.	Diagnóstico.....	34
1.1-6.	Estadificación.....	35
1.1-7.	Biología molecular.....	40
1.1-8.	Factores pronósticos.....	43
1.2-	<u>Cáncer de Mama hereditario</u>	46
1.2-1.	Susceptibilidad genética.....	46
1.2-2.	Genes de alta susceptibilidad: BRCA1 y BRCA2.....	47
1.2-3.	Mutaciones germinales BRCA1 y BRCA2.....	50
1.2-4.	Penetrancia de los genes BRCA1 y BRCA2.....	52
1.2-5.	Métodos de determinación mutacional.....	53
1.2-6.	Criterios de Selección.....	54
1.2-7.	Patrón fenotípico del cáncer de mama asociado a BRCA1/2.....	57
1.2-8.	Justificación de la identificación de mutaciones BRCA1/2.....	62

2. OBJETIVOS 67

3. MATERIAL Y MÉTODOS 71

3.1-	<u>Tipo de estudio</u>	73
3.2-	<u>Material</u>	73

3.2-1.	Universo Poblacional.....	73
3.2-2.	Población a estudio.....	73
3.2-3.	Criterios de inclusión.....	74
3.2-4.	Muestra.....	75
3.3-	<u>Métodos</u>	76
3.3-1.	Consideraciones éticas.....	76
3.3-2.	Recogida de datos.....	76
3.3-3.	Recogida de muestra tumoral.....	77
3.3-4.	Recogida de muestra para la determinación de BRCA1.....	77
3.3-5.	Estudio anatomopatológico y de expresión de inmunohistoquímica.....	78
3.3-6.	Procedimiento e el análisis genético de BRCA1.....	79
3.3-6.1.	Extracción de muestra de sangre periférica.....	79
3.3-6.2.	Extracción de ADN linfocitario a partir de una muestra de sangre periférica.....	80
3.3-6.3.	Reacción de cadena de polimerasa (PCR).....	81
3.3-6.4.	Cromografía líquida desnaturalizante de alta resolución.....	82
3.3-6.5.	Secuenciación.....	84
3.3-6.6.	Multiplex ligation dependent probe analysis.....	85
3.3-7.	Análisis estadístico.....	87

4. RESULTADOS 89

4.1-	<u>Prevalencia de mutaciones germinales BRCA1</u>	91
4.1-1.	Mutaciones Patógenas.....	91
4.1-2.	Variantes sin clasificar o de significado incierto.....	92

4.2-	<u>Análisis descriptivo</u>	93
4.2-1.	Edad al diagnóstico.....	93
4.2-2.	Tipo de historia familiar.....	95
4.2-3.	Estadio tumoral.....	97
4.2-4.	Grado histológico.....	98
4.2-5.	EGFR.....	100
4.2-6.	Citoqueratina 5/6.....	101
4.2-7.	Fenotipo basal.....	103
4.2-8.	Características de las pacientes incluidas en el estudio.....	105
4.2-9.	Características de las pacientes con mutación patógena BRCA1 y variantes de significado incierto.....	111
4.3-	<u>Análisis Inferencial</u>	112
4.3-1.	Edad al diagnóstico.....	112
4.3-2.	Historia familiar.....	113
4.3-3.	Estadio tumoral.....	114
4.3-4.	Grado histológico.....	115
4.3-5.	EGFR.....	115
4.3-6.	Citoqueratina 5/6.....	116
4.3-7.	Fenotipo basal.....	117
5.	<u>DISCUSIÓN</u>	119
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	131
7.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	137
8.	<u>ANEXO</u>	157
9.	<u>ARTÍCULO CIENTÍFICO</u>	161

ABREVIATURAS

Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar

El texto de este trabajo contiene una serie de abreviaturas y anglicismos que se han utilizado, dada su frecuencia en la terminología científica. A continuación se exponen las utilizadas en esta tesis.

<u>ADN</u>	Acido desoxirribonucleico
<u>ADNc</u>	Acido desoxirribonucleico complementario
<u>ARN</u>	Acido ribonucleico
<u>ARNa</u>	Acido ribonucleico ampliado
<u>ARNm</u>	Acido ribonucleico mensajero
<u>Array</u>	Término que se utiliza para definir la matriz sobre la que se encuentra impresos los clones de ADN donde se realizan las hibridaciones genómicas o los cilindros tumorales donde se realizan las hibridaciones inmunohistoquímicas o valoraciones histológicas.
<u>ATM</u>	Ataxia telangiectasia mutated. Proteína capaz de regular el ciclo celular. Su mutación desarrolla la enfermedad denominada Ataxia Telangiectasia, enfermedad neurológica progresiva autosómica recesiva.
<u>Autosómico Dominante</u>	Un gen en un cromosoma, su presencia provocará casi siempre una enfermedad o rasgo. La probabilidad de transmisión a la descendencia es de 50:50.
<u>BIC</u>	Centro de información del Cancer de mama. Breast Cancer information core.
<u>BOADICEA</u>	Modelo estadístico de cálculo de la probabilidad de ser portador de la mutación BRCA.
<u>Brazo p</u>	Brazo corto de un cromosoma.
<u>Brazo q</u>	Brazo largo de un cromosoma.
<u>BRCA1</u>	Gen 1 del cáncer familiar de mama y ovario.
<u>BRCA2</u>	Gen 2 del cáncer familiar de mama y ovario.
<u>BRCAPRO</u>	Modelo estadístico de cálculo de la probabilidad de ser portador de la mutación BRCA.
<u>Ca 125</u>	Cancer antigen 125.
<u>Caretakers</u>	Genes encargados del mantenimiento de la integridad del genoma.

<u>CDI</u>	Carcinoma ductal infiltrante.
<u>CAV 1</u>	Caveolin 1. Proteína integral de membrana plasmática que interviene en la regulación celular
<u>CAV 2</u>	Caveolin 2.
<u>CDIS</u>	Carcinoma ductal in situ.
<u>Cebadores (primers)</u>	Una secuencia corta de oligonucleótidos, se une de forma complementaria a una cadena única de ácido nucleico e inicia la síntesis de esa cadena en presencia de ADN polimerasa y nucleótidos en una reacción de PCR.
<u>CEICA</u>	Comité ético de investigación clínica de Aragón.
<u>CK 5/6</u>	Citoqueratina 5/6.
<u>CK 8</u>	Citoqueratina 8.
<u>CK 17</u>	Citoqueratina 17.
<u>CK 18</u>	Citoqueratina 18.
<u>c-Kit</u>	Gen relacionado con la proliferación
<u>CLI</u>	Carcinoma lobulillar infiltrante
<u>CLIS</u>	Carcinoma lobulillar in situ.
<u>c-myc</u>	Oncogen que codifica un factor de la transcripción. Interviene en la proliferación tumoral.
<u>CM</u>	Cáncer de mama.
<u>CMTN</u>	Cáncer de mama triple negativo.
<u>CO</u>	Cáncer de Ovario.
<u>CHECK 2</u>	Gen encargado de intervenir en el control del ciclo celular, relacionado con el mantenimiento, control de mitosis y apoptosis.
<u>del</u>	Delección. Mutación que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN de un cromosoma.
<u>DHPLC</u>	Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. Cromografía líquida desnaturizante de alto rendimiento.
<u>DQ</u>	Dosis génica
<u>EDTA</u>	Anticoagulante compuesto por ácido etilen diamino tetracético.
<u>Erb B2</u>	Oncogen que codifica para receptores de tirosin kinasa de la familia del factor de crecimiento epidérmico relacionado con la génesis tumoral.

<u>EGFR</u>	Epidermal growth factor receptor. Factor de crecimiento epidérmico.
<u>Exón</u>	Región de ADN de un gen que codifica para una parte de la proteína.
<u>FISH</u>	Fluorescent in situ hybridization. Hibridación in situ por fluoresceína.
<u>GATA 4</u>	Proteína asociada a la regulación de genes que intervienen en la embriogénesis.
<u>Her2</u>	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2. Ver Erb B2
<u>Herceptest</u>	Estudio inohistoquímico para la determinación de la proteína Her2 (c-erb-B2 oncoprotein) sobreexpresada en el cáncer de mama.
<u>HPLC</u>	High performance liquid chromatography. Cromatografía líquida de alta resolución.
<u>HR</u>	Hazard ratio.
<u>HyE</u>	Tinción de Hematoxilina y eosina.
<u>IC</u>	Intervalo de confianza.
<u>IHQ</u>	Inmunohistoquímica.
<u>ins</u>	Inserción. Tipo de mutación consistente en la introducción de un fragmento de ADN al cromosoma.
<u>Intrón</u>	Secuencia no codificadora de ADN que separa a dos exones.
<u>ITC</u>	Células tumorales aisladas.
<u>Kb</u>	Kilobase.
<u>KD</u>	KiloDalton.
<u>Ki 67</u>	Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal ki 67.
<u>Kit</u>	Conjunto de reactivos y material para realizar técnicas experimentales de uso común en el laboratorio.
<u>Locus (Loci)</u>	Posición de un gen dentro del cromosoma.
<u>LOH</u>	Loss of heterozigosity. Pérdida de heterocigosidad.
<u>Mamaprint</u>	Técnica basada en microarrays. Se basa en la expresión de 70 genes relacionados con la proliferación tumoral, clasificando a las pacientes en bajo/alto riesgo.
<u>Missense</u>	Tipo de mutación en la que un cambio de un nucleótido produce un cambio de aminoácido que hace que la proteína pueda no ser funcional.
<u>MLH1</u>	Gen implicado en el cáncer colorectal, endometrial y ovárico.
<u>MLPA</u>	Multiplex Ligation dependent probe amplification. Técnica para el

	cribado de regiones de DNA utilizando sondas de hibridación.
<u>MSH2</u>	Mut S homolog 2, colon cancer, nonpoliposis type 1 gene. Gen homólogo 2 de mutS, causante del cáncer de colon no poliposico tipo 1.
<u>n</u>	Tamaño muestral.
<u>Nonsense</u>	Mutación puntual en la secuencia de ADN que resulta en un codón de pasada, ue produce una proteína trucada que con frecuencia es no funcional.
<u>Oncotype</u>	Técnica basada en microarrays. Se basa en la expresión de 21 genes relacionados con la proliferación tumoral, clasificando a las pacientes en bajo/alto riesgo.
<u>p</u>	p- value. Nivel de significación empírico.
<u>p53</u>	Gen supresor de tumores, desempeñan un papel importante en la inducción de las vías de apoptosis en respuesta a un daño en el DNA.
<u>PAAF</u>	Punción con aguja fina.
<u>PARP</u>	Poli- ADP-ribosa polimerasa. Encima implicada en la reparación de excisión de bases, siendo este el principal mecanismo de reparación de roturas de cadenas de ADN.
<u>PCR</u>	Reacción en cadena de polimerasa (Polymerase Chain Reaction). Mecanismo utilizado para la amplificación de secuencias concretas de ADN.
<u>Pedigree</u>	Árbol familiar.
<u>PTEN</u>	Gen implicado en el Síndrome de Cowen, asociado a hamartomas, gliomas, cáncer de próstata y endometrio.
<u>Ratio</u>	Relación entre dos datos.
<u>RE</u>	Receptores de estrógenos.
<u>RP</u>	Receptores de progesterona.
<u>RMN</u>	Resonancia Nuclear Magnética.
<u>rpm</u>	Revoluciones por minuto.
<u>RR</u>	Riesgo Relativo.
<u>RT-PCR</u>	Reacción en cadena de la transcriptasa/polimerasa inversa.
<u>Salting out</u>	Técnica empleada para la extracción del ADN mediante la concentración salínica.

<u>SDS</u>	Dodecil Sulfato de Sodio.
<u>SEOM</u>	Sociedad española de Oncología Médica.
<u>SHOH</u>	Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.
<u>SNPs</u>	Single Nucreotide Polimorphism. Polimorfismo de un solo nucleótido.
<u>SOBP</u>	Salpingo-ooforectomía bilateral profiláctica.
<u>splicing</u>	Método de edición postranscripcional que se produce tras la obtención del ARNm primario.
<u>STK</u>	Serin Treonin quinasa, causante del síndrome de Peutz-Jegher.
<u>SPSS</u>	Statistical Paccage for de Social Sciencies. Paquete estadístico utilizado en ciencias sociales.
<u>TP53</u>	Tumor Protein p53. Gen de la proteína tumoral p53. Ver p53.
<u>Tru-cut</u>	Biopsia con aguja gruesa.
<u>.VUS</u>	Variant uncertain significance. Variante de significado incierto o variante sin clasificar.

1-INTRODUCCIÓN

Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar

1.1-GENERALIDADES DEL CANCER DE MAMA

1.1-1. EPIDEMIOLOGÍA

Cada año la Sociedad Americana de Cancer estima el riesgo de nuevos casos de cáncer y muertes esperadas en EEUU, recopilando los datos más recientes de incidencia, mortalidad y supervivencia.

Un total de 1.638.910 casos nuevos y 577.190 muertes por cáncer se prevén en EEUU en el año 2012. Para los cinco últimos años de los que se dispone de datos (2004-2008) las tasas de incidencia global para hombres han disminuido un 0,6%, mientras que en mujeres se mantienen estables. En cambio las tasas de mortalidad por cancer han disminuido un 1,8% en hombres y un 1,6% en mujeres.

Atendiendo al cáncer de mama se prevé 226.870 casos nuevos en EEUU en 2012, lo que supone un 29% del total de los nuevos casos, constituyendo la primera causa de cáncer en mujeres. Se prevé que 72.590 pacientes fallezcan por esta causa, el 14% de la mortalidad por cáncer en mujeres, siendo esta la segunda causa por detrás del cáncer de pulmón. (Figura 1)¹.

Las mejores estimaciones de supervivencia disponibles de países europeos proceden del estudio EUROCARE. Los últimos datos publicados se refieren al periodo 2000-2002 (EUROCARE-4). En este estudio, la información para España se basa en los registros de

Introducción

Albacete, Castellón y Girona. Las conclusiones que se alcanzan son que la supervivencia global en Europa a los 5 años fue del 79%, inferior a la observada en EE.UU. (90%). Dentro de Europa, la supervivencia fue significativamente mayor en los países nórdicos, Suiza, Italia, Holanda, España y Austria. En España, la supervivencia a 5 años se sitúa en un 83%, significativamente más alta que la media europea. La peor supervivencia se observa en los países del Este, Irlanda y el Reino Unido. La supervivencia a 5 años aumentó entre 1992 y 2002 un 1,6% anual y las diferencias entre los distintos países europeos se han ido reduciendo².

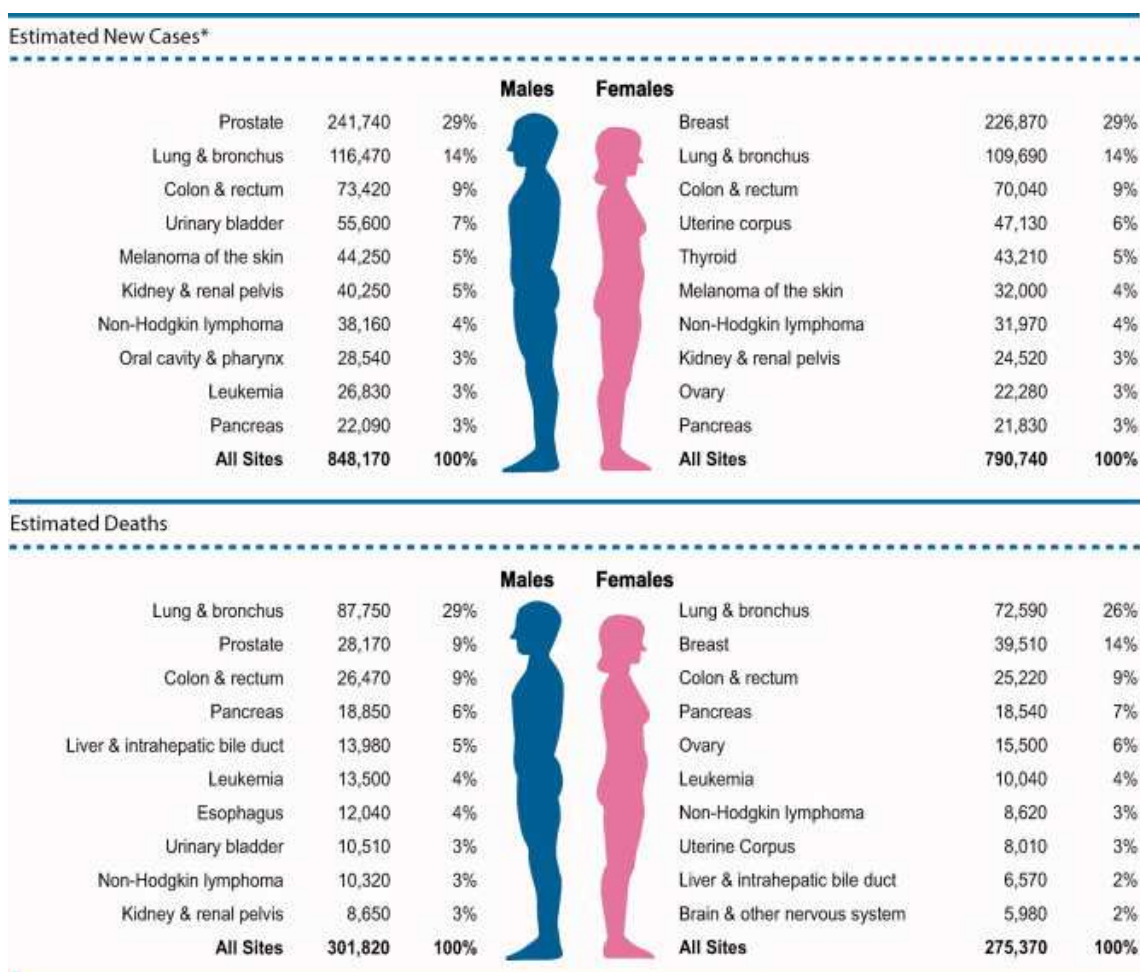


Figura 1: Número de casos nuevos y muerte por cáncer en EEUU previsto en 2012¹.

En las mujeres españolas se diagnostican cada año unos 16.000 casos nuevos de cáncer de mama y mueren por esta causa 6.000 mujeres³. Mientras que la incidencia está aumentando en nuestro país un 2-3% anual, la mortalidad también muestra el cambio de tendencia al inicio de los 90, momento a partir del cual las tasas disminuyen un 2% al año. La tasa ajustada de mortalidad (población estándar europea) en el 2005, fue de 18,6 casos por 100.000 mujeres al año inferior a la estimada para el conjunto de Europa⁴. El estudio El Álamo, desarrollado por el grupo GEICAM, aporta información sobre la supervivencia de las pacientes atendidas en los hospitales españoles participantes con amplia representación geográfica. El Álamo II incluyó más de 10.000 mujeres españolas con cáncer de mama entre 1994 y 1997. La supervivencia a los 5 años fue superior al 80%⁵. La supervivencia a 5 años se sitúa en un 83% significativamente más alta que la media europea.

1.1-2. FACTORES DE RIESGO

En el desarrollo del cáncer de mama influyen distintos factores de riesgo genético y ambiental. La menarquía temprana, la menopausia tardía y la nuliparidad o la edad tardía al primer embarazo son los principales factores reproductivos, los cuales están relacionados a una mayor exposición de la glándula mamaria a los estrógenos circulantes⁶.

Otros factores de riesgo son el consumo de alcohol y grasas, la obesidad y la vida sedentaria, que han sido investigados pero su implicación no está definida de forma clara.

Introducción

La enfermedad mamaria benigna también aumenta la probabilidad de desarrollar cáncer de mama, existiendo un riesgo mayor en las patologías proliferativas y en aquellas lesiones que presentan atipias celulares⁷.

A parte de la edad y el sexo, el factor de riesgo más importante es la historia familiar de cáncer de mama que es indicativa de la herencia de variantes genéticas que incrementan de manera sustancial la probabilidad de padecer esta enfermedad⁸.

Se ha estimado que un 5-10% de los casos de cáncer de mama son debido a mutaciones de genes de alta penetrancia, de los cuales el 20-25% ocurren en BRCA1 y BRCA2. Estas pacientes portadoras tienen un riesgo acumulado de desarrollar cáncer de mama a los 70 años que varía entre el 40% y el 85%⁸. En la población española este riesgo se ha estimado en un 52% (95% IC, 26-69%) para portadoras de mutación en BRCA1 y 47% (95% IC 29-60%) para BRCA2⁹.

Existen identificados otros genes como TP53, ATM o PTEN, considerados de alta penetrancia que determinan un alto riesgo de cáncer de mama en el contexto de diferentes síndromes genéticos como Li- Fraumeni, Ataxia-telangiectasia o Codwen respectivamente^{10 11 12}.

Existe el modelo poligénico en el que la susceptibilidad vendría modulada por la contribución de variables de baja penetrancia. Los polimorfismos más estudiados incluyen los genes implicados en las rutas de síntesis y metabolismo de los estrógenos, la reparación del ADN y las principales rutas metabólicas¹³.

1.1-3. CARCINOGENESIS

Las características de la carcinogénesis comprenden seis funciones biológicas adquiridas durante el desarrollo de las células tumorales. Estas características constituyen una organización para intentar entender la complejidad de la enfermedad neoplásica.

El mantenimiento de la señal de la proliferación, evitando el estímulo de la supresión del crecimiento, que confiere la capacidad de hacerse resistente a la muerte celular, la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis y la activación de la capacidad de invasión y metastatizar a otros niveles configuran las seis características. (Figura 2)¹⁴.

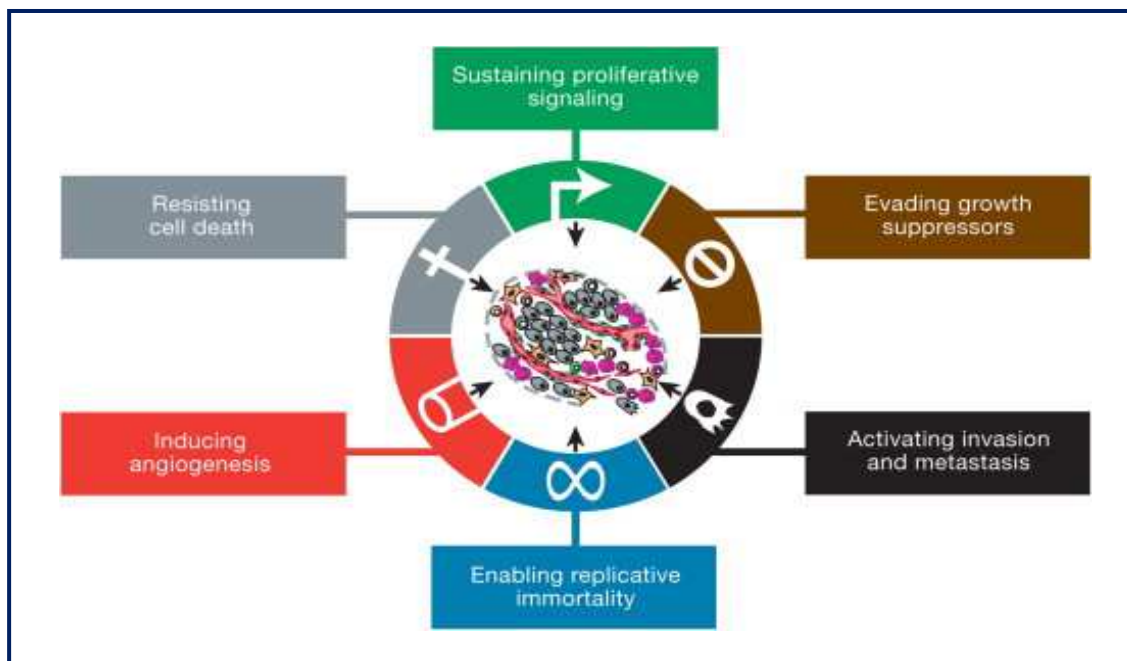


Figura 2: Características implicadas en la carcinogénesis¹⁴.

Introducción

El escenario que es capaz de aportar una diversidad de actuación de las características biológicas que permiten la formación tumoral es el genoma que puede facilitar la adquisición de estas. En la última década se ha añadido otras características como son el metabolismo energético, la inflamación y la capacidad de estas células de evitar la reacción inmune del organismo huésped. Además existen células no tumorales que contribuyen a la formación de un ambiente favorable para la proliferación de las células neoplasias. (Figura 3)¹⁴.

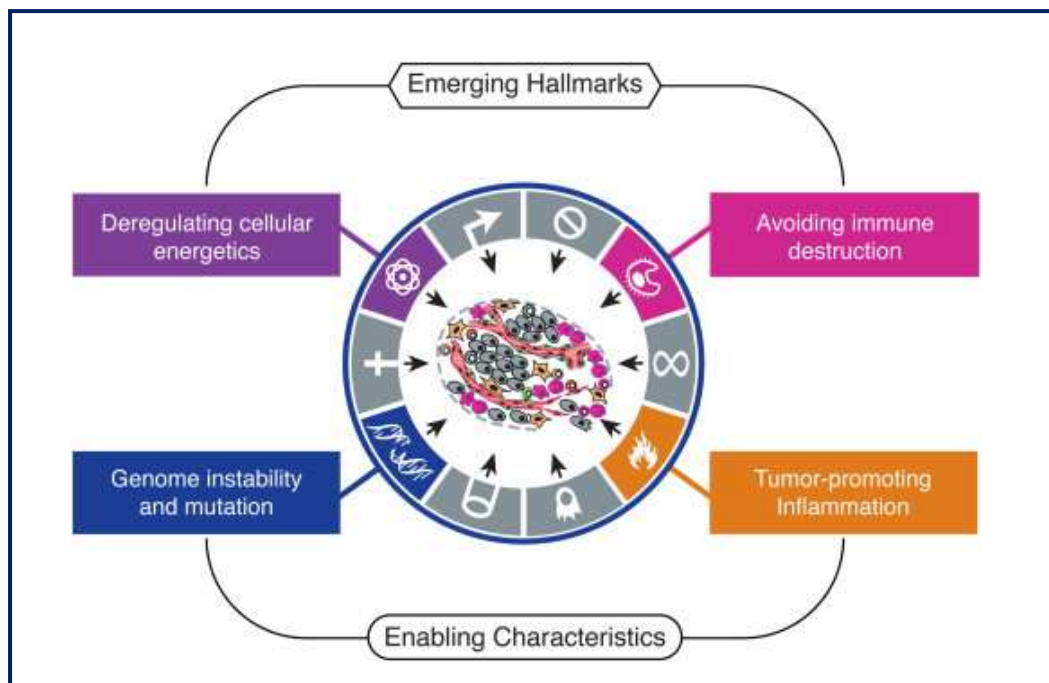


Figura 3: Nuevos mecanismos implicados en la carcinogénesis¹⁴.

El conocer esta serie de mecanismos implicados en la formación tumoral permite investigar en nuevas formas terapéuticas.

1.1-4. TIPOS HISTOLÓGICOS

El carcinoma ductal se origina en los ductos mamarios y representa el tipo histológico más frecuente de cáncer de mama.

El Carcinoma ductal in situ (CDIS) presenta una proliferación de las células del ducto pero no atraviesa la lámina basal y por lo tanto no invade el estroma circundante. Su clasificación puede atender a un patrón arquitectural (cribiforme, comedo, papilar y sólido) o a el grado de diferenciación nuclear (alto, intermedio o bajo grado).

El carcinoma ductal infiltrante (CDI) es la forma invasiva del carcinoma ductal, es la forma más frecuente de cáncer de mama, tiene su origen en las células del epitelio ductal, las cuales, atraviesan la capa basal e invaden los tejidos que rodean al ducto. Histológicamente, las células son irregulares, con núcleos grandes, hipercromáticos y de límites poco netos, nucléolos muy evidentes y numerosas mitosis. Se supone que todo CDI proviene de un CDIS pero se desconoce la proporción de CDIS que se transforman en CDI.

El carcinoma lobulillar deriva de las células del lóbulo o lobulillo de la mama. El carcinoma lobulillar in situ (CLIS) es una lesión no palpable y en la mayoría de los casos se detecta de forma incidental junto a otras lesiones como calcificaciones e hiperplasia.

El carcinoma lobulillar infiltrante es un carcinoma con origen en los acinos glandulares, el crecimiento celular rompe la membrana basal e infiltra los tejidos adyacentes. Constituida por células redondeadas u ovals, con citoplasma claro y núcleos hipercromáticos y moderada actividad mitótica. Este tipo de cáncer representa

Introducción

aproximadamente el 5%. Con frecuencia su comportamiento es multicéntrico y bilateral¹⁵.

La E-cadherina es un marcador relevante para la diferenciación entre CDIS y CLIS, presentando una reactividad positiva inmunohistoquímica en el segundo¹⁶.

Existen otros tipos histológicos menos frecuentes como el carcinoma medular el cual presenta una morfología anaplásica y es poco agresivo, carcinoma tubular caracterizado por ser bien diferenciado y con un buen pronóstico, carcinoma mucinoso, neuroendocrino, carcinoma papilar invasivo con clara configuración papilar, apocrino, secretor juvenil con secreciones tanto intra como extracelular, cístico adenoide de baja malignidad y frecuentemente nodular y el carcinoma metaplásico el más heterogéneo (de tipo escamoso, espinocelular, óseo y cartilaginoso y de tipo mixto).

1.1-5. DIAGNÓSTICO

La mortalidad por cáncer de mama depende en gran medida del diagnóstico en fases iniciales de la enfermedad. El diagnóstico obligado conlleva a una adecuada anamnesis y exploración física dado que en muchas ocasiones el diagnóstico se realiza por la presencia de una masa mamaria palpable. Las pruebas radiológicas mediante mamografía bilateral y ecografía mamaria nos permiten detectar imágenes sospechosas de malignidad las cuales también constituyen una forma común de diagnóstico. De esto se deriva la importancia del cribado poblacional de cáncer de mama mediante la mamografía. La agencia Internacional de Investigación del Cáncer considera que existe

una evidencia en mujeres de entre 50 y 69 años, estimando una reducción de la mortalidad por este tumor de un 20 a un 35%¹⁷.

La realización de la resonancia nuclear magnética (RMN) permite detectar áreas muy específicas de la mama y realizar un diagnóstico histológico dirigido por pruebas de imagen. No está indicada para la realización de cribado salvo algunos casos concretos como en las portadoras de mutación BRCA¹⁸.

El estudio histológico y las pruebas anatomopatológicas son imprescindibles en el diagnóstico, permitiéndonos evaluar la lesión, ya sea mediante una punción con aguja fina (PAAF) menos invasiva, pero sin capacidad de determinar marcadores hormonales, la biopsia con aguja gruesa o trucut la cual si permite la valoración de éstos o la biopsia excisional, la cual nos aporta una histología completa pero con un mayor riesgo dado que se trata de un método invasivo^{19 20}.

1.1-6. ESTADIFICACIÓN

La American Joint Committee on Cancer (AJCC) clasifica los tumores de mama atendiendo a la clasificación TNM.

La clasificación refleja tres características tumorales que aportan un valor pronóstico, Tamaño tumoral (T), afectación ganglionar locoregional (N) y metástasis a distancia (M)²¹. (Figura 4).

T (Tamaño tumoral):

- Tx: El tumor primario no se detecta.

Introducción

- T0: No existe evidencia de tumor primario.
- Tis: Carcinoma in situ.
- T1: Tumor de un tamaño inferior a los 2 cm en su diámetro mayor.
 - T1mic: Microinvasión. Tamaño inferior a 0,1 cm.
 - T1a: 0,1 a menos de 0,5 cm.
 - T1b: Tamaño mayor de 0,5 y menor de 1 cm.
 - T1c: Tamaño mayor de 1 cm y menor de 2 cm.
- T2: Tumor mayor a 2 cm y menor a 5 cm en su diámetro mayor.
- T3: Tumor mayor de 5 cm en su diámetro mayor.
- T4: Tumor con cualquier tamaño pero que presente afectación de pared torácica o/y piel.
 - T4a: extensión sobre pared torácica sin afectación en musculo pectoral.
 - T4b: Edema o ulceración en la piel de la mama o presencia de satélites nodulares confinados a la misma.
 - T4c: T4a + T4b.
 - T4d: Carcinoma inflamatorio.

N (afectación ganglionar clínica):

- Nx: Adenopatías regionales no son detectadas.
- N0: No afectación ganglionar metastásica.
- N1: Metástasis en adenopatías axilares ipsilaterales de los Niveles I y II.
- N2: Metástasis ganglionares ipsilaterales en niveles I y II
 - N2a: Metástasis ganglionares en niveles I y II axilares fijados a estructuras adyacentes.

- N2b: Metástasis clínicamente detectados en ganglios de mamaria interna ipsilaterales en ausencia de axilares en niveles I y II.
- N3: Metástasis en adenopatías ipsilaterales infraclavicular (Nivel III axilar)
 - N3a: Metástasis ganglionares infraclaviculares ipsilaterales.
 - N3b: Metástasis ganglionares ipsilaterales en mamaria interna y axilares.
 - N3c: Metástasis ganglionares en adenopatías ipsilaterales supraclaviculares.

pN (afectación ganglionar patológica):

- pNx: Sin adenopatías encontradas.
- pN0: No adenopatías metastásicas histológicas.
- pN0 (i-): No afectación ganglionar metastásica histológica. IHQ negativa.
- pN0 (I+): Células malignas detectadas en ganglios regionales no superior a 0,2 mm detectados por HyE o IHQ, incluido ITC).
- pN0 (mol-): No afectación ganglionar metastásica histológica. RT-PCR negativo.
- pN0 (mol +): Positividad para malignidad por RT-PCR pero no detectada con técnica de IHQ.
- pN1: Micrometastasis o metástasis en 1-3 ganglios linfáticos; y/o en mamaria interna detectados por ganglio centinela pero no clínicamente.
 - pN1 mic: Micrometástasis, mayor de 0,2 mm y menor de 2 mm.
 - pN1a: Metástasis ganglionares en 1-3 ganglios.
 - pN1b: Metástasis en ganglios mamaros internos, detectados mediante biopsia del ganglio centinela.
 - pN1c: pN1a + pN1b.

Introducción

- pN2: Metástasis en 4-9 ganglios axilares o afectación de mama interna clínicamente aparente sin afectación de ganglios axilares.
 - pN2a: Metástasis en 4-9 ganglios axilares.
 - pN2b: Metástasis en ganglios de mama interna clínicamente aparente y sin afectación axilar.
- pN3: Metástasis en 10 o más ganglios axilares o infiltración de los ganglios infraclaviculares o afectación clínicamente aparente de la mama interna homolateral en presencia de uno o más ganglios axilares positivos o infiltración de más de tres ganglios axilares y de la mama interna con enfermedad microscópica detectada mediante disección del ganglio centinela pero no clínicamente aparente o metástasis en los ganglios supraclaviculares homolaterales.
 - pN3a: Metástasis en 10 o más ganglios axilares o infiltración de los ganglios infraclaviculares..
 - pN3b: Afectación clínicamente aparente de la mama interna homolateral en presencia de uno o más ganglios axilares positivos o infiltración de más de tres ganglios axilares y de la mama interna con enfermedad microscópica detectada mediante disección del ganglio centinela pero no clínicamente aparente.
 - pN3c: metástasis en los ganglios supraclaviculares homolaterales.

M (Metástasis a distancia):

- M0: No afectación clínica ni radiológica de metástasis a distancia.

- cM0 (I+): No clínica ni radiológica evidencia de metástasis a distancia, pero presencia de células no mayores a 0,2 mm por depósitos moleculares, sin clínica acompañante.
- M1: Metástasis a distancia.

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mic	M0
	T1	N1mic	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Figura 4: Estadios del cáncer de mama.

1.1-7. BIOLOGÍA MOLECULAR

Hasta hace poco tiempo el cáncer de mama se clasificaba únicamente en función de la morfología celular, de la determinación inmunohistoquímica de Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona (RP) y Her2 y de parámetros clínicos como el tamaño tumoral, la afectación de ganglios linfáticos y la presencia de metástasis a distancia²².

Perou et al utilizaron un modelo de microarrays de cDNA de 40 muestras de mama y 17 líneas de cultivos celulares de este tipo de cáncer. Concluyeron que existía gran diferencia en la expresión génica entre tumores, pero aún así lograron establecer la existencia de varios subtipos génicos de cáncer de mama que incluyen Luminal A y B, HER-2+/RE-, basal like y normal like²³. (Figura 5).

<u>Subgrupos</u>	<u>Expresión Génica</u>
Luminal A	RE+++ , RP+++ , Her2- , CK8+ , CK18+
Luminal B	RE+ , RP+ , Her2 + (Expresión moderada/baja de genes específicos del patrón luminal).
HER2 +	RE- , RP- , Her2+ (importante expresión de genes próximos a Her2)
Basal-Like	RE- , RP- , Her2- , c-Kit +/- , EGFR +/- , CK 5/6 + , CK 17 + , Integrina β 4 , Laminina , Mioesina , Vimentina , P-Cadherina , CAV 1 y 2.
Normal Like (Mamario Normal)	Con frecuencia RE - , RP - , Her2- . Gran expresión de genes característicos de células epiteliales basales y adiposas y escasa expresión de genes de células epiteliales lumbinales.

Figura 5: Subtipos moleculares de cáncer de mama.

El tipo Luminal es el más común, recibe este nombre por su similitud con las células epiteliales lumbinales presentes en la capa interna de los conductos mamarios, tiene una expresión de RE y RP, genes asociados (LIV1, Ciclina 1) y Citoqueratinas 8/18. Las mutaciones en p53 son raras en este tipo de tumores, representan menos del 20%. Este grupo no es heterogéneo, el subtipo Luminal A expresa con mayor intensidad los genes de RE, mientras que el subtipo Luminal B tiene una expresión solo moderada de estos genes y además el subtipo Luminal A presenta un mejor pronóstico que el subtipo Luminal B²⁴.

El tipo Her2+ se asocia con otros marcadores de mal pronóstico, incluyendo alteraciones de otros genes del amplión 17q21 como la topoisomerasa II α , GATA4, genes de angiogénesis y proteólisis.

El subtipo basal comparte características moleculares con las células mioepiteliares del tejido mamario normal, por lo que se supone que su origen se encuentra precisamente en esas células. Se caracterizan por la falta de expresión de RE, RP y Her2 y expresión de citoqueratinas 5/6 y 17, EGFR, p53 y genes relacionados con la proliferación (c-Kit).

Nielsen et al se propusieron identificar mediante inmunohistoquímica (IHQ) los tumores definidos por expresión génica como basal y determinar si, efectivamente, esto tenía implicaciones clínicas. Para ello, estudiaron 119 muestras de cáncer de mama, encontrando un 15% de tumores basales mediante cDNA arrays. A continuación estudiaron los mismos tumores mediante inmunohistoquímica, observando que al realizar las tinciones, la mayoría de los tumores basales presentaban un patrón de inmunohistoquímica triple negativo (RE-, RP-, Her2 -) pero existía un pequeño porcentaje de los basales expresaban estas proteínas, de modo que el solapamiento entre triple negativo y tumores basales no era completo²⁵.

Introducción

La tinción con CK17 es con frecuencia más débil que con CK5/6 por lo que Nielsen et al abogan por el empleo de este último como marcador de célula basal. Además comprobaron que el 57% de los tumores de su muestra expresaban EGFR, frente al 8% que lo hacía en los tumores no seleccionados. Este no es un marcador específico de célula basal pero la alta frecuencia con la que se expresa en estos tumores hace que deba ser tenido en cuenta a la hora de identificarlos. La expresión de c-kit se vio en un 13% frente al 11% de los tumores no basales. Más del 80% de los tumores basales presentaron mutaciones de p53 frente al 13%²⁵.

Con todo esto, los autores de este trabajo consideran que para poder afirmar mediante inmunohistoquímica que un tumor es basal debe ser RE-, RP-, Her2-, CK5/6 + (y/o CK17+) y/o EGFR + y no únicamente triple negativo.

Los primeros trabajos de Perou y Nielsen se han seguido de muchos otros que han estudiado patrones de expresión génica o inmunohistoquímica y hoy se sabe que los tumores basales se caracterizan por la expresión de marcadores de célula basal como CK5/6, 17, la expresión frecuente de EGFR, c-kit, p53, P-cadherina, CAV1 y 2, mioesina, vimentina, laminina y Ki-67 y la ausencia de RE, RP, Her2, p27, ciclina D1, proteína FHIT Y MUC1²⁶.

Los tumores con fenotipo basal son en su mayoría de alto grado y ductales aunque en ocasiones pueden ser metaplásicos, medulares típicos o atípicos o adenoides quísticos. Presentan una historia natural agresiva, con aparición a edad precoz y con un intervalo libre de enfermedad y supervivencia global inferior al resto de subgrupos²⁷.

Gran parte de los cánceres asociados a mutaciones BRCA1 son basales. El 80-90% de los tumores de mama que se observan en portadoras de mutaciones BRCA1 son de

subtipo basal aunque este subgrupo solo representa el 15% de los tumores esporádicos²⁸.

1.1-8. FACTORES PRONÓSTICOS

Los factores pronósticos clásicos establecidos son la afectación ganglionar, el grado histológico, el tamaño tumoral, extensión local y el estado de los receptores hormonales. Pero estos no son lo suficientemente precisos para predecir la evolución del cáncer de mama tras la cirugía.

La ausencia o presencia de afectación ganglionar constituye el factor pronóstico más importante. Existe una relación directa entre el número de ganglios afectados y la recaída a distancia²⁹. Tradicionalmente el estado ganglionar axilar ha sido evaluado mediante el vaciamiento axilar de los niveles I y II. Con la intención de minimizar la movilidad producida por el vaciamiento ganglionar axilar, la técnica del ganglio centinela se ha instaurado en la práctica clínica³⁰.

El tamaño tumoral uno de los factores pronósticos más consistentes en el cáncer de mama, en especial en pacientes sin afectación ganglionar. El riesgo de recidiva se incrementa a medida que aumenta el tamaño tumoral y este riesgo se mantiene durante el seguimiento de estas pacientes³¹.

Existen diferentes clasificaciones para el grado histológico. La más utilizada es la de Scarff-Bloom-Richardson que clasifica los tumores considerando el índice mitótico, la diferenciación celular y el pleomorfismo y los clasifica en: bien diferenciados (grado I), moderadamente diferenciados (grado II) o pobremente diferenciados (grado III). Así,

Introducción

los tumores de grado III se han relacionado con un peor pronóstico en las pacientes afectadas de cáncer de mama. La clasificación de Fisher evalúa el grado nuclear incluyendo: tamaño nuclear, forma, componente nucleolar, patrón de cromatina y rango mitótico.

La invasión linfovascular ha sido asociada a mayor riesgo de recidiva y mortalidad. Se asocia a peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global³².

Los receptores hormonales de estrógenos y progesterona son imprescindibles en el momento actual para el manejo clínico del cáncer de mama. Los receptores de estrógenos son considerados un factor pronóstico, así los rasgos de recurrencia en los primeros cinco años en mujeres con tumores con RE positivo sin tratamiento complementario son 5-10% inferiores en comparación a los de los tumores con RE negativo³³. Sin embargo existen estudios con un mayor tiempo de seguimiento, los cuales concluyen que las diferencias disminuyen a medida que aumenta el tiempo de seguimiento, sugiriendo que los receptores de estrógenos podrían ser un marcador de crecimiento siendo lento cuando se expresan. Por otra parte, los RE se asocian con otros factores pronósticos como son la edad más avanzada, tumores bien diferenciados, menor índice de proliferación y menor porcentaje de sobreexpresión de Her2. La utilidad de los receptores de progesterona como factor pronóstico no está tan establecida, aunque se ha relacionado con el fenotipo Luminal B que se relaciona con una mayor agresividad y resistencia a la hormonoterapia. La mayor utilidad de los receptores hormonales radica en la posibilidad de beneficiarse de un tratamiento hormonal. La ausencia de receptores hormonales predice la falta de respuesta a este tratamiento en cáncer de mama avanzado y neoadyuvante. Los estudios realizados en neoadyuvancia o metastásico calculan que existe entre un 50-60% de respuestas en aquellas pacientes que expresan RE positivos³⁴. En cuanto al valor predictivo de la

hormonoterapia adyuvante en tumores con RE +, el metaanálisis de Oxford confirma que el estado del RE es factor predictor de beneficio del tratamiento con Tamoxifeno durante 5 años³⁵.

El gen Her2 esta sobreexpresado en aproximadamente el 15-25% de todos los canceres de mama³⁶. La amplificación de Her2 es un factor pronóstico en ausencia de tratamiento complementario, asociándose a una peor supervivencia libre de enfermedad y peor supervivencia global. Se trata de un factor pronóstico independiente del estado ganglionar, el tamaño tumoral, el grado histológico y el estado del receptor hormonal³⁷. Presenta un importante valor predictivo de la respuesta a tratamientos quimioterápicos y de hormonoterapia, y en especial de la respuesta a los agentes antiher-2 con la resistencia a agentes alquilantes³⁸.

Ki-67 es un antígeno nuclear expresado en células en fase de proliferación, pero no durante la fase de G0. Los niveles de Ki-67 son bajos en las fases G1 y S, adquiriendo un pico en la fase de mitosis. Existe una evidencia acerca del valor pronóstico de Ki-67, existiendo una peor supervivencia en aquellos que presentan un elevado índice proliferativo. En cambio no existe una evidencia científica sobre el valor que predictivo que representa Ki-67³⁹.

La precisión de los factores individuales es limitada y quizá se precisan modelos más complejos que incluyan nuevos factores moleculares o plataformas de expresión génica, para mejorar el poder pronóstico de los factores clásicos y ayudar en la predicción de la recaída de la enfermedad. En los últimos años ha surgido la tecnología de los microarrays, de estos el MammaPrint y el Oncotype son los más conocidos⁴⁰.

1. 2- CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

1.2-1. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA

La presencia de una historia familiar de cáncer de mama constituye un factor de riesgo. En estudios epidemiológicos se ha demostrado que el riesgo de padecer cáncer de mama se duplica en pacientes con un antecedente de primer grado de cáncer de mama⁴¹.

Diversos estudios han estimado que entre un 5 y un 10 % de todos los tumores de mama diagnosticados presentan un componente hereditario relacionado con mutaciones germinales en genes de susceptibilidad⁴².

Aproximadamente la mitad de estos casos son debidos a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. La frecuencia poblacional de estas mutaciones es 1/400- 1/800 y el riesgo de cáncer de mama es superior a 10 veces con respecto a las no portadoras. Por ahora, BRCA1 y BRCA2 son los genes de alta penetrancia mas frecuentes asociados al cáncer de mama hereditario⁴³.

Existen otros genes de alta penetrancia que se asocian al cáncer de mama hereditario, se incluyen dentro de síndromes hereditarios, como el TP53 en el Síndrome de Li-Fraumeni o PTEN en el síndrome de Cowden o MSH2/MLH1 en el síndrome de Muir Torre o STK en el Síndrome de Peutz-Jehger, se trata de casos muy infrecuentes que suponen menos de un 1% de los casos de cáncer de mama hereditario^{11 12 44}.

Otros genes que intervienen en la aparición del cáncer de mama hereditario serían CHECK 2, ATM, PALB2, los cuales no alcanzan un porcentaje mayor a un 5%, interviniendo en la reparación del ADN o en la interacción con BRCA1 y BRCA2. Aumentan el riesgo en portadoras de forma moderada, siendo de 2 a 4 veces más que el resto de la población^{45 46}.

Existen genes candidatos desconocidos con susceptibilidad poligénica que corresponde entre un 50-60% de los genes responsables del cáncer de mama hereditario⁴⁷. (Figura 6).

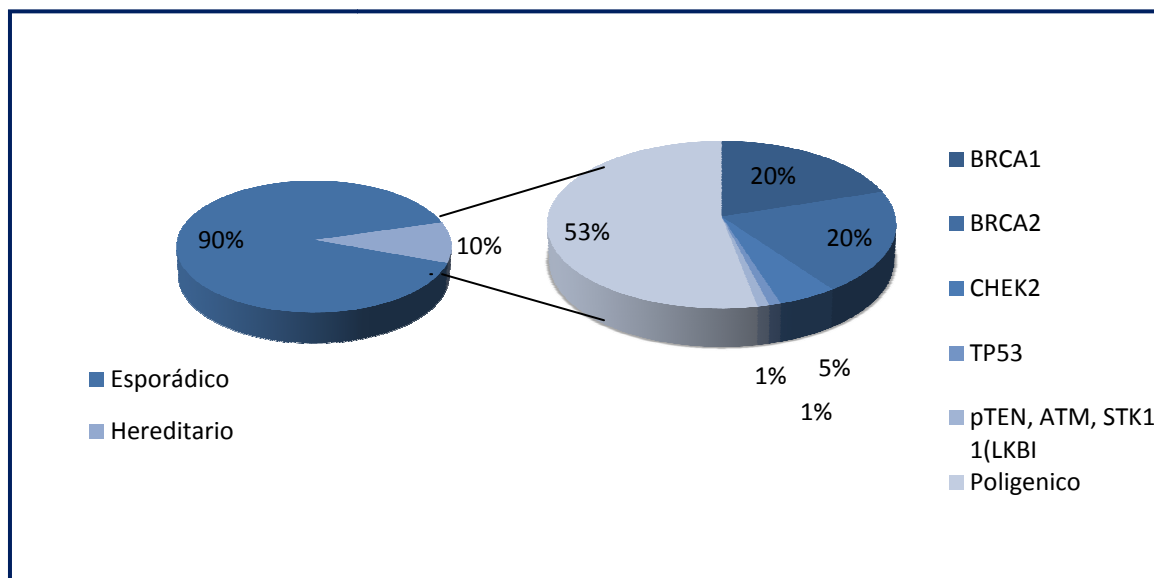


Figura 6: Genes de susceptibilidad al cáncer de mama.

1.2-2. GENES DE ALTA SUSCEPTIBILIDAD: BRCA1 Y BRCA2

El gen BRCA1 es un gen de gran tamaño. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21). Su secuencia contiene 5592 nucleótidos, repartidos en 24 exones y se extiende a lo largo de 100Kb de ADN genómico. Se transcribe en numerosos tejidos, en

Introducción

los que destacan mama y ovario. Se conocen diversos trascritos del gen, aunque el más completo es de unas 7,2 Kb, y se traduce en una proteína de 220 kD compuesta por 1863 aminoácidos^{48 49}. (Figura 7).

El gen BRCA2 es aun más grande que el gen BRCA1. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 13 (13q12). Se compone de 11.385 nucleótidos, repartidos en 27 exones, a lo largo de 70 Kb de DNA genómico. Aparece en tejidos como mama, placenta, testículo, ovario y timo. La transcripción de 12 Kb, se compone de 3418 aminoácidos^{50 51}. (Figura 7).

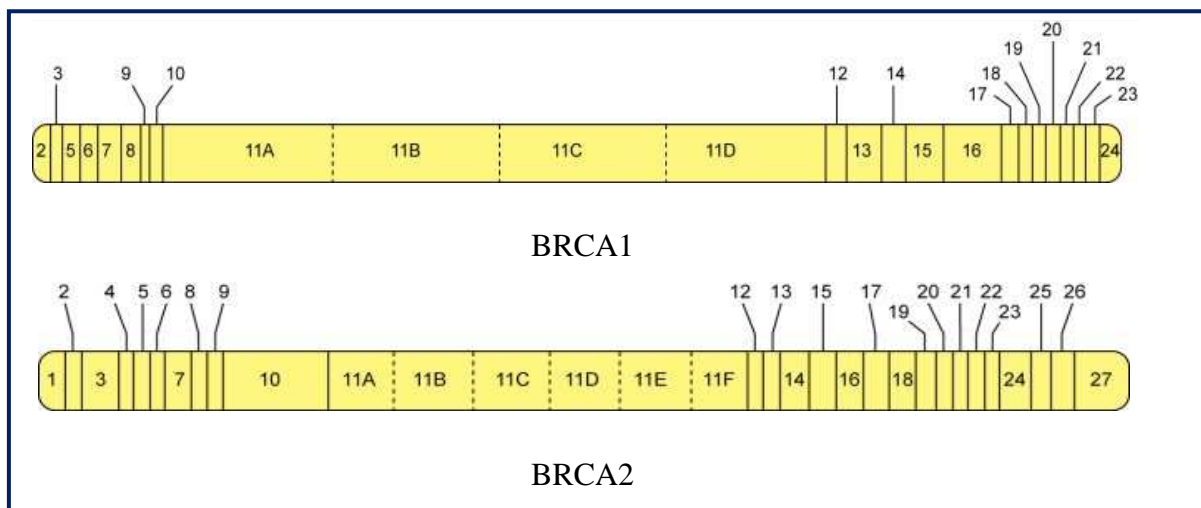


Figura 7: Estructura génica de los genes BRCA1 y BRCA2.

La proteína BRCA1 interactúa con muchas otras proteínas correspondientes a genes supresores de tumores, oncogenes, activadores y represores de la transcripción del DNA, ubiquitinación de proteínas, remodelación de la cromatina, reparación y transcripción del DNA y control del ciclo celular. La finalidad es mantener la estabilidad genómica y por tanto el control de la aparición de tumores de mama y de ovario⁵².

Las funciones de BRCA2 parecen ser más limitadas que las de BRCA1. BRCA2 participa en la regulación del ciclo celular y especialmente en la reparación del DNA mediante recombinación homóloga⁵³.

Esto sugiere que ambas proteínas actúan en las vías de reparación del DNA y su inactivación mediante mutaciones origina inestabilidad genética, provocando indirectamente la aparición del tumor por acumulo de mutaciones en otros genes, reguladores directos del ciclo celular. Debido a este tipo de funciones en el mantenimiento de la integridad del genoma BRCA1 y BRCA2 se consideran genes supresores de tumores del tipo *caretakers*.⁵⁴ (Figura 8).

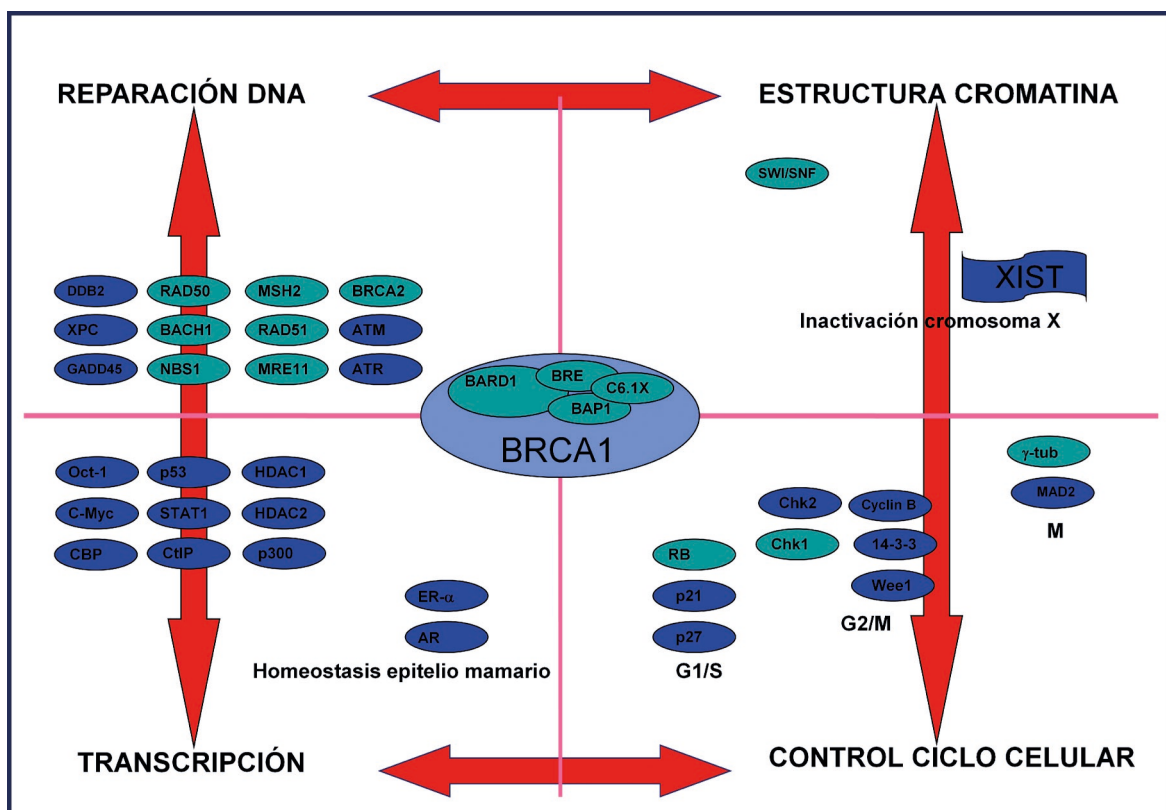


Figura 8: Biología de BRCA1.

1. 2-3. MUTACIONES GERMINALES BRCA1 Y BRCA2

Se han registrado más de mil mutaciones distintas tanto de BRCA1 y BRCA2, recogidas en la base de datos BIC⁵⁵.

La mayoría de las mutaciones consiste en insercciones o deleciones que provocan un cambio en la transcripción del ADN, dando lugar a la aparición de un codón de stop o parada en la lectura del genoma. También se han descrito sustituciones que originan la aparición de un codón de parada, denominado estas mutaciones como nonsense. Ambas alteraciones provocan la formación de proteínas no funcionantes o la degradación de los mRNA formados.

En ocasiones variantes generalmente localizadas en los lugares de corte y empalme de exones, alteran el proceso de eliminación de intrones (splicing), causando la pérdida de exones o la inserción de intrones en el fragmento transcrito. También grandes deleciones o duplicaciones se pueden dar, suponiendo una frecuencia inferior a 10% de todas las mutaciones detectadas.

Algunas mutaciones se observan de forma repetida en familias no emparentadas y en ciertas poblaciones unas pocas mutaciones se presentan con una frecuencia alta. Se ha demostrado que estas mutaciones recurrentes provienen de un mismo antecesor portador. Estas mutaciones se denominan “fundadoras” y aparecen en individuos de poblaciones pequeñas y tras generaciones sucesivas de endogamia. Así pues una mutación pasa a ser altamente recurrente o incluso característica de un área geográfica o grupo étnico. Por ejemplo las mutaciones 185delAG y 5382insC en BRCA1 y 6174delT

en BRCA2 son características de la población judía azquenazi, apareciendo en un 2,5% de la población general^{56 57}. (Figura 9).

<u>Población</u>	<u>BRCA1</u>	<u>BRCA2</u>
Origen africano	1832del5	
Judíos ashkenazi	185delAG; 5832insC	6174delT
Británicos	4184del4	6503delTT
Finlandia		L2776X
Hungría	5282insC	
Islandia		999del5
Italia	1499insA	
Países Bajos	2804delAA	
Noruega	1136insA	
Suecia	3166insTGAGA	4486delG
Rusia	5382insC	

Figura 9: Principales mutaciones fundadoras.

Según la base de datos BIC aproximadamente un 30% de los cambios de secuencia corresponden a sustituciones de nucleótidos que producen cambios de aminoácidos en la proteína (missense). Según la localización y las características, estos cambios pueden provocar alteraciones en la funcionalidad de la proteína, conllevando un riesgo de apariciones de tumores o ser un cambio sin relevancia. El termino variables de significado incierto, describe a la perfección este problema. El conocer este dato resulta

difícil a nivel de la práctica médica habitual, debido a que las técnicas de detección para conocer la patogenicidad resultan complejas. La cosegregación de la mutación con la enfermedad dentro de una familia, la localización de la lesión, la funcionalidad de la proteína obtenida, serían los datos evaluables para determinar el grado de daño provocado⁵⁸.

1.2-4. PENETRANCIA DE LOS GENES BRCA1 Y BRCA2

Las personas portadoras de mutaciones germinales en BRCA1 y BRCA2 tienen un riesgo aumentado de desarrollar cáncer de mama y ovario. Aproximadamente las personas portadoras de esta mutación tienen un riesgo de desarrollar cáncer a lo largo de su vida de un 87%^{59 60}.

Se ha estimado que el riesgo acumulado de aparición a los 70 años de cáncer de mama es del 65% (IC 95%=44-78%) en BRCA1 y del 45% (IC 95%=18-54%) para BRCA2, y en el caso del cáncer de ovario del 39% (IC 95%=18-54%) para BRCA1 y del 11% (IC 95%=2-19%) para BRCA2^{8 61}.

En familias españolas portadoras de la mutación BRCA1 y BRCA2, se estima que el riesgo acumulado de aparición a los 70 años de cáncer de mama es del 52% (IC 95%=26-69%) en BRCA1 y del 47% (IC 95%=29-60%) para BRCA2. Y para cáncer de ovario del 22% (IC 95%=0-40%) para BRCA1 y del 18% (IC 95%=0-35%) para BRCA2. En este estudio el riesgo relativo para cáncer de mama presentaba un pico máximo de 35-40 años (HR=32 y 51 para edades de 20-29 y 30-39 respectivamente) y

posteriormente desciende a medida que aumentaba la edad. En el caso del cáncer de ovario el riesgo relativo se encontraba antes de los 50 años (HR= 32 y 51 para edades 20-29 y 30-39 respectivamente). El riesgo relativo empieza a incrementarse a partir de los 40 años para BRCA1 y de los 50 para BRCA2 y se mantiene hasta los 70 años⁹.

Otros tumores que pueden aparecer en pacientes portadoras de BRCA serían, para BRCA1 el carcinoma de trompas de Falopio (RR 50-100), peritoneo (RR 45-100), carcinoma uterino (RR 2), cáncer de cérvix (RR 3,8), páncreas (RR 2.0) y próstata (RR 1,8)⁶². Mientras que para BRCA2 se ve una aparición de cáncer de mama en varón de un 6%. El cáncer de próstata también se ve aumentado con un RR de 4,7-7. Y otros como el carcinoma gástrico, cavidad oral, faringe, vesícula biliar y trompas de Falopio⁶³.

1.2-5. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN MUTACIONAL

El estudio de mutaciones germinales de BRCA1 y BRCA2 puede realizarse a partir de DNA obtenido de linfocitos de sangre periférica, células epiteliales bucales, la médula ósea, los ganglios, tejidos tumorales, el líquido amniótico, las vellosidades corionicas y las blastomera.

Existen diversos métodos para la detección de alteraciones en el ADN. La cromografía líquida desnaturizante de alto rendimiento (DHPLC, Denaturing High-Performance Liquid Chromatography) puede detectar diferencias de secuencia tanto de un solo par de bases, como también las inserciones y deleciones. La DHPLC está basada en la emulsión diferencial del ADN homoduplex y heteroduplex cuando migran a través de

una columna cromatográfica. La ventaja, respecto a otros métodos de análisis de mutaciones, es su mayor sensibilidad aunque se trata de una técnica costosa y de cuidada interpretación⁶⁴.

El estudio de grandes deleciones, duplicaciones o reordenamientos complejos del gen debe realizarse por otras técnicas más sensibles para la detección de estas alteraciones como MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). La cual se basa en la hibridación del DNA con dos oligonucleotidos o sondas, seguida por la unión de ambas sondas y amplificación por PCR de los productos obtenidos^{65 66}.

1.2-6. CRITERIOS DE SELECCIÓN

A nivel del Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario hereditario (SMOH) no existen unos criterios aprobados por consenso de forma internacional. Existen guías publicadas para recomendar la realización del test genético en BRCA y los criterios de selección de las familias candidatas para la detección de mutaciones BRCA1 y BRCA2 suelen ser similares en los distintos grupos de trabajo, hallando unas tasas superiores al 10%. Se basan en datos clínicos que incluye el número de casos de cáncer mama y/o ovario familiares, edad de diagnóstico y la presencia de cáncer de mama bilateral^{67 68}.

Los criterios para determinar un estudio genético en cáncer de mama y/u ovario familiar hereditario, se exponen a continuación (Guía clínica SEOM de cáncer hereditario)⁶⁹:

Independientemente de la historia familiar:

- Paciente con cáncer de mama u ovario sincrónico o metacrónico.
- Cáncer de mama bilateral <40 años.
- Cáncer de mama \leq 30 años.

Familia con dos miembros afectados de cáncer de mama y/o cáncer de ovario y al menos una de las siguientes características:

- Varón con cáncer de mama.
- Uno de ellos es un cáncer de ovario, cáncer tubárico o primario peritoneal.
- Ambos casos diagnosticados con edad inferior a 50 años.
- Uno de ellos es bilateral y el otro diagnosticado con menos de 50 años.

Familias con tres o más individuos con cáncer de mama y/o cáncer de ovario en la misma rama familiar.

Se han desarrollado tablas de prevalencia (Tablas de prevalencia de Myriad), modelos empíricos (Couch, Manchester y Myriad II) y genéticos (BRCAPRO y BOADICEA) que de manera sencilla permiten conocer la probabilidad de detectar una mutación. El modelo empírico se basa en la regresión logística, es rápido pero presenta como limitaciones una alta sensibilidad en el método de detección de las mutaciones. Las tablas de prevalencia son también métodos rápidos pero presentan en algunos grupos unos tamaños muestrales pequeños. El modelo genético se basa en el teorema de Bayes, evita la ambigüedad en la definición de la historia genética y la prevalencia y la penetrancia pueden ser modificadas pero requiere un mayor tiempo^{70 71 72 73}.

Introducción

Pero en los modelos publicados hasta la fecha, las variables investigadas se restringen básicamente al número, naturaleza y/o edad del diagnóstico de los tumores presentes en cada pedigree. La historia familiar en ocasiones es incompleta, imprecisa y con frecuencia no informativa. Se considera historia familiar no informativa aquella que en al menos una de las ramas paterna o materna existe un número menor de dos mujeres (familiares de primer o segundo grado) mayores de 45 años. (Figura 10)⁷⁴.

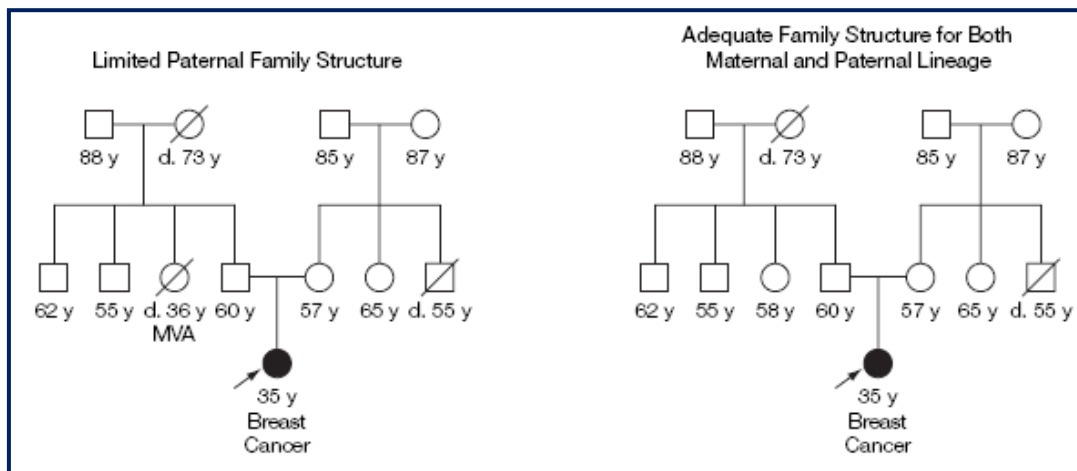


Figura 10: El árbol genealógico no informativo a la izquierda frente al informativo a la derecha⁷⁴.

Existen otras variables, como las características anatomopatológicas de los tumores diagnosticados en la familia que hasta ahora no se han incorporado a estos modelos. Mavaddat y colaboradores incorporan al método BOADICEA la expresión de receptores de estrógenos, el estadio TN y marcadores de fenotipo basal, lo que conlleva una mejora en la predicción del riesgo de cáncer de mama asociado a la mutación BRCA⁷⁵.

1.2-7. PATRÓN FENOTÍPICO DEL CÁNCER DE MAMA ASOCIADO A BRCA1/2

Los tumores mamarios asociados a mutación BRCA1 presentan diferencias con respecto a los tumores esporádicos desde el punto de vista morfológico. En cambio los tumores BRCA2 representan un grupo más heterogéneo, sin establecer diferencias significativas con respecto a los esporádicos. (Figura 11).

<u>Fenotipo tumoral</u>	<u>BRCA1</u>	<u>Esporádicos</u>	<u>BRCA2</u>
Alto grado	66%	36%	41%
RE negativos	90%	35%	34%
ErbB2	97%	85%	97%
C-Myc Amplificación	53%	23-31%	62%
Carcinoma Medular	13%	2%	3%
Carcinoma ductal in situ	41%	56%	52%
Borde continuo	51%	20%	36%
Infiltración linfocitaria	13%	3%	4%
Mutación en PT53	67%	35%	63%
Fenotipo basal	88%	45%	No
Expresión de EGFR	67%	21%	8%

Figura 11: Fenotipo tumoral de los tumores de mama asociados a BRCA1 y BRCA2.

La mayoría de los cánceres de mama son carcinoma ductal infiltrante aunque existe un porcentaje más elevado que en la media de aparecer carcinomas medulares en pacientes portadoras de BRCA1.

Introducción

BRCA1 Y BRCA2 presentan un mayor grado histológico que el cáncer de mama esporádico y además BRCA1 tiende a tener un mayor pleomorfismo, índice mitótico e infiltración linfocitaria⁷⁶.

Es más probable que BRCA1 presente RE y RP negativos (80-90%) comparado con el cáncer de mama esporádico (30%). En cambio la presencia de negatividad en los RE y RP para BRCA2 no presenta una diferencia significativa. En lo referente a la amplificación de Her2, es raro su sobreexpresión tanto para BRCA1 como BRCA2^{77 78}⁷⁹. (Figura 12). Los tumores asociados a BRCA1 con mayor frecuencia aparecen a una edad temprana, se asocian a un alto grado tumoral y no expresan receptores hormonales⁸⁰.

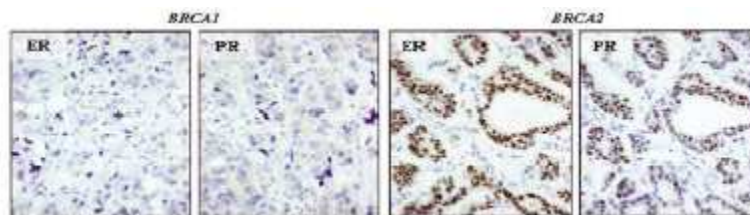


Figura 12: Inmunohistoquímica de BRCA1 y BRCA2.

BRCA1 con frecuencia son tumores con perfil triple negativo y una alta proporción muestran un fenotipo basal definido por perfiles de expresión génica y por análisis inmunohistoquímico, incluyendo Citoqueratinas 5/6, 14 y 17, epidermal growth factor receptor (EGFR), c-kit y p53^{81 82}.

Además la proporción de cáncer de mama RE negativo está asociado a la edad de presentación, de manera que disminuye al incrementarse la edad⁸³. Los tumores asociados a BRCA1/2 diagnosticados antes de 50 años difieren de una manera significativa de aquellos presentes a una edad superior pudiendo ser debido a diferente

comportamiento biológico y vías de desarrollo tumoral^{84 85}. Eisinger et al, concluyen en su estudio que además de la negatividad de los receptores de estrógenos y del alto grado histológico presente en estos tumores, la edad temprana de aparición del cáncer de mama es el único elemento predictivo del estado de BRCA1, reportado en un análisis multivariante⁸⁶.

Collins y colaboradores realizaron un estudio en el que relataban que la expresión de citoqueratinas basales y/o EGFR (fenotipo basal) puede utilizarse para identificar tumores triple negativo, pero que la expresión por si solos no es un marcador suficiente para distinguir a las mujeres que presentan una mutación germinal BRCA1⁸⁷.

Farshid et al demuestran que mediante el uso de los criterios morfológicos estándar en ausencia de conocer la historia familiar o la información clínica de la paciente, los patólogos son capaces de predecir el riesgo de asociación con una mutación germinal BRCA1 en una serie de tumores de mama, con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 86%⁸⁸.

El estudio de Liderau y colaboradores fue el primer estudio publicado en el año 2000. Puso de manifiesto la existencia de una mayor asociación entre las pacientes con cáncer de mama receptores de estrógeno negativo y alto grado histológico con la presencia de mutaciones BRCA. (Figura 13)⁸⁹.

Existen varios estudios publicados hasta el momento que evalúan la frecuencia de mutaciones BRCA1 en pacientes con cáncer de mama triple negativo (Receptores de estrógenos, progesterona y Her2 negativo). En ellos la frecuencia de detección de mutaciones fue mayor de la esperada. Los resultados y las características de los más relevantes se detallan a continuación. (Figura 13).

Autor	Criterios de inclusión	Estudio	N	Mutación BRCA1 (%)
<u>Lidereau et al.</u> 2000 (Rene hospital) ⁸⁹ .	Cm < 35 años	Registro hospitalario. Retrospectivo	70 (14 RE+, GIII).	4/14(28,6%)
<u>Chanj et al.</u> 2001. (Singapour hospital) ⁹⁰ .	Cm < 45 años	Unidad de mama. Prospectivo.	76 (24 CMTN)	6/24 (25%)
<u>Foulkes et al.</u> 2003. (Montreal hospital) ⁹¹ .	Cm < 65 años en Ashkenazi	Banco de tumores. Retrospectivo	292 (72 CMTN)	17/72 (23,6%)
<u>Kaldel et al.</u> 2006. (Dana Farber) ⁹² .	Cm triple negativo	Banco de tumores. Retrospectivo	177 (97<50 años)	20/177 (11,3%) 17/97 (17,5%)
<u>Young et al.</u> 2009. (Ohio/Nort Carolina hospitales) ⁹³ .	Cm triple negativo < 40 años. No Ashkenazi. Sin Historia familiar.	Registro + Unidades de Consejo genético. Retrospectivo.	54	6 (11%) BRCA1 +. 1 (1,85%) BRCA2 +. 9 VUS.
<u>Fostira et al.</u> 2010. (Group Cooperative. Grecian) ⁹⁴ .	Cm triple negativo.	¿?	284 (36< 40 años).	30 mutaciones recurrentes (11%)/284. 17 (47%)/36. 20 Historia familiar (66%)/30.
<u>Saura et al.</u> 2010. (Vall d'Hebron) ⁹⁵ .	Cm de alto riesgo familiar.	Unidades de Consejo genético. Retrospectivo	227 (58 CMTN)	21/58 (36%). 16 BRCA1+. 5 BRCA2+.

<u>Gonzalez Angulo et al.</u> 2011. (University of Texas) ⁹⁶ .	Cm triple negativo	Retrospectivo (1997-2006).	77	15/77 (19,5%).
<u>Evans et al.</u> 2011. ⁹⁷ .	Cm triple negativo < 41 años		63	8/63 (12,7%).
<u>Comen et al.</u> 2011. (Sloan Kettering) ⁹⁸ .	Cm Ashkenazi.	Unidades de Consejo Genético. Retrospectivo (2000-2004).	451(64 CMTN)	25/64(39,1%). Mutaciones fundadores. 48% CM < 50 años.
<u>Robertson et al.</u> 2012. UK ⁹⁹ .	Cm triple negativo	Retrospectivo	308 (149 seleccionadas por H ^a familiar o edad).	45/308 (15%). Seleccionadas 30/149 (20%).
<u>Hartman et al.</u> 2012. ¹⁰⁰	Cm triple negativo	Retrospectivo	199 (153 sin historia familiar positiva) (66<50 años)	21/199 (10,6%) 8/153 (5,2%). 6/66 (9,1).

Figura 13: Principales estudios que determinan frecuencia de BRCA en CMTN.

Estos estudios difieren en cuanto al tipo de estudio, el número de pacientes incluidas y los criterios de selección. En algunos de ellos se incluyen pacientes con historia familiar de riesgo y pacientes con ascendencia Ashkenazi. En cualquier caso, independientemente de esta variabilidad, tanto analizándolo conjuntamente como por separado, se concluye que existe una asociación entre mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo (CMTN).

1.2-7. JUSTIFICACION DE LA IDENTIFICACION DE MUTACIONES BRCA1/2

Las pacientes que presentan la mutación BRCA1 presentan un riesgo elevado de padecer cáncer de mama y/u ovario a lo largo de su vida. Se estima que una mujer portadora de mutación germinal en BRCA1 tiene un riesgo de padecer cáncer a lo largo de su vida del 87%^{59 60}, un riesgo acumulado a los 70 años de cáncer de mama del 65% y de cáncer de ovario del 39%⁶¹. Detectar a las portadoras permite poner en marcha medidas preventivas y/o terapéuticas que disminuyen la incidencia y la mortalidad en este subgrupo de pacientes.

Existen dos tipos de estrategias que se recomiendan a los portadores de mutación en estos genes, que conducen a un diagnóstico precoz o a una reducción del riesgo de cáncer.

La primera estrategia es el cribado de cáncer de mama y ovario, el cual se basa en la realización de autoexploración mamaria mensual a partir de los 18 años, exploración física por un especialista cada seis meses a partir de los 25 años, mamografía o RMN mamaria anual a partir de los 25 años y determinación de Ca 125 cada 6 meses y ecografía trasvaginal cada 6 meses a partir de los 35 años¹⁰¹.

La segunda estrategia es la cirugía reductora de riesgo mediante la mastectomía bilateral profiláctica y la salpingooforectomía bilateral. La mastectomía bilateral reduce el riesgo de cáncer de mama en portadoras en un 90%^{102 103}. La salpingooforectomía bilateral profiláctica, consigue una reducción de riesgo de cáncer de ovario 71-96%. Esta ha

demostrado además una reducción del 53-68% de riesgo de presentar cáncer de mama

104 105 106 107 .

Existen diferencias con respecto al abordaje terapéutico de estas pacientes portadoras de mutación germinal BRCA, tanto desde el punto de vista quirúrgico como sistémico. En pacientes diagnosticadas de cáncer de mama, la presencia de mutación patogénica en BRCA1 o BRCA2 puede modificar la decisión del tratamiento quirúrgico. Las pacientes que se someten a cirugía conservadora tiene un riesgo cuatro veces superior de cáncer de mama ipsilateral respecto a las que se realizaron mastectomía. El 70% de las pacientes presentaron un tumor en otro cuadrante, por lo que se trataría de segundos cánceres de mama más que de recidivas¹⁰⁸.

Estudios caso-control también ponen de manifiesto un mayor riesgo de cáncer de mama contralateral. Según Pierce et al, la tasa de aparición de cáncer de mama contralateral en pacientes portadoras de mutación BRCA (n=160) frente a controles (n=445) a diez años es 26% (IC 95%, 22-30%) y a 15 años de 39% (IC 95%, 31-47%)¹⁰⁹. El estudio de Malone et al, pone de manifiesto que una paciente con cáncer de mama antes de los 55 años portadora de mutación BRCA1 tiene una probabilidad de desarrollar un cáncer de mama contralateral del 20% y si es portadora de mutación BRCA2 del 15%¹¹⁰. Por todo ello, estas pacientes en el momento de la cirugía del cáncer de mama, si se conoce su estado de portadoras, debería ofrecérseles la realización de mastectomía bilateral.

Con respecto al tratamiento sistémico, actualmente las pacientes portadoras reciben el mismo tipo de tratamiento y con los mismos fármacos que las no portadoras. Pero cada vez se sabe más sobre el comportamiento biológico diferente de estos tumores a distintos fármacos. Se conoce que los tumores de mama asociados a mutaciones germinales en BRCA1 y BRCA2 son más sensibles a ciertos esquemas, como es el caso

de aquellos basados en platinos^{111 112} y se conoce que las mutaciones en BRCA2 son un factor predictivo de respuesta al tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer de ovario¹¹³. Pero sin duda los inhibidores de PARP han generado una gran expectación en los últimos años, mostrando su eficacia en mutaciones germinales BRCA1 y BRCA2 siendo su diana terapéutica los mecanismos de reparación celular^{114 115 116}.

En el momento actual los criterios para la selección de las pacientes candidatas a la realización de un test genético están basados en la historia familiar, básicamente en la edad temprana de aparición de la enfermedad neoplasia y la presencia de antecedentes familiares de cáncer de mama y/o ovario. La dificultad en identificar estas familias se encuentra en que los varones son en general portadores asintomáticos y en múltiples portadores la penetrancia no es completa.

El concepto de “historia familiar no informativa” lo definió Weitzel⁷⁴ como aquella que en al menos una de las ramas, paterna o materna, presenta menos de dos mujeres (familiares de primer o segundo grado) mayores de 45 años. Son historias familiares por tanto que carecen de suficientes elementos informativos. Los elementos informativos serían mujeres que han llegado a una edad de riesgo suficiente como para desarrollar un cáncer. En estas familias, la presencia de un número pequeño de casos de cáncer no debería ser motivo para excluirlas de la realización de estudio genético. Las muertes a edades tempranas, las adopciones, el desarraigo familiar, la tendencia actual a tener un menor número de hijos, son factores que determinan que este tipo de familias no sean infrecuentes.

Numerosos estudios asocian el cáncer de mama en pacientes portadoras de mutación germinal BRCA1 a la ausencia de expresión de receptores de estrógenos y progesterona y her2, lo que se denomina cáncer de mama triple negativo.

Teniendo en cuenta que aproximadamente del global de cánceres de mama el 15-20% son tumores triple negativo, Atchley et al¹¹⁷, examinaron 491 pacientes, detectando que un 57,1% de las pacientes portadoras de mutación germinal BRCA1 eran triple negativo, frente al 23,3% de la BRCA2 mutadas y frente al 13,8% de las pacientes sin mutación en BRCA.

También en el estudio de Xu et al¹¹⁸, se observó que más de la mitad de los casos de cáncer de mama portadoras de mutación BRCA1 eran triple negativo (53,85%), encontrando unas diferencias estadísticamente significativas con respecto a las portadoras de mutación en BRCA2 o a las pacientes no portadoras de mutación BRCA, presentando también un grado nuclear superior y un mayor número de metástasis ganglionares.

Los modelos de selección de las pacientes para determinar la presencia de mutación germinal BRCA publicados hasta la fecha incluyen variables clínicas como son el número, naturaleza y edad al diagnóstico de los tumores presentes en cada familia. La búsqueda de características que mejoren esta selección y permitan una mayor especificidad de las pruebas diagnósticas nos lleva a pensar que las características intrínsecas tumorales, es decir las características anatomopatológicas, pueden ser incorporadas en estos modelos de selección.

2-OBJETIVOS

Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar

- Objetivo principal:
 - Determinar la prevalencia de mutaciones germinales en BRCA1 en pacientes diagnosticadas antes de los 50 años de edad de cáncer de mama triple negativo y sin historia familiar de riesgo.

- Objetivo secundario:
 - Determinar la asociación de mutaciones germinales BRCA1 en función de la edad (menor e igual o mayor a 35 años).

 - Determinar la asociación de mutaciones germinales en BRCA1 en función del tipo de historia familiar informativa o no.

 - Determinar la asociación de mutaciones germinales en BRCA1 en función de la expresión de fenotipo basal.

 - Determinar la asociación de mutaciones germinales en BRCA1 atendiendo al estadiaje tumoral al diagnóstico (Estadio I-II o III-IV).

 - Determinar la asociación de mutaciones germinales en BRCA1 atendiendo al grado histológico de malignidad tumoral (bajo y moderado o alto grado).

3-MATERIAL Y MÉTODOS

Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar

3.1- TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio descriptivo trasversal sobre la presencia de mutaciones germinales en BRCA1 en mujeres diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo antes de los 50 años de edad y sin historia familiar de riesgo.

3.2- MATERIAL

3.2-1. UNIVERSO POBLACIONAL

Mujeres atendidas en el servicio de Salud español por cáncer de mama.

3.2-2. POBLACIÓN A ESTUDIO

Las pacientes fueron derivadas desde los hospitales de referencia pertenecientes a la sección de cáncer hereditario de SEOM.

Hospitales que intervinieron:

- Hospital Universitario Lozano Blesa (Zaragoza).
- Hospital Vall d'Hebron (Barcelona).

- Instituto Oncológico del Vallés (Barcelona).
- Hospital de la Santa Creu y San Pau (Barcelona).
- Hospital Clínico (Valencia).
- Hospital Arnau de Vilanova (Lérida).
- Hospital 12 de Octubre (Madrid)
- Hospital Complejo asistencial de Burgos (Burgos).
- Hospital Universitario de Getafe (Madrid).

3.2-3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se trata de un estudio multicéntrico en el que se han reclutado 92 pacientes procedentes de 9 centros hospitalarios españoles desde mayo de 2008 hasta mayo de 2009.

Población de mujeres españolas diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo diagnosticadas antes de los 50 años de edad y sin antecedentes familiares de riesgo que hayan sido atendidas en los servicios de Oncología.

- Pacientes con cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años de edad.
- Estudio inmunohistoquímico realizado en cada centro hospitalario de procedencia y con resultado de receptores de estrógeno y progesterona negativo y Her2: 0 ó 1+, si el resultado es 2+ es necesario un estudio FISH (Fluorescent in situ hybridization) no amplificado.

- Ausencia de historia familiar de riesgo. Se define historia familiar de riesgo como aquella que presenta uno o más familiares en primer o segundo grado con cáncer de mama u ovario en cualquiera de las dos ramas (paterna o materna)
- Firma previa de consentimiento informado para participar en este estudio. (Anexo 1).

3.2-4. MUESTRA

<u>Hospital</u>	<u>Número de pacientes (n=92)</u>
H.C.U. Lozano Blesa (Zaragoza)	27
Hospital Vall d'Hebron (Barcelona)	19
Institut Oncologic del Vallés (IVO)	15
Hospital de la Santa Creu y San Pau (Barcelona)	10
Hospital Clínico de Valencia	9
Hospital Arnau de Vilanova (Lérida)	6
Hospital 12 de Octubre (Madrid)	4
Complejo Asistencial de Burgos	1
Hospital Universitario de Getafe	1

3.3- METODOLOGIA

3.3-1. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se presentó al comité ético de investigación clínica de Aragón (CEICA) y fue aprobado en Abril de 2008 para su realización.

3.3-2. RECOGIDA DE DATOS

Tras firma de consentimiento informado, de cada caso incluido se recogió la información perteneciente a:

- Anamnesis con recogida de edad al diagnóstico de la enfermedad neoplásica.
- Bilateralidad.
- Antecedentes personales de enfermedades neoplásicas.
- Estadio tumoral.
- Grado histológico.
- Tipo de historia familiar informativa o no informativa. Se define como historia familiar informativa aquella que presenta en las dos ramas (materna y paterna)

de al menos dos mujeres (familiares de primer o segundo grado) mayores de 45 años). La historia familiar no informativa es aquella que no cumpla estos criterios.

3.3-3. RECOGIDA DE MUESTRA TUMORAL

Se obtuvo una muestra tumoral en bloque de parafina a partir de la cual se llegó al diagnóstico tumoral de cáncer de mama triple negativo mediante estudio de inmunohistoquímica (IHQ). Dicho estudio anatomopatológico se completó con el estudio de marcadores de inmunohistoquímica con el objetivo de identificar el fenotipo basal, EGFR y Citoqueratina 5/6, que se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

3.3-4. RECOGIDA DE MUESTRA PARA DETERMINACION BRCA1

Se procedió a la extracción de 12-20 ml de sangre venosa periférica en EDTA para la realización del estudio de mutaciones germinales, a partir de la cual se realizará la determinación de las mutaciones BRCA1.

3.3-5. ESTUDIO DE MARCADORES DE INMUNOHISTOQUÍMICA

De las muestras de tumor de las participantes en el estudio se realizó la inmunohistoquímica de EGFR y citoqueratina 5/6.

La inmunohistoquímica de EGFR y Citoqueratina 5/6 se realizó a partir de las muestras embebidas en parafina mediante una inmunotinción automática, seguida de la incubación con formalina en un kit de detección mediante el método estándar de estreptavidina biotina que pone de manifiesto la actividad peroxidasa de 3-3'diaminobencidina.

La tinción de EGFR se realizó utilizando el kit EGFR pharmDx (Dako) con una recuperación de antígeno enzimático por proteinasa K durante 5 minutos. Para la Citoqueratina 5/6 (Clon D5/16B4, Zymed Laboratories) se utilizó el anticuerpo siguiendo el protocolo automatizado Ventana CC1 con tinción leve a dilución de 1:100.

Se definió en el estudio como casos fenotipo basal, aquellos que presentaban positividad en citoqueratina 5/6 o en EGFR. Siendo dada como positivo aquellos casos en los que existiera tinción en citoplasma o membrana aunque fuera de manera focal^{119 120 121 122}.

3.3-6. PROCEDIMIENTO EN EL ANÁLISIS GENÉTICO DE BRCA1

Se aisló ADN genómico a partir de sangre periférica usando el procedimientos estándar. El análisis de la mutación se realizó mediante PCR, DHPLC (desnaturalización cromatografía líquida de alto rendimiento) y la secuenciación de todos los exones, así como los intrones del gen BRCA1, utilizando el método empleado previamente por Simard et al ¹²³.

3.3-6.1. EXTRACCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA

La extracción de sangre periférica se realizó mediante venopunción en el Servicio de Oncología Médica de los hospitales que participaron en este estudio. La recogida fue de 12-20 ml en EDTA. Las muestras se conservaron en nevera a una temperatura de 4 C°. El transporte de las muestras fue a temperatura ambiente en un plazo de tiempo no superior a 48 horas desde su extracción, al servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

3.3-6.2- EXTRACCIÓN DE ADN LINFOCITARIO A PARTIR DE UNA MUESTRA DE SANGRE PERIFÉRICA

La extracción del DNA se realizó en el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza manualmente utilizando el método de “Salting out”¹²⁴.

Se inició a partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica, recogida en tubo EDTA.

Para la lisis celular y mezcla de sus componentes, se realizó mediante métodos químicos, con la adición de 40 ml de STMT, compuesto formado por sacarosa 0,32M, tris HCL 1 mM ph 7,05, MgCL₂, Triton X-100 1%), dejando reposar 5 minutos y centrifugando a 3500 rpm durante 30 minutos a 4 C°. Posteriormente se procedió a decantar el sobrante y lavar el sedimento con la misma solución hasta eliminar los restos.

A continuación se añadió un tampón de lisis de leucocitos, un detergente, 120 microlitros de SDS o dodecil sulfato de sodio al 10% y 50 microlitros de proteinasa K (20 mg/ml). El fin era separar el DNA de las proteínas a las que se encuentra asociado. Se incubó durante toda la noche a 37 C° de temperatura y a la mañana siguiente, el ADN se sometió a precipitación y dilución.

Para precipitar los péptidos se añadió 1,76 ml de NaCl 6M, agitando en vortex fuertemente durante 15 segundos y centrifugando a 3500 rpm durante 30 minutos a 45C°. En el caso de permanecer partículas en suspensión se volvió a centrifugar.

Se recogió el sobrante y se precipitó el ADN con un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión. Si quedaron pequeñas cantidades se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos a 4 C°.

Se lavó el sedimento (ADN) con etanol al 70%, se secó al aire y se volvió a suspender en un volumen adecuado al precipitado obtenido de tampón TE (tris HCL 10 mM ph 7,5, EDTA 0,1 mM).

Posteriormente se cuantificó el ADN mediante la lectura de absorbancia a 260 nm. Su pureza se estimó hallando el cociente ABs_{260}/Abs_{280} , si este era mayor de 1,8, la muestra se consideró adecuada. La cuantificación de ADN se cuantificó teniendo en cuenta que la unidad de D.O. se corresponde con 50 nanogramos/microlitro. Una vez cuantificado el ADN, se preparó una dilución de trabajo a una concentración de 50 nanogramos/microlitros. Se comprobó el estado y la cuantificación de ADN por electroforesis en agarosa al 0,8%.

3.3-6.3. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

Para el posterior análisis de mutaciones en BRCA1 es necesario amplificar el ADN correspondiente al mismo, esto se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El contenido de los 22 exones codificantes y de las regiones intrónicas adyacentes se amplificaron en 37 reacciones de PCR diferentes (debido a su gran tamaño, el exón 11 se dividió en varios fragmentos). Los Primers usados fueron los descritos en: Van Orsouw NJ et al ¹²⁵.

La reacción de PCR constó de una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos seguida de 35 ciclos de 95° durante 30 segundos, un paso de hibridación cuya temperatura dependió de la secuencia del fragmento a amplificar durante 30 segundos y 72° durante 1 minuto seguidos de un paso de elongación final a 72° durante 10 minutos. Para cada reacción de secuenciación se partió de 100 ng de ADN.

La amplificación correcta de los fragmentos se comprobó por electroforesis en un gel agarosa al 2%.

3.3-6.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

DESNATURALIZANTE DE ALTA RESOLUCIÓN

La técnica de DHPLC permite detectar alteraciones en la secuencia de ADN (cambios puntuales e inserciones o deleciones de unas pocas bases) debido al cambio de temperatura de desnaturalización que se produce en las moléculas de ADN homoduplex y heteroduplex que se separan por una cromatografía líquida de fase reversa a través de una matriz que utiliza el gradiente de concentración de acetanitrilo.

El producto obtenido de las PCR se utiliza directamente. A lo largo del proceso de la PCR se forman compuestos homoduplex y heteroduplex a partir de fragmentos amplificados de ADN con presencia de mutaciones o polimorfismos. Estos fragmentos al migrar a través de la columna de la DHPLC y debido a la temperatura y al acetanitrilo se desnaturalizan formándose estructuras “en horquilla” (combinan DNA separado y de doble cadena) que varía la retención en la columna. La presencia de heteroduplex desestabiliza la molécula de ADN haciendo que se desnaturalicen antes

que los homoduplex pudiéndose separar de estos. Es necesario analizar cada amplicón a diversas temperaturas para que todas las posibles mutaciones se puedan detectar. Para analizar BRCA1 fue necesario realizar 79 inyecciones en el DHPLC. (Figura 14).

Se utilizó una instrumentación automática tal y como se describe en Underhill et al ¹²⁶. A partir de 4 a 7 µl del producto de la PCR que contiene aproximadamente de 50 a 100 ng de DNA, se desnaturalizó a una temperatura de 95 C° durante tres minutos. Posteriormente y de forma gradual se realizó el descenso de temperatura en la muestra de 95C° a 65C° durante 30 minutos. Los productos fueron separados a una velocidad de flujo de 0,9 ml/min a través del gradiente lineal de acetonitrilo. La columna de fase móvil consistió en la mezcla de 0,1 M de acetato de trietilamina con (tampón A) o sin (tampón B) acetonitrilo al 25%.

Se trata de una técnica compleja y de difícil interpretación pero que alcanza el 100% de sensibilidad al utilizar cada fragmento de PCR frente a los diferentes gradientes de temperatura.

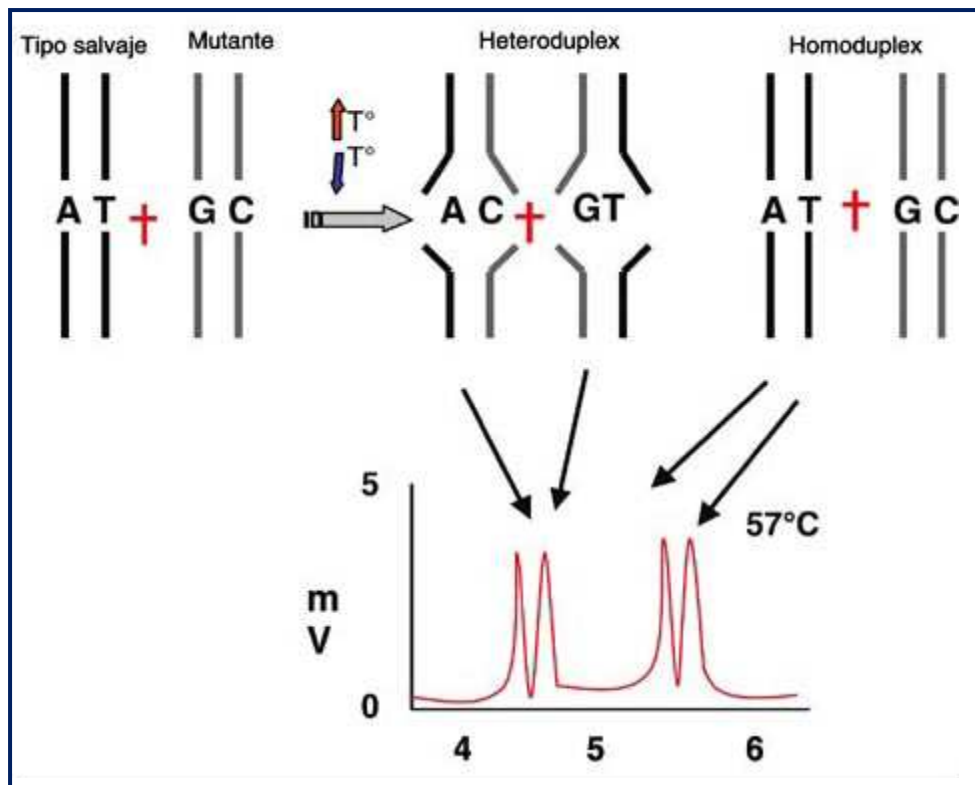


Figura 14: Representación gráfica del análisis de DHPLC. Dos (PCR amplificados) cadenas de ADN que difieren en un único nucleótido son desnaturalizadas y aneladas, formando heteroduplex, el cual puede ser distinguido de un homoduplex mediante HPLC. Adaptado de www.transgenomic.com¹²⁷.

3.3-6.5. SECUENCIACIÓN

De aquellas muestras en las que se detectó un patrón de cromatografía alterado se realizó la secuenciación del fragmento en las dos direcciones para confirmar la presencia de mutaciones patógenas.

La secuenciación se llevó a cabo mediante el secuenciador (Megabace, Amershan-Pharmacia) del servicio de secuenciación de la universidad de Zaragoza.

El producto obtenido tras la realización de la PCR se mezcló con 100 microlitros de tampón purificador y 1 ml de resina. Se agitó y se dejó reposar un minuto. La mezcla se

pasó a través de la columna con ayuda de una jeringa. Se lavó la columna con 2 ml de isopropanol al 80% y se transfirió la columna a un tubo de 1,5 ml. Posteriormente se procedió a la centrifugación durante dos minutos a 10000 g. Se añadió 50 picolitros de TE a la columna para diluir el ADN y se dejó reposar un minuto de tiempo y tras transferir la columna a un tubo de 1,5 ml se centrifugó 20 segundos a 10000 g.

Se realizó la reacción de la secuenciación donde se mezcló 4 microlitros de compuesto formado por el tampón, Taq polimerasa y la mezcla de nucleótidos con 10 moles del primer y 5,5 microlitros del producto de la PCR amplificada.

La reacción de desnaturalización constó de una desnaturalización inicial a 94°C durante un tiempo de cinco minutos seguido de 25 ciclos de 94° durante 10 segundos, 60° si el primer usado incluía una cola de 40/50 GCs o 50° en caso de utilizar un primer sin colas de GCs durante 10 segundos, y 60° durante dos minutos y un paso final a 60° durante 7 minutos y por último a 4°C indefinidamente.

Los productos obtenidos una vez realizada la secuenciación se analizaron mediante electroforesis capilar a 15 KW, durante 36 minutos en un secuenciador automático ABI 310 (Applied Biosystems). Los resultados obtenidos se analizaron posteriormente mediante el programa sequencing Analysis.

3.3-6.6. MULTIPLEX LIGATION DEPENDENT PROBE

ANALYSIS

Para el estudio de presencia de grandes deleciones, duplicaciones o reordenamientos complejos del gen BRCA1 se utilizó la técnica de MLPA. Esta técnica se realizó en el

laboratorio de la unidad de análisis genéticos del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

El DNA de los pacientes (50-500 mg, 5 microl) y tres controles se desnaturalizaron 5 minutos a 98 C°, y se añadió 3 microl de la mezcla con la sonda. Se calentó a 95C° durante un minuto y se incubó a 60 C° durante toda la noche (16 horas). La ligación se realizó con la enzima termoestable Ligasa-65 (32 microl mezcla de Ligasa-65) durante 15 minutos a 54 C°. Tras la inactivación de la ligasa (5 minutos a 98 C°) los productos de ligación se amplificaron por PCR, mediante un oligonucleótido marcado con 6-FAM. La PCR consistió en 35 ciclos (30 segundos a 60 C° y 60 segundos a 72 C°). Preparándose una mezcla de 0,75 microl de los fragmentos resultantes, 0,5 microl de standard ROX GS-500, 0,75 microl de agua desionizada y 12 microl de formamida altamente desionizada y se incubó durante 2 minutos a 94 C°.

Tras enfriar a 4C° en hielo, la muestra se analizó en un secuenciador capilar ABI PRISM 310 mediante el software Genescan (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los tamaños de los picos específicos para cada exón se identificaron de acuerdo con su migración relativa a los del standard GS-500.

Los datos correspondientes al área se exportaron a una hoja de Excel (Microsoft, Rodmond, USA) y se calculó el área media de los tres controles para cada sonda. Se aplicó una normalización interna de la muestra y la media de los controles mediante el cociente entre cada área y todos los controles internos. Posteriormente se realizó una normalización externa que calculó el cociente entre la muestra normalizada y la media de los controles normalizados, la cual proporcionó la medida de la dosis génica (DQ)¹²⁸.

La DQ esperada para los pacientes no portadores fue de 1 y para los portadores de una delección/duplicación 0,5 y 1 respectivamente. Se consideró como en la literatura, que

una delección de dos o más exones contiguos representaba una verdadera delección y picos duplicados correspondientes a dos o más exones contiguos representaban una verdadera duplicación sin necesidad de estudios posteriores. Sin embargo cuando se trató de un solo exón deleccionado/duplicado fue necesario un estudio mutacional en el cDNA para verificar este resultado.

3.3-7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el estudio inferencial se realizó un análisis bivalente, realizando una serie de cruces entre las diferentes variables: Mutación BRCA1 e Historial familiar, Grado histológico, Edad al diagnóstico, Grupo de estadio tumoral, EGFR, Citoqueratina 5/6 y fenotipo basal.

Definición de las variables:

- Presencia de mutación BRCA1.
- Edad al diagnóstico (menor o mayor/igual a 35 años).
- Presencia o no de una historia familiar informativa.
- Grado histológico (bajo o moderado grado frente a alto grado).
- Estadio tumoral (estadio inicial I y II o avanzado III y IV).
- Expresión de EGFR.
- Expresión de Citoqueratina 5/6.
- Fenotipo basal.

Material y Métodos

Para dichas variables en estudio que tomaron valores cualitativos, se aplicó el test de Chi-cuadrado de Pearson, con la corrección de Yates o la Prueba exacta de Fisher si fuera necesario. El nivel de confianza escogido para los test fue del 95% ^{129 130 131}.

El software utilizado para la realización de este estudio, fue: PASW Statistic v.18.0.0 (SPSS Inc.)¹³².

4-RESULTADOS

Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar

4.1- PREVALENCIA DE MUTACIONES

GERMINALES BRCA1

4.1-1. MUTACIONES PATOGÉNICAS

Se detectaron 7 mutaciones patógenas del gen BRCA1 entre las 92 pacientes estudiadas, lo que supone un 7,6% del total. (Tabla 1).

N muestral	Numero de mutaciones patógenas identificadas	% mutacional
92	7	7,6

Tabla 1: Mutaciones patógenas BRCA1 identificadas.

El tipo de mutaciones encontradas fueron: dos deleciones, 2 insercciones, dos mutaciones missence y una mutación nosence. (Tabla 2). Todas estas mutaciones registradas están clasificadas como mutaciones patógenas en la base de datos BIC.

N	Mutación	Tipo de mutaciones
1	G4643A/ W1508X	Nosence
2	4286insAG;stop 1392	Insercción
3	C4966T/ A1616V	Missence
4	3019insCT	Inserccion
5	C5242A/ A1708E	Missence
6	3748 del TT;stop1217	Delección
7	3886 del CA;stop1264	Delección

Tabla 2: Mutación y tipo de mutación detectada.

4.1-2. VARIANTES SIN CLASIFICAR O DE SIGNIFICADO INCIERTO

Se detectaron 3 variantes sin clasificar de BRCA1 del total de la muestra, lo que supone un 3, 26%. (Tabla 3).

N muestral	Numero de variantes sin clasificar	% mutacional
92	3	3,26

Tabla 3: Número de variantes sin clasificar BRCA1 identificadas.

Las tres mutaciones detectadas fueron mutaciones missence o sin sentido. (Tabla 4).

N	Mutación	Tipo de mutaciones
1	G3238A/S1040N	Missence
2	G4251A/V1378I	Missence
3	A4158G/R1347G	Missence

Tabla 4: Variantes sin clasificar detectadas.

4.2- ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Las principales características muestrales de las pacientes recogidas en el estudio se detallan de la siguiente manera.

4.2-1. EDAD AL DIAGNÓSTICO

La mediana de edad de diagnóstico del cáncer de mama triple negativo entre las 92 pacientes reclutadas fue de 41 años, con un intervalo de 23 a 50 años. La moda fue de 47 años.

Resultados

La edad es una variable cualitativa que se convierte en una variable cuantitativa dicotómica, tomando como valores de referencia la edad inferior a 35 años o igual/superior a 35 años de edad.

Del computo total de pacientes (n=92), 19 presentaron una edad inferior a 35 años (20,65%) al diagnóstico y 73 (79,35%) igual o superior a los 35. (Tabla 5).

Edad	N= 92	%
< 35 años	19	20,65
≥ 35 años	73	79,35

Tabla 5: Edad de diagnóstico.

La población de pacientes mutadas (n=7), presentaron una edad inferior a 35 años en 2 pacientes (28,58%) y 5 (71,42%) igual o superior a 35 años. (Tabla 6).

Edad	N=7	%
< 35 años	2	28,58
≥ 35 años	5	71,42

Tabla 6: Edad al diagnóstico en pacientes con mutación germinal BRCA1.

Las variables de significado incierto (n=3) presentaron una edad de diagnóstico igual o superior a 35 años en la totalidad de los casos (100%).

En el subgrupo de 19 pacientes con edad inferior a 35 años, 2 presentaban mutación en BRCA1 (10,52%) y en el subgrupo de 73 de 35 años o más, 5 pacientes presentaron mutación en BRCA1 (6,84%). (Tabla 7).

Edad al diagnóstico	N=92	Mutación BRCA1 (N=7)	%
<35 años	19	2	10,52
≥ 35 años	73	5	6,84

Tabla 7: Mutación BRCA1 en los subgrupos de edad.

4.2-2. TIPO DE HISTORIA FAMILIAR

La historia familiar es una variable cualitativa dicotómica, siendo informativa o no informativa.

De las 92 pacientes, 54 de ellas presentaron una historia familiar informativa (58,69%) frente a 38 no informativa (41,31%). (Tabla 8).

Historia Familiar	N= 92	%
Informativa	54	58,69
No informativa	38	41,31

Tabla 8: Tipo de historia familiar.

Resultados

La población de pacientes mutadas (n=7), presentó una historia familiar no informativa en 5 (71,42) casos mientras que informativa en 2 (28,58%). (Tabla 9).

Historia Familiar	N= 7	%
Informativa	2	28,58
No informativa	5	71,42

Tabla 9: Tipo de historia familiar en pacientes con mutación germinal BRCA1.

Las variables de significado incierto (n=3) presentaron una historia familiar no informativa en 2 (66,6%) mientras en un caso fue informativa (33,3%).

De 38 pacientes con historia familiar no informativa, 5 presentaban mutación en BRCA1 (13,15%) y de 54 con historia familiar informativa, 2 (3,70%). (Tabla 10).

Historia Familiar	N=92	Mutación BRCA1 (N=7)	%
No Informativa	38	5	13,15
Informativa	54	2	3,70

Tabla 10: Mutación BRCA1 en los subgrupos de historia familiar.

4.2-3. ESTADIO TUMORAL

El estadio tumoral es una variable cuantitativa no dicotómica, que se transforma en dicotómica al agrupar los estadios en iniciales (estadio I y II) y localmente avanzado o metastásico (III-IV).

De 73 pacientes, 56 presentaron un diagnóstico precoz en estadios I y II (76,71%) frente a 17 avanzados en III y IV (23,29%). (Tabla 11).

Estadio	N=73	%
Inicial (I-II)	56	76,71
Avanzado (III-IV)	17	23,29

Tabla 11: Estadío tumoral al diagnóstico.

La población de pacientes mutadas en las que se conoció el estadio tumoral (n=5) reveló 3 estadio localmente avanzado/metastásico (60%) y 2 iniciales (40%). (Tabla 12).

Estadio	N=5	%
Inicial (I-II)	2	40
Avanzado (III-IV)	3	60

Tabla 12: Estadío tumoral al diagnóstico en pacientes con mutación germinal BRCA1.

Resultados

La totalidad de la población que presentaron variables de significado incierto (n=3) presentaron un estadio inicial (100%).

En el subgrupo de 56 pacientes con estadio inicial (I-II), 2 presentaban mutación en BRCA1 (3,5%) y en el subgrupo de 17 con estadio avanzado (III-IV), 3 pacientes presentaron mutación en BRCA1 (17,64%). (Tabla 13).

Estadio tumoral	N=73	Mutación BRCA1 (N=5)	%
Inicial (I-II)	56	2	3,50
Avanzado (III-IV)	17	3	17,64

Tabla 13: Mutación BRCA1 en los subgrupos estadio tumoral.

4.2-4. GRADO HISTOLÓGICO

El grado histológico es una variable cuantitativa, que se define como dicotómica al dividir en grado bajo/moderado o alto grado histológico.

De 48 pacientes, 7 presentaban un grado histológico bajo/moderado (14,54%) frente a 41 de alto grado (85,16%). (Tabla 14).

Grado Histológico	N=48	%
Bajo/Moderado	7	14,54
Alto	41	85,16

Tabla 14: Grado Histológico.

El grado histológico se recogió en 3 pacientes con presencia de mutación germinal BRCA1 de las 7 detectadas en la muestra, de las cuales 2 presentaron un alto grado histológico (66.66%) y 1 un grado histológico bajo/moderado (33,33%). (Tabla 15).

Grado Histológico	N=3	%
Bajo/Moderado	1	33,3
Alto	2	66,6

Tabla 15: Grado histológico en pacientes con mutación germinal BRCA1.

En el subgrupo de 7 pacientes con grado histológico bajo/moderado, 1 presentaba mutación en BRCA1 (14,28%) y en el subgrupo de 41 con grado histológico alto, 2 pacientes presentaron mutación en BRCA1 (4,87%). (Tabla 16).

Grado Histológico	N=48	Mutación BRCA1 (N=3)	%
Bajo/Moderado	7	1	14,28
Alto	41	2	4,87

Tabla 16: Mutación BRCA1 en los subgrupos grado histológico.

4.2-5. EGFR

La determinación de EGFR es una variable cualitativa dicotómica, presencia o ausencia de la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

De 59 pacientes, la determinación de EGFR fue positiva en 17 de ellos (28,81%) y negativa en 42 pacientes (71,19%). (Tabla 17).

EGFR	N=59	%
Positivo	17	28,81
Negativo	42	71,19

Tabla 17: Determinación de EGFR.

De la población de pacientes mutadas se obtuvo negatividad en los 3 casos en los que se realizó la determinación de EGFR (100%). (Tabla 18).

EGFR	N=3	%
Positivo	0	0
Negativo	3	100

Tabla 18: Determinación EGFR en pacientes con mutación germinal BRCA1.

En el subgrupo de 17 pacientes con EGFR positivo, 0 presentaban mutación en BRCA1 (0%) y en el subgrupo de 42 con EGFR negativo, 3 pacientes presentaron mutación en BRCA1 (7,14%). (Tabla 19).

EGFR	N=59	Mutación BRCA1 (N=3)	%
Positivo	17	0	0
Negativo	42	3	7,14

Tabla 19: Mutación BRCA1 en los subgrupos de EGFR.

4.2-6. CITOQUERATINA 5/6

La ausencia o presencia de positividad para la citoqueratina 5/6 es una variable cualitativa dicotómica.

De 68 pacientes, presentaron positividad para citoqueratina 5/6 41 (60,29%) y negatividad 27 (39,71%). (Tabla 20).

Citoqueratina 5/6	N=68	%
Positiva	41	60,29
Negativa	27	39,71

Tabla 20: Determinación de Citoqueratina 5/6.

Resultados

La determinación de la citoqueratina 5/6 en la población de pacientes con mutación germinal BRCA1 se consiguió determinar en 4 (n=4), con la expresión de la totalidad de los casos. (Tabla 21).

Citoqueratina 5/6	N=4	%
Positiva	4	100
Negativa	0	0

Tabla 21: Determinación de Citoqueratina 5/6 en pacientes con mutación germinal BRCA1.

En el subgrupo de 41 con citoqueratina 5/6 positiva, 4 presentaban mutación en BRCA1 (9,75%) y 27 en el subgrupo de citoqueratina 5/6 negativa, 0 pacientes presentaron mutación en BRCA1 (0%). (Tabla 22).

Citoqueratina 5/6	N=68	Mutación BRCA1 (N=4)	%
Positivo	41	4	9,75
Negativo	27	0	0

Tabla 22: Mutación BRCA1 en los subgrupos de citoqueratina 5/6.

4.2-7. FENOTIPO BASAL

La determinación de fenotipo basal es una variable cualitativa dicotómica, presencia o ausencia de expresión.

De 63 pacientes donde se determino el fenotipo basal, 46 lo presentaban (73,02%) y 17 no (26,98%). (Tabla 23).

Fenotipo basal	N=63	%
Expresión	46	73,02
Ausencia	17	26,98

Tabla 23: Expresión de fenotipo basal.

4 de las 7 pacientes con mutación germinal BRCA1 en las que se determino fenotipo basal lo expresaban (100%). (Tabla 24).

Fenotipo basal	N=4	%
Expresión	4	100
Ausencia	0	0

Tabla 24: Expresión de fenotipo basal en pacientes con mutación germinal BRCA1.

Resultados

En el subgrupo de 46 pacientes con positividad para epitelio basal, 4 presentaban mutación en BRCA1 (8,69%) y en el subgrupo de 17 con negatividad, 0 pacientes presentaron mutación en BRCA1 (0%). (Tabla 25).

Fenotipo Basal	N=63	Mutación BRCA1 (N=4)	%
Positivo	46	4	8,69
Negativo	17	0	0

Tabla 25: Mutación BRCA1 en los subgrupos de epitelio basal.

4.2-8. CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

Nº	Hospital	Edad	Bilateral	Otros Tumores	Histología	GH	Estadio	EGFR	Cit 5/6	Basal	Hª Familiar	Mutación
1	Clínico de Valencia	42	No	No	CDI	III	III	Negativo	Negativo	No	Informativa	No
2	Clínico de valencia	44	Si	No	CDI	-	-	Negativo	Negativo	No	Informativa	No
3	H.C.U. Lozano Blesa	44	No	No	CDI	II	III	Negativo	Negativo	No	No informativa	No
4	H.C.U. Lozano Blesa	48	No	No	CDI	III	I	Negativo	Negativo	No	Informativa	No
5	H.C.U. Lozano Blesa	47	No	No	CDI	III	II	Negativo	Negativo	No	Informativa	VSC
6	H.C.U. Lozano Blesa	40	No	No	CDI	-	II	Negativo	Negativo	No	Informativa	No
7	H.C.U. Lozano Blesa	39	Si	No	CDI	III	II	Negativo	Negativo	No	No informativa	No
8	H.C.U. Lozano Blesa	40	No	No	CDI	III	II	Negativo	Negativo	No	No informativa	No
9	H.C.U. Lozano Blesa	44	No	No	CDI	-	-	Negativo	Negativo	No	Informativa	No
10	H.C.U. Lozano Blesa	41	No	No	CDI	III	III	Negativo	Negativo	No	No informativa	No

11	Hospital Arnau de Vilanova	37	No	No	CDI	III	-	Negativo	Negativo	No	No informativa	No
12	Hospital de Getafe	46	No	No	CDI	I	I	Negativo	Negativo	No	No informativa	No
13	Hospital San Pau	50	No	No	CDI	-	-	Negativo	Negativo	No	Informativa	No
14	IOV	47	No	No	CDI	III	II	Negativo	Negativo	No	No informativa	No
15	Universitario 12 de Octubre	26	No	No	CDI	III	II	Negativo	Negativo	No	Informativa	No
16	Universitario 12 de Octubre	33	No	No	CDI	-	-	Negativo	Negativo	No	Informativa	No
17	Universitario 12 de Octubre	34	No	No	CDI	III	-	Negativo	Positivo	S	Informativa	No
18	Clínico de Valencia	47	No	No	CDI	II	I	Positivo	Positivo	Si	Informativa	No
19	Clínico de Valencia	39	No	No	CDI	-	-	Positivo	Positivo	Si	No informativa	No
20	Clínico de Valencia	36	No	No	CDI	III	III	Negativo	Positivo	Si	No informativa	No
21	Clínico de Valencia	32	No	No	CDI	-	II	Positivo	Positivo	Si	No informativa	No
22	Clínico de Valencia	40	No	No	CDI	III	II	Positivo	Positivo	Si	No informativa	No
23	Clínico de Valencia	49	No	No	CDI	III	-	Positivo	Positivo	Si	Informativa	No
24	Clínico de Valencia	49	No	No	CDI	I	I	-	Positivo	Si	Informativa	No
25	H.C.U. Lozano Blesa	42	No	No	CDI	III	I	Negativo	Positivo	Si	No informativa	No
26	H.C.U. Lozano Blesa	43	No	No	CDI	III	I	Positivo	Negativo	Si	No informativa	No

27	H.C.U. Lozano Blesa	47	No	No	CDI	III	III	Positivo	Negativo	Si	No informativa	No
28	H.C.U. Lozano Blesa	41	No	No	CDI	III	I	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
29	H.C.U. Lozano Blesa	45	Si	No	CDI	-	II	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
30	H.C.U. Lozano Blesa	42	Si	No	CDI	-	III	Negativo	Positivo	Si	No informativa	No
31	H.C.U. Lozano Blesa	42	No	No	CDI	III	II	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
32	H.C.U. Lozano Blesa	49	No	No	CDI	III	-	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
33	H.C.U. Lozano Blesa	42	No	No	CDI	III	II	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
34	H.C.U. Lozano Blesa	33	No	No	CDI	-	III	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
35	H.C.U. Lozano Blesa	50	No	No	CDI	III	I	Negativo	Positivo	Si	No informativa	No
36	H.C.U. Lozano Blesa	42	No	No	CDI	III	II	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
37	Hospital Arnau de Vilanova	36	No	No	CDI	III	I	Positivo	Positivo	Si	Informativa	No
38	Hospital Arnau de Vilanova	39	No	No	CDI	III	I	Positivo	Positivo	Si	No informativa	No
39	Hospital Arnau de Vilanova	45	No	No	CDI	III	I	Positivo	Positivo	Si	No informativa	No
40	Hospital San Pau	47	No	No	CDI	-	-	Positivo	Negativo	Si	No informativa	No
41	Hospital San Pau	50	No	No	CDI	-	-	Positivo	Negativo	Si	Informativa	No
42	Hospital San Pau	41	No	No	CDI	-	-	Negativo	Positivo	Si	No informativa	Patògena

43	Hospital San Pau	39	No	No	CDI	-	-	Positivo	Negativo	Si	Informativa	No
44	Hospital San Pau	43	No	No	CDI	-	-	Negativo	Positivo	Si	No informativa	No
45	Hospital San Pau	43	No	No	CDI	-	-	Negativo	Positivo	Si	Informativa	Patógena
46	Hospital San Pau	49	No	No	CDI	-	-	Positivo	Negativo	Si	Informativa	No
47	Hospital San Pau	44	No	No	CDI	-	-	Positivo	Positivo	Si	No informativa	No
48	Hospital San Pau	31	No	No	CDI	-	-	Negativo	Positivo	Si	No informativa	No
49	IOV	37	No	No	CDI	III	III	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
50	IOV	49	No	No	CDI	III	II	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
51	IOV	38	Si	No	CDI	III	II	Negativo	Positivo	Si	No informativa	Patógena
52	IOV	46	No	No	CDI	III	II	Positivo	Positivo	Si	No informativa	No
53	IOV	37	No	No	CDI	III	III	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
54	IOV	40	No	No	CDI	III	II	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
55	IOV	34	No	No	CDI	III	II	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
56	IOV	49	No	No	CDI	III	III	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
57	IOV	31	No	No	CDI	III	I	Negativo	Positivo	Si	Informativa	No
58	Universitario 12 de Octubre	42	No	No	CDI	III	II	Positivo	Positivo	Si	No informativa	No
59	Complejo asistencial de Burgos.	47	No	No	CDI	III	II	-	-	-	Informativa	No
60	H.C.U. Lozano Blesa	39	No	No	CDI	-	II	-	-	-	Informativa	No

61	H.C.U. Lozano Blesa	37	No	No	CDI	II	III	-	-	-	-	-	-	Informativa	Patògena
62	H.C.U. Lozano Blesa	47	No	Ca. de Cèrvix	CDI	II	I	Negativo	-	-	-	-	-	No informativa	No
63	H.C.U. Lozano Blesa	23	No	No	CDI	III	II	-	-	-	-	-	-	No informativa	Patògena
64	H.C.U. Lozano Blesa	44	No	No	CDI	III	II	-	-	-	-	-	-	Informativa	No
65	H.C.U. Lozano Blesa	47	No	No	CDI	-	I	-	-	-	-	-	-	Informativa	No
66	H.C.U. Lozano Blesa	37	No	No	CDI	II	II	-	-	-	-	-	-	Informativa	No
67	Hospital Arnau de Vilanova	38	No	No	CDI	-	-	-	-	-	-	-	-	Informativa	No
68	Hospital Arnau de Vilanova	35	No	No	CDI	-	II	-	-	-	-	-	-	No informativa	No
69	Hospital Vall d'Hebron	42	-	No	CDI	-	I	-	-	-	-	-	-	Informativa	No
70	Hospital Vall d'Hebron	36	-	No	CDI	-	IV	-	Negativo	-	-	-	-	Informativa	No
71	Hospital Vall d'Hebron	37	-	No	CDI	-	III	-	-	-	-	-	-	Informativa	No
72	Hospital Vall d'Hebron	34	-	No	CDI	-	II	-	-	-	-	-	-	Informativa	No
73	Hospital Vall d'Hebron	32	-	No	CDI	-	II	-	-	-	-	-	-	No informativa	No
74	Hospital Vall d'Hebron	38	-	No	CDI	-	I	-	-	-	-	-	-	Informativa	No
75	Hospital Vall d'Hebron	36	-	No	CDI	-	III	-	Positivo	-	-	-	Si	No informativa	No
76	Hospital Vall d'Hebron	41	-	No	CDI	-	II	-	-	-	-	-	-	Informativa	No

77	Hospital Vall d'Hebron	50	-	No	CDI	-	I	-	-	-	Informativa	No
78	Hospital Vall d'Hebron	35	-	No	CDI	-	II	-	Negativo	-	Informativa	No
79	Hospital Vall d'Hebron	37	-	No	CDI	-	II	-	-	-	No informativa	VUS
80	Hospital Vall d'Hebron	39	-	No	CDI	-	I	-	-	-	No informativa	VUS
81	Hospital Vall d'Hebron	30	-	No	CDI	-	III	-	Positivo	Si	No informativa	No
82	Hospital Vall d'Hebron	33	-	No	CDI	-	II	-	Negativo	-	Informativa	No
83	Hospital Vall d'Hebron	38	-	No	CDI	-	I	-	-	-	Informativa	No
84	Hospital Vall d'Hebron	34	-	No	CDI	-	I	-	-	-	Informativa	No
85	Hospital Vall d'Hebron	31	-	No	CDI	-	II	-	Positivo	Si	No informativa	No
86	Hospital Vall d'Hebron	31	-	No	CDI	-	III	-	-	-	No informativa	Patògena
87	Hospital Vall d'Hebron	37	-	No	CDI	-	II	-	-	-	Informativa	No
88	IOV	49	No	No	CDI	II	III	-	Positivo	Si	No informativa	Patògena
89	IOV	41	No	No	CDI	III	II	-	Positivo	Si	Informativa	No
90	IOV	47	No	No	CDI	III	I	-	Negativo	-	Informativa	No
91	IOV	43	No	No	CDI	-	II	-	Negativo	-	Informativa	No
92	IOV	35	No	No	CDI	-	II	Negativo	-	-	No informativa	No

4.2-9. CARACTERÍSTICAS DE LAS PACIENTES CON MUTACIÓN PATÓGENA BRCA1 Y VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO

n	Edad	Estadio	GH	Historia Familiar	Mutación Patógena	Tipo	EGFR	Cit 5/6	Epitelio basal
1	37	IIIB	-	Informativa	G4643A/ W1508X	Nosence	-	-	-
2	23	IIA	III	No Informativa	4286insAG;stop 1392	Insección	-	-	-
3	31	IIIB	-	No Informativa	C4966T/ A1616V	Missence	-	-	-
4	41	x	-	No Informativa	3019insCT	Insección	Negativo	Positiva	Positivo
5	43	x	-	Informativa	C5242A/ A1708E	Missence	Negativo	Positivo	Positivo
6	49	IIIA	II	No Informativa	3748 del TT;stop1217	Delección	-	Positivo	Positivo
7	38	IIA	III	No Informativa	3886 del CA;stop1264	Delección	Negativa	Positiva	Positiva

n	Edad	Estadio	GH	Historia Familiar	VUS	Tipo	EGFR	Cit 5/6	Epitelio Basal
1	47	IIA	III	Informativa	G3238A/S1040N	Missence	Negativo	Negativo	Negativo
2	37	IIA	-	No Informativa	G4251A/V1378I	Missence	-	-	-
3	39	I	-	No Informativa	A4158G/R1347G	Missence	-	-	-

4.3- ANÁLISIS INFERENCIAL

4.3-1. EDAD AL DIAGNÓSTICO

El estudio estadístico que comparó la presencia de mutación germinal BRCA1 y la edad al diagnóstico de cáncer de mama triple negativo, detectó un valor de $p= 0,631 (>0,05)$ en la prueba exacta de Fisher, por lo tanto se observó que no existe una asociación estadísticamente significativa entre estas dos variables. (Tabla 26).

Mutación BRCA1	Edad al diagnóstico			Significación Fisher
	Menor de 35 años	Mayor o igual de 35 años	Total	
Sí	2	5	7	0,631
	28,6%	71,4%	100,0%	
No	17	68	85	
	20,0%	80,0%	100,0%	
<u>Total</u>	19	73	92	

Tabla 26: Asociación estadística entre la mutación BRCA1 y la edad al diagnóstico.

4.3-2. HISTORIA FAMILIAR

Realizando la prueba exacta de Fisher se observa un valor $p= 0,121 (>0,05)$ lo que se traduce en que no existe una asociación estadísticamente significativa entre la variable historia familiar informativa y la determinación de la mutación BRCA1. (Tabla 27).

Mutación BRCA1	Historia familiar			Significación Fisher
	Informativa	No informativa	Total	
Sí	2	5	7	0,121
	28,6%	71,4%	100,0%	
No	52	33	85	
	61,2%	38,8%	100,0%	
<u>Total</u>	54	38	92	

Tabla 27: Asociación estadística entre mutación BRCA1 e historia familiar.

4.3-3. ESTADIO TUMORAL

Atendiendo al grupo de estadio tumoral al diagnóstico, se detecto un valor de $p= 0,079$ ($>0,05$), por lo tanto no se observo significación estadística entre las variables mutación BRCA1 y estadio tumoral. (Tabla 28).

Mutación BRCA1	Grupo de estadio			Significación Fisher
	Incluye I y II	Incluye III y IV	Total	
Sí	2	3	5	0,079
	40,0%	60,0%	100,0%	
No	54	14	68	
	79,4%	20,6%	100,0%	
<u>Total</u>	56	17	73	

Tabla 28: Asociación estadística entre mutación BRCA1 y estadio tumoral.

4.3-4. GRADO HISTOLÓGICO

Se halló un valor de $p = 0,384$ ($>0,05$) realizándose la prueba exacta de Fisher, con los que se deduce que no existe asociación estadísticamente significativa entre la variable presencia de mutación BRCA1 y grado histológico. (Tabla 29).

Mutación BRCA1	Grado histológico			Significación Fisher
	I y II	III	Total	
Sí	1	2	3	0,384
	33,3%	66,7%	100,0%	
No	6	39	45	
	13,3%	86,7%	100,0%	
<u>Total</u>	7	41	48	

Tabla 29: Asociación estadística entre mutación BRCA1 y Grado histológico.

4.3-5. EGFR

La presencia de EGFR frente a la mutación de BRCA1, halló un valor de $p = 0,550$ ($>0,05$) por la prueba de significación de Fisher por lo que no se detectó una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables. (Tabla 30).

Mutación BRCA1	EGFR			Significación Fisher
	Positivo	Negativo	Total	
Sí	-	3	3	0,550
	-	100,0%	100,0%	
No	17	39	56	
	30,4%	69,6%	100,0%	
<u>Total</u>	17	42	59	

Tabla 30: Asociación estadística entre mutación BRCA1 y determinación de EGFR.

4.3-6. CITOQUERATINA 5/6

La presencia de la citoqueratina 5/6 en la muestra en relación estadística frente a la mutación de BRCA1 detecta un valor de $p=0,146$ ($>0,05$), al realizar la prueba exacta de Fisher, por lo tanto no se encontró un valor estadísticamente significativo, sin asociación pues entre la variable mutación BRCA1 y citoqueratina 5/6. (Tabla 31).

Mutación BRCA1	Citoqueratina 5/6			Significación Fisher
	Positiva	Negativa	Total	
Sí	4	-	4	0,146
	100,0%	-	100,0%	
No	37	27	64	
	57,8%	42,2%	100,0%	
<u>Total</u>	41	27	68	

Tabla 31: Asociación estadística entre mutación BRCA1 y Citoqueratina 5/6.

4.3-7. FENOTIPO BASAL

Enfrentando las variables de fenotipo basal y mutación germinal patógena BRCA1, se observó un valor de $p = 0,567$ ($>0,05$) en la prueba exacta de Fisher, por lo tanto se observa que no existe asociación estadísticamente significativa entre estas dos variables. (Tabla 32).

Mutación		Fenotipo basal			Significación
BRCA1	Positivo	Negativo	Total	Fisher	
Sí	4	-	4	0,567	
	100,0%	-	100,0%		
No	42	17	59		
	71,2%	28,8%	100,0%		
<u>Total</u>	46	17	63		

Tabla 32: Asociación estadística entre mutación BRCA1 y fenotipo basal

5-DISCUSIÓN

Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar

Este estudio es el primero que se realiza en una población de mujeres españolas menores de 50 años de edad con cáncer de mama triple negativo y sin antecedentes familiares conocidos de cáncer de mama y/o cáncer de ovario.

La prevalencia de mutaciones BRCA1 encontradas en nuestro estudio fue del 7,3%. En 7 pacientes se detectó una mutación patogénica en BRCA1 de un total de 92 pacientes incluidas. Estos resultados justifican la realización del estudio de mutaciones germinales en BRCA1 en pacientes con cáncer de mama triple negativo menores de 50 años incluso en ausencia de historia familiar positiva. En el momento actual, la realización del estudio genético se realiza atendiendo a factores clínicos y familiares. La presencia de un cáncer de mama triple negativo aumentaría la probabilidad de detectar una mutación en BRCA1 y justificaría la realización del estudio en determinado tipo de pacientes en las que por los criterios habituales no serían candidatas.

Otros estudios realizados en pacientes con cáncer de mama con receptores hormonales negativos o triples negativos han reportado una prevalencia de mutaciones en BRCA1 algo superior a nuestro estudio. Esto se debe a diferentes criterios de selección de las pacientes incluidas en el estudio, como son la edad o los antecedentes familiares de cáncer de mama y/o ovario.

Liderau et al⁸⁹, estudian 70 pacientes con cáncer de mama menores de 35 años de edad. 14 presentaban una histología negativa para receptores de estrógenos, hallando una tasa de mutación BRCA1 del 28,6%, en comparación con el 3,6% del registro general de pacientes (odds ratio (OR):10,8 IC del 95% 1,28 a 127,70, p= 0,007). Atendiendo a los criterios actuales, el hecho de presentar una edad menor de 35 años sería criterio para realizar el estudio de mutaciones germinales en BRCA1 y BRCA2. Curiosamente, solo

Discusión

una paciente con mutación germinal BRCA1 presentaba una historia familiar no positiva.

Chang et al⁹⁰, realizan un estudio prospectivo donde de 76 pacientes reclutadas, hallan 6 mutaciones patógenas en BRCA1 entre las 24 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo, menores de 45 años y con historia familiar de cáncer de mama y/o cáncer de ovario de riesgo, lo que supone una prevalencia de un 25%.

Ambos estudios, el de Liderau et al⁸⁹ y el de Chang et al⁹⁰, son los primeros en aportar datos que sugieren que el cáncer de mama que desarrollan las pacientes portadoras de mutación patogénica en BRCA1 se asocia a determinadas características histológicas. Cuando se publicaron estos trabajos en los años 2000 y 2001 el concepto de cáncer de mama triple negativo no era tan conocido como ahora. Es más, la realización del estudio de la sobreexpresión del oncogen Her2 no se realizaba sistemáticamente en todas las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama. Además, la inclusión retrospectiva de casos hacía que esto fuera menos probable. En cualquier caso, estos estudios aportan datos que indicaban que este tipo de cáncer suele presentar alto grado histológico y con frecuencia hay una ausencia de expresión de receptores hormonales.

Farshid et al⁸⁸ también demuestran que las características anatomopatológicas sin conocer la historia familiar o la información clínica de la paciente, permiten predecir el riesgo de asociación con una mutación germinal BRCA1 en una serie de tumores de mama, con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 86%.

Eisinger y colaboradores⁸⁶, concluyen en su estudio que en ausencia de historia familiar, la negatividad de los receptores de estrógenos, el grado histológico alto y la edad temprana de aparición del cáncer de mama son factores predictores de presencia de mutación en BRCA, en un análisis multivariante.

El estudio realizado por Young y colaboradores⁹³ es el que más similar al nuestro. La muestra incluyó 54 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo antes de los 40 años de edad, sin historia de cáncer de mama y/o cáncer de ovario entre familiares de primer grado. Los casos fueron identificados de las bases de datos de pacientes de dos hospitales (the Palmetto Health Richland/Baptist Hospitals, Columbia SC y the Cancer Genetics Clinic of Ohio State University, Columbus). Mediante secuenciación, se estudió la región codificante de BRCA1 y los exones 10 y 11 de BRCA2. Se hallaron cinco mutaciones patogénicas en el gen BRCA1 y una mutación en el gen BRCA2, lo que supone una prevalencia de mutaciones del 11%. Las mutaciones detectadas y las características de las pacientes vienen especificadas en la figura 15.

Gen	Exón	Mutación	Tipo de Mutación	de Edad	Etnia
BRCA1	11	1294del40	Delección	35	Caucásica
BRCA1	11	2800delA	Delección	32	Irlandesa/Escocesa
BRCA1	15	4731C>T	Nonsense	36	Caucásica
BRCA1	20	5382insC	Inserción	38	Caucásica
BRCA1	20	5382insC	Inserción	39	Caucásica
BRCA2	11	4936delAG	Delección	39	Afroamericana

Figura 15: Mutaciones BRCA1/2 detectadas entre 54 CMTN⁹³.

González-Angulo et al⁹⁶ detectan en 77 pacientes con cáncer de mama triple negativo no seleccionadas por edad ni historia familiar. Quince pacientes tenían mutación en BRCA (19.5%): 12 (15.6%) en BRCA1 (una de ellas somática, 11 germinales) y (3.9%) en BRCA2.

Evans et al⁹⁷ detectan en una población de 63 mujeres diagnosticadas antes de los 41 años de cáncer de mama triple negativo y sin historia familiar de cáncer de mama y/u ovario, 8 mutaciones patógenas en BRCA1 (prevalencia de 12,7%).

Discusión

En el análisis más amplio realizado de BRCA1 en cáncer de mama triple negativo, Robertson y colaboradores⁹⁹ estudiaron un total de 308 pacientes con cáncer de mama triple negativo. Esta muestra estaba constituida por dos series de pacientes bien diferenciadas: 159 no seleccionadas para estudio genético y 149 que se habían seleccionado para estudio de BRCA por la edad de presentación del cáncer de mama o por la historia familiar. La figura 16 recoge los resultados encontrados.

	Mutación BRCA1/ N serie no seleccionada (%)	Mutación BRCA1/ N serie seleccionada (%)	Mutaciones BRCA1/ Total (%)
Total	15/159 (9)	30/149 (20)	45/308 (15)
<50 años	11/58 (19)	26/111 (23%)	37/169 (22)
≥50 años	4/101 (4)	4/38 (11)	8/139 (6)

Figura 16: Mutaciones BRCA1 en 308 TNBC⁹⁹.

La prevalencia de mutaciones BRCA1 en individuos no seleccionados con cáncer de mama triple negativo es de 9%, aumentando hasta un 19% en las pacientes diagnosticadas a una edad inferior a 50 años. Este porcentaje resulta similar a la frecuencia de mutaciones germinales BRCA1 en individuos diagnosticados antes de los 50 años de edad, los cuales son seleccionados por sus antecedentes familiares de riesgo o por su edad temprana de diagnóstico de cáncer de mama⁹⁹.

Hartmann¹⁰⁰ evaluó una cohorte de 199 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama triple negativo. La prevalencia de mutaciones detectadas entre pacientes con cáncer de mama triple negativo fue significativamente más alto que la prevalencia entre pacientes no seleccionadas por las características anatomopatológicas de su cáncer de mama ($P < 0.0005$). En el grupo de 66 pacientes menores de 50 años, se detectaron 6 mutaciones (9.1%), casi dos veces lo esperado según las tablas de prevalencia de Myriad.

El estudio realizado por Mavaddat y colaboradores⁷⁵ pone de manifiesto la necesidad de incorporar el patrón fenotípico del cáncer de mama a los modelos actuales de predicción de mutación germinal BRCA1 y BRCA2. En este estudio incorporan al método BOADICEA la expresión de receptores de estrógenos, el estadio triple negativo y marcadores de fenotipo basal, demostrando que existe una mejora en la predicción de aquellas pacientes con mutación BRCA1, no siendo tan clara la ventaja en BRCA2.

A pesar del coste de la realización del estudio de mutaciones germinales en BRCA1, un estudio demuestra que realizar el test en mujeres menores de 50 años con cáncer de mama triple negativo resulta coste-efectivo y puede reducir el riesgo de aparición de cáncer de mama y ovario hasta un 40%¹³³.

Los tumores asociados a BRCA1 además de presentar en un elevado porcentaje un inmunofenotipo triple negativo, con frecuencia expresan marcadores del epitelio basal, como son la citoqueratina 5/6 y el EGFR.

Los estudios realizados por Foulkes et al⁸¹ y Lakhani et al⁸² confirmaron que la expresión de marcadores basales es frecuente en el cáncer de mama asociado a BRCA1. Pero la expresión de citoqueratina 5/6 y/o EGFR no es suficiente para distinguir aquellas pacientes con tumores triple negativo asociados a mutación en la línea germinal de BRCA1. (Collins et al)⁸⁷.

Discusión

Nuestro estudio incluye el mayor número de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo antes de la edad de 50 años y sin historia familiar de riesgo (ausencia de antecedentes de cáncer de mama y/o ovario entre familiares de primer y segundo grado). La prevalencia de mutaciones germinales en BRCA1 detectadas en este estudio (7.3%) es superior a la que presenta la misma cohorte de pacientes no seleccionadas por las características histopatológicas del cáncer de mama de laboratorios Myriad (cáncer de mama antes de los 50 años sin antecedentes familiares, prevalencia: 4.7%).

En este estudio el análisis univariante de los subgrupos en función de la edad, expresión de CK 5/6 o EGFR y el tipo de historia familiar no ha demostrado diferencias en cuanto a la probabilidad de detectar una mutación patogénica.

En cuanto a la edad, los dos subgrupos (menores de 35 años y mayor o igual a 35 años) se distribuyen de manera muy similar entre los pacientes con y sin mutaciones. Hay que resaltar que 73 de 92 pacientes tenían 35 años o más y que no habían sido candidatos a la realización del estudio de mutación germinal BRCA1 de no haber participado en este estudio.

Con respecto al fenotipo basal, no tener datos disponibles de 29 pacientes hace que sea difícil la valoración. Se analizaron sólo 63 casos, de los cuales, en 4 se había detectado mutación patogénica. En estos 4 casos portadoras de mutación, hubo expresión de CK 5/6 o de EGFR, por tanto todas ellas presentaban un fenotipo basal. Entre las 59 pacientes que no eran portadoras y se dispuso de muestra de tumor para el análisis de CK 5/6 y EGFR, la mayoría presentaban un fenotipo basal (42 pacientes, 71.2% vs 17 pacientes, 28.8%).

Esta es la primera serie que la prevalencia de mutaciones es analizada en función de la historia familiar (informativa/no informativa). A pesar de que no se obtuvieron diferencias significativas, la mayoría de las pacientes con mutación (5 de 7, 71.4%) tenían una historia familiar no informativa. Por el contrario, la mayoría de las pacientes sin mutación patogénica tenían una historia familiar informativa (52 pacientes de 85, 61.2%). Aunque no las diferencias no sean estadísticamente significativas, estos datos sugieren que la presencia de historia familiar no informativa, aumentaría la probabilidad de detectar una mutación y podría incluso ser utilizado como criterio adicional para indicar la realización del test.

Las limitaciones de nuestro estudio son las siguientes:

1. Carácter retrospectivo del estudio.
2. Selección de casos desde unidades de consejo genético.
3. Estudio anatomopatológico de cáncer de mama triple negativo no centralizado.
4. No se reporta la realización de estudio de mutaciones germinales en BRCA2.
5. La sensibilidad de los métodos de estudio de mutaciones en BRCA1.

1. Carácter retrospectivo del estudio.

La selección retrospectiva de los casos determina que hayan sido elegidas para el estudio pacientes que han sobrevivido a su cáncer de mama, durante tiempo variable e indefinido. Esto implica que las pacientes participantes puedan tener mejor pronóstico que otras diagnosticadas en periodos de tiempo equivalente pero, que por haber fallecido no han tenido opción de participar en este estudio. Con respecto al pronóstico

del cáncer de mama asociado a BRCA1 existen datos en la literatura contradictorios, dado que los estudios realizados son retrospectivos y con un número poco amplio de pacientes. El estudio de Stoppa-Lyonnet et al ¹³⁴ y Foulkes et al ¹³⁵ encuentran diferencias significativas en cuanto a supervivencia, siendo peor en portadoras de la mutación BRCA con respecto a controles. Otros estudios como Johannsson et al ¹³⁶ y Rennert et al ¹³⁷ no encuentran diferencias entre ambos grupos y otros como el de Marcus et al ¹³⁸ encuentran una mayor supervivencia en las pacientes portadoras de la mutación. Existe un metaanálisis realizado por Lee et al ¹³⁹, el cual concluye que existe una diferencia significativa con respecto a una peor supervivencia global y peor supervivencia libre de progresión en las pacientes con cáncer de mama portadoras de mutación germinal BRCA1. Esta diferencia no se encontró en pacientes portadoras de mutación BRCA2.

2. Selección de casos desde unidades de consejo genético.

Los casos fueron derivados desde Unidades de Consejo Genético pertenecientes a la sección de Cáncer Hereditario de la Sociedad Española de Oncología Médica. Esto determina que a pesar de los criterios de inclusión estrictos, en estas pacientes se consideró en los centros en los que se les atendió su valoración por una Unidad de Consejo Genético. En este sentido, se hubiera evitado el sesgo de selección si se hubiera llevado a cabo un estudio de tipo poblacional.

3. Estudio anatomopatológico de cáncer de mama triple negativo no centralizado.

El diagnóstico de cáncer de mama triple negativo se realizó en cada uno de los hospitales de referencia que intervinieron en el estudio. No se realizó una determinación centralizada, lo que hubiera aportado mayor calidad al diagnóstico.

4. No se reporta la realización de estudio de mutaciones germinales en BRCA2.

En este estudio no se realizó la determinación de mutaciones germinales de BRCA2. Hartmann¹⁰⁰ detecta en su cohorte una prevalencia de mutaciones germinales en BRCA2 que es mayor de lo esperado. Young et al⁹³ identificaron una mutación patogénica en BRCA2 en su cohorte de 54 pacientes diagnosticadas antes de los 40 años y sin historia familiar de riesgo. En nuestra cohorte el estudio de mutaciones germinales debería ofrecerse a las pacientes menores de 30 años y a las que tengan una historia familiar no-informativa y no sean portadoras de mutación patogénica en BRCA1.

5. La sensibilidad de los métodos de estudio de mutaciones en BRCA1.

Las técnicas empleadas (DHLPA, secuenciación y MLPA) en el estudio de mutaciones germinales en BRCA1 proporcionan en conjunto una elevada sensibilidad (en torno al 99%), pero no es del 100%. En cualquier caso, esta limitación de la sensibilidad es asumida en el resto de trabajos publicados sobre cáncer de mama hereditario.

Se observaron 3 variantes de significado incierto de BRCA1, de las cuales desconocemos su valor patógeno. Existen diversos métodos que permiten determinar el carácter patógeno o no de estas variantes como son los estudios de cosegregación o estudios de funcionalidad de la proteína entre otros. Ninguno de estos métodos se aplicó en estas variantes detectadas por lo que no han sido reclasificadas.

6-CONCLUSIONES

Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar

1. La prevalencia de mutaciones germinales en BRCA1 en 92 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo antes de los 50 años y sin historia familiar de riesgo es de 7,3%.
2. A las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama triple negativo antes de los 50 años, incluso en ausencia de historia familiar de riesgo, se les debe ofrecer la realización de estudio de mutaciones germinales en BRCA1.
3. En la cohorte estudiada no existe una asociación entre las variables tipo de historia familiar y presencia de mutación germinal en BRCA1 estadísticamente significativa (Test de Fisher, $p= 0,121$). La prevalencia de mutaciones germinales en BRCA1 en el subgrupo de 38 pacientes con historia familiar no informativa fue de 13,15% y en el subgrupo de 54 con historia familiar informativa fue 3,70%.
4. En la cohorte estudiada no existe una asociación entre las variables edad al diagnóstico y presencia de mutación germinal en BRCA1 estadísticamente significativa (Test de Fisher, $p= 0,631$). La prevalencia de mutaciones germinales en BRCA1 en el subgrupo de 19 pacientes con edad inferior a 35 años fue de 10,52% y en el subgrupo de 73 de 35 años o más fue de 6,84%.
5. En la cohorte estudiada no existe una asociación entre las variables estadio tumoral y presencia de mutación germinal en BRCA1 estadísticamente significativa (Test de Fisher, $p= 0,079$). La prevalencia de mutaciones

Conclusiones

- germinales en BRCA1 en el subgrupo de 56 pacientes con estadio inicial (I-II) fue de 3,5% y en el subgrupo de 17 con estadio avanzado (III-IV) fue de 17,64%.
6. En la cohorte estudiada no existe una asociación entre las variables grado histológico y presencia de mutación germinal en BRCA1 estadísticamente significativa (Test de Fisher, $p= 0,384$). La prevalencia de mutaciones germinales en BRCA1 en el subgrupo de 7 pacientes con grado histológico bajo/moderado fue de 14,28% y en el subgrupo de 41 con grado histológico alto, fue de 4,8%.
 7. En la cohorte estudiada no existe una asociación entre las variables EGFR y presencia de mutación germinal en BRCA1 estadísticamente significativa (Test de Fisher, $p= 0,550$). La prevalencia de mutaciones germinales en BRCA1 en el subgrupo de 17 pacientes con EGFR positivo fue de 0% y en el subgrupo de 42 con EGFR negativo fue de 7,14%.
 8. En la cohorte estudiada no existe una asociación entre las variables citoqueratina 5/6 y presencia de mutación germinal en BRCA1 estadísticamente significativa (Test de Fisher, $p= 0,146$). La prevalencia de mutaciones germinales en BRCA1 en el subgrupo de 41 pacientes con citoqueratina 5/6 positiva fue 9,75% y en el subgrupo de 27 con citoqueratina 5/6 negativa fue de 0%.

9. En la cohorte estudiada no existe una asociación entre las variables fenotipo basal y presencia de mutación germinal en BRCA1 estadísticamente significativa (Test de Fisher, $p=0,767$). La prevalencia de mutaciones germinales en BRCA1 en el subgrupo de 46 pacientes con positividad para epitelio basal fue de 8,69% y en el subgrupo de 17 con negatividad fue de 0%.

7-BIBLIOGRAFÍA

Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar

¹ Siegel R. *Cancer Statistic, 2012. Cancer Journal for clinician. Vol 2012, Issue 1;10-29. Janury/February 2012.*

²Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L, Kunkler I. *The EUROCARE-4 working group. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCARE-4 data. LancetOncol. 2007 Sep;8(9):784-796.*

³ López- Abente G, Pollan M, Aragonés N, et al. *La situación del Cáncer en España. Madrid: Ministerio de Sanidad y consumo: 2005.*

⁴ López- Abente G, Pollan M, Aragonés N, et al. *Mortalidad por cáncer y otras cuasas en España. 2005. Area de epidemiología ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología- ISCIII 2006.*

⁵ Martín M, Llombart-Cussac A, Lluch A, Alba E, Munárriz B, Tusquets I, Barnadas A, Balil A, Dorta J, Picó C; Grupo GEICAM. *Epidemiological study of the GEICAM group about breast cáncer in Spain: El ALAMO Project. Med Clin (Barc). 2004 Jan 17;122(1):12-7. Spanish. Med Clin (Barc). 2004 Jan 17;122(1):12-7. Spanish.*

⁶Colditz GA, Baer HJ, Tamini RM. *Breast Cancer. En: Schottenfeld D, Fraumeni JF editors. Cancer Epidemiology and Prevention. 3ª edición. New York: Oxford University Press; 2006.p. 995-1013.*

⁷ Colditz GA, Baer HJ, Tamini RM. *Bresta cáncer. Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. Cancer Epidemiology and Prevention. 3º. Edición. New York. Oxford University Press,2006.p.995-1013.*

⁸ Chen, S.Parmigiani, G. (2007): *Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. J. ClinOncol 25, 1329-33.*

⁹ Milne, R.L., Osorio A.,Cajal, T.R.,Vega, A., Llord G., de la Hoya, M., Diez, O., Alonso, M.C., LazaroC.,Blanco, I.,Sánchez de Abajo, A., Caldes T., Blanco, A., Grana, B., Duran, M., Velasco, E., Chirivella, I., Cardenosa, E.E., Tejada, M.I., Beristain, E., Miramar, M.D., Calvo, M.T., Martínez, E., Guillen, C., Salazar, R., San Roman, C.,Antoniou, A.C., Urioste, M., and Benítez J. (2008): *The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. Clin Cancer Res 14, 2861-9.*

¹⁰ Key, T.J., Verkasalo P.K., and Banks, E. (2001): *Epidemiology of breast cancer. Lancet Oncol2, 133-40.*

¹¹ Malkin D, Li FP, Strong LC et al. *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcoma, and other neoplasms. Science 1990;250:1233-8.*

¹² Nelen MR, Van Staveren WC, Peeters EA et al. *Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. Hum Mol Genet 1997;6:1383-7.*

¹³ Pharoah, M.D., Antoniou, A., Bobrow, M., et al. *Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. Nat Genet. 2002 May;31(1):33-6.*

¹⁴ Douglas Hanahan. Robert A. Weinberg. *Cell, Volume 144, Issue 5, 646-674, 4 March 2011.*

¹⁵ Ehemann, C.R., Shaw, K.M., Reyerson, A.B., Miller, J.W., Ajani, U.A., and White, M.C. (2009): *The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. CancerEpidemiol Biomarkers Prev 18, 1763-9.*

¹⁶ Lobular neoplasia morphology, biological potential and management in core biopsies. O'Malley F.P., *Mod. Pathol.* 2010 May, 23 Suppl 2:514-25. Review.

¹⁷ Castells X, Sala M, Ascunce N et al. *Descripción del cribado del cáncer en España. Proyecto DESCRIC. Ministerio de Sanidad y Consumo (en prensa).*

¹⁸ Saslow D, Boetes C, Burke W, et al. American Cancer Society Guidelines for Breast Screening with MRI as an adjunct to mamography. *CA Cancer J Clin* 2007;57(2):75.

¹⁹ Hammon S, Keyhai-Rofagha S, O'Toole R. Statistical analysis of fine needle aspiration of the breast: a review of 678 cases plus 4265 cases from the literature. *Acta Cytol* 1987;31:276.

²⁰ Morrow M, Venta L, Stinson T, Bennett C. Prospective comparison of sterotactic core biopsy and surgical excision as diagnostic proceduces for breast patients. *Ann Surg* 2001;233(4):537.

²¹ Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th Edition. New York: Springer, 2010.

²² D'Eredita G., Giardina C., Martellotta M., et al. Prognostic factors in breast cancer: The predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer*, 2001; 37:591-6.

²³ Perou Ch., S.T., Elsen M., et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000. 406: p. 747-752.

²⁴ Van 'tVeer L.J., D.H., van de Vijver et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cáncer. *Nature* 2002. 415:p.530-536.

²⁵ Nielsen T., H.F.D., P.C., Jensen K., et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2004. 10:p. 5367-5374.

²⁶ Charafe- Jauffret E., G.C., Monville F et al., Gene expression profiling of breast cancer cell lines identifies potential news basal markers. *Oncogene*, 2006. 25: p 2273-2284.

-
- ²⁷ Livasy C.A., K.G., Nanda R., et al., Phenotypic evaluation of the basal like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathology*, 2006. 19:p. 530-536.
- ²⁸ Turner N., R.-F.J., Rusell et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal like breast cancer. *Oncogene*, 2007. 26: p. 2126-2132.
- ²⁹ Fisher B, Bauer M, Wickerham DL et al. Relation of the number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983;52:1551-1557.
- ³⁰ Fant JS, Grant MD, Knox SM et al. Preliminary outcome analysis in patients with breast cancer in a positive sentinel lymph node who declined axillary dissection *Ann Surg Oncol* 2003;10:126-130.
- ³¹ Rosen PP, Groshen S, Kinne DW et al. Factors influencing prognosis in node negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long term follow-up. *J Clin Oncol* 1993;11:2090-2100.
- ³² Mohammed RA, Martín SG, Gill MS et al. Improved methods of detection of lymphovascular invasion demonstrate that it is the predominant method of vascular invasion in breast cancer and as important clinical consequences. *Ann Surg Pathol* 2007; 31:1825-1833.
- ³³ Fisher B, Redmond C, Fisher ER et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node-negative breast cancer patients. Findings from National Surgical Adjuvant Breast Cancer and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988; 6:176-187.
- ³⁴ Lower EE, Glass EL, Bradley DA et al. Impact of metastatic estrogen receptor and progesterone receptor status on survival. *Breast Cancer Res Treat* 2005;90:65-70.

-
- ³⁵ *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-years survival: an overview of randomised trials. Lancet 2005;365:1687-1717.*
- ³⁶ *Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. Science 1987;235:177-182.*
- ³⁷ *Slamon DJ, Godolphin W, Jones SG et al. Studies of the Her2/neu proto-oncogen in human breast and ovarian cancer. Science 1989;244:707-712.*
- ³⁸ *Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch et al. Prognostic importance of c-erbB2 expression of breast cancer. International Breast Cancer Study Group. J. Clin Oncol 1992;10:1049-1056.*
- ³⁹ *Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32825. Breast 2008;17:323-34.*
- ⁴⁰ *Albain KS, Barlow WE, Shak S et al. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node positive, estrogen receptor positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomized trial. Lancet Oncol 2010;11(1):55-65.*
- ⁴¹ *Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA et al. Systematic population based assessment of cancer risk in first degree relatives of cancer probands. J Natl Cancer Inst 1994;86:1600-8.*
- ⁴² *Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast cancer and ovarian cancer. Cancer 1996;77(11):2318-2324.*
- ⁴³ *Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struwing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H,*

Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998 Mar;62(3):676-89.

⁴⁴ Spiegelman AD, Murday V, Phillips RK et al. Cancer and the Peutz-Jehgers Syndrome. *Gut* 1989;30:1588-1590.

⁴⁵ Johnson N, Fletcher O, Palles C et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet* 2007;16:1051-7.

⁴⁶ Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 2002;71:432-8.

⁴⁷ Ghousaini G, Pharoah PDP. Polygenic susceptibility to breast cancer: current state of the art. *Future Oncol* 2009;5:689-701.

⁴⁸ Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994;266:66-71.

⁴⁹ Easton D, Bishop D, Ford D et al. Breast cancer linkage consortium. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: Results from 214 families. *Am J Hum Genet* 1993;52:678-701.

⁵⁰ Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995;378:789-92.

⁵¹ Pluta RM, Golub RM (2011) JAMA patient page. BRCA genes and breast cancer. *JAMA* 305(21):224.

⁵² Huen MS, Sy SM, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:138-48.

⁵³ *Thorslund T, West SC. BRCA2: a universal recombinase regulator. Oncogene. 2007;26:7720-30.*

⁵⁴ *Elledge SJ, Amon A. The BRCA1 suppressor hypothesis: an explanation for the tissue-specific tumor development in BRCA1 patients. Cancer Cell 2002;1:129-32.*

⁵⁵ *BIC: <http://research.nhgri.nih.gov/bic>.*

⁵⁶ *Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S, Samson C, Leblanc JF, Belanger C, Dion F et al. Common origins of BRCA1 mutation in Canadian breast and ovarian cancer families. Nat Genet 1998; 8:392-8.*

⁵⁷ *Oddoux C, Struewing JP, Clayton CM, Neuhausen S, Brody LC, Kaback M, Haas B, Norton L, Borgen P, Jhanwar S, Goldgar D, Ostrer H and Offit K. The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. Nat Genet 1996;12:188-90.*

⁵⁸ *Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM et al. Breast cancer information Core (BIC) Steering Committee. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. Am J Hum Genet 2004;75:535-44.*

⁵⁹ *Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE (1994) Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet 343:692–695.*

⁶⁰ *Guillem JG, Wood WC, Moley JF, Berchunck A, Karlan BY, Mutch DG, Gagel RF, Weitzel J, Morrow M, Weber BL, Giardiello F, Rodriguez-Bigas MA, Church J, Gruber S, Offit K; ASCO; SSO. ASCO/SSO review of current role of risk-reducing surgery in common hereditary cancer syndromes. J. Clin Oncol 2006 Oct 1;24(28):4642-60.*

⁶¹ *Antoniou A, Pharoah PD, Narod S et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case. Series unselected for*

family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.*2003;72:1117-1130.

⁶² Thompson D, Easton DF. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers, *J Natl Cancer Inst.*2002;94:1358-1365.

⁶³ Cancer risk in BRCA2 mutation carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:1310-1316.

⁶⁴ Gerhardus A, Schleberger H, Schlegelberger B and Gadzicki D. Diagnostic accuracy of methods for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations: a systematic review. *Eur J Hum Genet* 2007;15:619-627.

⁶⁵ Tejada I, Martínez C. Técnicas de diagnóstico molecular. En: *Cáncer hereditario*, Madrid, Dispublic: 2006.

⁶⁶ Yoshikawa K, Honda K, Inamoto T, Shinohara H, Yamauchi A, Suga K, Okuyama T, Shimada T, Kodama H, Noguchi S, Gazdar AF, Yamaoka Y, Takahashi R. *Clin Cancer Res.* Reduction of BRCA1 protein expression in Japanese sporadic breast carcinomas and its frequent loss in BRCA1 associated cases. 1999 Jun;5(6):1249-61.

⁶⁷ Hoya MDI. Documento de consenso sobre cáncer de mama hereditario. *Documentos de consenso en cáncer hereditario.* Madrid: Dispublic, 2004:13-5.

⁶⁸ Eccles DM, Evans DG, Mackay J. Guidelines for a genetic risk based approach to advising women with a family history of breast cancer. UK Cancer Family Study Group (UKCFSG). *J Med Genet* 2000; 37:203-9.

⁶⁹ Guía clínica SEOM cáncer hereditario. *Clin Transl Oncol* (En prensa).

⁷⁰ Evans DG. *J Med Genet* 2005;41:474-80.

⁷¹ www.swed.edu/home_pages/cancergene

⁷² www.srl.cam.ac.uk./genepi/boadicea_home.html

⁷³ James PA, Doherty R, Harris M, Mukesh BN, Milner A, Young MA, Scott C. Optimal selection of individuals for BRCA mutation testing: a comparison of available methods. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 1;24(4):707-15.

⁷⁴ Weitzel JN et al. Limited family structure and BRCA gene mutation status in single cases of breast cancer. *JAMA*. 2007 Jun 20;297 (23):2587-95.

⁷⁵ Mavaddat N, Rebbeck TR, Lakhani SR, Easton DF and Antonis C Antoniou AC. Incorporating tumour pathology information into breast cancer risk prediction algorithm. *Breast cancer Research* 2010,12:R28.

⁷⁶ Lynch BJ, Holden JA, Buys SS, Neuhausen SL, Gaffney DK. Pathobiologic characteristics of hereditary breast cancer. *Hum Pathol*. 1998;29:1140-1144.

⁷⁷ Ford D et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1998 Mar;62(3):676-89.

⁷⁸ Palacios J et al. Phenotypic characterization of BRCA1 y BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. *Breast Cancer Res Treat*. 2005Mar;90(1):5-14.

⁷⁹ Eerola et al. Histopathological features of breast tumor in BRCA1, BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res* 2005;7(1):R93-100.

⁸⁰ Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Arun BK (2008) Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 26:4282–4288.

⁸¹ Foulkes WD et al. Germinale BRCA1 mutations and basal epithelial phenotype breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003 Oct 1;95(19):482-5.

⁸² Lakhani SR et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 2005 July; 11(14):5175-80.

⁸³ Foulkes WD et al. Estrogen receptor status in BRCA1 and BRCA2 related breast cancer: the influence of age and histological type. *Clin Cancer Res* 2004 Mar 15; 10(6):2029-34.

⁸⁴ Eerola HP, Heikkilä P, Tamminen A, Aittomäki K, Blomqvist C, Nevanlinna H. Relationship of patients' age to histopathological features of breast tumours in BRCA1 and BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res*. 2005;7(4):R465-9

⁸⁵ Vaziri SA, Krumroy LM, Elson P, Budd GT, Darlington G, Myles J, Tubbs RR, Casey G. Breast tumor immunophenotype of BRCA1-mutation carriers is influenced by age at diagnosis. *Clin Cancer Res*. 2001 Jul;7(7):1937-45.

⁸⁶ Eisinger F, Nogues C, Guinebretiere JM et al (1999) Novel indications for BRCA1 screening using individual clinical and morphological features. *Int J Cancer* 84(3):263–267.

-
- ⁸⁷ Collins LC, Martyniak A, Kandel MJ et al (2009) Basal cytokeratin and epidermal growth factor receptor expression are not predictive of BRCA1 mutation status in women with triple-negative breast cancers. *Am J Surg*.
- ⁸⁸ Farshid G, Balleine RL, Cummings M, Waring P (2006) Morphology of breast cancer as a means of triage of patients for BRCA1 genetic testing. *Am J Surg Pathol* 30(11):1357–1366
- ⁸⁹ Lidereau R, Eisinge , Champeme MH, Nogues C, Bieche I, Birnbaum D, Pallud C, Jacquemier J, Sobol H. Major improvement in the efficacy of BRCA1 mutation screening using morphoclinical features of breast cancer. *Cancer Res*. 2000 Mar 1;60(5):1206-10.
- ⁹⁰ Chang J, Hilsenbeck SG, Sng JH, Wong J, Ragu GC. Pathological features and BRCA1 mutation screening in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001 Jun;7(6):1739-1.
- ⁹¹ Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, Trudel M, Akslen LA. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Oct 1;95(19):1482-5.
- ⁹² Kadel MJ. Prevalence of BRCA1 mutations in triple negative breast cancer. *Proc Annual Meeting ASCO 2006*, Abs. 508.
- ⁹³ Young SR, Pilarski RT, Donenberg T, Shapiro C, Hammond LS, Miller J, Brooks KA, Cohen S, Tenenholz B, DeSai D, Zandvakili I, Royer R, Li S and Narod SA. The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 2009, 9:86.

⁹⁴ F. Fostira, M. Tsitlaidou, H. Gogas, M. Pertesi, D. Yannoukakos, E. Bournakis, V. Karavassilis, P. Skarlos, I. Konstantopoulou and G. Fountzilav. Prevalence of BRCA1 mutations among 284 women with triple negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2010 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 28, No 15_suppl (May 20 Supplement), 2010: 1511.

⁹⁵ C. Saura, G. Sánchez-Ollé, N. Bosch, N. Gadea, M. Masas, A. Tenes, S. Gutierrez-Enríquez, O. Díez, J. Baselga, J. Balmaña. High prevalence of BRCA1/2 germline mutations in female breast cancer patients with triple-negative phenotype. *J Clin Oncol* 28:15s, 2010 (suppl; abstr 1534).

⁹⁶ Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, Lanchbury JS, Stemke-Hale KA, Hennessy B, Arun BK, Hortobagyi GN, Do KA, Mills GB, Meric-Bernstam F. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:1082-9.

⁹⁷ Evans DG, Howell A, Ward D, Lalloo F, Jones JL, Eccles DM. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in triple negative breast cancer. *J Med Genet* 48:520-522.

⁹⁸ Comen E, Davids M, Kirchhoff T, Hudis C, Offit K, Robson M. Relative contributions of BRCA1 and BRCA2 mutations to "triple-negative" breast cancer in Ashkenazi Women. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Aug;129(1):185-90. Epub 2011 Mar 11.

⁹⁹ L Robertson, H Hanson, S Seal ET AL. BRCA1 testing should be offered to individuals with triple-negative breast cancer diagnosed below 50 year. *British Journal of Cancer* 106, 1234-1238.

¹⁰⁰ Anne-Renee Hartman; Rajesh R. Kaldate; Lisa M. Sailer; Lisa Painter; Charles E. Grier; Robbin R. Endsley; Marlana Griffin; Stephanie A. Hamilton; Cynthia A. Frye; Mark A. Silberman; Richard J. Wenstrup; and John F. Sandbach, *Prevalence of BRCA Mutations in an Unselected Population of Triple-Negative Breast Cancer*. *Cancer*. Volume 118, Issue 11, pages 2787–2795, 1 June 2012

¹⁰¹ *NCCN Guidelines Version 1.2011. Hereditary Breast and/or ovarian cancer. HBOC Syndrome management.*

¹⁰² Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ et al. *Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers*. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1633-1637.

¹⁰³ Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT et al. *Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group*. *J Clin Oncol.* 2004;22:1055-1062.

¹⁰⁴ Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME et al. *Risk reducing Salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation*. *N. Engl J Med.* 2002;346:1609-1615.

¹⁰⁵ Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL et al. *Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations*. *N Engl J Med.* 2002;346:1616-1622.

¹⁰⁶ Rebbeck TR, Kauff ND, Domchek SM. *Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers*. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:80-87.

¹⁰⁷ Kirk R (2010) *Surgical oncology: cancer risk reduction in BRCA mutation carriers*. *Nat Rev Clin Oncol* 7:609

¹⁰⁸ Pierce LJ, Phillips KA, Griffith KA et al. Local therapy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with operable breast cancer: comparison of breast conservation and mastectomy. *Breast Cancer Res Treat.* 2010.

¹⁰⁹ Pierce LJ, Levin AM, Rebbeck TR et al. Ten year multi-institutional results of breast-conserving surgery and radiotherapy in BRCA1/2-associated stage I/II breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:2437-2443.

¹¹⁰ Malone KE, Begg CB, Haile RW et al. Population-based study of the risk of second primary contralateral breast cancer associated with carrying a mutation in BRCA1 or BRCA2. *J Clin Oncol.* 2010;28:2404-2410.

¹¹¹ Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, et al. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2010; 28: 375-9.

¹¹² Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, et al. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5530-6.

¹¹³ Yang D, Khan S, Sun Y, et al. Association of BRCA1 and BRCA2 mutations with survival, chemotherapy sensitivity, and gene mutator phenotype in patients with ovarian cancer. *Jama* 2011; 306: 1557-65.

¹¹⁴ K. A. Gelmon, H. W. Hirte, A. Robidoux, K. S. Tonkin, M. Tischkowitz, K. Swenerton, D. Huntsman, J. Carmichael, E. Macpherson and A. M. Oza. Can we define tumors that will respond to PARP inhibitors? A phase II correlative study of olaparib in advanced serous ovarian cancer and triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 28 (15 Suppl.), a3002 (2010).

¹¹⁵ Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009; 361: 123-34.

¹¹⁶ Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 2010; 376: 235-4.

¹¹⁷ Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Arun BK (2008) Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 26:4282–428.

¹¹⁸ Jin Xu, Baosheng Wang , Yanjun Zhang, Ruihui Li, Yuehua Wang, Shaokun Zhang. Clinical implications for BRCA gene mutation in breast cancer. *Mol Biol Rep* (2012) 39:3097–3102

¹¹⁹ Eerola H, Heinonen M, Heikkila P, et al. Basal cytokeratins in breast tumors among BRCA1, BRCA2 and mutation negative breast cancer families. *Breast Cancer Res.*2008;10:R17.

¹²⁰ Lakhani SR, Van de Vijver MJ, Jacquemier J et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, Her2 and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol.*2002;20:2310-2318.

¹²¹ Lynch BJ, Holden JA, Buys SS et al. Pathobiologic characteristics of hereditary breast cancer. *Hum Pathol.*1998;29:1140-1144.

¹²² Laura C. Collins, Anthony Martyniak, Kandel MJ, Stadler ZK, Masciari S, Miron A, Richardson AL, Schnitt SJ and Garber JE. Basal Cytokeratin and epidermal growth factor receptor expression are not predictive of BRCA1 mutation Status in women with triple negative breast cancer.

¹²³ Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S, Samson C, Leblanc JF, Bélanger C, Dion F, Liu Q, Skolnick M, Goldgar D, Shattuck-Eidens D,

Labrie F, Narod SA (1994) Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet* 8(4):392–398.

¹²⁴ Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988;16:2115.

¹²⁵ Van Orsouw NJ et al. A highly accurate, low cost test for BRCA1 mutations. *J Med Genet* 1999; 36(19):747–53.

¹²⁶ Underhill, P.A., Jin, L., Lin, A.A., Mehdi, S.Q., Jenkins, T., Vollrath, D., Davis, R.W., Cavalli-Sforza, L.L. and Oefner, P.J. (1997) *Genome Res.*, 7, 996–1005.

¹²⁷ www.transgenomic.com.

¹²⁸ Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat* 22(6):428–433.

¹²⁹ Sydney Siegel. *Estadística no paramétrica*. Ed. Trillas, Tercera edición en español, junio 1990.

¹³⁰ George C. Canavos. *Probabilidad y Estadística, Aplicaciones y Métodos*. Ed. McGRAW-HILL, 1988.

¹³¹ Daniel Peña Sánchez de Rivera *Estadística, Modelos y Métodos 2. Modelos lineales y series temporales* (1989).

¹³² Dixon WJ, editor. *BMDP statistical software manual: versión dynamic release 7.0* (Vol. 1 y 2). Berkeley: University of California Press, 1992.

¹³³ Janice S. Kwon, Angelica M. Gutierrez- Barrera, Diana Young, Charlotte C. Sun, Molly S. Daniels, Karen H. Lu and Banu Arun. *Expanding the criteria for BRCA mutation testing in breast cancer survivors. J Clin Oncol* 28:4214-4220.

¹³⁴ Stoppa-Lyonnet D, Ansquer Y, Dreyfus H et al. *Familial invasive breast cancers: worse outcome related to BRCA1 mutations. J Clin Oncol.* 2000;18:4053-4059.

¹³⁵ Foulkes WD, Wong N, Brunnet JS, Narod SA. *BRCA mutations and survival in breast cancer. J Clin Oncol.* 1998;16:3206-3208.

¹³⁶ Johannson OT, Ranstam J, Borg A, Olsson H. *Survival of BRCA1 breast and ovarian cancer patients: a population based study from southern Sweden Sweden. J Clin Oncol* 1998;16:397-404.

¹³⁷ Rennert G, Bisland-Naggan S, Barnett- Griness O et al. *Clinical outcomes of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. N Engl J Med.* 2007;357:115-123.

¹³⁸ Marcus JN, Watson P, Page DL et al. *Hereditary breast cancer pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. Cancer.* 1996;77:697-709.

¹³⁹ Lee EH, Park SK, Park B et al. *Effect of BRCA1/2 mutation on short term and longterm breast cancer survival: a systematic review and metaanalysis. Breast Cancer Res Treat.*2010.

8-ANEXO

Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar

Anexo 1: Consentimiento Informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: ASOCIACIÓN ENTRE PRESENCIA DE MUTACIONES GERMINALES EN BRCA1 Y CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO DIAGNOSTICADO ANTES DE LOS 50 AÑOS

Yo, (Nombre y Apellidos).....he sido informado por el Dr.perteneiente al servicio de Oncología de los siguientes aspectos:

1º) La posibilidad de colaborar voluntariamente en un proyecto de investigación sobre determinación de mutaciones germinales en el gen BRCA1 y diagnóstico de cáncer de mama triple negativo antes de los 50 años.

2º) Para dicho fin, se precisa una muestra de tejido tumoral y la extracción de una muestra de sangre.

3º) Dicha prueba no entraña ningún riesgo para la salud, salvo los propios de una extracción sanguínea.

4º) Los datos obtenidos se podrán a la disposición de las personas en estudio, siempre y cuando así lo deseen.

5º) Si usted desea conocer el resultado del estudio, en caso de que se detectará mutación patógena en BRCA1, recibirá asesoramiento genético siendo informada del riesgo de cáncer existente, así como de las alternativas de prevención disponibles en la actualidad. Cuando la existencia de la mutación ha sido confirmada, debe saber de otros miembros de su familia pueden haberla heredado: de usted (en caso de descendientes) o de sus antepasados (en caso de otros familiares como tíos o primos). Los responsables del proyecto en ningún caso contactarán con ellos por propia iniciativa para advertirles de esta circunstancia, ya que esta información es estrictamente confidencial. Es decisión personal suya informar a dichos familiares con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cual es su riesgo personal con respecto a estos tumores.

6º) Se me asegura la confidencialidad de todos mis datos, tanto personales como del estudio que puedan ser utilizados sin mi consentimiento, según la ley de protección de datos LO15/99.

7º) La realización de este análisis se realizará en el hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. La muestra de sangre obtenida y la muestra tumoral serán conservadas por el servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Los datos obtenidos se conservarán de forma indefinida, existiendo posibilidad de cancelación pasados 5 años.

Declaro que todas mis dudas y preguntas han sido convenientemente aclaradas y que he comprendido toda la información que me ha proporcionado. Por ello en pleno uso de mis facultades mentales doy mi consentimiento para la realización de consejo genético y prevención por el Servicio de Oncología médica.

Y para que así conste firmo el siguiente original, en

Firma del paciente

Fecha:

Firma tutor (caso de menor o incapacitado legalmente)

Fecha

Firma médico

Fecha

REVOCACIÓN

En ejercicio de derecho que tengo de anular el consentimiento prestado manifiesto mi voluntad de revocarlo y solicito se proceda a la destrucción de las muestras sanguíneas extraídas.

Firma

Fecha

9-ARTÍCULO CIENTÍFICO

Asociación de mutaciones germinales en BRCA1 y cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años y sin historia familiar

ASSOCIATION OF BRCA1 GERMLINE MUTATIONS IN YOUNG

ONSET TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER (TNBC)

Raquel Andrés¹, Isabel Pajares¹, Judith Balmaña², Gemma Llorç³, Teresa Ramón y Cajal⁴, Isabel Chirivella⁵, Elena Aguirre⁶, Luis Robles⁷, Enrique Lastra⁸, Pedro Pérez-Segura⁹, Nina Bosch², Carmen Yagüe³, Enrique Lerma⁴, Javier Godino¹⁰, M^a Dolores Miramar¹¹, Manuel Moros¹, Pilar Astier¹², Berta Saez¹⁰, María Jesús Vidal¹³, Angels Arcusa³, Santiago Ramón y Cajal¹, María Teresa Calvo¹¹, Alejandro Tres¹.

1-Hospital Clínico Lozano Blesa de Zaragoza. 2-Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. 3-Instituto Oncológico del Vallés. 4-Hospital de la Santa Creu y San Pau de Barcelona. 5-Hospital Clínico de Valencia 6- Hospital Arnau de Vilanova de Lérida. 7- Hospital Universitário 12 de Octubre. 8- Hospital G. Yagüe de Burgos. 9- Hospital Clínico San Carlos de Madrid. 10- Aragon Health Science Institute. 11- Hospital Universitário Miguel Servet. 12- Centro de Salud San Pablo, Zaragoza. 13- Hospital Valle Hebron.

ABSTRACT

BACKGROUND: BRCA1-associated breast cancers have been associated to a triple negative phenotype. The prevalence of BRCA1 germline mutations in young onset TNBC based on informativeness of family history has not been reported.

PATIENTS AND METHODS: From January 2008 to May 2009 were collected blood and tumor samples from patients with TNBC younger than 50 years and without a family history of breast and ovarian cancer in first and second degree relatives. Analysis of BRCA1 germline mutations was made. Age at diagnosis and informativeness of family history (presence of female in first and second degree relatives alive until age 45)

was collected in all cases. Immunohistochemistry of basal-like features was performed centrally in all available tumors.

RESULTS: Seven pathogenic mutations were detected in 92 patients (7.6%), two of them in patients younger than 35 years (28.6%).(Fisher's exact test, $p=0.631$) Three non-classified variants were detected (3.2%).

Family history was informative in 2 patients with a pathogenic mutation (28.6%) and not informative in 5 (71.4%) (Fisher's exact test, $p=0.121$). Of the 7 patients with a pathogenic mutation, 4 had a basal-like phenotype.

CONCLUSION: Patients with apparently sporadic TNBC younger than 50 years and a non-informative family history are candidates for germline genetic testing of BRCA1.

INTRODUCTION

Between 3-5% of breast cancers and 10% of ovarian cancers currently diagnosed are associated with germline mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. After these genes were identified as highly susceptible to breast- and ovarian cancer in the 1990s, several clinical criteria to guide the recognition of candidate subjects for genetic studies have been reported. In general, the test is offered to individuals with a likelihood greater than 10% of having mutations. Unlike other syndromes, there are no international consensus criteria indicating the genetic test for hereditary breast ovarian cancer syndrome associated with BRCA1 and BRCA2. Nowadays, there are guidelines with similar criteria and mathematical models based on Bayes' theorem (BRCAPRO, BOADICEA) that are capable of estimating the likelihood of detecting a mutation (1,2). Both consider factors such as: age at diagnosis, bilateralism, presence of breast cancer in males and the

number of cases. Including pathology features of tumors would probably improve the predictability of clinical guidelines and predictive models.

BRCA1-associated breast cancers have some histopathological characteristics different from sporadic breast cancer. More often these tumors have a higher histological grade than sporadic breast cancer, have negative estrogen- and progesterone receptors (80-90%), and rarely amplify or overexpress HER2. Therefore, they are triple-negative phenotypes in up to 80-90% of cases and, in a high percentage, they present a basal phenotype (3-7). Moreover, the distinctive features of BRCA1-associated tumors appear when breast cancer is diagnosed before age 50. The tumor characteristics are not different from those of sporadic cancers in women over that age. Tumours from the older patients in BRCA1 families differed significantly only in grade from tumours in non-BRCA1/2 patients (8-10).

Several studies have shown a high prevalence of germline BRCA1 mutations among triple-negative breast cancer patients. Nevertheless, none of the studies has analyzed the prevalence of germline mutations among “sporadic” young onset TNBC based upon the informativeness of their family history. (11-13).

The goal of our study is to determine the prevalence of BRCA1 germline mutations in patients with no breast and ovarian cancer family history and diagnosed with triple-negative breast cancer before age 50 based upon the informativeness of their family history.

DESIGN

A descriptive study on the presence of germline BRCA1 mutations in women diagnosed with triple negative breast cancer before age 50 that do not have a family risk history was conducted (one or more first- or second-degree relative with breast- or ovarian

cancer). The association between BRCA1 mutation detection and the presence of basal phenotype, age, and family history type was determined by univariate analysis. This work has been approved by the Ethics Committee of Aragon (CEICA).

Elegibility criteria

Selected patients were females from the High Risk and Cancer Prevention Units belonging to the Hereditary Cancer Programme of the Spanish Medical Oncology Association. Patients had been diagnosed with triple negative breast cancer, which is defined by a lack of expression by immunohistochemistry of ER, PR and Her2. Fluorescent in situ hybridization (FISH) for Her-2 was performed for Her-2 IHC score of ++/+++. Patients were younger than 50 years and had no family history of breast and ovarian cancer among first-and second-degree relatives.

Patients signed an informed consent form in order to take part in the study.

A family tree was made for all patients collecting at least data about first- and second-degree relatives. Cases were separated into two groups: informative group (at least two 45-year old women or older from the same genealogic side, either paternal or maternal) or non-informative group, as defined Weitzel et al (14). The age at breast cancer diagnosis was collected from each patient.

BRCA1 genetic study

Genomic DNA was isolated from blood using standard procedures. Mutation analysis was performed using PCR, DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) and sequencing of all exons, as well as intron boundaries of the BRCA1 and BRCA2 genes, with primer pairs used previously described by Simard et al. (15). Sequencing was carried out using ABI PRISM di-Deoxy Terminator Cycle

sequencing kit on an ABI 310 Genetic Analyzer, (Applied Biosystems). All nucleotide numbers refer to the wild type cDNA sequence of BRCA1 (U14680) as reported in GenBank.

MLPA kits for BRCA1 (P003) and BRCA2 (P045) are commercially available from MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands. These two sets of probes allow a screening for deletions and duplications of all BRCA1 and BRCA2 exons, plus 1100delC CHEK2 mutation in two PCR reactions. MLPA was performed as described by the manufacturer.

Immunohistochemistry

Tumor sample was obtained in 63 cases. Immunohistochemistry for EGFR and CK5/6 was done on each set of 17 formalin-fixed, paraffin-embedded tissue slides using the standard streptavidin-biotin complex method with 3,3'-diaminobenzidine chromogen. EGFR staining was done using the EGFR pharmDx kit (DAKO) with an enzymatic antigen retrieval by proteinase K for 5 min. CK5/6 (Clone D5/16B4, Zymed Laboratories) antibody was used following the Ventana automated stainer mild CC1 protocol with 1:100 dilution. EGFR and CK5/6 stains were considered positive if any (weak or strong) cytoplasmic and/or membranous invasive carcinoma cell staining was observed (17).

Statistical analysis

The prevalence of pathogenic mutations detected in this patient cohort was determined. A univariate analysis was conducted for the following variables: basal phenotype, age younger than 35 years, and non-informative family history based on Pearson's chi-

square test with Yates' correction or Fisher's exact test, if necessary. A 95% confidence level was chosen for the tests.

RESULTS

Ninety-two women with triple-negative breast cancer were included. None of the patients had Ashkenazi Jewish ancestry.

The characteristics of the cases included in the study are specified in Table 1.

Table 1.

No. of patients	92
Family history	
Informative	54 (58.69%)
Non-informative	38 (41.31%)
Age at diagnosis	
Younger than 35 years	16 (17.39%)
Age 35 or older	76 (82.61%)
Basal phenotype	
Yes	4 (6.34%)
No	59 (93.65%)
Unknown	29

Seven pathogenic mutations were detected in 92 patients. Prevalence was: 7.6%. Three non-classified variants were detected (3.2%). The characteristics of the detected pathogenic mutations and non-classified variants are specified in Table 2.

Table.2

Patient	Pathogenic mutations	Type
1	G4643A/ W1508X	Nonsense
2	1389insAG;stop 1393	Insertion
3	C4966T/ A1616V	Missense
4	3019insCT	Insertion
5	C5242A/ A1708E	Missense
6	3748 of TT;stop1217	Deletion
7	3886 of CA;stop1264	Deletion
Patient	Non-classified variant	Type
8	G3238A/S1040N	Missense
9	G4251A/V1378I	Missense
10	A4158G/R1347G	Missense

Characteristics of pathogenic mutation carriers with respect to age at breast cancer diagnosis, type of family history, and presence or absence of a basal phenotype are described in Table 3.

Table 3.

Patient	Age	Basal phenotype	Family history
1	37	Unknown	Informative
2	23	Unknown	Non-informative
3	31	Unknown	Non-informative
4	41	Yes	Non-informative
5	43	Yes	Informative
6	49	Yes	Non-informative
7	38	Yes	Non-informative

Of the 7 pathogenic mutations detected, 2 patients were younger than 35 years (28.6%) and 5 were 35 or older (71.4%) (Fisher's exact test, $p=0.631$) (Table 4). Family history was informative in 2 patients with a pathogenic mutation (28.6%) and not informative in 5 (71.4%) (Fisher's exact test, $p=0.121$) (Table 5).

Immunohistochemical study of EGFR and CK 5/6 was performed in 63 patients Of the 7 patients with pathogenic mutations, four patients had a baseline phenotype, and three did not have the tumor sample available. (Table 6).

Table 4.

<i>BRCA1</i> <i>mutation</i>	<i>Age at diagnosis</i>			<i>P value</i>
	Younger than 35 years	Age 35 or older	<i>Total</i>	
Yes	2	5	7	0.631
	28.6%	71.4%	100.0%	
No	17	68	85	
	20.0%	80.0%	100.0%	
Total	19	73	92	

Table 5.

<i>BRCA1</i> <i>mutation</i>	<i>Family history</i>			<i>P value</i>
	Informative	Non-informative	<i>Total</i>	
Yes	2	5	7	0.121
	28.6%	71.4%	100.0%	
No	52	33	85	
	61.2%	38.8%	100.0%	
Total	54	38	92	

Table 6.

<i>BRCA1</i> <i>mutation</i>	<i>Basal-like epithelium</i>			<i>P value</i>
	Positive	Negative	Total	
Yes	4	-	4	0.567
	100.0%	-	100.0%	
No	42	17	59	
	71.2%	28.8%	100.0%	
Total	46	17	63	

DISCUSSION

Our study is conducted in a population of women younger than 50 years with triple-negative breast cancer and no known family history of breast and/or ovarian cancer. Unlike other studies, this is the first one that bears in mind the type of family history, informative or non-informative. The prevalence of BRCA1 mutations found in our study was 7.3%. Overall, 7 pathogenic mutations were detected in BRCA1 in 92 patients. These data suggest that triple-negative breast cancer in patients younger than 50 years old could be used to indicate a BRCA1 genetic test, even in the absence of other factors, as family history.

Other studies with similar characteristics report a somewhat higher prevalence. This is due to a different patient selection and to the fact that patients with a family history of breast and/or ovarian cancer were not excluded. Liderau and colleagues examine 70 patients with ER-negative and high-grade breast cancer who were diagnosed before age 35 and they find a 28.6% BRCA1 germline mutation rate compared with only 3.6% in their general tumor registry, odds ratio (OR): 10.8, 95% CI: 1.28–127.70, P = 0.007.

Interestingly, only one of the patients with a BRCA1 germline mutation had a significant family history (11).

Chang et al. detect 6 (25%) pathogenic mutations in 24 women under 45 years of age with ER-negative breast cancer and a family history of breast or ovarian cancer (12). Farshid et al. (18) also demonstrate that by using the standard morphologic criteria in absence of any knowledge of family history or clinical information, pathologists are able to predict the likelihood of association with a BRCA1 mutation in a series of breast cancers, with a sensitivity of 92% and a specificity of 86%. Eisinger et al. (19) report that in addition to ER negativity and high histological grade, early age of onset of breast cancer is the only predictive feature of BRCA1 carrier status in a multivariate analysis.

The study conducted by Young et al. is the most similar to ours. Fifty-four patients with triple negative breast cancer diagnosed at age 40 or earlier, with little or no family history, are studied. Six (11%) deleterious mutations are detected, five in BRCA1 and one in BRCA2 (13). In the largest analysis of BRCA1 in TN breast cancer, Robertson et al show that the frequency of BRCA1 mutations in unselected individuals with TN breast cancer is approximately 10%, increasing to 19% of individuals diagnosed below 50 years, that is similar to the frequency of BRCA1 mutations in individuals diagnosed before 50 years that were selected for inclusion because family history of BC and/or young age at diagnosis (20).

Hartmann evaluated a cohort of 199 women diagnosed with triple negative breast cancer. A general linear model analysis shows that the observed mutation rate among patients with triple-negative BC is significantly higher ($P < .0005$) than the expected rate among patients with BC unselected for pathology. Among 66 women without significant family history diagnosed before age 50, 6 mutations were detected

(prevalence 9.1%), almost twice the expected frequency according to Myriad prevalence tables (21).

Despite the cost of performing germinal mutation analysis, a study demonstrates that BRCA mutation testing for women with triple-negative BC who were younger than 50 years was cost-effective and could reduce subsequent BC and ovarian cancer risks by up to 40% (22).

BRCA1 associated tumours are characteristically not only triple negative but also frequently express one or more 'basal' markers (CK5/6, EGFR). The studies from Lahkani et al (23) and Foulkes et al (6) confirmed that expression of basal markers is frequent in BRCA1-related cancer, but the expression of basal cytokeratins and/or EGFR is not sufficient to distinguish which women with triple negative breast cancers are likely to harbor BRCA1 germline mutations (24).

Our study included the highest number of patients without family history and diagnosed of triple negative breast cancer before the age of 50.

Selection criteria were stricter, since patients with any — either first- or second- degree — family history of breast- or ovarian cancer were excluded. Even so, the pathogenic mutation rate detected in our study (7.3%) is higher than what would be expected for women with breast cancer detected before age 50. According to the Myriad prevalence tables, the prevalence rate in this population would be 4.7%. Despite the cohort size, the subgroup analysis based on age, family history type, and presence or absence of a baseline phenotype did not report any difference. With respect to the basal phenotype, not having data available from 29 patients makes it difficult to assess. Regarding age, the two sub-groups (younger than 35 and 35 or older) are distributed very similarly among patients with and without mutations. Should be noted that 73 of our 92 patients

had 35 years or more and they had not been candidates to realizing the study of BRCA1 germline mutations of not having taken part in this study and 5 pathogenic mutations would have not been detected. this is the first series that the prevalence of mutations analyzes depending on the information of the familiar history. even though significant differences were not detected, 5 out of the 7 identified mutations were in patients with non-informative family history (71.4%). Besides, among 54 women with informative family history, only 2 mutations were detected (28.6%).

Unlike other reports, we have not performed a BRCA2 genetic study. Hartman detected in his cohort a BRCA2 mutation prevalence that was higher than expected. Young et al identified 1 BRCA2 mutation in their cohort of 54 women aged <40 years with triple-negative BC without family history. In our cohort, a BRCA2 study should be offered to very young women (under 30 years of age) or to those with a non-informative family history and non-carriers of a BRCA1 mutation.

One limitation in our study is the retrospective inclusion of cases. A recent study did not find differences in terms of survival among patients with TNBC BRCA1 mutation carriers and no carriers. Nevertheless, a bias may have occurred by selecting patients who were survivors of breast cancer.

The data reported previously, and in our study, indicate that a triple negative phenotype in patients under age 50 should be a selection criterion to test for BRCA1 germline mutations even in the absence of other factors. The type of familiar history, non-informative, increases the probability of detecting a mutation.

REFERENCES

1. Mavaddat N, Rebbeck TR, Lakhani SR, et al. Incorporating tumour pathology information into breast cancer risk prediction algorithms. *Breast Cancer Res* 12(3):R28, 2010.
2. James PA, Doherty R, Harris M, Mukesh BN, Milner A, Young MA, Scott C. Optimal selection of individuals for BRCA mutation testing: a comparison of available methods. *J Clin Oncol* 24(4):707-15, 2006.
3. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 62(3):676-89, 1998.
4. Palacios J, Honrado E, Osorio A, et al. Phenotypic characterization of BRCA1 y BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. *Breast Cancer Res Treat* 90(1):5-14, 2005.
5. Eerola H, Heikkilä P, Tamminen A, et al. Histopathological features of breast tumor in BRCA1, BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res* 7(1):R93-100, 2005.
6. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, et al. Germinale BRCA1 mutations and basal epithelial phenotype breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95(19): 482-5, 2003.
7. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* (14)5175-80, 2005.
8. Foulkes WD, Metcalfe K, Sun P, et al. Estrogen receptor status in BRCA1 and BRCA2 related breast cancer: the influence of age, grade and histological type. *Clin Cancer Res* 10(6):2029-34, 2004.
9. Eerola H, Heikkilä P, Tamminen A, et al. Relationship of patients' age to histopathological features of breast tumours in BRCA1 and BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res* 7(4):R465-9, 2005.
10. Vaziri SA, Krumroy LM, Elson P, et al. Breast tumor immunophenotype of BRCA1-mutation carriers is influenced by age at diagnosis. *Clin Cancer Res* 7(7):1937-45, 2001.

11. Lidereau R, Eisinger F, Champeme MH, et al. Major improvement in the efficacy of BRCA1 mutation screening using morphoclinical features of breast cancer. *Cancer Res* 60(5):1206-10, 2000.
12. Chang J, Hilsenbeck SG, Sng JH, et al. Pathological features and BRCA1 mutation screening in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 7(6):1739-1, 2001.
13. Young SR, Pilarski RT, Donenberg T, et al. The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 19;9:86, 2009.
14. Weitzel JN, Lagos VI, Cullinane CA, et al. Limited family structure and BRCA gene mutation status in single cases of breast cancer. *JAMA* 297:2587-2595, 2007.
15. Simard J, Tonin P, Durocher F, et al. Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet* 8(4):392–398, 1994.
16. Taylor CF, Charlton RS, Burn J, et al. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat* 22(6):428–433, 2003.
17. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 20(9):2310-8, 2002.
18. Farshid G, Balleine RL, Cummings M, et al. Morphology of breast cancer as a means of triage of patients for BRCA1 genetic testing. *Am J Surg Pathol* 30(11):1357–1366, 2006. Eisinger F, Nogues C, Guinebretiere JM, et al. Novel indications for BRCA1 screening using individual clinical and morphological features. *Int J Cancer* 84(3):263–267, 1999.
19. Eisinger F, Nogues C, Guinebretiere JM, et al. Novel indications for BRCA1 screening using individual clinical and morphological features. *Int J Cancer* 84(3):263–267, 1999.

20. Robertson L, Hanson H, Seal S, et al. *BRCA1 testing should be offered to individuals with triple-negative breast cancer diagnosed below 50 year. Br J Cancer* 106, 1234-1238, 2012.
21. Hartman AR, Kaldate RR, Sailer LM, et al. *Prevalence of BRCA Mutations in an Unselected Population of Triple-Negative Breast Cancer. Cancer* 118(11):2787-95, 2012.
22. Kwon JS, Gutierrez-Barrera AM, Young D et al. *Expanding the criteria for BRCA mutation testing in breast cancer survivors. J Clin Oncol* 28(27):4214-20, 2010.
23. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. *Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. Clin Cancer Res* 11(14):5175–5180, 2005.
24. Collins LC, Martyniak A, Kandel MJ, et al. *Basal cytokeratin and epidermal growth factor receptor expression are not predictive of BRCA1 mutation status in women with triple-negative breast cancers. Am J Surg* 33(7):1093-7, 2009.
25. Lee E, McKean-Cowdin R, Ma H, Spicer DV et al. *Characteristics of triple-negative breast cancer in patients with a BRCA1 mutation: results from a population-based study of young women. J Clin Oncol* 29(33):4373-80, 2011.

