

BARRIDO MUTACIONAL PARCIAL DEL GEN BRCA1 EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA FAMILIAR

Karen Daniela Gómez Ortega

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: danielagomezortega@gmail.com

Guillermo Barreto Rodríguez

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: guillermo.barreto@correounivalle.edu.co

RESUMEN

El cáncer es considerado un problema de salud pública a escala mundial por ser la principal causa de muerte. El más frecuentemente diagnosticado en las mujeres es el carcinoma mamario. En Colombia su frecuencia ha ido aumentando durante los últimos cinco años, pasando de ser la tercera causa de muerte (después del cáncer de cuello uterino y de estómago) a ser la primera. La mayoría de cánceres de mama son de tipo esporádico; sin embargo existe una fuerte predisposición hereditaria para desarrollar la enfermedad, donde el 5-10 % de todos los casos de cáncer mamario se asocian con genes de susceptibilidad de herencia autosómica dominante, tales como BRCA1 y BRCA2. La contribución de mutaciones de línea germinal en el gen BRCA1 en Colombia es desconocida, por esta razón en el presente trabajo se analizaron mediante secuenciación directa los exones 20, 21 y 22 del gen BRCA1 en 90 familias provenientes de diferentes regiones de Colombia. No fueron observadas mutaciones o alteraciones de secuencia en estos tres exones en las 90 familias analizadas. Se sugiere hacer un barrido mediante secuenciación de la totalidad del gen BRCA1 y BRCA2 para tener una visión completa del estatus mutacional de las pacientes muestreadas.

Palabras clave: Diagnóstico molecular, población colombiana, predisposición genética al carcinoma mamario, secuenciación directa.

ABSTRACT

Cancer is a leading cause of death and also a worldwide problem public health. Breast cancer is most frequently diagnosed and the first cause of death in women. In Colombia it has been increased in the last five years, in the beginning was the third leading cause of death in women, after from cervical and stomach, to become in the first. Most of breast cancers are sporadic, nevertheless, there is a strong hereditary component to developing the disease, that 5 to 10 % of all of breast cancer are related with autosomal dominant inheritance susceptibility genes, such as BRCA1 and BRCA2. The contribution of germline mutations in the BRCA1 gene in Colombia is unknown, for that reason in this study were analyzed by direct sequencing the exons 20, 21 and 22 of the BRCA1 gene in 90 families from different regions in Colombia. No mutations or altered sequences were observed in the 90 families analyzed on all three exons. We suggest realizing a screening of the entire BRCA1 and BRCA2 genes for having a full view of the mutational status of the sampled patients.

Key words: Molecular diagnostics, colombian population, genetic predisposition to breast

INTRODUCCIÓN

Según la OMS (2014), el cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites. Es considerado un problema de salud pública a escala mundial por ser la principal causa de muerte, debido a que se le atribuyen 8,2 millones de defunciones ocurridas en 2012 y se prevé que el número de casos anuales de cáncer aumentará a 22 millones en las próximas dos décadas. Los que más muertes causan cada año son los cánceres de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. El cáncer de mama es diagnosticado más frecuentemente y es la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres, lo que representa el 23 % del total de casos y el 14 % de muertes por cáncer (Blay *et al.* 2013). La incidencia del cáncer de mama en la población asiática es en efecto 6 a 7 veces menor en comparación con la población occidental (Privat *et al.* 2009); población en la cual, las mujeres latinas y afroamericanas tienen el peor diagnóstico en comparación con otros grupos (Wu *et al.* 2013).

Para el año 2014 se estima que 232.670 nuevos casos de cáncer de mama invasivo hayan sido diagnosticados en mujeres estadounidenses, así como un estimado de 62.570 nuevos casos de cáncer de mama in situ. De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer de Seno (2014), se espera que fallezcan aproximadamente 40.000 mujeres de cáncer de mama; siendo superado solamente por el cáncer de pulmón, el cual representa más muertes por cáncer en las mujeres de Estados Unidos. En América Latina y el Caribe, durante el 2012, más de 408.000 mujeres fueron diagnosticadas de cáncer de mama, y 92.000 fallecieron a causa de esta enfermedad. La más alta incidencia de cáncer de mama en la región se registró en

Bahamas, seguida de Uruguay, y las mayores tasas de mortalidad se presentaron en Bahamas, Trinidad y Tobago y Uruguay. De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (2014), se estima que en el año 2030 se presentarán más de 596.000 nuevos casos y más de 142.100 muertes por cáncer de mama, cuyo incremento será casi el doble en América Latina y el Caribe en comparación con Norte América.

El cáncer de mama en Colombia ha ido aumentando durante los últimos cinco años. De ser la tercera causa de muerte por cáncer en mujeres, después del cáncer de cuello uterino y de estómago, paso a ser la primera. En Colombia se diagnostican al año 5.526 casos de cáncer de mama, ocurriendo al menos 2.253 fallecimientos; esto significa 15 diagnósticos y 6 muertes por día. El cáncer de mama es el tumor más frecuente en la población femenina, y en departamentos como Antioquia, Arauca, Atlántico, Bolívar y Valle, genera hasta el 22,3 % de las muertes por cáncer de acuerdo con el Atlas de Mortalidad por Cáncer (2013), citado por Cortés (2013). Una gran mayoría de los cánceres de mama son de tipo esporádico (Privat *et al.* 2009), no obstante, existe una predisposición hereditaria para desarrollar la enfermedad. Se estima que el 5-10 % de todos los casos de cáncer de mama, se asocian con genes de susceptibilidad con herencia autosómica dominante, tales como BRCA1 (“Breast Cancer 1”) y BRCA2 (“Breast Cancer 2”) (Delgado *et al.* 2011). Estos se caracterizan por una edad de aparición más temprana que la del cáncer esporádico, transmisión vertical, presentación bilateral o de múltiples cánceres primarios en un individuo y asociación familiar con otros cánceres, en particular el cáncer de ovario (Calderón & Gallón 2012).

El gen BRCA1 fue mapeado por Hall *et al.* (1990), quien estableció la configuración regional 17q21. Posteriormente fue determinada mediante clonación posicional la expresión del gen BRCA1, el cual está conformado por 24 exones, 22 de los cuales codifican una proteína de 1863 aminoácidos (Miki *et al.* 1994). La región codificante comienza en el exón 2, siendo el exón 11 el de mayor tamaño abarcando aproximadamente el 60 % de todo el gen. Este gen es responsable del 45 % de familias con múltiples casos de cáncer de mama, y de más del 90 % de casos de cáncer de mama y ovario; así de todas las mujeres en donde se han detectado mutaciones en este gen tienen entre un 60 % y 80 % de mayor riesgo de presentar este tipo de cáncer que aquellas que no lo tienen (Vidal 2008).

El gen BRCA1 posee un anillo N-terminal, que es un dominio globular de unión a zinc implicado en las vías de ubiquitinación. En el extremo C-terminal del gen BRCA1 se han identificado dos dominios globulares repetidos en tándem, denominados BRCT (Scully & Puget 2002). Los dominios BRCT están presentes en una variedad de proteínas implicadas en la respuesta al daño del ADN y en puntos de control del ciclo celular (Billack & Monteiro 2005). Estos dominios actúan como sitios de interacciones proteína-proteína e incluyen la ARN polimerasa II, P300, p53, CtIP, HDAC 1 y 2, BACH1, COBRA y otros (Palma *et al.* 2006). De los 24 exones que codifican para la proteína BRCA1, los últimos 4 corresponden a los dos dominios BRCT que esta presenta (Obregón 2004) es decir, que los exones 20, 21 y 22 evaluados en el presente estudio se encuentran en esta área. Además, es importante destacar que los dominios BRCT y anillo de Zinc, son las regiones más conservadas de la proteína. Sin embargo, mutaciones con sentido erróneo fueron mapeadas codificando marco abierto de lectura en estas regiones, sugiriendo que la función intacta de estos dominios es necesario

para la supresión tumoral (Scully & Puget 2002).

Mutaciones sin sentido localizadas en esta región, fueron descritas segregando con la enfermedad y tenían un efecto desestabilizador en el dominio BRCT. Según Vasickova *et al.* (2007) mutantes con deleciones genómicas en el exón 20, codificaron una proteína con pérdida de unión entre la región N-terminal y C-terminal de las repeticiones BRCT del BRCA1. Por otra parte, deleciones en el marco de lectura presentadas en los exones 21 y 22 resultaron en una proteína con pérdida de repetición en la región C-terminal del BRCT; y esta proteína no puede cumplir su función de supresión tumoral, puesto que la eliminación conduce a defectos en el plegado del BRCT. Lo anterior permite resaltar la importancia de los exones 20, 21 y 22, cuyos tamaños corresponden a 259, 161 y 203pb respectivamente (Barker *et al.* 2000), en el plegamiento del dominio, y en consecuencia su implicación con la aparición del cáncer de mama.

En Colombia es desconocida la contribución de mutaciones de línea germinal en los genes BRCA1 y BRCA2 susceptibles a cáncer de mama hereditario en la población. El primer estudio fue realizado en 53 familias con cáncer de mama y ovario provenientes de la región Central, Costa Pacífica y Caribe mediante una serie de técnicas, incluyendo DHPLC, SSCP, y PTT (Torres *et al.* 2007). Luego en 30 pacientes afectados con cáncer de mama de Bucaramanga, empleando PCR-mismatch, Sanabria *et al.* (2009) no detectó las mutaciones más frecuentes 185delAG y 5382insC. En 58 familias con cáncer de mama en el Suroccidente Colombiano, Cifuentes (2010) estudió el gen BRCA1 mediante técnica SSCP, encontrando diferentes alteraciones de secuencia en esta población. Cortes (2013) secuenció el exón 11 del gen BRCA1 en

53 familias con cáncer de mama y/u ovario familiar de las regiones Pacífico y Atlántico, detectando 14 alteraciones de secuencia de las cuales 3 fueron clasificadas como variantes probablemente patogénicas en la población de estudio.

Las mutaciones que causan cáncer de mama y ovario, y otras variantes se encuentran distribuidas a lo largo de las regiones codificantes y no codificantes del gen BRCA1 (Solano *et al.* 2012). Debido a que estas mutaciones suceden a todo lo largo de los genes, el método más confiable de detección se logra al secuenciar. La secuenciación del DNA puede definir la localización y la naturaleza de la mutación, presentando una tasa muy baja de falsos negativos (Calderón & Gallón 2012). Adicionalmente, la tecnología de secuenciación continua siendo un método estándar para evaluar el gen BRCA1 (Monaco *et al.* 2008). De esta manera, teniendo en cuenta que los reportes sobre la contribución de mutaciones en la línea germinal del gen BRCA1 en Colombia son escasos, y que determinar la existencia de susceptibilidad a desarrollar la neoplasia en la población puede realizarse mediante secuenciación directa; se ha propuesto como objetivo principal de este trabajo identificar las mutaciones presentes en los exones 20, 21 y 22 del gen BRCA1, que generen predisposición al desarrollo del cáncer de mama en una muestra poblacional colombiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio y consentimiento informado

Se contactaron 90 mujeres no emparentadas entre sí, de diferentes regiones de Colombia con antecedentes de cáncer de mama y/u ovario familiar; cada paciente debía cumplir con por lo menos uno de los siguientes criterios:

- Tener dos parientes en primer grado afectados con cáncer de mama y/u ovario, y al menos uno de ellos, diagnosticado antes de los 40 años de edad para cáncer de mama.
- Tener por lo menos 3 parientes en primer o segundo grado de la misma línea familiar, afectados con cáncer de mama y/u ovario.
- Tener por lo menos un caso de cáncer de mama y/u ovario diagnosticado antes de los 35 años, de preferencia bilateral.
- Tener diagnóstico de cáncer de mama y/u ovario antes de los 30 años.

El contacto con los pacientes se llevó a cabo con la colaboración del Registro Poblacional de Cáncer de Cali –RPCC–, Hospital Universitario del Valle, Fundación Fondo de Droga para el Cáncer (FUNCANCER), Hemato-Oncólogos (Cali), Unicáncer Palmira, Oncólogos de Occidente (Pereira), Mujeres por sus Senos (Cartagena) y La Liga Contra el Cáncer Cartagena. Esta investigación fue aprobada por el Comité Institucional de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle (Acta de aprobación No. 004 de 2006, Código interno 082). Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes y para cada paciente se llenó una historia clínica general. Todos los casos de cáncer de mama y ovario fueron verificados mediante el informe de patología.

Extracción de ADN

De cada paciente fue tomada una muestra de 5ml de sangre periférica, que fue almacenada en un tubo vacutainer EDTA a 4°C, para ser procesada posteriormente en las instalaciones del Laboratorio de Genética Molecular Humana, adscrito a la Sección Genética de la Universidad del Valle Sede Meléndez. El ADN se extrajo siguiendo el protocolo de Salting-out descrito por Miller *et al.*

(1988). El ADN extraído fue cuantificado empleando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thomas Scientific, USA). A partir del ADN stock se realizaron diluciones en Low TE, con una concentración final de 50ng/ μ l.

Amplificación mediante PCR de los Exones 20, 21 y 22 del gen BRCA1

El proceso de amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se realizó a cada uno de los pacientes empleando los cebadores reportados por Barker (2000). Para el exón 20 se amplificó usando el par de cebadores Forward (5'-ATATGACGTGTCTGCTCCAC-3') y Reverse (5'-AGTCTTACAAAATGAAGCGG-3'); para el exón 21 el par de cebadores Forward (5'-TTTCCTTCTCTCCATTCCCC -3') y Reverse (5'-TCCACTATGTAAGACAAAGGCT-3'); y para el exón 22 el par de cebadores Forward (5'-GGGTAGAGGGCCTGGGTT-3') y Reverse (5'-CCAGTCTTGCTCACAGGAC-3'). El coctel de PCR consistía en: 50ng de ADN, 5U de Taq, 20 μ M de cada uno de los dos cebadores correspondiente a cada exón, 2.5 μ M de dNTPs, 50mM de MgCl₂ y 1X de buffer, para un volumen final de 25 μ l por muestra, en la misma reacción. El programa de amplificación se realizó de acuerdo con los parámetros descritos por Barker (2000), con las siguientes modificaciones: los ciclos térmicos son iniciados 2 minutos a 94°C; seguido por 30 ciclos de 45 segundos a 93°C, 1 minuto a 61°C (T de hibridación), 1 minuto a 72°C y 5 minutos de extensión final a 72°C. La reacción se llevó a cabo en el equipo MultigeneII personal– modelo TC 020^a (Labnet International, USA).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La verificación de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida:bisacrilamida 29:1 al 8%, preparados en TBE1X, adicionando 5 μ l

de producto de PCR y 5 μ l de buffer ficoll 2X. La separación electroforética se realizó con una precorrida a 40 voltios durante 10 minutos y una corrida a 150 voltios durante 25 minutos. Una vez terminada la electroforesis, las muestras en el gel se fijaron y tiñeron con nitrato de plata de acuerdo a la metodología de Sanguinetti *et al.* (1994). La lectura de cada gel se realizó sobre un transiluminador donde se visualizaron las bandas correspondientes a los exones 20 (259pb), 21 (161pb) y 22 (203pb); las cuales fueron amplificadas y visualizadas de manera independiente, empleando como referencia los valores conocidos del marcador de peso molecular de 100pb Invitrogen (*Invitrogen Corp., USA*).

Purificación de ADN

La primera purificación de ADN fue realizada, siguiendo el protocolo de precipitación con etanol, de acuerdo a las especificaciones del *Kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA)*. Posteriormente, se suspendió el ADN, en agua-miliQ estéril y finalmente se cuantificó el ADN purificado, mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop 2000 (*Thomas Scientific, USA*).

Reacción de Secuencia

Luego de purificados y cuantificados los productos de PCR, se realizó una reacción de secuencia en dirección forward. En aquellos casos donde fuese observada una alteración en la secuencia de nucleótidos, comparada con la secuencia de referencia del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), se realizaba la reacción de secuencia en dirección reverse, para confirmar la presencia de la alteración. El coctel de PCR de secuencia consistía en: 2 μ l de buffer; 6,4 μ l de cebador; 0,7 μ l de *BigDye Terminator (Applied Biosystems, USA)*; 100ng de ADN según la concentración particular obtenida en la purificación, y agua-miliQ estéril para

un volumen final de 20 μ l. El programa de amplificación empleado en la PCR de secuencia constó de los siguientes ciclos térmicos: un ciclo inicial de 1 minuto a 96°C, seguido por 30 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C (T. de hibridación), 4 minutos a 60°C y un ciclo de extensión final a 18°C. La reacción se llevó a cabo en el equipo *Verity™ System (Applied Biosystems, USA)*.

Purificación y electroforesis capilar

Partiendo de los 20 μ l obtenidos en el procedimiento anterior, se purificaron los productos de PCR de secuenciación siguiendo las recomendaciones del *Kit BigDye Xterminator (Applied Biosystems, USA)*. Luego de realizar la purificación, las muestras se centrifugaron y se procedió a extraer 100 μ l del sobrenadante, que se dispensaron en la placa del analizador genético ABI 3130 (*Applied Biosystems, USA*). Las condiciones de electroforesis capilar consistieron en una inyección de 18 a 1200 segundos en un capilar de 36cm, usando 3130 POP7TM (*Applied Biosystems, USA*).

Análisis de datos.

Las secuencias de las muestras procesadas se examinaron con el objetivo de identificar la presencia o no de alteraciones, en cada una de las secuencias que generó el Analizador Genético ABI 3130 (*Applied Biosystems, USA*), mediante el software libre Chromas Pro versión 2.33; se les realizó el alineamiento de secuencias, usando el algoritmo BLAST con el objeto de comparar la secuencia que se obtuvo, con las secuencias de referencia del NCBI: NG_005095.2 (ADN) y U68041.1 (ARN), las cuales permitieron verificar la presencia de alteraciones en la secuencia del ADN, y en la secuencia primaria de la proteína, para cada paciente. Finalmente, se llevó a cabo un alineamiento generalizado de todas las secuencias obtenidas de los pacientes para cada uno de los exones (20, 21

y 22) usando el programa Geneious versión 7.0.5; empleando las secuencias de referencia mencionadas anteriormente, para visualizar y corroborar la presencia de variantes de secuencia.

RESULTADOS

Del total de las familias contactadas, 90 procedente de diferentes regiones fueron encuestadas y acordaron participar del estudio (Fig. 1), debido a que cumplían con los criterios de inclusión propuestos al presentar antecedentes de cáncer de mama y ovario familiar.

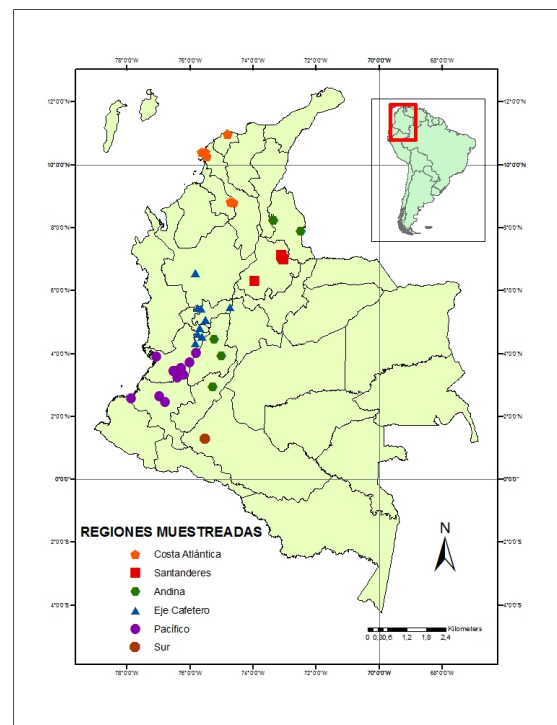


Figura 1. Mapa de Colombia ilustrando las regiones de la muestra poblacional evaluada.

La edad de diagnóstico de las mujeres incluidas en el estudio varió entre los 10 a los 65 años; donde la mayoría de ellas fueron diagnosticadas con la patología entre los 36 a 45 años y entre los 46 a 55 años (Fig. 2); la edad promedio de diagnóstico de los pacientes fue de 45 años.

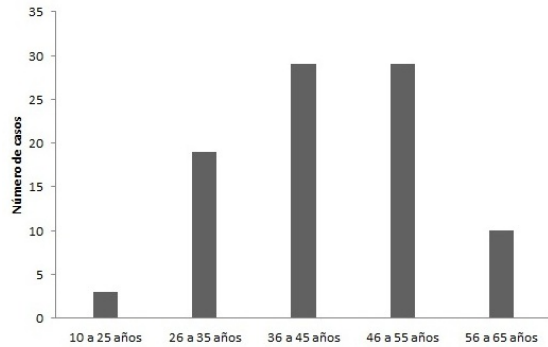


Figura 2. Asignación de pacientes con cáncer de mama de acuerdo a la edad de diagnóstico, en una muestra poblacional colombiana.

Adicionalmente, se identificó que la presencia de casos de cáncer de ovario fue menos representativa entre las familias encuestadas, respecto a los casos de cáncer de mama presentes en un 97 % de las familias (Fig. 3).

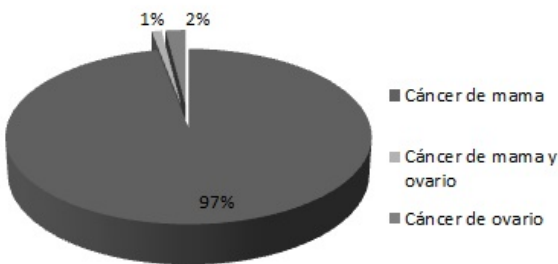


Figura 3. Distribución de casos de cáncer de mama y ovario en una muestra de familias Colombianas.

Por otra parte, se encontró que la mayoría de las pacientes muestreadas presentaron un cáncer de mama unilateral (96 %), siendo menor la frecuencia de la patología de tipo bilateral en un 4 % (Fig. 4).

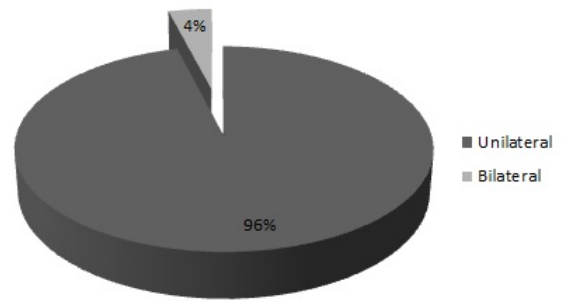


Figura 4. Tipos de tumor mamario presentes en la muestra poblacional evaluada.

Con respecto a las características histopatológicas, el tipo más reportado fue el carcinoma ductal infiltrante en el 84,5 % de los casos. El 4,5 % de las pacientes presentó carcinoma lobulillar infiltrante, seguido por carcinoma ductal in situ y otros con un 3,3 %; finalmente, el 2,2 % de los casos presentaron carcinoma canalicular y cáncer de ovario (Fig. 5).

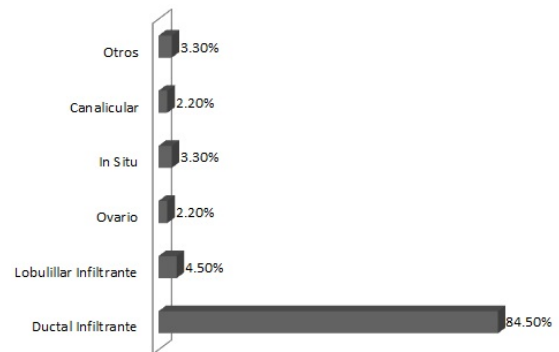


Figura 5. Distribución de tipos de cáncer de mama y ovario presentes en los casos muestreados.

De acuerdo con los resultados correspondientes al análisis molecular de los exones 20, 21 y 22 del gen BRCA; en todos los casos se obtuvieron amplicones de 259, 161 y 203 pares de bases respectivamente (Fig. 6).

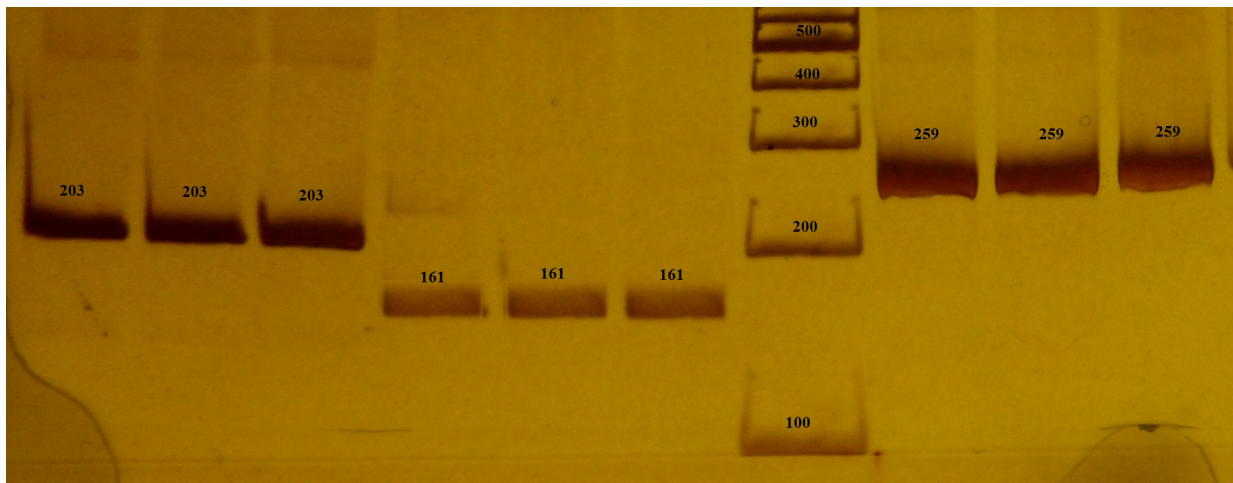


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (29:1) al 8 %, donde se visualizan los productos de PCR. De izquierda a derecha se muestran los amplicones correspondientes a los exones 22 (203pb), 21(161pb), marcador de peso molecular de 100pb, y exón 20 (259pb).

Respecto al análisis realizado mediante secuenciación directa, no se observaron alteraciones en las secuencias obtenidas, con relación a las secuencias de referencia, debido a que el alineamiento fue en un 100 % idéntico a las secuencias de referencia, en los tres exones evaluados (Figs. 7a, 7b y 7c).

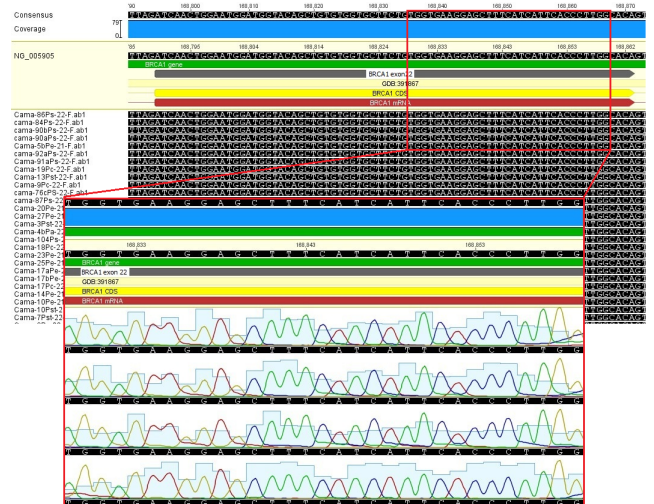
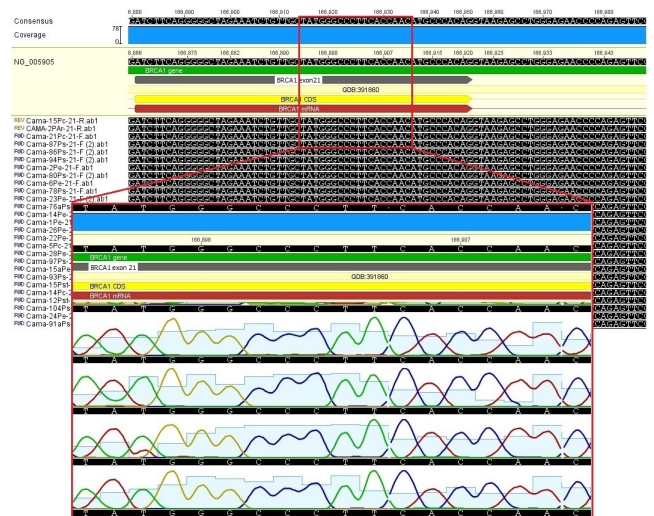
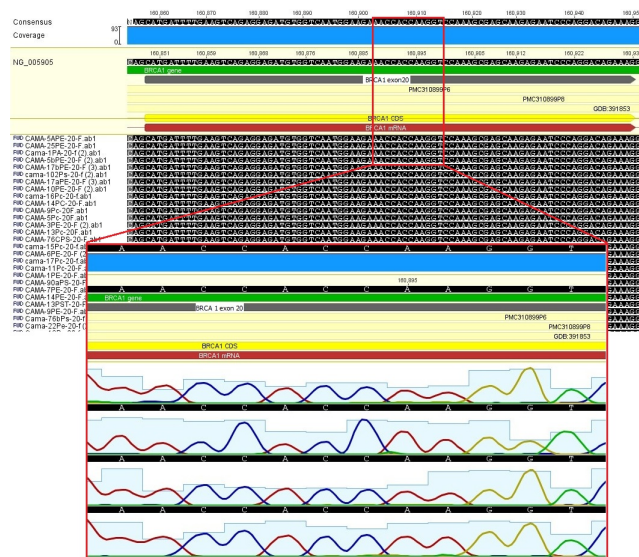


Figura 7. Alineamiento de las secuencias obtenido mediante programa Geneious versión 7.0.5 donde: a. Exón 20; b. Exón 21; c. Exón 22.

DISCUSIÓN

El Cáncer de mama es la forma más común de cáncer en las mujeres, y al menos una de cada 9-12 mujeres del primer mundo presentarán la patología (Lalloo & Evans 2012). Aunque la mayoría de los cánceres comunes son de tipo esporádico (80 %), el 5-10 % son hereditarios y surgen debido a mutaciones de la línea germinal; y el 10-15 % puede ser causada por la interacción de genes de baja penetrancia, las interacciones gen-ambiente, o ambos (Nagy *et al.* 2004).

Dentro de los factores con fuerte asociación al riesgo de cáncer de mama se encuentra la historia familiar, el cual puede estar mayormente asociado al presentar una aparición temprana de la enfermedad (Fodor *et al.* 1998, Lux *et al.* 2006, Saxena *et al.* 2006). Caso opuesto en la gran mayoría de cánceres de mama de tipo esporádico, el cual presenta una edad de inicio usualmente entre los 65 y 80 años, que desde un punto de vista genético no demuestran un patrón de herencia definido (Margarit 2008). Palma *et al.* (2006) encontraron que el riesgo de cáncer de mama en portadores de alteraciones polimórficas del gen BRCA1 aumentó en términos de menor edad al momento del diagnóstico. Razones por las cuales, se considera que la edad promedio de diagnóstico de las pacientes incluidas en el estudio, se encuentra dentro del rango aceptado.

En el análisis realizado a las pacientes muestreadas en este estudio, se encontró la presencia de casos de cáncer de ovario, y de cáncer de mama asociado a ovario; según la literatura, estos casos se encuentran en portadores de mutaciones del gen BRCA1,

confiriendo un riesgo promedio de desarrollar cáncer de mama en un 65 %, y en un 39 % presentar cáncer de ovario (Levanat *et al.* 2012, Lux *et al.* 2006).

De acuerdo con los tipos de cáncer de mama hallados en el estudio, se encontró que el carcinoma ductal infiltrante fue predominante en las pacientes evaluadas. Este resultado concuerda con las características histopatológicas registradas en 30 pacientes de Santander y Norte de Santander, donde el carcinoma ductal infiltrante fue el más frecuente (76,7 % de los casos), con respecto a las pacientes diagnosticadas con carcinoma ductal in situ (Sanabria *et al.* 2009). Adicionalmente, se encontraron otros tipos de cáncer de mama con igual proporción, según lo registrado por la National Breast Cancer Foundation (2011), donde el carcinoma lobulillar infiltrante y el carcinoma canalicular, se mostraron de manera menos frecuente en un 5 % y 1-2 % de los casos respectivamente.

Ewald *et al.* (2011) afirma que las mujeres con cáncer de mama bilateral tiene mayor probabilidad de portar mutaciones en BRCA1, de acuerdo con los resultados que obtuvieron en 137 pacientes no relacionados de Brasil, donde encontraron una alta frecuencia de la mutación fundadora c.5266dup en el exón 20 en pacientes con cáncer de mama bilateral, en comparación con los que tenían cáncer de mama unilateral. Lo anterior podría explicar la no presencia de variantes de secuencia en las pacientes analizadas en el presente estudio, donde solo el 4 % presentó cáncer de mama bilateral.

A la fecha más de 1337 diferentes mutaciones han sido reportadas en BRCA1 y las cuales han sido claramente asociadas con susceptibilidad a desarrollar la patología. Sin embargo es importante resaltar el tamaño del exón 11, que representa aproximadamente la mitad de la región codificante y sobre la cual

se desarrollan el 62,3 % de las mutaciones. Lo anterior presenta relación con la ausencia de mutaciones en el presente estudio; debido a que el reporte de mutaciones en los exones 20, 21 y 22 del BRCA1, no son tan frecuentes a nivel poblacional, teniendo en cuenta que la distribución de las mutaciones es baja, siendo respectivamente el 2,62 %, 1,35 % y 1,27 %; para cada uno de los exones; en comparación con el tamaño que representa el exón 11 (Cheung *et al.* 2007).

En las poblaciones han sido descritas mutaciones fundadoras, responsables de una proporción significativa de diagnósticos positivos para la patología dentro del gen BRCA 1; como es el caso de 185delAG y 5382insC que se encuentran en un 10 – 12 % de mujeres judías Ashkenazi diagnosticadas con cáncer de mama; la mutación BRCA1c.5266dup presente en la población eslava; en la población islandés y finlandés la mutación BRCA2999del5, y BRCA1delexon17 en la población alemana (Ewald *et al.* 2011); de las cuales, la mutación 5382insC se ha desarrollado en la región terminal del gen BRCA1. Estas mutaciones fundadoras han sido reportadas en Sudamérica, donde encontraron la presencia de la mutación 5382insC en el exón 20 del gen BRCA1, representando un 2,3 % de prevalencia en 612 individuos evaluados en la población de Brasil (Esteves *et al.* 2009). En Colombia se llevó a cabo un estudio, donde se evaluaron las mutaciones comunes en judíos Ashkenazi; sin embargo en las 30 pacientes evaluadas no se hallaron mutaciones (Sanabria *et al.* 2009). Lo anterior pudo deberse a que el origen de las mutaciones son Escandinavas o del Norte de Rusia, y posteriormente se fueron extendiendo a diversas poblaciones, entre ellas la Ashkenzi; y estas se encuentran presentes en Brasil y otras partes del continente debido a dos grandes olas migratorias en los siglos XVIII y XIX (Ewald *et al.* 2011, Gomes *et al.* 2007); mientras que la constitución de la

población colombiana, es muy heterogénea; puesto que se compone de una mezcla entre nativos americanos, europeos (principalmente provenientes de España), negros (traídos de África durante la trata de esclavos) y los descendientes de los cruces entre individuos de estos grupos étnicos (Rondón *et al.* 2009).

En cuanto al tipo de mutaciones, se ha encontrado que existen algunas mutaciones compartidas a nivel mundial como es el caso de la mutación 5382insC encontrada en el exón 20, que ha sido reportada al Oeste de Estados Unidos, Grecia, Brasil, y Argentina (Fostira *et al.* 2012, Gomes *et al.* 2007, Koumpis *et al.* 2011, Lourenço *et al.* 2004, Sinilnikova *et al.* 2006, Solano *et al.* 2012). Sin embargo también existe una proporción de mutaciones propias, donde se reportaron para el exón 20 las mutaciones 5324A>G; 5332G>A en la población Iraní; y la mutación 5331G>A en la población griega (Keshavarzi *et al.* 2012, Koumpis *et al.* 2011). Para el exón 21 se registraron las mutaciones 5438insC, 5447insC, y una delEx21 en el Oeste de Estados Unidos, Grecia y Nigeria respectivamente (Fackenthal *et al.* 2012, Fostira *et al.* 2012, Sinilnikova *et al.* 2006). En menor proporción han sido reportadas las mutaciones para el exón 22 donde en la población griega se presentó la mutación c.5406+5G>C y en Dinamarca la mutación 9049C>T (Fostira *et al.* 2012, Hansen *et al.* 2011).

Palma *et al.* (2006) asegura que es importante tener en cuenta la presencia de múltiples genes que pueden estar implicados en la predisposición familiar de cáncer de mama, y la que estos no estén relacionados con los genes BRCA1. Además de la existencia de estudios epidemiológicos que sugieren que gran parte de la susceptibilidad heredada para el cáncer de mama, puede ser consecuencia de la combinación de variantes genéticas que involucran múltiples loci. O bien podría existir algún otro gen de alta penetrancia,

combinaciones de genes de baja penetrancia, que en colaboración y junto con factores ambientales causen alto porcentaje de agregaciones familiares de cáncer de mama. Lo anterior podría indicar la ausencia de alteraciones de secuencia en los exones 20, 21 y 22 del gen BRCA1 evaluados en las pacientes, sumando a esto que la capacidad de detección de la secuenciación es máxima para pequeñas variaciones de la secuencia (Gibert *et al.* 2006).

Finalmente, del presente estudio se puede concluir que la ausencia de mutaciones o alteraciones de secuencia en las pacientes analizadas podría ser producto, inicialmente de la baja proporción de mutaciones que representan los exones 20, 21 y 22 (constituyendo el 5.24 % de la totalidad del gen) dentro del gen BRCA1; razón por la cual, si se espera encontrar mutaciones en la región C-terminal del gen, es necesario realizar el análisis en una muestra poblacional más grande que la del presente trabajo. De acuerdo con lo anterior, es posible afirmar que las familias de las pacientes analizadas, no presentaron mutaciones para los exones evaluados; sin embargo es necesario realizar la caracterización mutacional de la totalidad de los exones del gen BRCA1, para determinar la susceptibilidad al cáncer de mama familiar, debido a mutaciones en la

línea germinal del mismo; empleando como estrategia metodológica la secuenciación directa del ADN que es más sensible y precisa que cualquiera de los otros métodos de barrido para la detección de mutaciones, y permite tener una alta confiabilidad en los resultados obtenidos. .

AGRADECIMIENTOS

A todas las familias que participaron en el estudio, a las entidades e instituciones que facilitaron el contacto con los pacientes como Hospital Universitario del Valle, Registro Poblacional de Cáncer de Cali (RPCC), Fundación Fondo de Droga para el Cáncer (FUNCANCER), Hemato-Oncólogos (Cali), Unicáncer Palmira, Oncólogos de Occidente (Pereira), Mujeres por sus Senos (Cartagena) y La Liga Contra el Cáncer Cartagena.

Al profesor Guillermo Barreto por el conocimiento brindado, a Carolina Cortés, a los compañeros del proyecto de cáncer de mama, a todos los integrantes del grupo de investigación en Genética Molecular Humana de la Universidad del Valle, y a todos aquellos que me brindaron su ayuda y apoyo. Finalmente, gracias a la Universidad del Valle y a COLCIENCIAS (proyecto código 1106-519-29134) por el apoyo financiero.

LITERATURA CITADA

- American Cancer Society (2014), Breast Cancer Facts & Figures 2014, American Cancer Society Inc, Atlanta.
- Barker, D. (2000), "Direct genomic multiplex PCR for BRCA1 and application to mutation detection by single-strand conformation and heteroduplex analysis", *Human mutation*, Vol. 16 pp. 334–44.
- Billack, B. and Monteiro, A. (2005), "BRCA1 in breast and ovarian cancer predisposition", *Cancer letters* Vol.227 pp. 1-7.
- Blay, P., Santamaría, I., Pitiot, S., Luque, M., Alvarado, G., Lastra, A. and Balbín, M. (2013), "Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer families from Asturias (Northern Spain)", *BioMedCentral Cancer*, Vol. 13 pp. 243.

- Calderón, S. y Gallón, L. (2012), “Cáncer de mama asociado a mutaciones genéticas de los BRCA 1 y 2”, *Rev CES Medicina*, Vol. 26 No. 2, pp. 185-199.
- Cifuentes, L. F. (2010) *Identificación de mutaciones asociadas con riesgo hereditario de cáncer de mama y/u ovario en el sur-occidente colombiano*. Tesis de Doctorado, Universidad del Valle, Cali.
- Cortes, C. (2013) *Caracterización de mutaciones en el exón 11 del gen BRCA1 y asociación de las variantes XRCC3 T241M- RAD51 G135C en mujeres con cáncer de mama en Colombia*. Tesis de Maestría, Universidad del Valle, Cali.
- Cheung, L., Lee, Y., Wai, T., Ching, W., Khoo, U., Ng, M. and Wong, A. (2007), “CpG/CpNpG motifs in the coding region are preferred sites for mutagenesis in the breast cancer susceptibility genes”, *FEBS letters*, Vol. 581 No. 24, pp. 4668–74.
- Delgado, L., Fernández, G., Grotiuz, G., Cataldi, S., González, A., Lluveras, N., Heguaburu, M., Fresco, R., Lens, D., Sabini, G. and Muse, I. M. (2011), “BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Uruguayan breast and breast-ovarian cancer families. Identification of novel mutations and unclassified variants”, *Breast cancer research and treatment*, Vol. 128 No. 1, pp. 211–8. Esteves, V. F., Thuler, L., Amêndola, L., Koifman, R., Koifman, S., Frankel, P. and Vieira, R. (2009), “Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil”, *Brazilian journal of medical and biological research*, Vol. 42 No. 5, pp. 453–7.
- Ewald, I. P., Izetti, P., Vargas, F., Moreira, M., Moreira, A., Moreira-Filho, C. and Ashton-Prolla, P. (2011), “Prevalence of the BRCA1 founder mutation c.5266dupin Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome”, *Hereditary cancer in clinical practice*, Vol. 9 No. 1, pp. 9-12.
- Fackenthal, J., Zhang, J., Zhang, B., Zheng, Y., Hagos, F., Burrill, D. and Olopade, O. (2012), “High prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected Nigerian breast cancer patients”, *International journal of cancer*, Vol. 131 No.5, pp. 1114–23.
- Fodor, F., Weston, A., Bleiweiss, I., McCurdy, L., Walsh, M., Tartter, P. and Eng, C. (1998), “Frequency and carrier risk associated with common BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer patients”, *American journal of human genetics*, Vol. 63 No. 1, pp. 45–51.
- Fostira, F., Tsitlaidou, M., Papadimitriou, C., Pertesi, M., Timotheadou, E., Stavropoulou, A. and Fountzilias, G. (2012), “Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study”, *Breast cancer research and treatment*, Vol. 134 No. 1, pp. 353–62.
- Gibert, O. (2006), “Estudio de los genes BRCA1 y BRCA2 en 200 familias con cáncer de mama hereditario”, *Educación continuada en el laboratorio clínico*, Vol. 9, pp. 202–206.
- Gomes, M., Costa, M., Borojevic, R., Monteiro, A., Vieira, R., Koifman, S. and Narod, S. (2007), “Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil”, *Breast cancer research and treatment*, Vol. 103 No. 3, 349–53.
- Hall, J., Lee, M., Newman, B., Morrow, J., Anderson, L., Huey, B. and King, M. (1990), “Linkage of early- onset familial breast cancer to chromosome 17q21”, *Science*, Vol. 250, pp. 1684-1689.

- Hansen, T., Jønson, L., Steffensen, A., Andersen, M., Kjaergaard, S., Gerdes, A. and Nielsen, F. (2011), "Screening of 1331 Danish breast and/or ovarian cancer families identified 40 novel BRCA1 and BRCA2 mutations", *Familial cancer*, Vol. 10 No. 2, pp. 207–12.
- Keshavarzi, F., Javadi, G. and Zeinali, S. (2012), "BRCA1 and BRCA2 germline mutations in 85 Iranian breast cancer patients", *Familial cancer*, Vol. 11 No.1, pp. 57–67.
- Koumpis, C., Dimitrakakis, C., Antsaklis, A., Royer, R., Zhang, S., Narod, S. and Kotsopoulos, J. (2011), "Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from Greece", *Hereditary cancer in clinical practice*, Vol. 9 No. 1, pp. 10.
- Laloo, F. and Evans, D. (2012), "Familial breast cancer", *Clinical genetics*, Vol. 82 No. 2, pp. 105-14.
- Levanat, S., Musani, V., Cvok, M., Susac, I., Sabol, M., Ozretic, P. and Eljuga, D. (2012), "Three novel BRCA1/BRCA2 mutations in breast/ovarian cancer families in Croatia", *Gene*, Vol. 498 No. 2, pp. 169–76.
- Lourenço, J., Vargas, F., Bines, J., Santos, E., Lasmar, C., Costa, C. and Moreira, M. (2004), "BRCA1 mutations in Brazilian patients" *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 27 No. 4, pp. 500-504.
- Lux, M., Fasching, P. and Beckmann, M. (2006), "Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives", *Journal of molecular medicine*, Vol. 84 No. 1, pp. 16–28.
- Margarit, S. (2008), "Cáncer hereditario de mama", *Revista Chilena de Radiología*, Vol. 14, pp. 135–141.
- Miki, J., Swensen, D., Shattuck-Eidens, P., Futreal, K., Harshman, S., Tavtigian, Q., Liu, C., Cochran, L., Bennett, W., Ding, R., Bell, J., Rosenthal, C., Hussey, T., Tran, M. and McClure, C. (1994), "Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer", *Science*, Vol. 266, pp. 66-71.
- Miller, S., Dykes, D. and Polesky, H. (1988), "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells", *Nucleic acids Research*, Vol. 16, No. 3, pp. 1215.
- Monaco, A., Menolascina, F., Zhao, Y., Tommasi, S., Sabatino, M., Fasano, R. and Wang, E. (2008), "Sequencing-grade screening for BRCA1 variants by oligoarrays", *Journal of translational medicine*, Vol. 6, pp. 64.
- Nagy, R., Sweet, K. and Eng, C. (2004), "Highly penetrant hereditary cancer syndromes", *Oncogene*, Vol. 23 No. 38, pp. 6445–70.
- National Breast Cancer (2011), "Breast cancer types", disponible en: <http://www.nationalbreastcancer.org/types-of-breast-cancer> (acceso 6 Agosto 2014).
- Obregón, A. (2004) *Estructura y estabilidad de un dominio proteico BRCT*. Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Organización Mundial de la Salud (2014), "Cancer", disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (acceso 29 Agosto 2014).
- Organización Panamericana de la Salud (2014), *Cáncer de mama en las Americas*, Organización Panamericana de la Salud, Washington D.C.
- Palma, M., Ristori, E., Ricevuto, E., Giannini, G. and Gulino, A. (2006), "BRCA1 and BRCA2: the genetic testing and the current management options for mutation carriers", *Critical reviews in oncology/hematology*, Vol. 57 No. 1, pp. 1–23.

- Privat, M., Aubel, C., Arnould, S., Communal, Y., Ferrara, M. and Bignon, Y. J. (2009), “Breast cancer cell response to genistein is conditioned by BRCA1 mutations”, *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 379 No. 3, pp. 785–9.
- Rondón, F. (2009) *Estudio de la variabilidad genética en poblaciones humanas del centro y suroccidente colombiano mediante el uso de marcadores moleculares*, Tesis de Doctorado, Universidad del Valle, Cali.
- Sanabria, M., Muñoz, G. y Vargas, C. (2009), “Análisis de las mutaciones más frecuentes del gen BRCA1 en mujeres con cáncer de mama en Bucaramanga, Colombia”, *Biomédica* Vol. 29. No.1, pp. 61-72.
- Sanguinetti, C., Dias, E. and Simpson, A. (1994), “Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels”, *Biotechniques*, Vol. 17, pp. 915–919.
- Saxena, S., Chakraborty, A., Kaushal, M., Kotwal, S., Bhatnager, D., Mohil, R. S. and Szabo, C. (2006), “Contribution of germline BRCA1 and BRCA2 sequence alterations to breast cancer in Northern India”, *BMC medical genetics*, Vol. 7, pp. 75.
- Sinilnikova, O., Mazoyer, S., Bonnardel, C., Lynch, H., Narod, S. and Lenoir, G. (2006), “BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and ovarian cancer syndrome: reflection on the Creighton University historical series of high risk families”, *Familial cancer*, Vol. 5. No. 1, pp. 15–20.
- Solano, A., Aceto, G., Delettieres, D., Veschi, S., Neuman, M., Alonso, E. and Podestá, E. (2012), “BRCA1 and BRCA2 analysis of Argentinean breast/ovarian cancer patients selected for age and family history highlights a role for novel mutations of putative south-American origin”, *SpringerPlus*, Vol. 1, pp. 20.
- Scully, R. and Puget, N. (2002), “BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast cancer”, *Biochimie*, Vol. 84, pp. 95-102.
- Torres, D., Usman, M., Gil, F., Umana, A., Ramelli, G., Robledo, J., Tawil, M., Torregrosa, L., Briceno, I. and Hamann, U. (2006), “High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia” *Breast Cancer Research Treatment*, Vol. 103, pp. 225-32.
- Vasickova, P., Machackova, E., Lukesova, M., Damborsky, J., Horoky, O., Pavlu, H., Kuklova, J., Kosinova, V., Navratilova, M. and Foretova, L. (2007), “High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic”, *BMC Medical Genetics*, Vol. 8, pp. 32.
- Vidal, S. (2008), “Cáncer de mama hereditario: Identificación y elección de pacientes para estudio molecular de los genes BRCA”, *Cancerología*, Vol. 3, pp. 51-61.
- Wu, Y., Sarkissyan, M., Elshimali, Y. and Vadgama, J. V. (2013), “Triple Negative Breast Tumors in African-American and Hispanic/Latina Women Are High in CD44+, Low in CD24+, and Have Loss of PTEN”, *Plos one*, Vol. 8 No. 10, pp. e78259.