

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE LOS GENES BRCA1 Y
BRCA2 EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA MENORES
DE 41 AÑOS. RELACIÓN CON LOS ANTECEDENTES
ONCOLÓGICOS FAMILIARES CLÍNICO - PATOLÓGICOS

ISABEL CHIRIVELLA GONZÁLEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 28 de Setembre de 2004 davant un tribunal format per:

- D. Javier García – Conde Bru
- D^a. Ana Lluch Hernández
- D. Alfredo Carrato Mena
- D. Enrique Aranda Aguilar

Va ser dirigida per:

D^a. Andrea Cervantes Ruipérez

D^a. M^a Eugenia Armengod González

©Copyright: Servei de Publicacions
Isabel Chirivella González

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6070-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES
DE LOS GENES BRCA1 Y BRCA2 EN MUJERES CON
CÁNCER DE MAMA MENORES DE 41 AÑOS. RELACIÓN
CON LOS ANTECEDENTES ONCOLÓGICOS
FAMILIARES Y CARACTERÍSTICAS
CLÍNICO – PATOLÓGICAS.



ISABEL CHIRIVELLA GONZÁLEZ

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. CÁNCER DE MAMA. GENERALIDADES	3
INCIDENCIA.....	3
FACTORES DE RIESGO	3
HISTORIA NATURAL	4
DETECCIÓN PRECOZ.....	5
CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO.....	5
TIPOS HISTOLÓGICOS.....	6
PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO	7
RELACIÓN CON EL CÁNCER DE OVARIO	8
I.2. CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO	9
1. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y EXPRESIÓN DE <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>	11
2. MUTACIONES EN LOS GENES <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>	17
Mutaciones en la línea germinal.....	17
Mutaciones somáticas.....	19
3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS. PRONÓSTICO	20
Correlaciones genotipo/fenotipo	20
Características clínico-patológicas de los cánceres debidos a mutaciones en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	23
Carcinoma de mama contralateral en pacientes con mutación en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	25
Carcinoma de ovario en pacientes con mutación en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	25
Pronóstico del cáncer de mama y ovario en portadores de mutaciones <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	26
4. PREVALENCIA Y PENETRANCIA DE LAS MUTACIONES <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>	27
5. VALORACIÓN DE LA PROBABILIDAD DE DETECTAR MUTACIÓN <i>BRCA</i> . DIAGNÓSTICO GENÉTICO	32
El modelo de Couch.....	35
El modelo de Frank	36
El modelo <i>BRCAPRO</i>	37
El modelo de la Hoya (Hospital Clínico San Carlos de Madrid)	37
6. MEDIDAS PROFILÁCTICAS Y TERAPEÚTICAS EN PACIENTES CON MUTACIÓN EN LOS GENES <i>BRCA</i>	38
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
III.1.DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES: TT-SSCP	43
III.2.ESTUDIO DE LOS GENES <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>	46
SELECCIÓN DE PACIENTES.....	46

MÉTODOS	50
Extracción del material genético.....	50
Detección de mutaciones <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	51
III.3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS	70
IV. RESULTADOS.....	71
IV.1. PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i> EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA MENORES DE 41 AÑOS	71
1. MUTACIONES PATOGENICAS.....	73
2. MUTACIONES DE SIGNIFICADO INCIERTO: MUTACIONES DE SENTIDO ERRÓNEO	75
IV.2. FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i> SEGÚN LA HISTORIA FAMILIAR DE CÁNCER DE MAMA/OVARIO	77
IV.3. HISTORIA FAMILIAR DE OTROS TIPOS DE TUMORES Y SU RELACIÓN CON LAS MUTACIONES <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>.....	87
IV.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y EVOLUTIVAS DE LAS PACIENTES. DIFERENCIAS ENTRE LOS CASOS ESPORÁDICOS Y LOS RELACIONADOS CON MUTACIÓN <i>BRCA</i>.....	91
IV.5. UTILIDAD DE LOS MODELOS DE PREDICCIÓN DE PROBABILIDAD DE MUTACIÓN EN <i>BRCA</i>	93
V. DISCUSIÓN.....	101
V.1.PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i> EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA MENORES DE 41 AÑOS	101
Características de la muestra	102
Análisis mutacional e inclusión en los estudios de mutaciones patogénicas y mutaciones de significado incierto	103
Diferencias en la distribución de las mutaciones <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	105
Mutaciones prevalentes del área mediterranea.....	108
V.2. FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i> SEGÚN LA HISTORIA FAMILIAR DE CÁNCER DE MAMA/OVARIO	110
Cáncer de mama bilateral/contralateral	114
Cáncer de ovario	115
Cáncer de mama en el varón	117
V.3.HISTORIA FAMILIAR DE OTROS TUMORES Y SU RELACIÓN CON LAS MUTACIONES <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>.....	117
V.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y EVOLUTIVAS DE LAS PACIENTES. DIFERENCIAS ENTRE LOS CASOS ESPORÁDICOS Y LOS DEBIDOS A MUTACIÓN	118
V.5. UTILIDAD DE LOS MODELOS DE PREDICCIÓN DE PROBABILIDAD DE MUTACIÓN <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>	121
VI. CONCLUSIONES	125
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	127

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AT	Ataxia-telangiectasia
BIC	Breast Cancer Information Core
BRC	Breast cancer domain (Domino de cáncer de mama)
BRCT	Breast cancer terminal domain (Dominio terminal de Cáncer de mama)
C	Citosina
CDNA	ADN complementario del mRNA
Cm	centímetro
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilen-diaminoteraacético
G	Guanina
g	Gramos
Kb	Kilobases
Kda	Kilodaltons
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baja densidad
M	Molar
mA	Miliamperios
min	Minutos
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
nt	Nucleótido
OCCR	Ovarian cancer cluster region (Región de agrupamiento de cáncer de ovario)
RR	Riesgo relativo
pB	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la Polimerasa)
PTT	Protein truncation test (test de la proteína truncada)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RR	Riesgo relativo
RT	Reacción de retrotranscripción
Seg	Segundos
SSCP	Single strand conformation polymorphism (polimorfismo de conformación de cadena sencilla)
T	Timina
TH	Temperatura de hibridación
TT-SSCP	Temporal temperature single strand conformation (Gradiente temporal de temperatura en polimorfismo de conformación de cadena sencilla)
UV	Ultravioleta
V	Voltios
W	Vatios
Y cols.	y colaboradores
µg	Microgramo
µl	Microlitro

I. INTRODUCCIÓN

I.1. CÁNCER DE MAMA. GENERALIDADES

INCIDENCIA

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la mujer (con excepción del cáncer de piel), y una de las principales causas de muerte entre los 45 y los 50 años. Se espera que en el año 2004 el cáncer de mama sea el 32% de todos los nuevos tumores diagnosticados. Durante las últimas décadas se ha registrado un aumento progresivo de la incidencia de la enfermedad.

Actualmente el riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida es aproximadamente una de cada ocho mujeres. Entre las mujeres menores de 40 años es 1 cada 228; entre los 40 y los 59 años 1 cada 24; y entre las mujeres de 60 a 79 años 1 cada 14 (Jemal y cols. 2004). Los hombres, aunque en una proporción muy inferior a las mujeres, también son susceptibles de padecer cáncer de mama (Couch y cols. 1996, Friedman y cols. 1997).

FACTORES DE RIESGO

La edad es el factor de riesgo más importante para el cáncer de mama, ya que aproximadamente el 77% de los casos son diagnosticados en mujeres con más de 50 años. La historia familiar de cáncer de mama se considera el segundo factor de riesgo, indicando un importante papel de la herencia (Colditz y cols. 1993). Comparado con mujeres sin antecedentes familiares de cáncer de mama, el riesgo relativo oscila entre 1.4 para mujeres cuya madre se diagnosticó de cáncer de mama después

de los 60 años hasta 15 para mujeres de 40 años con mutación en el gen *BRCA1* (Colditz y cols. 1993, Gail y cols. 1989, Easton y cols. 1993).

Otros factores de riesgo son la menarquia precoz, la nuliparidad y la menopausia tardía. Se piensa que estos factores influyen debido al aumento en el número de ciclos menstruales, y por tanto, al aumento en la exposición de las células de la mama al efecto estimulador de los estrógenos. Hay dos estudios que demuestran, que el alto contenido de grasas en la dieta contribuye también al aumento de riesgo del cáncer de mama (Hunter y cols. 1996).

HISTORIA NATURAL

El cáncer de mama se caracteriza por una larga historia natural y una clara relación con las hormonas sexuales. La edad de la menarquia, el establecimiento de ciclos ovulatorios regulares y la edad de la menopausia tienen una fuerte asociación con el riesgo de cáncer de mama.

El tumor primitivo se produce inicialmente por la modificación en las propiedades de una o varias células. La célula transformada se reproduce y origina una clona celular neoplásica. El fenómeno de la inducción del cáncer conlleva una alteración en el material genético de las células somáticas, siendo esta transformación hereditaria para toda la clona de células inducidas. A lo largo de su historia natural, la mayor inestabilidad genética que tienen las células neoplásicas, facilita el desarrollo de alteraciones cromosómicas que provocan múltiples cambios a nivel celular de carácter irreversible.

El crecimiento del cáncer de mama a menudo es regulado por los esteroides sexuales femeninos. La determinación de los receptores de

estrógenos y progesterona en el tumor, diferencian a las pacientes de buen pronóstico que podrán beneficiarse del tratamiento hormonal.

Existen diferentes tipos de diseminación local del cáncer de mama: infiltración directa del parénquima glandular por los conductos mamarios, y a través de los linfáticos de la mama. Respecto a la capacidad de desarrollar metástasis es imprevisible; es capaz de invadir o metastatizar muy pronto, incluso antes de que el tumor presente un tamaño perceptible clínicamente. Los factores que determinan cuando un cáncer localizado diseminará células en el drenaje linfático o en la circulación general, no se conocen todavía bien; ni tampoco se conocen los factores que deciden si una célula maligna desarrollará una metástasis con éxito.

DETECCIÓN PRECOZ

La única manera de detectar de forma precoz el cáncer de mama es la auto-exploración mamaria y la mamografía. Hoy en día se recomienda en la población general, la realización de mamografía anual a partir de los 45 años hasta los 69 años, y posteriormente de forma bianual.

La Sociedad de Oncología Médica Americana recomienda a las pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer de mama debido a su historia familiar, empezar el screening mamográfico a los 25-35 años mediante la auto-exploración mamaria mensual, exámen clínico anual o semestral y mamografía anual.

CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO

La tumoración es el signo más frecuente para la detección de estos tumores malignos. También pueden aparecer otros signos como la

retracción del pezón, la “piel de naranja” o la secreción sanguinolenta por el pezón.

El diagnóstico se realiza mediante la exploración clínica adecuada, una mamografía y la punción con citología y biopsia para la determinación anatómo-patológica.

Hoy en día se diagnostica en estadio localizado el 63% de las ocasiones, en estadio regional el 29% y en estadio metastásico un 6% (Jemal y cols. 2004).

TIPOS HISTOLÓGICOS

Existen muchas clasificaciones anatómo-patológicas. La más comúnmente utilizada es la presentada por la Organización Mundial de la Salud. La mayor parte de las neoplasias de la mama se originan en el epitelio de los conductos galactóforos (carcinoma ductales) y los restantes se forman en estructuras acinares de los lobulillos mamarios (carcinomas lobulillares). Ambos grupos presentan variedades infiltrantes y no infiltrantes. Los carcinomas infiltrantes podemos dividirlos en:

- Carcinoma ductal: supone el 70% de los cánceres de mama
- Carcinoma medular: esta variedad posee bajas posibilidades infiltrativas. Constituye del 5 - 7% de todos los cánceres de mama
- Carcinoma tubular: forma túbulos de forma evidente. Su pronóstico es mejor que el de los carcinomas ductales
- Carcinoma mucinoso: constituye el 3% de todos los carcinomas mamarios. Es de crecimiento lento
- Carcinoma lobular infiltrante: supone del 5-10% de los cánceres de mama
- Comedocarcinoma infiltrante: es un tipo de carcinoma ductal
- Enfermedad de Paget: ocurre en el 1% de todos los cánceres de mama. La epidermis del pezón contiene células tumorales

- Carcinoma inflamatorio de la mama: se caracteriza clínicamente por edema de la piel de la mama, enrojecimiento, calor e induración del tejido subyacente. Su pronóstico suele ser malo.

PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO

Varios parámetros influyen con mayor intensidad en el pronóstico de la enfermedad. Los factores más importantes son: el tamaño del tumor, la afectación ganglionar axilar, el grado de atipia nuclear y los receptores hormonales.

En las últimas décadas, la mortalidad ha disminuido. En 1940 la supervivencia a los 5 años en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama localizado era del 72%, hoy en día es del 97%. Según los estadios, la supervivencia a los 5 años es del 97% para el cáncer de mama localizado, del 78% en el cáncer de mama regional, del 25% en el cáncer de mama metastásico y del 85% para todos los estadios (Jemal y cols. 2004). El aumento en la supervivencia se debe al screening mediante la auto-exploración y la mamografía, que detectan tumores en estadio localizado y permite un tratamiento curativo.

El tratamiento del cáncer de mama normalmente es abordado mediante cirugía, quimioterapia, radioterapia y hormonoterapia. La correcta elección de un determinado tratamiento viene indicado por las características tumorales y el estado del paciente. En general, para tumores sin metástasis y localizados, se utiliza la cirugía, mediante tumorectomía o mastectomía. En estos casos, la cirugía suele ir acompañada de un tratamiento de quimioterapia, hormonoterapia o radioterapia adyuvante para disminuir el riesgo de desarrollar recurrencias locorregionales y a distancia. Cuando la enfermedad es metastásica, el tratamiento de la enfermedad tiene fines paliativos. El tratamiento tiene por objeto mejorar la calidad de vida y prolongarla. En este tipo de

pacientes la media de supervivencia es baja, aunque algunas mujeres pueden sobrevivir durante mucho tiempo. El tratamiento para el cáncer metastásico suele comprender la quimioterapia, la hormonoterapia o ambas. La radioterapia y/o la cirugía sólo se utiliza en casos muy concretos dentro de este grupo de pacientes, por ejemplo ante una metástasis dolorosa, o ante problemas locales de dolor o hemorragia en la mama. En aquellas pacientes que tienen tumores que sobreexpresan HER2/neu el tratamiento con Herceptin (anticuerpo monoclonal que se une al receptor del HER2/neu) aumenta la supervivencia.

RELACIÓN CON EL CÁNCER DE OVARIO

En contraste con el cáncer de mama, el carcinoma epitelial de ovario constituye sólo el 4% de los tumores de la mujer; sin embargo es la quinta causa de muerte. La supervivencia al año es de 76% y a los 5 años de 46%. Desafortunadamente, el cáncer de ovario en estadio inicial, no suele dar síntomas, y debido a la ausencia de métodos efectivos de screening, sólo el 24% del cáncer de ovario se detecta de forma localizada.

Los factores de riesgo del cáncer de ovario son similares a los del cáncer de mama. Igual que en el cáncer de mama, la edad es el factor de riesgo más importante. El segundo factor de riesgo más importante es la historia familiar de cáncer de ovario, de cáncer de mama o de cáncer colorectal (HNPC). Si se comprueba por un test genético mutación en *BRCA1*, *BRCA2* o en los genes del HNPCC, el riesgo de padecer cáncer de ovario a lo largo de la vida es muy alto, del 40 al 60% (Easton y cols. 1995, Ford y cols. 1995).

I.2. CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

La mayor parte de los cánceres de mama son cánceres esporádicos, es decir, no hay indicio de una susceptibilidad heredada a padecer la enfermedad. Los cánceres esporádicos se generan por una acumulación de eventos genéticos que provocan el crecimiento descontrolado de un clon celular. Estas alteraciones genéticas implican, sobre todo, a genes relacionados con la proliferación y se producen a nivel de las células somáticas, por tanto, no es hereditario. Pero existe una baja proporción, estimada en torno al 5%-10%, donde aparece una predisposición hereditaria al cáncer (Newman y cols. 1998, Claus y cols. 1996). La alteración mutacional aparece a nivel de un gen que se hereda de forma mendeliana y confiere un mayor riesgo de padecer la enfermedad. Por tanto, la mutación, a diferencia del cáncer esporádico, está presente en cada una de las células del paciente.

En general una de cada 8 mujeres desarrollará cáncer de mama a lo largo de su vida, pero en algunas familias el número de afectados es mayor. El síndrome de cáncer de mama/ovario hereditario se caracteriza por un acúmulo de casos de cáncer de mama sólo, o casos de cáncer de mama y ovario en una familia. Históricamente, el cáncer de mama/ovario hereditario, se reconoció en familias con un modelo hereditario de transmisión autosómica dominante, a principios de 1970.

Se conoce que *BRCA1* y *BRCA2* actúan como "genes supresores", es decir, suprimiendo un antioncogen; en estos casos se necesita la supresión de dos alelos para que tenga lugar la aparición de la neoplasia. Este concepto se deriva de las observaciones de Knudson a principios de los años 70, ya que a partir del estudio del retinoblastoma familiar y esporádico, y el análisis de la edad, le permitió proponer la "teoría de los dos hitos" o eventos mutagénicos que son necesarios para el desarrollo del

retinoblastoma. En individuos con la forma heredada, Knudson propuso que el primer hito es la presencia de la mutación en la línea germinal, y por tanto, en todas las células del cuerpo. Sin embargo, la presencia de esta mutación es insuficiente para la formación de un tumor, y una segunda mutación somática es necesaria para producir la formación de un tumor. Esta teoría de Knudson sería aplicable al cáncer de mama/ovario hereditario, y explicaría su aparición a edad más precoz que el cáncer de mama esporádico.

Mediante estudios epidemiológicos se demostró la existencia de genes de susceptibilidad al cáncer de mama. Pero fue en 1990 cuando mediante análisis de ligamiento de familias con múltiples casos de cáncer de mama se aisló el primer gen de susceptibilidad a esta enfermedad (Hall y cols. 1990).

Este gen conocido como *BRCA1* se localizó en el cromosoma 17q12-q21 y fue clonado en 1994 (Miki y cols. 1994). *BRCA1* parecía además estar relacionado con el cáncer de ovario. *BRCA1* no sólo no explicaba la totalidad de los cánceres hereditarios (Easton y cols. 1993), ya que, además, en un grupo de cánceres congénitos en los cuales aparecían casos de varones afectados no parecía encontrarse un ligamiento a este loci (Straton y cols. 1994). Parecía evidente que debía haber uno o más genes que al igual que *BRCA1* estuviesen relacionados con esta patología.

Usando familias que no presentaban ligamiento a *BRCA1* y con miembros varones con cáncer de mama, se localizó *BRCA2* en el cromosoma 13q12-q13 en 1994 (Wooster y cols. 1994) y fue identificado en 1995 (Wooster y cols. 1995, Tavtigian y cols. 1996). Aunque en un principio estos dos genes explicaban la mayor parte de los casos de cáncer hereditario (Easton y cols. 1995, Wooster y cols. 1994, Tonin y cols. 1995), estudios posteriores demuestran que las probabilidades fueron sobrestimadas ya que los estudios fueron realizados en familias con gran

carga genética. Hoy en día se sabe que la contribución de estos dos genes a este tipo de cáncer es más modesta, y que aún quedan muchos casos que no pueden ser explicados por alteraciones a nivel de *BRCA1* y *BRCA2* (Szabo y cols. 1997, Serova y cols. 1997, Schubert y cols. 1997, Malone y cols. 1998). Se postula la existencia de un posible *BRCA3* pero hasta el momento no ha sido localizado (Thompson y cols. 2002).

Hay otros genes relacionados con el cáncer de mama (Tabla 1), pero confieren un riesgo mucho menor, y en la mayoría de los casos están implicados en enfermedades sindrómicas con alta tasa de incidencia de cáncer de mama, es el caso del síndrome de Cowden (*PTEN*) (Liaw y cols. 1997), síndrome de Li-Fraumeni (*p53*) (Malkin y cols. 1990, Sidransky y cols. 1992, Borresen y cols. 1992), Muir-Torre (*MSH2/MLH1*), y Peutz-Jegher (*SKT11*).

Tabla 1. Causas de susceptibilidad hereditaria al cáncer de mama.

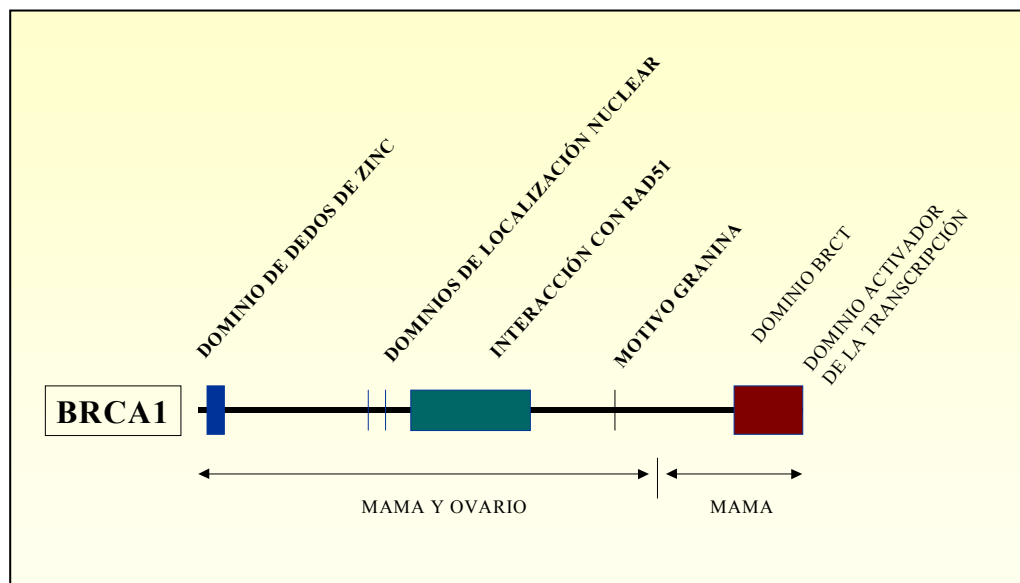
Genes	Contribución al cáncer de mama hereditario (%)
<i>BRCA1</i>	20-40
<i>BRCA2</i>	10-30
<i>p53</i>	<1
<i>PTEN</i>	<1
Genes desconocidos	30-70

1. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y EXPRESIÓN DE *BRCA1* Y *BRCA2*

BRCA1 es un gen de gran tamaño que posee 24 exones, 22 de los cuales son codificantes, distribuidos a lo largo de unos 100 Kb de DNA genómico (Miki y cols. 1994). Un gen llamado NBR-2 se encuentra localizado muy cercano a la región 5' de *BRCA1* pero se transcribe en dirección opuesta; aunque tal proximidad no implica una relación funcional, se piensa que ambos genes podrían estar corregulados a partir de un promotor común (Smith y cols. 1996, Xu y cols 1997). *BRCA1* codifica

una proteína de unos 1863 aminoácidos con un peso molecular de 220 Kd (Miki y cols. 1994). El exón 11 es comparativamente mucho más grande que el resto de exones (3.5 Kb). *BRCA1* posee 2 exones 1, denominados 1a y 1b que generan 2 transcritos distintos a partir de 2 promotores.

Figura 1. Principales dominios de la proteína BRCA1



La mayor parte de la secuencia de *BRCA1* no tiene una homología muy fuerte con el resto de genes conocidos (Figura 1), sólo una secuencia situada en la zona amino-terminal de *BRCA1* (residuos: 20-68) guarda homología con proteínas previamente descritas. Esta secuencia conocida como "dominio de dedos de zinc", es característica de muchos factores de transcripción y parece estar implicada en la interacción de proteínas con el DNA y en la unión proteína-proteína (Saurin y cols. 1996). Mediante el sistema del doble híbrido se ha localizado una proteína que interactúa con este dominio en dedos de zinc llamada BRAD1 (Wu y cols. 1996, Jensen y cols. 1998). *BRCA1* también posee una secuencia en la zona carboxi-terminal de la proteína, conocida como dominio BRCT, que aunque está poco conservada, mantiene una cierta homología con otras

proteínas implicadas en la reparación del DNA (Koonin y cols. 1996, Bork y cols. 1997, Callebaut 1997).

La función de *BRCA1* parece estar relacionada con el mantenimiento de la integridad del genoma. El hecho de que la superexpresión de *BRCA1* produzca una inhibición del crecimiento celular (Holt y cols. 1996) junto a que en los cánceres provocados por mutaciones en este gen se observe una pérdida del alelo sano (Smith y cols. 1992), se sugiere que *BRCA1* es un gen supresor de tumores. La inestabilidad genómica que provoca una disfunción de *BRCA1* (Crook y cols. 1997, Gowen y cols. 1998, Xu y cols. 1999, Phillips y cols. 1999), la interacción con otras proteínas relacionadas directamente con la reparación del genoma (como RAD51) y con el ciclo celular (Scully y cols. 1997, Wang y cols. 1997, Zhong y cols. 1999), la presencia del dominio BRCT localizado en algunas proteínas reparadoras de DNA (Koonin y cols. 1996, Callebaut y cols. 1997), así como la identificación de una secuencia de localización nuclear en el interior del exón 11 (Chen y cols. 1996, Thakur y cols. 1997) llevan a pensar que *BRCA1* está implicado en el mantenimiento y reparación del genoma, siendo capaz de regular el ciclo celular cuando el DNA está dañado. Parece ser que la activación de la función de *BRCA1* está muy relacionada con su fosforilación. Algunos estudios muestran como *BRCA1* se fosforila cuando se lesiona el ADN y se piensa que esta fosforilación es capaz de activar algunas de las funciones que se le atribuyen a *BRCA1* (Scully y cols. 1997, Cortez y cols. 1999).

BRCA1 es una proteína que posee además dominios capaces de activar la transcripción, concretamente, es capaz de activar p21, que es un potente supresor del ciclo celular en la fase G1/S (Somasundaram y cols. 1997). También la relación con desacetilasas, helicasas, así como proteínas reguladoras como la CtIP sugiere que *BRCA1* tenga un papel regulador de la transcripción y reparación del ADN (Scully y cols. 1997, Anderson y cols. 1998, Li y cols. 1999, Yarden y cols. 1999). Algunos trabajos

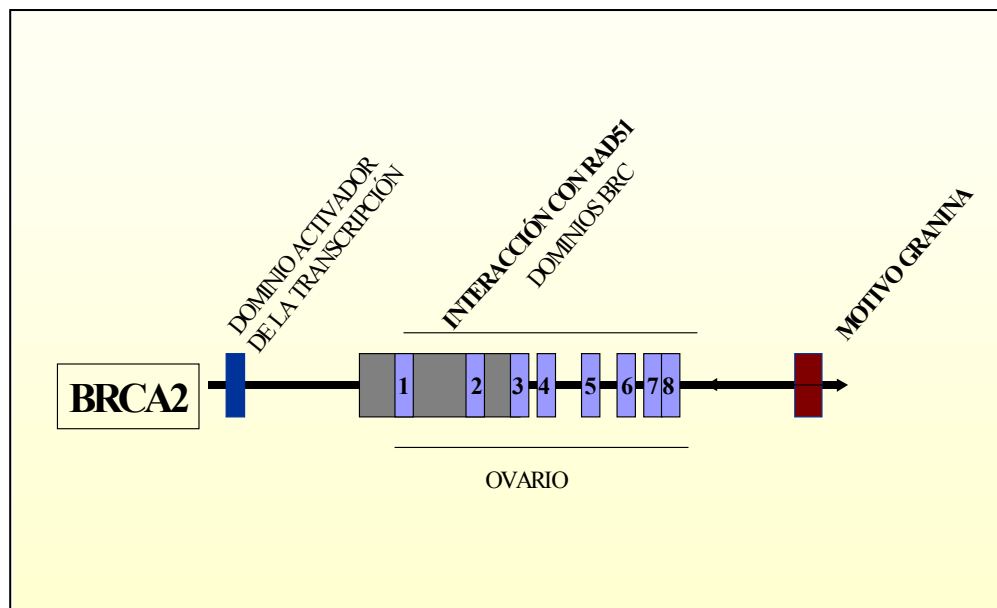
muestran como *BRCA1* podría estar implicado en la degradación dependiente de ubiquitina de ella misma o de otras proteínas (Jensen y cols. 1998).

BRCA2 es estructuralmente parecido a *BRCA1*. También es un gen de gran tamaño. Posee 27 exones que codifican una proteína de 3418 aminoácidos (casi el doble que *BRCA1*), con un peso molecular de unos 384 kD. El cDNA es de aproximadamente unas 12 KB. Como le ocurre a *BRCA1*, *BRCA2* posee un exón 11 mucho más grande (5 Kb) que el resto y un exón 10 proporcionalmente mayor (Wooster y cols. 1995, Tavtigian y cols. 1996). *BRCA2* también posee una secuencia de señalización nuclear pero esta localizada en el extremo C-terminal (Figura 2), mientras que en *BRCA1* tal secuencia está en el exón 11.

BRCA2 tampoco muestra una homología muy fuerte con ninguna proteína. Sólo una región situada en el exón 11 que incluye ocho copias de una repetición forman un dominio conocido como repeticiones BRC (Tavtigian y cols. 1996, Bork y cols. 1996, Bignell y cols. 1997).

La función de *BRCA2* es similar a la de *BRCA1*. La unión a RAD51 (Wong y cols. 1997), su señalización al núcleo (Yano y cols. 2000), así como su patrón de expresión, indicarían que *BRCA2* podría estar también implicado en la reparación de ADN. Además, *BRCA2* tiene un dominio en el exón 3 capaz de activar la transcripción (Milner y cols. 1997). Algunos casos en los cuales este dominio se ve comprometido, alterando su capacidad transcripcional, aparecen en pacientes con cáncer de mama, lo que podría indicar que la alteración de esta función puede estar relacionada con el desarrollo tumoral (Milner y cols. 1997). Últimamente se ha descrito una posible actividad acetiltransferasa de *BRCA2* (Xu y cols. 1998, Fuks y cols. 1998, Siddique y cols. 1998) lo que sugiere que podría ser un regulador de otros genes.

Figura 2. Principales dominios de la proteína BRCA2.



En general, tanto *BRCA1* como *BRCA2* están relacionados con el mantenimiento de la integridad del genoma; un fallo a nivel de *BRCA1* o *BRCA2* provocaría un acúmulo de mutaciones en otros genes que podrían suponer el desarrollo de un tumor (Kinzler y cols. 1997). Por tanto, estos dos genes estarían dentro de lo que se conoce como genes supresores de tumores. Los genes supresores de tumores se caracterizan por tener un modelo de actuación característico. Cuando se posee una alteración *BRCA1* o *BRCA2* en línea germinal, cada una de las células del sujeto portador posee la mutación. Un alelo sano es suficiente para mantener la funcionalidad del gen. Es necesario, por tanto, la pérdida del alelo sano para poder llegar a desarrollar una neoplasia (Kinzler y cols. 1997). La pérdida del alelo puede producirse por una delección de la zona que incluye el gen, aunque también puede producirse una hipermetilación que silencia el gen. La hipermetilación (Dobrovic y cols. 1997, Catteau y cols. 1999), es un proceso mediante el cual se metilan posiciones concretas de las islas CpG que existen tanto en la región promotora de *BRCA1* (Smith y cols. 1996) como de *BRCA2* (Davis y cols. 1999). Esta modificación del promotor impide la transcripción del gen, bien porque

proteínas reguladoras necesarias para la transcripción ya no son capaces de unirse al promotor o porque proteínas represoras que tienen afinidad por las zonas metiladas se unen inactivando la transcripción.

Debido al gran tamaño y a la gran complejidad de *BRCA1* y *BRCA2*, no se descarta que nuevas funciones puedan ser atribuidas a estos genes, que actuarían a distintos niveles mediante dominios diferentes.

Expresión de *BRCA1* y *BRCA2*

BRCA1 y *BRCA2* se expresan en gran variedad de tejidos y tipos celulares. Este patrón de expresión no se corresponde con las manifestaciones fenotípicas de la enfermedad, que aparecen fundamentalmente en el carcinoma de mama y ovario. La transcripción de ambos genes es inducida durante la fase G1 del ciclo celular y permanece alta durante la fase S (Wang y cols. 1997). *BRCA1* y *BRCA2* se expresan, por tanto, justo antes de la división, cuando es necesario revisar el buen estado del ADN y reparar posibles daños, evitando la transmisión de estas alteraciones a la nueva copia. La expresión de ambos genes tiene una regulación hormonal (Rajan y cols. 1997). Los niveles de RNA mensajero de estos dos genes aparecen elevados en células de cáncer de mama mediante una estimulación por estrógenos (Spillman y cols. 1996). Los patrones similares de expresión de ambos genes se atribuyen a una corregulación de *BRCA1* y *BRCA2* (Rajan y cols. 1996), lo cual apoya la idea que ambos genes poseen una misma función que está implicada con el mantenimiento y reparación del genoma.

BRCA1 posee dos regiones promotoras que generan 2 transcritos diferentes. Uno de los dos promotores parece que regula además a otro gen en sentido contrario llamado NBR2 cuya función no se conoce. Esta corregulación podría estar influyendo directamente en la expresión del

RNA mensajero de *BRCA1* a partir de este promotor (Xu y cols. 1995, Xu y cols. 1997).

2. MUTACIONES EN LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2*

Mutaciones en la línea germinal

Las alteraciones provocadas en estos dos genes confieren una alta predisposición al cáncer de mama y un riesgo moderado a otros tipos de cáncer (Easton y cols. 1995, Tonin y cols. 1995).

Se han descrito más de 600 mutaciones y variantes alélicas en el gen *BRCA1* desde su identificación, mientras que *BRCA2* cuenta hasta el momento con unas 450 mutaciones pero su localización y clonación fueron posteriores a *BRCA1*. No se han encontrado puntos calientes en estos genes en los que se acumule un mayor número de mutaciones y sólo unas pocas mutaciones aparecen más frecuentemente en determinadas poblaciones debido a su carácter endogámico. En la población de judíos Ashkenazi se han detectado tres mutaciones propias (dos en *BRCA1*: 185delAG y 5382insC; una en *BRCA2*: 6174delT) (Struewing y cols. 1995, Oddoux y cols. 1996, Roa y cols. 1996). En Islandia también se ha detectado la mutación 995delA en *BRCA2* (Thorlacious y cols. 1997). El gran tamaño de estos genes, así como la dispersión y variedad de mutaciones que se registran en ellos, dificulta enormemente el cribado de mutaciones en poblaciones no endogámicas.

La mayoría de las mutaciones descritas hasta el momento son pequeñas deleciones, inserciones o mutaciones de pérdida de sentido que provocan el truncamiento de la proteína y por tanto la pérdida de función de ésta. Este dato puede estar, en parte, sesgado por la utilización de sistemas de detección que únicamente detectan mutaciones que generan una proteína truncada (como es el caso del PTT, Protein

Truncation Test). Por otra parte, el significado biológico de la mayoría de las mutaciones de sentido erróneo detectadas es muy discutido y sus efectos funcionales van a depender mucho de la posición del aminoácido que cambie, y de lo brusco que sea el cambio. Como veremos más adelante, existen algunos indicios que pueden ayudar a dilucidar el efecto patogénico de este tipo de mutaciones.

Podemos encontrar también mutaciones en los sitios de "splicing" (ajuste) que alteran la secuencia consenso que la maquinaria necesaria para el procesamiento del RNA mensajero primario ha de reconocer para eliminar los intrones, generando una proteína truncada. Además de mutaciones en la secuencia consenso, variaciones en otras zonas del gen pueden generar nuevos sitios de "splicing" (ajuste) provocando de igual manera la alteración en la maduración del RNA mensajero. Existe un sistema celular que es capaz de degradar los RNA mensajeros que no son completamente traducidos por contener secuencias de parada generadas por mutaciones de diversa índole (Hentze y cols. 1999). Este hecho dificulta la detección de mutaciones que están basadas en la localización de mutaciones a partir del RNA mensajero, como el PTT o la retrotranscripción ya que el RNA mensajero proveniente del alelo mutado puede ser degradado mucho más rápido y sólo se analiza el sano (Den Dunnen y cols. 1999). Por otra parte, se ha descrito una delección de la región promotora. La alteración de estas zonas puede tener consecuencias graves en la transcripción (Swensen y cols. 1997, Brown y cols. 2002) aunque hasta ahora no han sido estudiadas. Por último, se han detectado algunos casos de grandes reordenamientos en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Petrij y cols. 1997, Swensen y cols. 1997). Estas alteraciones incluyen delecciones o inserciones que por su gran tamaño requieren técnicas especiales para su detección, como el análisis Southern Blot. Debido a que los sistemas de cribado de mutaciones que se utilizan habitualmente tienen limitaciones y que la mayor parte de la búsqueda

de mutaciones se centra en la región codificante del gen, algunas mutaciones no son detectadas.

Mutaciones somáticas

Por las características que poseen *BRCA1* y *BRCA2* de genes supresores de tumores, y el hecho de que se haya observado una pérdida de heterocigosis de las regiones pertenecientes a los genes *BRCA1* y *BRCA2* en parte de los cánceres esporádicos, indica que pueden existir mutaciones somáticas en el alelo no perdido en estos genes en tumores esporádicos de mama (Futreal y cols. 1994, Lancaster y cols. 1996). Sin embargo, en los tumores de mama esporádico, no se han encontrado mutaciones en el gen *BRCA1* y en muy pocos casos debidas a mutaciones en el gen *BRCA2* (Teng y cols. 1996, Rahman y cols. 1998, Kwiatkowska y cols. 2002).

Existen otros mecanismos mediante los cuales se pueden inactivar los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Se ha observado que muchos cánceres de mama esporádicos muestran una reducción de los niveles de RNA mensajero de *BRCA1* y *BRCA2* (Chan y cols. 2002, Yang y cols. 2002). Este hecho implica que algún mecanismo debe estar alterando la expresión de este gen. Se piensa que esta reducción de la expresión puede ser provocada por una hipermetilación de la región promotora de estos genes. Tanto *BRCA1* como *BRCA2* poseen islas CpG susceptibles de metilación en las zonas promotoras, y se ha detectado hipermetilación de *BRCA1* y en *BRCA2* en cánceres de mama esporádicos (Smith y cols. 1996, Catteau y cols. 1999, Baldwin y cols. 2000, Rice y cols. 2000, Chan y cols. 2002).

3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS. PRONÓSTICO

Correlaciones genotipo/fenotipo

Teniendo en cuenta la posible naturaleza multifuncional de *BRCA1* y *BRCA2*, es obvio que no todas las mutaciones en estos genes van a contribuir de la misma manera a la enfermedad, y que algunas de estas diferencias encontradas entre las portadoras de mutaciones, como la diferente penetrancia, aparición o no de cáncer de ovario, así como posiblemente algunas de las características propias del tumor, serán debidas en parte al tipo de mutación (de cambio de aminoácido, de pérdida de sentido, grandes reordenamientos...) y a su localización en el gen. Aunque algunas de las diferencias clínicas entre portadores pueden ser explicadas por la aparición de mutaciones que confieren diferentes rasgos y características patológicas, portadores de una misma mutación pueden desarrollar distintos tipos de cánceres, a edades muy distintas, o no desarrollar ningún cáncer. Esta variabilidad puede ser debida a algunos factores adicionales (genéticos y ambientales), que pueden modular el fenotipo conferido por las mutaciones *BRCA*. Polimorfismos en otros genes o en los mismos *BRCA1* y *BRCA2* pueden estar influyendo en las características fenotípicas de una determinada mutación, bien porque modulan el efecto de ésta directamente o bien porque confieren un riesgo, o protección adicional al cáncer.

En cuanto a los factores no genéticos que serían susceptibles de modular la expresión de mutaciones *BRCA1* y *BRCA2*, serían los mismos que incrementan el riesgo a cáncer en la población general: una historia familiar, nuliparidad, menarquia prematura, edad avanzada, menopausia tardía, dieta, obesidad, etc.

El cáncer de mama y el cáncer de ovario son los cánceres que más habitualmente presentan estas portadoras, pero hay estudios en familias

con mutaciones en *BRCA* donde se ha observado un aumento del riesgo de cáncer de próstata y de cáncer de colon. Los otros tipos de cánceres asociados a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* (cáncer de páncreas, vesícula biliar, conductos biliares, gástrico, melanoma) aparecen en una baja proporción por lo que la estimación del riesgo de los mismos sería muy imprecisa. (Ford y cols. 1998, Breast Cancer Linkage Consortium. 1999; Thompson y cols. 2002).

Fenotipo relacionado con mutaciones BRCA1

Los portadores de mutaciones en *BRCA1* presentan además de un riesgo elevado de cáncer de mama, una mayor predisposición al cáncer de ovario. Gayther y cols. (1995) observaron una asociación entre la localización de la mutación en el gen *BRCA1* y el riesgo de padecer cáncer de mama u ovario. Mutaciones localizadas en el extremo 5' de *BRCA1* están relacionadas con un mayor riesgo a cáncer de ovario que las situadas en el extremo 3', que confieren mayor susceptibilidad a cáncer de mama. En el centro del gen aparece una zona entre los codones 145 y 1433 donde la predisposición al cáncer de mama y ovario es muy similar (Gayther y cols. 1995). Se piensa que el motivo de esta posible distribución puede ser debido a la existencia de un dominio localizado en la zona de transición, que protege contra el cáncer de ovario. Por el contrario, mutaciones situadas detrás de este dominio, lo dejarían intacto y el riesgo de padecer cáncer de ovario disminuiría (Rahman y cols. 1998). Nuevos estudios que trataban de confirmar estos datos han resultado contradictorios (Struewing y cols. 1997, Thomson y cols. 2002).

También la mutación en el gen *BRCA1* confiere un riesgo elevado a padecer cáncer de colon y de próstata (Struewing y cols. 1997).

Thompson y cols.(2002), en un estudio del Breast Cancer Linkage Consortium, analizaron a 11847 individuos de 699 familias. Los portadores

de mutación *BRCA1* presentaban un aumento del riesgo de varios tumores, entre ellos de cáncer de páncreas (RR=2.26), carcinoma de endometrio (RR=2.65), cáncer de cérvix (RR=3.72), y de cáncer de próstata en menores de 65 años (RR=1.82).

Fenotipo relacionado con mutaciones BRCA2

Las mutaciones en *BRCA2* están menos relacionadas con el cáncer de ovario que *BRCA1*, aunque existe un dominio denominado OCCR (Ovarian Cancer Cluster Region) donde las mutaciones parece que confieren un riesgo más elevado a padecer cáncer de ovario (Ford y cols. 1998, Gayther y cols. 1997).

Además del riesgo de cáncer de mama y ovario asociado a las mutaciones en *BRCA2*, también se ha documentado un aumento del riesgo de otros tipos de tumores. Easton y cols. (1997) encontraron un aumento del riesgo de cáncer de próstata y carcinoma laríngeo. Struwing y cols. (1997) en su estudio de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* de mujeres judías Ashkenazi, encontraron un aumento del cáncer de próstata con un riesgo acumulado de 16% a los 70 años.

En uno de los estudios con más mujeres realizado (3728 individuos con mutación, 681 de ellos con cáncer de mama/ovario, entre 173 familias con cáncer de mama/ovario y mutación en *BRCA2*), estudiaron la frecuencia de otros cánceres en los familiares de 1° grado, encontrando un aumento del riesgo estadísticamente significativo en el cáncer de próstata (RR=4.65), cáncer de páncreas (RR=3.51), cáncer de vesícula biliar y conductos biliares (RR=4.97), estómago (RR=2.59), y melanoma maligno (RR=2.58). El riesgo de cáncer de próstata en hombres menores de 65 años es de 7.33 (Breast Cancer Linkage Consortium, 1999).

Por último, mutaciones en este gen aumentan la predisposición al cáncer de mama en varones. Es frecuente que las familias de alto riesgo con casos de cáncer de mama en varones posean mutaciones en *BRCA2* (Couch y cols. 1996, Friedman y cols. 1997).

Características clínico-patológicas de los cánceres debidos a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*

Tamaño tumoral y afectación ganglionar axilar

Muchos estudios han analizado estos factores pronósticos fundamentales en el cáncer de mama (Johannsson y cols. 1998, Marcus y cols. 1996, Verhoog y cols. 1998, Ansquer y cols. 1998), y sólo en uno de estos estudios (Marcus y cols. 1996) se ha encontrado una diferencia significativa respecto al tamaño tumoral, con tamaños tumorales más pequeños y menor número de ganglios infiltrados por el tumor, en las pacientes que presentan mutación en *BRCA*.

Características histológicas

La mayor parte de los estudios realizados encuentran diferencias respecto a las características patológicas en las pacientes con cáncer de mama relacionado con mutación en *BRCA1*. Estos tumores suelen ser de alto grado histológico, y expresan con menor frecuencia receptores de estrógenos o de progesterona (Johannsson y cols. 1997, Ansquer y cols. 1998, Robson y cols. 1998, Armes y cols. 1998). Ambas características en los tumores esporádicos se han relacionado con un peor pronóstico. Sin embargo, en algunos estudios se ha encontrado una mayor frecuencia del tipo histológico medular o medular atípico, (Johannsson y cols. 1997, Marcus y cols. 1996, Armes y cols. 1998, Lakhani y cols. 1998) subtipo histológico que en pacientes con cáncer de mama esporádico, se ha relacionado con un mejor pronóstico. El aumento del infiltrado linfocitario

típico de los tumores medulares, se ha pensado que podría reflejar una respuesta agresiva por el sistema inmune, que podría influir favorablemente en el pronóstico.

Respecto a *BRCA2* se han realizado muchos menos estudios, y no se han encontrado características patológicas que los distingan de los tumores esporádicos de forma repetida y consistente. En algunos estudios se describe un menor grado histológico comparado con los controles (Lakhani y cols. 1998, Marcus y cols. 1997), y en otro se ha demostrado un grado histológico mayor (Agnarson y cols. 1998). La distribución de los tipos histológicos es semejante a los tumores de mama esporádicos. Sólo algún estudio sugiere que estos tumores relacionados con *BRCA2* presentan un mayor número de cánceres lobulares y túbulo-lobulares (Armes y cols. 1998, Marcus y cols. 1997). Respecto a los niveles de estrógeno y progesterona tampoco se ha encontrado diferencia de forma reiterada en los diferentes estudios. En un estudio se ha descrito unos niveles elevados de receptores de estrógenos y progesterona en las mujeres con mutación en *BRCA2* comparado con los controles (Agnarson y cols. 1998). Sin embargo, otro estudio que examinó el estado de los receptores hormonales no mostró diferencias entre las mujeres con mutación en *BRCA2* y los controles (Loman y cols. 1998).

Características moleculares

El inicio y la progresión del cáncer, se debe a una célula que adquiere una alteración genética específica, la expansión clonal de ésta célula y la aparición de sucesivas alteraciones genéticas. En el cáncer de mama, se pueden encontrar dos de las alteraciones moleculares más comunes: mutaciones en *p53* y amplificación del gen *erbB-2*. Estudios preclínicos sugieren que el gen *p53* jugaría un papel importante en la patogénesis de los tumores asociados a *BRCA* (Crook y cols. 1998, Phillips y cols. 1999).

Aunque existen unas características típicas de los tumores hereditarios debidos a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, estas evidencias no son exclusivas de estos cánceres, y de momento no se puede determinar si un tumor tendrá mutación en *BRCA1* o *BRCA2* exclusivamente por sus características clinico-patológicas, aunque si ofrecen una base importante para definir un grupo de riesgo.

Carcinoma de mama contralateral en pacientes con mutación en *BRCA1* y *BRCA2*

Las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama tienen una probabilidad del 10 al 13% de desarrollar cáncer de mama contralateral a los 15 años del diagnóstico.

Se conoce que el presentar una mutación en el gen *BRCA2* aumenta el riesgo de cáncer de mama contralateral, así como su aparición más precoz. A los 2 y 5 años del seguimiento se diagnostican un 4% y un 12% respectivamente, de cáncer de mama contralateral en las pacientes con mutación en *BRCA2*, versus 1% y 2% en las pacientes con cáncer de mama esporádico (Verhoog y cols. 1999, Robson y cols. 1998).

En el análisis realizado de 173 familias portadoras de mutación en *BRCA2*, por el Breast Cancer Linkage Consortium (1999), la probabilidad acumulada de presentar cáncer de mama contralateral hasta los 70 años es de 52.3%.

Carcinoma de ovario en pacientes con mutación en *BRCA1* y *BRCA2*

La mayoría de las familias con cáncer de ovario tienen mutación en *BRCA1*, y sólo una pequeña proporción se asocia a mutación en *BRCA2*.

La probabilidad de cáncer de ovario en familias con mutación en *BRCA1* es del 28 al 44% y en *BRCA2* del 27% (Easton y cols. 1995, Ford y cols. 1998).

El cáncer de ovario hereditario asociado a *BRCA1* suele aparecer a una edad más temprana que el cáncer de ovario no hereditario, de 10 a 15 años antes. El cáncer de ovario asociado a *BRCA2* se diagnostica en las mismas edades que el cáncer de ovario esporádico.

Pronóstico del cáncer de mama y ovario en portadores de mutaciones *BRCA1* y *BRCA2*

Cáncer de mama

Se han realizado algunos estudios para valorar el pronóstico de las mujeres con cáncer de mama y mutación en *BRCA1* o *BRCA2*. Unos han demostrado un aumento en la supervivencia de las pacientes con mutación en *BRCA1* comparado con los controles (Marcus y cols. 1996, Porter y cols. 1994). En otro estudio de mujeres con mutación en *BRCA1* se encontró un pronóstico significativamente peor (Ansquer y cols. 1998). Sin embargo, en la mayoría de estudios realizados no se encuentra una diferencia en el pronóstico de las mujeres con mutación en *BRCA1* o *BRCA2* respecto a los controles (Verhoog y cols. 1996, Robson y cols. 1998, Johannsson y cols. 1998, Gaffney y cols. 1998).

Cáncer de ovario

Muchos estudios han investigado la supervivencia de los pacientes con carcinoma de ovario hereditario, y los resultados son contradictorios. En un estudio, Rubin y cols. (1996), encuentran una supervivencia mediana de 77 meses en 43 pacientes con mutación en *BRCA1*, comparado con una supervivencia de 29 meses para el grupo control

apareado por la edad y el estadio. Ningún otro estudio ha encontrado diferencias significativas. Este estudio ha sido criticado por las posibles diferencias existentes en los tratamientos administrados. Un estudio reciente (Pharoah y cols. 1999) ha encontrado lo contrario, los casos de cáncer de ovario con sospecha de ser hereditarios (no confirmados con la existencia de mutación) tienen un pronóstico peor. En otro estudio (Johannsson y cols. 1998), 38 pacientes con mutación en *BRCA1* tienen un pronóstico similar (apareadas por la edad y el estadio) durante los primeros dos años y medio, pero después la supervivencia es peor.

Aunque en *BRCA2* este aspecto está menos estudiado, algunos datos apuntan a un mejor pronóstico de los cánceres de ovario con mutación en *BRCA2* (Ben-David y cols. 2002).

4. PREVALENCIA Y PENETRANCIA DE LAS MUTACIONES *BRCA1* Y *BRCA2*

Prevalencia

Se han realizado muchos estudios encaminados a analizar la contribución de las mutaciones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* al cáncer de mama y ovario. Muchos de estos estudios se han realizado con familias muy seleccionadas, familias que tenían una gran carga genética, con casos de cáncer de ovario y aparición temprana del tumor, que no eran representativas de las familias que habitualmente se encuentran en la clínica (Easton y cols. 1995, Tonin y cols. 1995, Easton y cols. 1997, Ford y cols. 1998). La prevalencia de las mutaciones encontradas en los distintos estudios varía mucho en función de la muestra seleccionada. Para familias con una mayor carga genética la prevalencia de mutaciones localizada es muy alta, llegando a más del 80%. Sin embargo, trabajos realizados en familias con una historia familiar menos extensa encuentran tasas de prevalencia mucho menores (Szabo y cols. 1997, Serova y cols. 1997,

Schubert y cols. 1997, Ford y cols. 1998, Malone y cols. 1998, Papelard y cols. 2000).

La contribución de ambos genes al cáncer de mama es similar en los casos de familias con cáncer de mama sin cáncer de ovario ni casos de varones con cáncer de mama en la familia; sin embargo en las familias donde aparecen cánceres de ovario las mutaciones en *BRCA1* son superiores a *BRCA2*. La prevalencia de las mutaciones encontradas en el gen *BRCA1* en familias con cáncer de mama y ovario, también varía en función del número de mujeres afectas en la familia. En la bibliografía encontramos valores que van desde el 80% de familias con mutación en el gen *BRCA1*, en aquellas con más miembros afectados (Easton y cols. 1993, Narod y cols. 1995), hasta un 45% en familias con menor carga genética (Serova y cols. 1997, Couch y cols. 1997, Shattuck-Eidens y cols. 1997). Estos datos reflejan que una gran mayoría de las familias con cáncer de mama y ovario se deben a mutaciones en *BRCA1*, siendo la contribución de *BRCA1* muy superior a *BRCA2*. Por otra parte, en núcleos familiares donde además de una asociación al cáncer de mama se dan casos de cáncer de mama en varones, la prevalencia de las mutaciones en el gen *BRCA2* es superior a la de *BRCA1* (Couch y cols. 1996, Friedman y cols. 1997).

Mutaciones en estos dos genes aparecen en una muy baja proporción entre la población general y únicamente algunas mutaciones de origen endogámico poseen una representación mayor en sus poblaciones respectivas (Ford y cols. 1995, Roa y cols. 1996).

Como ya se ha mencionado, la aparición precoz del tumor es una de las características clínicas de los cánceres producidos por estos genes. Por ejemplo, en un estudio realizado en población inglesa con cáncer de mama precoz (Peto y cols. 1999), un 6.3% de las mujeres menores de 36 años con cáncer de mama presentaban mutación en alguno de los dos genes (3.9% en *BRCA1* y 2.4% en *BRCA2*). Entre mujeres con cáncer de

mama diagnosticadas entre los 35 y los 45 años, el 4.1% tenían mutaciones (1.9% en *BRCA1* y 2.2 % en *BRCA2*). Como se observa en estos datos la contribución de los dos genes al cáncer de mama precoz es muy similar. En otro trabajo publicado de la población del sur de Suecia, la frecuencia de las mutaciones que truncaban la proteína, en mujeres con cáncer de mama precoz no seleccionadas por la historia familiar era del 6.8% (Loman y cols. 2001). Se han publicado trabajos similares en diferentes poblaciones (Turquía, Italia, China...) examinando la asociación de mutaciones *BRCA* con cáncer de mama (Tabla 2). Dependiendo de la población y de los criterios de selección, la prevalencia de las mutaciones y la distribución de éstas entre los dos genes es diferente.

Tabla 2. Trabajos más relevantes publicados en diferentes poblaciones con cáncer de mama precoz.

Autor	Población	Nº casos	Edad (años)	Mutaciones <i>BRCA1</i>	Mutaciones <i>BRCA2</i>
Fitzgrald	Boston	30	< 30	13%	-
Langston	Washington	80	< 35	7.5%	-
Abelovich	Ashkenazis	43	< 40	23.3%	7%
Peto	U.K.	254, 363	<36, 36-45	3.5, 1.9%	2.4, 2.2%
Southey	Australia	91	< 40	3.8%	-
Malone	Washington	203	< 35	5.9%	3.4%
Pharoah	U.K.	1435	< 55	0.7%	1.3%
Loman	Suecia	234	< 41	6.8%	2.1%
Yacizi	Turquía	52	< 50	3.8%	1.9%
Turchetti	Italia	40	< 35	15%	-
Sng	China	76	< 40	8.6%	-
Diez	España	159	< 40	1.3%	-
De la Hoya	España	36	< 45	0%	-
De Sanjose	España	136	<46	0.7%	5.8%

En población española apenas existen trabajos en relación con el cáncer de mama precoz. Un análisis del gen *BRCA1* en una muestra de 159 mujeres con cáncer de mama precoz, únicamente detectó dos mutaciones, lo que constituye el 1.3% (Diez y cols. 1999). Por otra parte de la Hoya y cols. (2001) no encontraron ninguna mutación en el gen *BRCA1* en 36 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama u ovario antes de los 45 años. En un trabajo sobre la prevalencia de *BRCA1* y *BRCA2* en mujeres jóvenes (menores de 46 años) del área de Gerona y Tarragona, se describe un 6.6% de mutaciones en *BRCA* (0.7% en *BRCA1* y 5.8% en *BRCA2*) (de Sanjose y cols. 2003).

En general, no existen mutaciones con una prevalencia muy superior al resto, esto sólo se da en casos muy concretos de poblaciones endogámicas debido a mutaciones con un efecto fundador. Concretamente 3 mutaciones características de los Judíos Ashkenazis, dos en *BRCA1* (185delAG y 5382insC), y una en *BRCA2* (6174delT), aparecen en una proporción mayor del 2% entre esta población (Struewing y cols. 1995, Oddoux y cols. 1996, Roa y cols. 1996). Se han descrito otros casos de mutaciones recurrentes en otros países del mundo, como en Alemania (mutación 2080delAA en *BRCA1*) (Peelen y cols. 1997), Islandia (mutación 995delA en *BRCA2*) (Thorlaciús y cols. 1997), Noruega (mutaciones 1675delA y 1135insA en el gen *BRCA1*) (Borg y cols. 1999) y España (mutación 9254del5 en *BRCA2* y R71G en *BRCA1*) (Diez y cols. 2003, Vega y cols. 2002, Llort y cols. 2002).

Las mutaciones en *BRCA 1* y *BRCA2* aparecen en una muy baja proporción entre la población general sin cáncer de mama (Armstrong y cols. 2002).

Penetrancia

En algunos de los estudios de mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2*, la penetrancia de estas mutaciones fue sobrestimada ya que los cálculos se hicieron a partir de familias de muy alto riesgo donde muy probablemente otros factores estén jugando un papel importante. Estas estimaciones calculaban que para portadoras de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* el riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida es del 85%, y el de padecer cáncer de ovario de un 40%-60% en portadoras de *BRCA1*, y de un 10%-20% para portadoras *BRCA2* (Easton y cols. 1993, Ford y cols. 1994, Easton y cols. 1995, Tonin y cols. 1995, Easton y cols. 1997, Ford y cols. 1998). El riesgo de padecer cáncer de mama se incrementa con la edad (Serova y cols. 1997, Struewing y cols. 1997).

Más conservadores aún son los datos que se han obtenido de estudios de mujeres judías Ashkenazi no seleccionadas por su historia familiar, donde se ha estimado una penetrancia del 36% para mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* en mujeres menores de 30 años (Claus y cols. 1991) y aproximadamente del 5-11% en mujeres menores de 40 años (Ford y cols. 1995). Este trabajo sugiere que la penetrancia de las mutaciones *BRCA1* y *BRCA2* podría ser algo menor de lo calculado previamente en familias de alto riesgo, aunque mutaciones diferentes a las de estas poblaciones endogámicas pueden conferir un riesgo distinto a la enfermedad.

La frecuencia de mutaciones a medida que aumenta la edad disminuye drásticamente, ya que la proporción de carcinoma de mama en la población general debido a una herencia autosómica dominante es de 2.2% entre los 40-49 años y 1.1% entre los 50-70 años (Ford y cols. 1998).

En conclusión, podríamos decir que en pacientes con mutación *BRCA*, el riesgo de desarrollar cáncer de mama es del 50 al 70%, de 4-6 veces mayor que en la población general; y el de desarrollar cáncer de

ovario del 20 al 40%, que es de 10-20 veces superior a la población general (Brose y cols. 2002).

5. VALORACIÓN DE LA PROBABILIDAD DE DETECTAR MUTACIÓN *BRCA*. DIAGNÓSTICO GENÉTICO

La proporción de cáncer de mama debido a alteraciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* es muy baja, y el cribado de mutaciones muy costoso, por lo que es necesario disponer de un buen criterio para una correcta selección de las pacientes a las que se realizará el estudio. Son fundamentales estudios que ayuden a establecer mejor los grupos de riesgo para conseguir una óptima relación entre las ventajas que supone el diagnóstico genético y las actuales limitaciones técnicas para su elaboración.

Hoy en día, en las familias con un número importante de casos de cáncer de mama, familias en las que aparece el cáncer de mama combinado con casos de cáncer de ovario, familias con algún varón afecto de cáncer de mama, o familias de origen judío, es en las que se está realizando un cribado de mutaciones con un fin diagnóstico. Es en este grupo en el que, se ha encontrado una prevalencia mayor de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

En las familias con un riesgo moderado, no parece haber una asociación tan clara con *BRCA1* y *BRCA2* sino más bien, parece que la enfermedad en estos casos es debida a la combinación de varios factores genéticos de baja penetrancia actuando simultáneamente y/o factores ambientales (Nathanson y Weber. 2001, Pharoah y cols. 2002).

Un seguimiento de estas pacientes con mutación en *BRCA* nos va a permitir la detección temprana del cáncer, lo cual es fundamental para

aumentar la supervivencia. Por tanto, es importante el estudio de familiares cuando se produce la detección de una alteración presuntamente patogénica en una paciente de una familia, con el fin de localizar los familiares portadores y descartar los no portadores.

Un problema importante que se plantea a la hora de realizar el informe a los pacientes, es como tratar las variantes génicas que no truncan la proteína pero provocan cambios en ésta con consecuencias desconocidas. El hecho de que una determinada mutación esté localizada en un residuo conservado de la proteína, cosegrege con la enfermedad en la familia, no se encuentre en población general, suponga un cambio brusco de aminoácido y se encuentre pérdida de heterocigosidad para el gen en el tumor, son algunos de los indicios que pueden reflejar la importancia de una alteración de este tipo (Deffenbaugh y cols. 2002).

Respecto a la interpretación de un resultado positivo (identificación de una mutación) depende del tipo de mutación, si ha sido encontrada en familias con cáncer de mama/ovario, y de si ha sido encontrada en la población general no afecta de cáncer de mama. Si una paciente con cáncer de mama/ovario es portadora de una mutación el riesgo de desarrollar la enfermedad se incrementa según el número de familiares que también son portadores de la mutación. La presencia de mutación indica una probabilidad mayor (pero no cierta) de desarrollar cáncer de mama u ovario. La ausencia de mutación en *BRCA1* y *BRCA2* no reduce el riesgo de desarrollar cáncer de mama o de ovario esporádico a lo largo de su vida.

En familias donde una mutación todavía no ha sido identificada, un resultado negativo puede significar que el cáncer no es hereditario, las técnicas del laboratorio no son las adecuadas, o que el gen mutado es diferente a *BRCA1* o *BRCA2*.

Respecto a las estrategias y métodos para llevar a cabo el cribado de mutaciones: Single Strand Conformation Polimorphims (SSCP), Denature Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Protein truncation test (PTT), secuenciación directa, Southern Blot... Todas ellas tienen sus ventajas e inconvenientes, pero ninguna es efectiva al 100%. El uso de cualquiera de estas técnicas ya sea en solitario o combinadas, no asegura la detección de todas las mutaciones. Hay mutaciones que se localizan en regiones no codificantes y debido a que estas zonas intrónicas no son normalmente analizadas en su totalidad, estas mutaciones escapan del cribado. Por otra parte, para la detección de grandes reordenamientos debe utilizarse una estrategia basada en Southern Blot o PCR largo, técnicas que también tienen sus limitaciones. En conclusión, un resultado negativo en la búsqueda de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* no asegura la ausencia de mutaciones, y este dato es importante que sea conocido por la paciente a la que se realiza el estudio.

Las mujeres suelen sobreestimar su riesgo de padecer cáncer de mama o cáncer de ovario, por lo que se debe realizar una valoración correcta del riesgo en las familias con varios miembros afectados. Hoy en día, cada mujer presenta un riesgo del 12.5% de padecer cáncer de mama a lo largo de su vida, y un 1.5% de riesgo de padecer cáncer de ovario (Jemal y cols. 2004).

Los dos factores de riesgo más importantes para desarrollar un cáncer de mama/ovario son la edad y la historia familiar. Tener un familiar de primer o segundo grado con cáncer de mama, puede significar un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Hoskins y cols. 1995).

Existen dos modelos muy conocidos para estimar el riesgo de padecer cáncer de mama. Son los modelos de Gail y de Claus. Ambos se utilizan para calcular el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

El **modelo de Gail** utiliza cinco variables para calcular el riesgo: la edad al diagnóstico, edad del primer embarazo, edad de la menarquia, número de familiares de primer grado con cáncer de mama, y número de biopsias de mama realizadas. Con estas variables se calcula el riesgo específico por edad. El modelo de Gail no valora bien el riesgo en todos los casos ya que no considera la presencia de cáncer de mama en los familiares de segundo grado, y tampoco tiene en cuenta la presencia de cáncer de ovario en la familia (Gail y cols. 1989).

El **modelo de Claus** se podría aplicar mejor a las mujeres con cáncer de mama hereditario porque se basa en la historia familiar de cáncer de mama, teniendo en cuenta la edad al diagnóstico. También considera la edad en que los familiares son diagnosticados de cáncer. Tampoco tiene en cuenta la historia familiar de cáncer de ovario (Claus y cols. 1991).

Ambos modelos infraestiman el riesgo individual de cáncer de mama en familias portadoras de mutación *BRCA*, mientras sobreestiman el riesgo en no portadoras. Sin embargo, otros modelos han sido estudiados para estimar la probabilidad de que una mujer concreta sea portadora de mutación en *BRCA1* o en *BRCA2*, los más utilizados son los modelos de Couch, Frank y el *BRCA*PRO. En España se ha desarrollado un modelo probabilístico en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

El modelo de Couch

El modelo de Couch se basa en la edad media del cáncer de mama en la familia de la probando (Couch y cols. 1997). Otros factores que se introducen son la historia familiar de cáncer de mama sólo o de

cáncer de mama y ovario. El problema respecto a este modelo es que se realizó con una media de casos en las familias de 3.5, la muestra seleccionada se basa en un número relativamente pequeño de familias (164 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama), sólo se escogieron mujeres caucásicas (se excluyen por tanto las mujeres de origen Ashkenazi), y sólo predicen las mutaciones en *BRCA1*. Detecta mutación en *BRCA1* sólo en el 16% de las mujeres con historia familiar de cáncer de mama, y en el 7% de las familias con historia de cáncer de mama. La mutación en *BRCA1* no se asocia con la presencia de cáncer de mama bilateral ni con el número de familiares afectados. Este modelo estima la probabilidad de encontrar una mutación en una familia con al menos dos casos de cáncer de mama.

El modelo de Frank

El modelo de Frank, coordinado por Myriad Genetics, estima la probabilidad de que una mujer con cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años, sea portadora de mutación en *BRCA1* o en *BRCA2* basándose exclusivamente en la historia familiar. Este modelo se desarrolló a partir de una muestra de 238 mujeres con cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años, o con cáncer de ovario, y al menos un familiar de 1° o 2° grado. Es útil para predecir la probabilidad de encontrar una mutación en una familia, determinando el grado de relación con la probando. Así, los familiares de primer grado no afectados tienen la mitad de probabilidad de padecer cáncer de mama, respecto al familiar afecto; los familiares de segundo grado tienen un 25% de probabilidad, etc (Frank y cols. 1998). Este modelo es más aplicable a familias con varias mujeres diagnosticadas de cáncer de mama antes de los 50 años o con cáncer de ovario a cualquier edad, excluyendo a las mujeres con cáncer de mama diagnosticadas después de los 50 años.

El modelo *BRCAPRO*

Este modelo se desarrolló por Berry y Parmigiani (Berry y cols. 1997, Euthus y cols. 2002). Utiliza un método matemático probabilístico basado en la herencia mendeliana y aplica las bases del teorema de Bayes. Estima la probabilidad individual de ser portador de una mutación en *BRCA1* o *BRCA2*, según la historia familiar. Este modelo se basa en la edad y la incidencia acumulada de cáncer de mama y ovario en pacientes portadoras de mutación *BRCA*, comparado con la incidencia en las pacientes no portadoras. El cálculo de la probabilidad final incorpora la edad y la información de la historia familiar de cáncer de los familiares de 1° y 2° orden, según la herencia Mendeliana de los genes autosómicos dominantes. La limitación de este estudio se debe a la que muestra seleccionada se compone de mujeres con una importante historia familiar de cáncer de mama y de ovario. Por tanto, este modelo predice de forma correcta cuando cuando la familia estudiada tiene un alto riesgo de presenta mutación en *BRCA1* o *BRCA2*.

El modelo de la Hoya (Hospital Clínico San Carlos de Madrid)

Estima la probabilidad de presentar mutación en *BRCA1* o *BRCA2* mediante el desarrollo de una regresión logística. Se seleccionaron 102 familias españolas con al menos 3 casos de cáncer de mama y/o cáncer de ovario (con al menos uno diagnosticado antes de los 50 años). Este modelo tiene en cuenta el número de casos de cáncer de ovario, la existencia de cáncer de mama y ovario en una misma persona, la presencia de cáncer de mama bilateral, el cáncer de mama en varones y la edad media del diagnóstico de cáncer de mama. Los autores estiman que su valor predictivo positivo es de 77.4% y el valor predictivo negativo de 79% (de la Hoya y cols. 2002).

Ningún modelo matemático, ha sido convenientemente validado. Por tanto, muchos especialistas en cáncer familiar optan por definir criterios de riesgo para la recomendación del análisis genético. A este respecto la literatura de estos últimos años demuestra que no existe consenso para definir criterios de riesgo de cáncer de mama hereditario.

6. MEDIDAS PROFILÁCTICAS Y TERAPEÚTICAS EN PACIENTES CON MUTACIÓN EN LOS GENES *BRCA*

La mastectomía bilateral profiláctica disminuye claramente el riesgo de cáncer de mama en portadoras de mutación *BRCA1* o *BRCA2*. En una revisión del hospital "Clínica Mayo" (Hartmann y cols. 1999), estudiaron 214 mujeres con historia familiar de alto riesgo de cáncer de mama; con una mediana de seguimiento de 14 años, encontraron un 90% de reducción del riesgo de cáncer de mama en las mujeres que se realizaron mastectomía, respecto a sus hermanas que no se realizaron mastectomía. Estos datos han sido confirmados en mujeres con mutación *BRCA*. Hartmann y cols (2001) realizaron el análisis genético en 176 muestras de las 214 pacientes de alto riesgo. 26 mujeres presentaban mutación en *BRCA*. Ninguna de las 26 mujeres desarrollaron cáncer de mama después de la mastectomía bilateral profiláctica, con una disminución del riesgo entre el 89.5% y el 100%. En el estudio realizado por Meijers-Heijboer y cols (2001), prospectivo, de 139 mujeres con mutación patológica en *BRCA1* o *BRCA2*, se analizaron dos grupos: de 76 mujeres a las que se realizó mastectomía profiláctica, ninguna presentó cáncer de mama; sin embargo, entre 63 mujeres a las que se realizó seguimiento, se detectaron 8 tumores de mama.

A pesar del beneficio obtenido con la mastectomía y la disminución en la preocupación de desarrollar cáncer de mama, la decisión debe realizarse cuidadosamente y de forma individualizada, considerando la

esperanza de vida y los efectos psicológicos en cada paciente (Frost y cols. 2000, Levine y Gemignani. 2003). Otra opción en determinadas pacientes puede ser el seguimiento intensivo (exámen físico, mamografía, ecografía, resonancia magnética), aunque esto no ha sido comparado con la mastectomía profiláctica en ensayos randomizados.

Respecto a la ooforectomía profiláctica, se han realizado dos estudio que han validado la recomendación de la ooforectomía, en las pacientes que presentan mutación *BRCA1* o *BRCA2*. Rebbeck y cols, (2002) siguieron a 259 mujeres con mutación *BRCA* en las que se realizó ooforectomía profiláctica. En el momento del procedimiento se detectaron 6 (2.3%) casos de cáncer de ovario estadio I, y durante el seguimiento se detectaron dos casos de cáncer peritoneal primario a los 3.8 y 8.6 años. En el grupo control se diagnosticaron 58 mujeres con cáncer de ovario con una mediana de seguimiento de 9 años. La reducción del riesgo de cáncer de ovario entre las mujeres en las que se realizó ooforectomía fue de 96% y el riesgo de cáncer de mama se redujo un 53%. En el otro estudio, Kauff y cols (2002), siguieron a 98 pacientes en las que se realizó una salpingo-ooforectomía bilateral profiláctica. Tras 24.2 meses de seguimiento mediano se diagnosticó un cancer peritoneal primario, mientras que en el grupo control se detectaron 5 casos de cáncer de ovario o peritoneal, resultando una reducción del riesgo del 85% para el cáncer de ovario y del 70% en el desarrollo de cáncer de mama.

La incidencia de cáncer ginecológico oculto entre las mujeres que eligieron ooforectomía profiláctica, fue entre 2-4% de cáncer de ovario en estadio precoz (Colgan y cols. 2001, Agoff y cols. 2002).

La ooforectomía (vía laparoscópica) es una opción para reducir el riesgo de cáncer de mama en las mujeres que no desean mastectomía profiláctica.

Respecto a los agentes quimiopreventivos, el tamoxifeno ha demostrado disminución del riesgo de cáncer de mama contralateral. Narod y cols. (2000) comprobaron que el tamoxifeno disminuye un 50% el riesgo de cáncer de mama contralateral en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y mutación *BRCA1* o *BRCA2*. El efecto protector del tamoxifeno no persiste más de 10 años, a diferencia de la ooforectomía que persiste durante toda la vida.

Hoy en día, no se recomienda una terapéutica diferente en las pacientes que tienen cáncer de mama con mutación *BRCA* respecto al cáncer de mama esporádico.

Por tanto, en las pacientes con mutación *BRCA* se debe realizar un screening de cáncer de mama y cáncer de ovario, de forma más precoz e intensivo que en el resto de las mujeres, y valorar las medidas profilácticas (mastectomía/ooforectomía) aconsejables en cada caso de forma individualizada.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Las mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* suelen aparecer en familias con antecedentes de cáncer de mama o cáncer de ovario, pero existen otros factores como la aparición de cáncer de mama en mujeres jóvenes, que también se ha relacionado con mutaciones en estos genes. Los estudios realizados en diferentes poblaciones han demostrado una baja incidencia de cáncer de mama familiar asociado a estos genes, y la proporción es diferente en cada una de las poblaciones del mundo.

Para que un gen supresor desarrolle un tumor se tienen que producir mutaciones en los dos alelos heredados. Según la teoría de los dos hitos de Knudson, la edad precoz explicaría la aparición de cáncer hereditario de mama/ovario, ya que el primer hito sería la mutación heredada a nivel de la línea germinal, y la segunda mutación sería adquirida a lo largo de los años.

La hipótesis de este trabajo es, que la prevalencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* puede ser mayor en pacientes jóvenes con cáncer de mama, porque según la teoría de Knudson, el desarrollo del segundo hito sería de forma precoz, ya que la primera mutación ha sido heredada.

La estimación de la prevalencia de mutaciones en estos genes en pacientes jóvenes, distribuidas en diferentes grupos según su historia familiar, permitirá establecer mejor los criterios de riesgo en nuestra población.

Este tipo de análisis permitirá conocer como se distribuyen las mutaciones en estos dos genes, y dentro de cada gen, identificar las mutaciones prevalentes en nuestra población, por lo que se facilitará el análisis posterior.

La asociación de las mutaciones con las características clínico-patológicas del tumor podría ayudar a reconocer los tumores debidos a estas mutaciones, y así indicar a qué pacientes se debería realizar el análisis de estos genes.

Objetivos concretos:

1. Determinar la prevalencia de mutaciones *BRCA1* y *BRCA2* en las mujeres menores de 41 años diagnosticadas de cáncer de mama en el Hospital Clínico Universitario de Valencia.

2. Estimar la frecuencia de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en mujeres menores de 41 años con cáncer de mama, estratificadas en función de sus antecedentes familiares de cáncer de mama u ovario.

3. Estudiar si existen otros tumores (excluidos el cáncer de mama y de ovario) más frecuentes en los familiares de las pacientes con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, en relación con los casos de cáncer de mama esporádicos.

4. Estudiar las características clínico-patológicas del cáncer de mama en pacientes menores de 41 años, comparando los casos esporádicos y los debidos a mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

5. Conocer la utilidad en nuestra población de los modelos, ya conocidos, capaces de predecir la probabilidad de mutación en *BRCA1* y *BRCA2* (el modelo de Couch, el modelo de Frank, el modelo *BRCAPRO* y el modelo de la Hoya).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES: TT-SSCP

El método TT-SSCP (Gradiente temporal de temperatura en polimorfismo de conformación de cadena sencilla) está basado en la utilización de diferentes temperaturas en cada electroforesis. La temperatura se va variando a medida que avanzan los fragmentos de simple cadena en la electroforesis y a cada temperatura distinta pueden aparecer nuevas conformaciones, con lo que será más fácil diferenciar dos cadenas distintas.

La optimización del sistema TT-SSCP para el cribado de mutaciones requería de mutaciones ya identificadas que pudiesen testarse mediante este método, comprobando la eficacia y rapidez del mismo. Cuarenta y dos variantes en el gen del receptor de la LDL previamente detectadas en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Citológicas, en pacientes con hipercolesterolemia familiar (Chaves y cols. 2001; García-García y cols. 2001) fueron utilizadas con este fin. El ADN del resto de probandos con hipercolesterolemia familiar, en los cuales no habían sido previamente identificadas variaciones en el gen del receptor de la LDL mediante los SSCP tradicionales, fue testado mediante TT-SSCP con el fin de verificar si este sistema era capaz de detectar nuevas mutaciones que hubiesen escapado a los SSCP tradicionales.

El ADN de las muestras con variantes génicas fue amplificado mediante multiplexes de la misma manera que se procedía en el análisis mediante los SSCP tradicionales. Las condiciones de electroforesis, cubetas utilizadas, sistemas de tinción, fotografía y secado de geles son los mismos

que los descritos en el apartado de estudio de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Las condiciones de amplificación aparecen resumidas en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de amplificación para las reacciones multiplex.

REACCIÓN PARA 50µl	
<i>OLIGONUCLEÓTIDO</i>	3 µl (10µM)*
<i>dNTPs</i>	1.5 µl (25µM)
<i>Cl₂Mg</i>	1.5 µl (2.5µM)
<i>TAMPÓN</i>	5 (10X)
<i>H₂O</i>	Hasta 50
<i>Enzima Taq Polimerasa</i>	1 unidad
Se alicuota en volúmenes de 12.5 µl y se añade unos 20ng de ADN.	

Temp.	Tiempo	Ciclos
94°	120 Seg.	1
94°	30 Seg.	40
TH ⁺	30 Seg.	
72°	45 Seg.	
72°	300 Seg.	1

+TH Temperatura de hibridación del cebador

* El volumen de cada uno de los cebadores para las reacciones multiplexes varía entre 1 y 3 µl. Con el fin de favorecer las amplificaciones de mayor tamaño en una reacción de PCR conjunta, se incrementaba el volumen de cebadores que amplificaban los fragmentos mayores. Para el resto de reacciones se utilizó un volumen de 2.5 µl.

Los oligonucleótidos usados así como la distribución de los diferentes exones en los distintos multiplexes aparecen reflejados en la tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para la amplificación de los diferentes multiplexes.

FRAGMENTO	NOMBRE	tamaño	MULTIPLEX	OLIGONUCLEÓTIDOS
Prom-E1	FH-39 I-E1-3'	338	A	GAGTGGGAATCAGAGCCTCACGGG CTGGCGCCTGGAGCAAGC
E2	I-E2-5' FH-24	215	B	CGTGGTCAGTTTCTGATTCTGGCG AAAATAAATGCATATCATGCCCAA
E3	I-E3-5' I-E3-3'	227	B	TGCGCCTCAGTGGGTCTTTC ACTCCCCAGGACTCAGATAGGC
E4A	I-E4A-5' I-E4A-3'	256	A	ACTGCGGCAGCGTCCCCGGC GGATGCAGGTGGAGCTGTTC
E4B	IE4B-5 I-E4B-3'	304	C	ACCTGTGGTCCCCGCCAGC CCAGGGACAGGTGATAGGACG
E5	I-E5-5' I-E5-3'	241	C	GGCCCTGCTGTTTTCTCTGG AGCAGCAAGGCACAGAGAATGG
E6	I-E6-5' I-E6-3'	232	A	ACGAAACTGAGGCTCAGACACACC GCTCCCCACAACTCTGCAAGC
E7	I-E7-5' I-E7-3'	212	C	AGAGTGACCAGTCTGCATCCCTGG TTGGTTGCCATGTCAGGAAGC
E8	I-E8-5' I-E8-3'	204	D	TCCCCACCAAGCCTCTTCTCTC CCACCCGCCGCCTTCC
E9	FH-43 FH-44	222	E	CCTGACCTCGCTCCCCGGACC GGCTGCAGGCAGGGGCGACG
E10	I-E10-5' FH-38	303	E	GCAGTGAGATGAGGGCTCCTCG AGCCCTCAGCGTCGTGGATACG
E11	I-E11-5B' FH-46	188	F	GCCCTCCAGCCTCACAGCTATTCTC TGGCTGGGACGGCTGTCTCTG
E12	I-E12-5' I-E12-3'	295	G	GGCCCTCAGGCCCTCTGG CCGAGTTTTCTGCGTTCATCTT
E13	I-E13-5' I-E13-3'	212	H	GTCATCTTCCTTGCTGCCTG CACAAGGAGGTTCAAGGTTGG
E14	I-E14-5' I-E14-3'	223	G	TCTCGTTCCTGCCCTGACTCC GACACAGGACGCAGAAACAAGG
E15	I-E15-5' I-E15-3C'	321	E	GGCACGTGGCACTCAGAAGACG AGTGAGGACGACACCTGGACTCC
E16	I-E16-5' I-E16-3'	188	H	CTCCATTCTTGGTGGCCTTCC CATAGCGGGAGGCTGTGACCTGG
E17	I-E17-5' I-E17-3'	228	D	GGCAGCTGTGTGACAGAGCG CATGGCTCTGGCTTCTAGAGAGG
E18	I-E18-5' I-E18-3'	293	F	CCTGAGTGCTGGACTGATAGTTC CAAGCCATTGCATGGGCACTGTC

El sistema TT-SSCP también fue optimizado para realizarse con el sistema semiautomático PhastSystem® de Pharmacia, utilizando minigeles de poliacrilamida no desnaturalizantes de tamaño 5cm x 5cm (PhastGeles T20 % de APB).

Las condiciones electroforéticas utilizadas en este caso fueron las siguientes.

Voltaje	Temperatura	Vh*
400	5°C	40
25	5°C	8
400	5°C	120
400	8°C	110
400	11°C	100
400	14°C	90
400	17°C	80
400	20°C	70

* Vh: Voltios/hora

La intensidad y los vatios fueron constantes a 5 mA y 1 W. En el primer paso, a 40 Vh la muestra aún no se ha aplicado, esto permite correr un tiempo el tampón y limpiar el gel, el segundo paso (8Vh) permite que las muestras entren muy lentamente mejorando el resultado final.

III.2.ESTUDIO DE LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2*

SELECCIÓN DE PACIENTES

Se ha realizado un estudio retrospectivo de pacientes con cáncer de mama del Servicio de Oncología Médica y Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia con el fin de identificar posibles candidatas para el presente estudio. El proyecto requería mujeres que hubieran manifestado cáncer de mama a edad temprana. Se reclutaron posibles candidatas con cáncer de mama, menores de 41 años, no

seleccionadas por su historia familiar, aunque tener familiares con cáncer de mama no era un criterio excluyente para este estudio.

Las pacientes fueron regularmente citadas para informarles del estudio y pedirles su colaboración y participación. Si la paciente accedía a participar en el estudio se le realizaba una encuesta sobre los antecedentes personales y familiares de cáncer, que complementaba a las características patológicas y al seguimiento a la que es sometida cada paciente en Consultas Externas del Hospital.

La construcción de una base de datos con las características clínicas, patológicas y epidemiológicas de cada paciente, permitió realizar estudios comparativos entre las pacientes a las que se detectó la mutación y las no portadoras de mutación.

En la base de datos de pacientes con cáncer de mama menores de 41 años, diagnosticadas entre los años 1989 y 1999 se obtuvieron 245 pacientes. Se realizó el estudio de mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* en 124 pacientes. Se excluyeron a 47 pacientes que habían fallecido previo a la realización de este estudio; 22 pacientes con progresión de enfermedad y dada su situación, no disponibles para realizar el estudio genético; 10 pacientes no localizadas, por realizar el seguimiento en hospitales más cercanos a su domicilio; 12 pacientes que no dieron su consentimiento, una vez informadas del estudio a realizar; 30 pacientes a las que se informó sobre el estudio y realizaron la entrevista sobre antecedentes familiares, pero posteriormente no acudieron a la extracción de sangre, al cambiar de opinión a participar en el estudio.

Las mujeres en el momento de la entrevista eran citadas para una extracción de sangre periférica con el fin de obtener su ADN y ARN a través de los linfocitos.

Con la intención de buscar en nuestra muestra, qué mujeres tienen un riesgo aumentado de presentar mutación en *BRCA1/BRCA2* se analizaron varios grupos:

- grupo de mujeres denominado "alto riesgo" frente al grupo de mujeres que no cumplen este criterio
- mujeres que presentan antecedentes de cáncer de mama/ovario en familiares de 1° grado respecto al resto del grupo de pacientes seleccionadas
- mujeres que presentan antecedentes de cáncer de mama/ovario en familiares de 1 y 2° grado respecto al resto del grupo de pacientes seleccionadas
- mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama/ovario (cualquier grado) frente al grupo de mujeres sin antecedentes familiares de cáncer de mama
- mujeres con dos o más familiares afectados de cáncer de mama/ovario
- mujeres con tres o más familiares afectados de cáncer de mama/ovario
- mujeres que presentan antecedentes de cáncer de ovario en la familia (independientemente del grado) respecto al resto del grupo de pacientes seleccionadas

Los criterios para incluir a una paciente en el subgrupo "**alto riesgo**" fueron los siguientes:

- 2 cánceres de mama en familiares de primer grado, uno diagnosticado antes de los 41 años
- 1 cáncer de mama antes de los 41 años y un cáncer de ovario en un familiar de 1° grado
- 1 cáncer de mama antes de los 41 años y un cáncer de mama en varón (independientemente del grado)

De entre las 124 mujeres seleccionadas 26 (21%) pertenecen a familias de alto riesgo; 47 (38%) tienen algún familiar afecto de cáncer de mama u ovario (aunque no cumplen los requisitos para considerarlas

como alto riesgo); 49 (39.5%) mujeres no tienen familiares afectos conocidos de cáncer de mama u ovario; y 2 (1.6%) mujeres no tienen historia familiar conocida ya que son adoptadas.

El grupo de mujeres con antecedentes de 1° grado, está constituido por aquellas que su madre/padre o hermanas/hermanos habían presentado cáncer de mama/ovario. El 20.6% de las pacientes tienen antecedentes de 1° grado con cáncer de mama/ovario.

Las mujeres con antecedentes de 1° y 2° grado, está constituido por aquellas que tienen antecedentes en padres/hermanos de cáncer de mama/ovario, y además, en 2° grado (abuelos/tíos). El 8.8% de las pacientes tienen antecedentes de 1° y 2° grado.

Otro grupo es el constituido por las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama/ovario, independientemente del grado. El 58.9% de las pacientes cumplen este criterio.

El 47.5% de las pacientes tiene antecedentes de dos o más familiares (de cualquier grado) con cáncer de mama. El 13% presentan tres o más familiares con cáncer de mama.

El 6.4% de las pacientes tienen antecedentes de cáncer de ovario en la familia (independientemente del grado).

Los familiares de las pacientes en las que fueron detectadas mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* fueron requeridos para el análisis genético de la alteración.

Se utilizó una colección de ADNs de cordones umbilicales para buscar algunas de las variantes encontradas en los genes *BRCA* en población general.

MÉTODOS

Extracción del material genético

Se extrajo una muestra de sangre periférica a las pacientes que fueron seleccionadas para el estudio con el fin de extraer ADN y ARN. Debido a que algunas de las pacientes estaban sometidas a quimioterapia el rendimiento de estas extracciones fue bajo. Tanto el ADN como el ARN se extrajo a partir de linfocitos de la muestra de sangre, para lo cual se lisaron los eritrocitos mediante choque osmótico en un tampón de lisis hipotónico (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, NaCl 10mM, MgCl 3mM) capaz de lisar los eritrocitos pero no el resto de componentes celulares. Tras una centrifugación a 10.000 rpm, la operación se repitió hasta obtener un pellet de linfocitos. Este pellet de linfocitos se cuantificó y se utilizaron en torno a 5×10^6 células para la extracción del ARN y el resto de las células para la extracción del ADN. Se estimó necesario este recuento de linfocitos con el fin de mantener una homogeneidad en las extracciones y evitar en parte el problema originado por la quimioterapia a la que eran sometidas algunas pacientes.

La extracción del ADN a partir de los linfocitos se realizó por el método de "salting out" (Miller SA y cols. 1988). Una vez extraído el ADN, fue cuantificado en un espectrofotómetro (Ultrospec III de LKB-Pharmacia) realizándose varias diluciones y cargado en un gel de agarosa al 0.6% (1 μ l de muestra junto con 2 μ l de tampón de carga y 4 μ l de H₂O bidestilada) con el fin de verificar su estado de degradación. Se diluyeron todas las muestras hasta llevarlas a una concentración de 50 ng/ μ l. De cada muestra se realizaron al menos 2 alícuotas, una de pequeño volumen para su uso que se almacenó a 4°C y varias que servían de stock y fueron congeladas a -70°C. Todas las muestras permanecen almacenadas en tubos estériles y en congeladores y neveras específicos para este uso.

Parte de los linfocitos se utilizaron para la extracción de ARN mediante el Kit RNeasy® de QUIAGEN. Con este kit obtuvimos aproximadamente 100µg de ARN total partiendo de unas 5 x 10⁶ células. El ARN fue inmediatamente congelado a -70°C.

Detección de mutaciones *BRCA1* y *BRCA2*

El análisis de estos genes se realizó mediante TT-SSCP. El TT-SSCP está basado en un gradiente de temperatura al que es sometida la electroforesis durante su migración, sometiendo las muestras a diferentes temperaturas mientras migran. Mediante este método conseguimos testar varias temperaturas en una sola electroforesis, incrementando considerablemente la eficacia para la detección de mutaciones.

Las amplificaciones de PCR se realizaron: 1- mediante fragmentos de tamaño estándar (pequeño); 2- mediante fragmentos de gran tamaño en exones grandes o donde varios exones se podían amplificar en un solo fragmento dada su cercana localización en el gen; 3- multiplexes de varios fragmentos simultáneamente.

Después de las amplificaciones, se procedió de la siguiente manera:

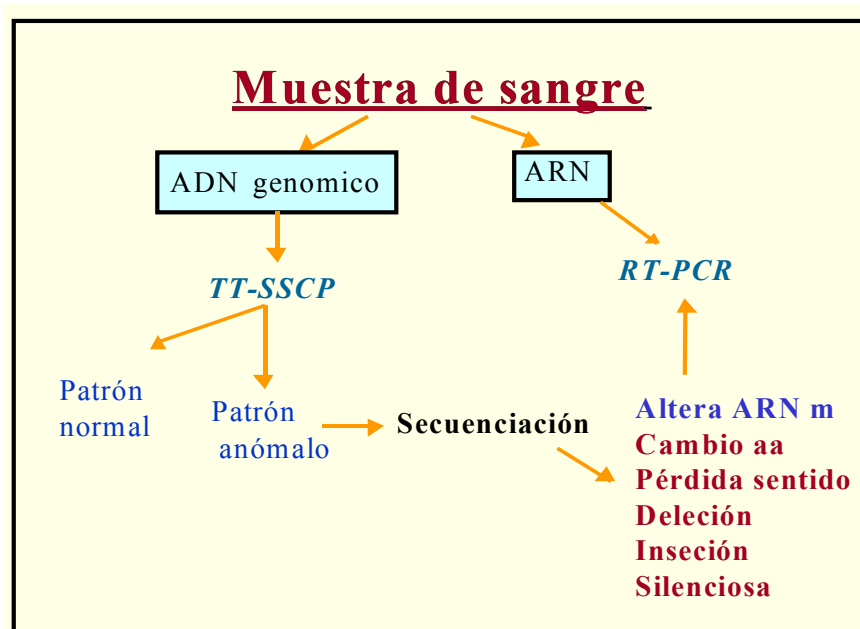
- los fragmentos de gran tamaño se digirieron con restrictasas que resuelven los amplificados en pequeños fragmentos de unos 300 a 400 pares de bases y cargados en la electroforesis (Barros y cols. 1997)
- los multiplexes se cargaron directamente en el gel de TT-SSCP
- los fragmentos de pequeño tamaño no incluidos en multiplexes se distribuyeron en distintos grupos y fueron cargados simultáneamente

Todos los fragmentos cargados en los geles se analizaron mediante TT-SSCP. Cuando se localizaba un patrón de migración anómalo, se caracterizaba la alteración mediante secuenciación directa. Los

fragmentos de gran tamaño eran secuenciados en su totalidad, sin embargo en los otros casos había que identificar primero a que fragmento correspondía la alteración amplificando y cargando cada fragmento del grupo por separado. Una vez localizada la mutación en un fragmento concreto se caracterizaba mediante secuenciación.

A los probandos con alteraciones localizadas en la secuencia consenso de "splicing" (ajuste) se les realizaba una RT-PCR con el fin de identificar si el procesado del ARN mensajero era anómalo. En el caso de que se encontrara una banda de tamaño no esperado ésta era secuenciada para caracterizar la alteración. La verificación de que cada uno de los alelos están siendo amplificados es importante en el caso en que una única banda del tamaño esperado apareciera en el RT-PCR. Un resumen de la estrategia seguida está representado en la figura 3.

Figura 3. Estrategia utilizada en el cribado de mutaciones de los genes BRCA1 y BRCA2.



Amplificaciones de PCR

Las amplificaciones por PCR fueron realizadas a partir de ADN genómico utilizando los siguientes reactivos:

Cebadores diseñados mediante el programa PC-GENE y sintetizados por GibcoBRL Life Technologies y Roche (Boehringer Mannheim). Los dNTPs utilizados en la síntesis fueron servidos por GibcoBRL Life Technologies. Se utilizó la Netzyme, de Need S.L., como enzima polimerasa termoestable. Todos los PCRs fueron realizados mediante tres posibles termocicladores: Progene de Techne, PTC-100 y PTC 150 de MJ Research. El volumen de reacción final para cada amplificación fue 12 μ l al que se le añadían unos 25 ng de ADN genómico.

La mayor parte de los exones de *BRCA1* fueron amplificados de forma individual en fragmentos de pequeño tamaño. El exón 11 fue amplificado en 4 fragmentos solapantes de entre 1000 y 1900 pares de bases. En el último fragmento del exón 11 se incluyó además el exón 12 ya que la región intrónica que los separa es de pequeño tamaño. En todos los casos, además del exón, se amplificaron unas 50 pares de bases de región intrónica a cada lado. Los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo las reacciones de PCR se describen en la tabla 5.

En el gen *BRCA2*, la mayor parte de los exones de menor tamaño fueron agrupados en 6 reacciones multiplex donde se distribuyeron los exones de la siguiente manera:

<i>Multiplex</i>	A	B	C	D	E	F
<i>Exones</i>	1+3+18	2+9	15+21	8+13+19	20+12+4+17	25+14

Los criterios para el diseño de los diferentes grupos de multiplex se realizaron teniendo en cuenta la compatibilidad entre los distintos oligonucleótidos (temperaturas de hibridación similares y que no hibridasen entre ellos) y los tamaños de los amplificadores (tamaños suficientemente parecidos para amplificarlos en un mismo programa pero suficientemente distintos para luego poder verificar la amplificación en un gel de agarosa).

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en el análisis del gen *BRCA1* (F:forward, R:reverse; TH: Temperatura de hibridación)

<i>EXON</i>	<i>SECUENCIA</i>	<i>TH</i>
1A F	CGTATTCTGAGA GGCTGCTG	58
1A R	TCTGTCA GCTTCGGA A ATCC	
1B F	GGATTTCCGA A GCTGACA GA	58
1B R	GCA TCTGTTA CTA CTGACGC	
2F	GA A A A TGA A GTTGTCAT	50
2R	GTCTTTTCTTCCCTAGTA TGT	
3F	A A CGA A CTTGA GGCCTTA TG	55
3R	TTGGA TTTTCGTTCTCACTT	
5F	GGCTCTTA A GGGCA GTTGTGA	55
5R	ATGGTTTTA TA GGA A CGCTA TG	
6F	TTTCTA CTGTTGCTGCATCT	55
6R	TA A TGTGCAA A CTTCTGAG	
7F	CACA A CAA A GA GCA TACA TAGG	58
7R	CATGGTGTCA A GTTTCTCTTCA GG	
8F	CATGGTGTCA A GTTTCTCTTCA GG	55
8R	A A TCCA GCA A TTA TTA TTA A A T A C	
9F	TGTCA A TCTTCTGTGCTC	55
9R	CTGA A TGA A TA TCTCTGGTTA G	
10F	TGGTCA GCTTTCTGTAA	55
10R	GTA A A GGTCCCA A A TGGTCTTCA G	
11A F	CCA A TCTGCTTTTA A TTCA CTCTTAGA GC	55
11A R	GTTGGGGA GGCTGCCTTCTCCG	
11B F	A CTCA CA TGA TGGGGA GTCTGATC	55
11B R	GTTGTA GGTTTCTGCTGTGCCTGA C	
11C F	A GCA GCA GTATA A GCA A TA TGGA A CTCG	55
11C R	A TCTA A GCA TA GCA TTCA A TTTTGGCCCTC	
11D12F	CTGGA CTCCA TTA CTCCA A A TAA A CA TGGA C	55
11D12R	GTGTA GGCTGTGTGTGCGC	
13F	A A TGGA A A GCTTCTCA A A GTA	55
13R	TGTTGGA GCTA GGTCTTAC	
14F	CTA A CCTGA A TTA TCA CTA TCA	55
14R	GTGTA TA A A TGCTGTATGCA	
15F	CAGA CTTCTA GGCTGTCTTGC	55
15R	GTGTTTGTTCCA A TA CAGCAG	
16F	A A TTCTTA A CAGA GACCA GA A C	55
16R	A A A A CTCTTCCA GA A TGTGT	
17F	GTGTA GA A CGTGCA GGA TTG	55
17R	TCGCCTCA TGTGGTTTTA	
18F	GGCTCTTGA GCTTCTTAGGAC	55
18R	CTCAGA CTCA A GCA TGA GC	
19F	CTGTCA A TCTTCTGTGCTC	55
19R	CTGA A TGA A TA TCTCTGGTTA G	
20F	A TA TGA CGTCTGTCCTCCAC	55
20R	AGTCTTACA A A A TGA A GCGG	
21F	GCA GCA GA A A TCA TCA GGTGGTG	55
21R	GTA GAGA A A TGA A TA GCCTCT	
22F	TCCCA TTGA GA GTCTTGCT	55
22R	GAGA A GACTTCTGAGGCTAC	
23F	CAGA GCA A GACCCTGTCTC	58
23R	A CTGTGCTA CTCA A GCA CCA GGT	
24F	GACA CTCA TACA A CCA GGA C	58
24R	GAGTGA GAGGA GCTCCCA	

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en el análisis del gen BRCA2.

EXON	SECUENCIA	TH
1F	TTCGCCACACTGAGAAAATACCCG	60
1R	CAGAGACAAAAGGGCAAGAAGCCG	
2F	AATCAGGAAGTCAGTTTGAATTTA	60
2R	TTGCTCCGTTTTAGTAGCAGTTAA	
3F	GATCTTAACTGTTCTGGGTCACA	60
3R	AAACGCAGTACACAATTAATGA	
4F	AGAATGCAAATTTATAACCAG	55
4R	AATCAGATTCATCTTTATAGAACAAA	
5, 6, 7 F	TGTGTTGGCATTTTAAACATCA	55
5, 6, 7 R	CAACCTCATCTGCTCTTTCTTG	
8F	GCCATACTTACCACCTTGTGA	55
8R	AGGTTTAGAGACTTTCTAAAGGC	
9F	ATAACTGAAATCACAAAAGTG	60
9R	CTGTAGTTCAACTAAACAGAGG	
10F	AACAGGAGAAGGGGTGACTGACC	60
10R	ATTTTCTCCATCTGGGCTCCATTTAGACC	
10BF	CAAATCAGAAGCCCTTTGAGAGTGG	60
10BR	ATGTACCCCGGAACCTAAAATAAACTGTC	
11AF	GAGATTACAGGCATGAGCCACTGTGCC	60
11AR	CTTTGATTATCTAATGCCAAGGTA	
11BF	CCAATTTCAAATCACAGTTTTGGAGGT	60
11BR	CGGGTTGTCCCTGGAAGGTCAC	
11CF	GTAAACACAAAATACTGAAAGAAAGTGTC	58
11CR	TTCAATACTGGCTCAATACCAGAAATCCAAG	
11DF	CTAACAGCTATTCTACCATTCTGATGAGG	62
11DR	CTCTGGGTTTCTCTTATCAACACGAGG	
11EF	TCTGGATTTAGTACAGCAAGTGGAAGC	56
11ER	GATTGGCAACACGAAAGGTAAAAATGAACAC	
12F	GTTAACATTTAAAGAGTCAATACTTTAGC	55
12R	CCACCTGAGGTCAGAATATTATATA	
13F	GCATCCGTTACATTCACTGAAA	55
13R	ACGGGAAGTGTTAACTTCTTAAC	
14F	GTTACCAGAATAGTATCACCATGTAGC	58
14R	TTTAAACAACGAAATATCTAACTGAAGGC	
15F	CCTGGCCAGGGGTTGTGC	60
15R	CACTCTGTCATAAAAGCCATCAGTATTGTA	
16F	TGGAAGAGGTACAGCAGACTGTGG	60
16R	AGTTAAGAGAAGAAAGAGGGATGAGGG	
17F	GAAATTATATTGTAGATCATATGAACTC	55
17R	CGTATATGATTACGTAATGTAATGC	
18F	CAGTTATTCAGTACTTGTTTAAACAGTGG	60
18R	GAATCAACGACTGATTTTACCAAGAGTGC	
19F	CTCTTATGATATCTGTAATAGA	55
19R	AGAAAGAAATATATGGTAAGTTTCAAG	
20F	GTGCCTGGCCTGATACAATTAAC	55
20R	GTTCTCATATTAGAAATAACAATGTGTAC	
21F	CCCTTCTTTGGGTGTTTTATGCTTGG	60
21R	CTTCTCACCTTGAATAATCATCAAGCCTC	
22, 23, 24F	AAAGCCATCTAGTTACAATAGATGGAACCTT	55
22, 23, 24R	ATTTGCAACTGGTAGCTCC	
25F	CCTGAGCTTTGCGCAAATTCAG	58
25R	AATACCAAAATGTGTGGTGATGCTG	
26F	GTCCCAAATTTTCAATTTCTGC	55
26R	GACCCACATAACAACCACA	
27F	TTAGGGGAGGGAGACTGTGTG	60
27R	AAGGTTAAGCGTCAATAATTTATTGTCGCC	

Tanto los exones 5, 6 y 7 como los exones 22, 23 y 24 se encuentran muy cercanos entre sí, debido a que están separados por una región intrónica muy pequeña, y se amplificaron simultáneamente en un único fragmento de PCR cada uno de los dos grupos de exones. Los restantes exones de pequeño tamaño se amplificaron individualmente. El exón 11 y el exón 10 tuvieron que ser amplificados en 5 y 2 fragmentos de PCR solapantes respectivamente, de entre 700 y 1500 pares de bases. Los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo las reacciones de PCR se describen en la tabla 6.

Las condiciones de amplificación tanto para los fragmentos de gran tamaño como para los menores aparecen resumidas en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de amplificación para BRCA1 y BRCA2.

<i>REACCIÓN PARA 50µl</i>	<i>(Concentración Final)</i>
<i>OLIGONUCLEÓTIDOS</i>	1-4 µl (10µM)*
<i>DNTPs</i>	1.5 µl (25µM)
<i>Cl₂Mg</i>	1.5 µl (2.5µM)
<i>TAMPÓN</i>	5 (10X)
<i>H₂O</i>	Hasta 50
<i>Enzima Taq Polimerasa</i>	1 unidad
Se alicuota en volúmenes de 12.5 µl y se añade unos 20ng de ADN.	

* El volumen de cada uno de los cebadores para las reacciones multiplex varían entre 1 y 4 µl. Con el fin de favorecer las amplificaciones de mayor tamaño en una reacción de PCR conjunta, se incrementaba el volumen de cebadores que amplificaban los fragmentos mayores. Para el resto de reacciones se utilizó un volumen de 2.5 µl.

PCR	Temp.	Tiempo	Ciclos	PCR	Temp	Tiempo	Ciclos
<u>PCR de pequeño tamaño y multiplexes</u>	94° C	120 Seg.	1	<u>PCR de gran tamaño</u>	94° C	20 Seg.	1
	94° C	30 Seg.	40		94° C	30 Seg.	40
	TH ⁺	30 Seg.			TH ⁺ C	30 Seg.	
	72° C	45 Seg.			70° C	120 Seg.	
	72° C	300 Seg.	1		70° C	300 Seg.	1

+ TH: Temperatura de hibridación de cada oligonucleotido. Las TH para cada una de las parejas de cebadores están reflejadas en las tablas 5 y 6.

La verificación de los productos de PCR de mayor tamaño se realizó en agarosa al 1% (Sigma- Aldrich Química S.A., Need S.L.). Los fragmentos menores se verificaron en 1.5-2% de agarosa y en la verificación de los multiplex se añadió agarosa de alta resolución (FMC). A 3 µl de muestra se le añadía 2µl de tampón de carga (2⁰/₀₀ Azul de bromofenol, 2⁰/₀₀ azul de xilencianol, 60% glicerol, 60 mM EDTA) y 5µl de H₂O. Los 10µl de muestra se cargaban en el gel y se corrían a un voltaje constante de 50 V. Los geles eran teñidos en tampón que contenía BrET y visualizados en un transiluminador de U.V. Las fotografías se realizaron con un sistema integrado de captación de imágenes Gel Printer Plus de TDI.

Digestión con restrictasas de los fragmentos de gran tamaño

Todos los fragmentos de PCR con un tamaño superior a 550 pb fueron digeridos con endonucleasas en fragmentos de entre 500 y 100 pares de bases. En algún caso se necesitó más de una enzima de restricción para conseguir que los productos de digestión tuviesen el tamaño buscado.

Las digestiones se realizaron en un volumen de 5 µl, de los cuales 2.5µl correspondían a los productos de PCR y la otra mitad a los reactivos

de la reacción. Dependiendo de la eficacia de cada enzima de restricción se utilizaban entre 1 y 2 unidades de enzima que se completaban con su tampón correspondiente y H₂O hasta 5 µl. Dado el pequeño volumen en que se realizan las digestiones es necesario añadir aceite mineral estéril que cubra el volumen de la reacción y evitar así la evaporación. Las digestiones se realizaron en un baño durante toda la noche a 37°C excepto para la enzima *ApoI* que trabaja a 50°C.

Análisis de SSCCPs en gradiente de temperatura: TT-SSCP

Un Microlitro de cada amplificado se diluía en 9 µl de tampón de desnaturalización (formamida 95%, 20mM EDTA, 0.05% azul bromofenol, 0.05% azul xilencianol). Algunos de los fragmentos amplificados individualmente se cargaron de forma conjunta guardando la proporción 1:9 con el tampón de desnaturalización. En las digestiones, donde la muestra ya aparecía diluida en la reacción de digestión, se guardó una proporción de 1:1 con el tampón de desnaturalización.

Los fragmentos que fueron amplificados de forma separada pero cargados en un mismo pocillo en la electroforesis fueron los siguientes:

BRCA1 : exones 2+10, 3+15+16, 5+13+14, 6+22, 8+24, 9+23,
17+18+19,20+21

BRCA2 : exones (27 digerido con *EcoRI*) + 26

Una vez llevada a cabo la mezcla con el tampón de desnaturalización, las muestras eran desnaturalizadas durante aproximadamente 1 minuto y rápidamente enfriadas en agua-hielo. Entre 0.8 µl y 1µl de la muestra eran cargadas en el gel. Los TT-SSCP se llevaron a cabo en geles verticales de poliacrilamida (29:1 acrilamida:*bis*acrilamida, Amresco) de dimensiones 10x10 cm². Los geles se prepararon a una concentración final de 12% de poliacrilamida, 10% de glicerol o 14% de

poliacrilamida sin glicerol y, en ambos casos, 1x TBE (Tris Borato EDTA). Las electroforesis se desarrollaron a 400 voltios durante 3.5-4 horas en cubetas refrigeradas y a una temperatura variable durante la electroforesis.

Las variaciones de temperatura durante la electroforesis se realizaron con un baño termostatzado de Selecta (Frigiterm 6000382). La electroforesis se iniciaba a una temperatura de 2°C y ésta se incrementaba 4°C cada media hora hasta una temperatura final de 24°C. En amplificadas donde algún fragmento es de mayor tamaño (400-500 pb) la electroforesis se prolonga 30 minutos a la última temperatura. Los cambios de temperatura se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Tiempos y temperaturas utilizadas en el protocolo de TT-SSCP

TIEMPO	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
TEMPERATURA	2°C	4°C	8°C	12°C	16°C	20°C	24°C

TIEMPO	210 min	240 min
TEMPERATURA	24°C	24°C
	Fin Electroforesis 1	Fin Electroforesis 2

El revelado de los geles se hizo mediante tinción con nitrato de plata, siguiendo el protocolo descrito por Beidler con pequeñas modificaciones.

Todos los geles fueron fotografiados situando el gel sobre papel fotográfico y realizando un flash de luz concentrada situada a unos 50cm. La duración del flash de luz depende de la intensidad de tinción del gel. Éstos son secados mediante el GelAir Dryer de BIORAD que permite la

conservación de los mismos. Los geles y fotos fueron debidamente identificados y archivados.

Cuando una banda anómala es identificada en una carrera donde varios fragmentos se han analizado simultáneamente, cada uno de éstos se carga a continuación por separado con el fin de identificar a qué fragmento corresponde la alteración. Si los fragmentos provienen de un multiplex cada uno ha de ser amplificado de forma individual, si provienen de fragmentos amplificados de forma individual sólo es necesario cargarlos por separado. Una vez identificado el fragmento donde se encuentra la alteración, ésta es caracterizada mediante secuenciación directa. En el caso de que los fragmentos provengan de la digestión de un amplificado de mayor tamaño, éste es secuenciado completamente para caracterizar la variación.

Secuenciación de los patrones anómalos

Los fragmentos con un patrón de migración anómalo en cada gel de TT-SSCP son identificados mediante secuenciación. Los patrones anómalos que se repiten en al menos 2 de las 20 muestras de cada gel, son considerados como polimorfismos frecuentes y no son secuenciados. Debido al sistema de identificación empleado es posible que polimorfismos relativamente frecuentes sean secuenciados si, por azar aparecen una única vez en un gel. Para llevar a cabo la caracterización de los fragmentos donde ha sido identificado un patrón anómalo, son reamplificados con el fin de tener suficiente material genético para llevar a cabo la secuenciación.

Las condiciones, oligonucleótidos y reactivos para llevar a cabo las reamplificaciones son las mismas que las utilizadas para amplificar los fragmentos en el análisis por TT-SSCP, pero se incrementan los volúmenes

proporcionalmente con el fin de conseguir un volumen final de 100 μ l ya que necesitamos más material de partida.

Cuando la banda correspondiente al patrón anómalo está lo suficientemente separada del resto de bandas se procedió a reamplificar el fragmento a partir de esta banda procediendo de la siguiente manera:

- 1- Se aisló la banda cortándola con un escalpelo
- 2- Se introdujo en unos 30 μ l de H₂O bidestilada estéril
- 3- Se homogeneizó con un émbolo estéril
- 4- Se dejó incubar a unos 42°C toda la noche para facilitar la disolución del ADN
- 5- Se utilizaron unos 5 μ l para reamplificar

En el caso que las bandas estuvieran muy juntas se amplificó el fragmento nuevamente a partir de ADN genómico. Cuando el patrón anómalo apareció en un producto de digestión la amplificación también se realizó de ADN genómico. En este caso, aunque sea posible aislar una banda anómala, los dos cebadores utilizados para amplificar el fragmento de gran tamaño no hibridan con los productos de digestión no siendo posible reamplificar la banda en estos casos. Estos fragmentos de gran tamaño son secuenciados íntegramente con varios oligonucleótidos.

Una vez reamplificados, los fragmentos han de ser purificados para eliminar las sales, dNTPs, oligonucleótidos y productos inespecíficos de pequeño tamaño presentes en la reacción de PCR que pudieran influir en la secuenciación.

La purificación se realizó con columnas "High Pyre PCR Product Purification Kit" de Roche o con "concert rapid PCR purification system" de Gibco BRL, en ambos casos se conseguían en torno a 50 μ l de volumen con

una buena pureza de ADN para llevar a cabo la secuenciación. En ambos casos se siguió el protocolo recomendado por el fabricante.

La muestra debía tener una concentración entre 5-100 ng/ μ l (dependiendo del tamaño) para llevar a cabo la secuenciación por lo que la concentración a la que se encontraba el amplificado también debía ser calculada mediante un espectrofotómetro. Si la concentración era muy alta se diluía la muestra en H₂O bidestilada estéril, si por el contrario era baja se concentraba con un concentrador a vacío (Concentrator 5301 de Eppendorf).

Las secuenciaciones se realizaron en los secuenciadores A.L.F (Pharmacia Biotech) y A.B.I PRISM™ 310 (Applied Biosystems). En ambos casos se llevó a cabo una reacción cíclica de secuenciación. Entre 5 y 100ng de ADN amplificado y purificado se mezclaron en las proporciones adecuadas con el oligonucleótido, los dNTPs, ddNTPs y la Taq polimerasa.

Dos protocolos de secuenciación distintos fueron utilizados según el secuenciador usado.

1- Secuenciación realizada con el secuenciador automático A.L.F. de Pharmacia Biotech:

La reacción de secuenciación se realizó con marcaje interno de la cadena de ADN sintetizada, en forma de dUTP-Fluoresceína. En un volumen total de 18 μ l se preparó una mezcla con unos 5-100ng de ADN, 17,78 μ M de cada uno de los deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dTTP, 7-deaza-GTP), 30 pmoles de cebador, 1.11 μ M dUTP-fluoresceína, 22% DMSO v/v, 1.5 mM MgCl₂ y 67.5 mM Tris-HCl, pH 9. A esta mezcla se añadió 2.5 unidades de Taq polimerasa y ésta se repartió en cuatro tubos nombrados A, C, G, T en donde se depositaron 2 μ l de ddATP 750 μ M, ddCTP 250 μ M, ddGTP 35

μM , ddTTP 1000 μM , respectivamente. Las muestras se cubrieron con aceite mineral y se colocaron en el termociclador.

La reacción de secuenciación se realizó mediante un ciclo de 2.5 minutos a 94°C, entre 25 y 30 ciclos de 25 segundos a 94°C, 30 segundos a una temperatura entre 58°C y 64°C dependiendo de la T_M del oligonucleótido y 60 segundos a 70°C. Finalmente se realiza una extensión adicional de unos 3 min. La reacción, una vez acabado el proceso de amplificación, se detuvo añadiendo 4 μl de disolución de parada.

La mitad de la mezcla es cargada en un gel de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bisacrilamida 19:1), 7 M de urea y 1,2 x TEB. Las condiciones electroforéticas eran las siguientes: 1500 V, 45 mA, 38 W, 50°C de temperatura y un tiempo de electroforesis de unos 240 minutos. La secuencia fue finalmente leída por el secuenciador automático A.L.F.

2- Secuenciación realizada con el secuenciador automático ABI PRISM 310 (APPLIED BIOSYSTEMS):

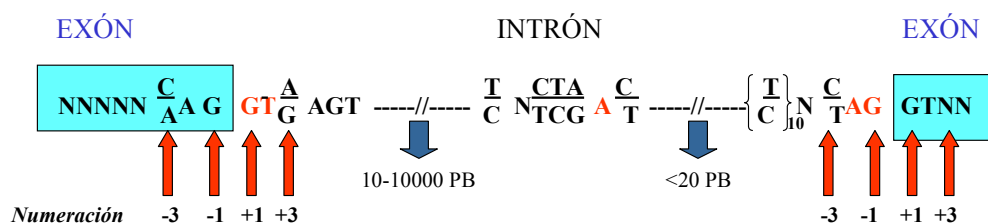
Los distintos clones se secuenciaron siguiendo el método de los dideoxinucleótidos (*terminadores*) marcados con compuestos fluorescentes (Prober y cosl, 1987). Los productos marcados se resolvieron en un equipo de secuenciación automática ABI 377 (Applied Biosystems).

Los oligonucleótidos utilizados para las secuenciaciones fueron los mismos que los utilizados en las amplificaciones. En el caso de algún fragmento de gran tamaño fue necesario diseñar un oligonucleótido interno para secuenciar la totalidad del fragmento.

RT-PCR

Cuando se identificó una mutación que altera la secuencia consenso de "splicing" (ajuste), se realizó una RT-PCR del ARN del probando, con el fin de caracterizar el efecto que la mutación provoca a nivel del procesamiento del ARN mensajero.

La secuencia consenso descrita por Mount (1982) es la siguiente:



Las zonas que flanquean el final de un exón y el comienzo del siguiente contienen las secuencias que junto a una intrónica son requeridas para llevar a cabo el proceso de "splicing" (ajuste), aunque las bases en rojo corresponden a las zonas más conservadas.

Las reacciones de retrotranscripción realizadas se llevaron a cabo con el sistema "Enhanced Avian RT-PCR Kit" (Sigma). Todos los reactivos y el material de plástico fueron preparados libres de RNAsas. Se utilizó fundamentalmente el DEPC para tratar la mayor parte del material. Las reacciones de retrotranscripción se realizaron con oligonucleptidos poli-T.

PROTOCOLO:

En un tubo libre de RNAsas se mezclan:

3.0 μ l de RNA total

1 μ l de oligonucleótido poli-T (70 μ M)

1 μ l de dNTP (10 mM cada uno)

Se cubre con dos gotas de aceite y se incuba a 85°C durante unos 10 min. A continuación se pone el tubo en hielo. Añadir:

- 1 µl de Tampon 10 X de la enzima
- 0.5 µl de Enzima (Enhancer AMV Reverse Transcriptasa)
- 0.5 µl de inhibidor Rnasa
- 3 µl de H₂O bidestilada estéril y libre de Rnasas

Se incuba unos 15 minutos a 25°C para permitir la unión de los oligonucleótidos poli-T al RNA y después se incuba durante 90-120 minutos a unos 45°C para que la enzima sintetice el DNA complementario.

Una vez sintetizado el cDNA se procede a amplificar la zona de interés para nuestro estudio. Debido a que una mutación de "splicing" (ajuste) puede provocar la pérdida de varios exones fue necesario alejarse lo suficiente de la zona alterada para asegurarnos que la amplificación por PCR se llevará a cabo. Por este motivo, se realizó una PCR larga mediante el Kit "Expand Long Template PCR System" de Roche, cuyo protocolo se desarrollará en el apartado siguiente.

Tanto *BRCA1* como *BRCA2* presentan una expresión muy baja en células sanguíneas, por lo cual es muy difícil el análisis del ARN mensajero. El hecho de que se requiriera, además, hacer amplificaciones de gran tamaño dificulta aún más el análisis, por lo que es necesario realizar una RT-PCR anidada o semianidada para obtener un buen rendimiento en la amplificación. Así, cuando el primer PCR largo es realizado a partir de la síntesis de cDNA, el producto de este PCR se utiliza como molde de una segunda PCR donde al menos un oligonucleótido es interno con respecto al fragmento amplificado. Con esto se consigue un aumento considerable de la producción del amplificado y una alta especificidad, dado que el cebador interno sólo hibridará en el amplificado correcto y no en amplificados inespecíficos del primer PCR.

El proceso de retrotranscripción y posterior amplificación queda resumido en la Figura 4. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 9.

Figura 4. Estrategia seguida en el proceso de la retrotranscripción.

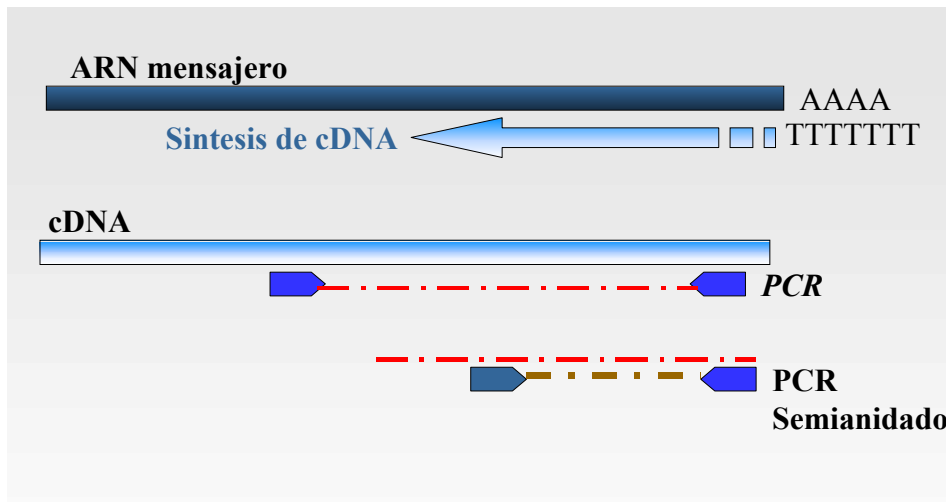


Tabla 9. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de los productos de la retrotranscripción.

MUTACIÓN	CDNA	PCR 1 (5´-3´)	SEMIANIDADO (5´-3´)
D117Y	Síntesis	ctgggccacacgattgacgg →	ctgggccacacgattgacgg
	Poli-T	ggggatctggggatcaggtagg	cacaggtgcctcacacatcttgcc
295+2 (t-c)	Síntesis	ctcgggtgtctttgcggcggtg →	ctcgggtgtctttgcggcggtg
	Poli-T	catttctagaacatttctcagaattgtcc	Attttctccatctgggctccatttagacc

Una vez realizada la RT-PCR, ésta se verifica en un gel de agarosa con el fin de identificar bandas de un tamaño anormal que correspondan a posibles errores en la maduración del RNA mensajero. El sistema de verificación en gel de agarosa es similar a los casos ya citados.

En el caso en el cual una banda de tamaño anormal estuviese presente en el mutante y no en los controles, el experimento se repetía para descartar la posibilidad de que la banda sea un artefacto. La banda fue secuenciada para identificar la alteración que se produce en el ARN mensajero maduro. La banda fue aislada del gel de agarosa con un escalpelo y el ADN fue extraído mediante el sistema Quiaquick Gel Straction Kit de Quiagen. Posteriormente, el ADN fue llevado a la concentración óptima y secuenciado según el protocolo anteriormente citado.

Es conocido que en muchos casos un ARN mensajero anómalo es rápidamente degradado por la maquinaria celular, por lo que en el caso en el que no se obtuviese una banda de tamaño irregular, se descartaba la pérdida del alelo anómalo mediante la secuenciación del producto de la RT-PCR con el fin de identificar polimorfismos que diferencien ambos alelos. Este sistema de discriminación alélica sólo es posible en el caso de que existan variaciones polimórficas entre los dos alelos amplificados.

PCR LARGO

Como se ha citado en el apartado anterior, fue necesario, en algunos casos, el uso de una PCR larga para alejarse lo suficiente de la zona que presentaba una alteración en el "splicing" (ajuste).

Se usó el Kit "Expand Long Template PCR System" de Roche. Éste kit está compuesto de una mezcla de 2 enzimas, una con actividad exonucleasa 3' a 5' que le permite la corrección de errores y otra de alta procesividad. Es el trabajo conjunto de estas dos enzimas lo que va a permitir la amplificación de fragmentos de gran tamaño.

El protocolo consta de 20 ciclos donde el tiempo de extensión es incrementado en 20 segundos en cada ciclo ya que la enzima va

perdiendo actividad y cada ciclo necesita más tiempo para amplificar un fragmento del mismo tamaño.

Para llevar a cabo el PCR largo se usó el siguiente protocolo:

Tabla 10. Condiciones de amplificación del PCR largo.

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
94°C	3'	1
94°C	20''	10
TH*	30''	
70°C	TE*	
94°C	20''	20
TH*	30''	
70°C	TE*+20''	
70°C	15'	1

REACTIVOS

38.5 µl H₂O
 3 µl dNTPs(2.5mM cada uno)
 1.5 µl Oligonucleotido 5' (10µM)
 1.5 µl Oligonucleotido 3' (10 µ M)
 5 µl Tampón1 (5X) (con Cl₂Mg)
 0.5 µl Mezcla de taq ADN polimerasas

↓

Se divide en 4 reacciones de 12 µl y se le añade unos 20 ng de ADN

* TH: Temperatura de Hibridación según las características del oligonucleotido.
 TE: Tiempo de extensión según el tamaño del fragmento.

Alineamientos de secuencias

Los alineamientos de secuencias para los genes *BRCA1* y *BRCA2* de diferentes especies (humana, perro, rata y ratón) se realizaron mediante clustalW alignment program (www.ch.embnet.org/cgi-bin/clustalw_parser).

Las secuencias utilizadas para llevar a cabo las comparaciones fueron las que aparecen en la Tabla11.

Tabla 11. Secuencias utilizadas en los alineamientos.

	<i>BRCA1</i> (GeneBank ccesion no.)	<i>BRCA2</i> (GeneBank ccesion no.)
<i>Humano</i>	U14680	U43746
<i>Ratón</i>	U68174	U89652
<i>Rata</i>	AFO36760	T42207
<i>Perro</i>	U50709	Ochiai y cols, 2002

III.3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el test de χ^2 y el test exacto de Fisher dependiendo del tamaño de la muestra, utilizando el programa SPSS 11.0 para Windows.

En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas dentro de un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$).

Para el cálculo de la probabilidad de presentar mutación *BRCA1* y *BRCA2*, se utilizó un programa computerizado desarrollado por David Eulus en la Universidad de Texas, llamado *CAGene*, que incluye los modelos de Couch, Myriad y *BRCAPRO* (www.utsouthwestern.edu/cancergene/).

IV. RESULTADOS

IV.1. PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2* EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA MENORES DE 41 AÑOS

Con el objetivo de determinar la prevalencia de las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en mujeres españolas menores de 41 años, no seleccionadas por su historia familiar, se reclutaron 124 pacientes no emparentadas entre sí. El análisis de las mutaciones se realizó mediante TT-SSCP utilizando fragmentos amplificados mediante multiplex o fragmentos de gran tamaño (800-1500 pb) digeridos con endonucleasas. Los patrones anómalos fueron posteriormente identificados mediante secuenciación directa.

Un estudio de este tipo además de permitir establecer la prevalencia de estas mutaciones en nuestra población puede facilitar el estudio de las relaciones fenotipo-genotipo. La identificación de posibles mutaciones propias de nuestra población, podría orientar al cribado de mutaciones de nuevas pacientes.

La búsqueda de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en esta muestra ha permitido obtener los siguientes resultados:

En la tabla 12 se resumen todas las alteraciones localizadas en nuestra muestra, tanto las definitivas o patogénicas como las de cambio de aminoácido o sentido erróneo.

Tabla 12. Resumen de todas las alteraciones encontradas

Paciente	Gen	Exón	Mutación	Tipo de mutación	Alto riesgo	Historia familiar
15	<i>BRCA1</i>	11	2080del-A P871L	Cambio de pauta Sentido erróneo	+	Madre: ovario(45)
131	<i>BRCA1</i>	15	S1512I	Sentido erróneo		
119	<i>BRCA1</i>	7	Y105C	Sentido erróneo		Madre: hepatocarcinoma (79); Prima de la abuela: mama (70)
23	<i>BRCA1</i>	11 18	R841W G1706A	Sentido erróneo Sentido erróneo		Tía (M): ovario; Abuela (P): mama
128	<i>BRCA1</i>	23	P1812A	Sentido erróneo	+	Madre: mama (52) y ovario (63); tía (M)(46) y abuela (M)(40): mama; tía abuela (M)(50): mama; prima segunda (M): ovario (50); tío (M): pulmón (60); primo (M): próstata (70)
13	<i>BRCA1</i>	11	Q356R	Sentido erróneo	+	Madre, abuela(M), tía abuela (M): mama (62, 42, 50); abuelo (M): sarcoma
75	<i>BRCA1</i>	5	D67Y	Sentido erróneo		Prima (P): mama (56); padre: pulmón
120	<i>BRCA2</i>	23	Y3006X	Sin sentido		Tía (M): ovario (70)
70	<i>BRCA2</i>	11	Q1994X G2044A	Sin sentido Sentido erróneo		Prima (P): linfoma (40)
78	<i>BRCA2</i>	23	9204 del 14	Cambio de pauta	+	Madre: mama (40); tía (M): mama bilareral (36, 46); prima de la madre (M): mama (59)
127	<i>BRCA2</i>	23	9254 del 5	Cambio de pauta		Abuela (P): mama (47), tía (M): mama; abuelo (M): pulmón
145	<i>BRCA2</i>	23	9254 del 5	Cambio de pauta	+	Abuelo (P): mama; padre: estómago (54); abuela (P): estómago; abuelo (M): colon
1	<i>BRCA2</i>	2	295+2 T/C	Ayuste	+	Madre: ovario (61)
54	<i>BRCA2</i>	3	A75P	Sentido erróneo		Abuelo (P): mama; padre: hepatocarcinoma; hermana, hermano, tía (M): ORL
123	<i>BRCA2</i>	11	G2044A	Sentido erróneo		Abuela (M): mama (70); abuelo (P): estómago
57	<i>BRCA2</i>	18	V2728I	Sentido erróneo		Prima de la madre y su hija: mama (60,38); prima (M): leucemia (38); abuelo (P): esófago (76); tío (P): colon
134 *	<i>BRCA2</i>	18	V2728L	Sentido erróneo	+	Madre: mama bilateral (72, 77); 2 hermanas **: mama (43 y 46); abuela (M): mama; tía (M): páncreas; prima (M) leucemia; abuelo (P): próstata
122	<i>BRCA2</i>	11	R2108H	Sentido erróneo		Madre: endometrio (71); abuela (M): hepatocarcinoma; prima (M):hepatocarcinoma (57); primo (P): pulmón

Las mutaciones patogénicas aparecen en negrita.

Criterios de "alto riesgo" definido como mujeres con antecedentes familiares de 1° grado de cáncer de mama /ovario, o un varón en la familia diagnosticado de cáncer de mama.

Abreviaturas: (P): paterno; (M): materno.

Las edades al diagnóstico aparecen entre paréntesis.

* Paciente con cáncer de mama contralateral a los 43 años

** Una de las hermanas es hermanastra materna

1. MUTACIONES PATOGENICAS

Se localizaron siete mutaciones truncantes (5.6%) entre los dos genes, aunque la mayor parte (6 de 7) fueron localizadas en *BRCA2* (4.8%). La diferencia en la cantidad de mutaciones localizadas en los dos genes es estadísticamente significativa ($p=0.03$) lo que indica que la prevalencia de mutaciones en nuestra muestra es mayor en el gen *BRCA2*.

En el gen *BRCA1* sólo se localizó la mutación definitiva 2080delA (paciente n° 15). Esta mutación rompe la pauta de lectura y genera un codón de parada. Esta mutación localizada en el exón 11, ha sido descrita 15 veces en la base de datos del BIC (Breast Cancer Information: www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic). Esta mutación no se pudo estudiar en la madre de la paciente (diagnosticada de cáncer de ovario a los 45 años), ya que había fallecido.

En el gen *BRCA2* se localizaron cinco mutaciones definitivas diferentes en 6 mujeres (Tabla 12), representando el 4.8% (95% IC: 1.8-10.2) del total de la muestra de mujeres con cáncer de mama menores de 41 años. Dos mutaciones (Q1994X y 9254del5) han sido previamente descritas y aparecen en la base de datos del BIC. Mientras que las otras tres mutaciones (9204del 14, Y3006X y 295+2 T/C) han sido identificadas por primera vez en nuestra muestra.

La delección 9254del5, que rompe la pauta normal de lectura generando un codón de parada y truncando la proteína a ese nivel, fue encontrada en dos pacientes distintas no emparentadas (pacientes n° 127 y 145). Esta mutación ha sido descrita varias veces en la población española y, fundamentalmente, en la población del área mediterránea (BIC, Osorio y cols. 2001, Llorc y cols. 2002, Díez y cols. 2003). La paciente n° 127 tiene antecedentes de cáncer de mama en su abuela paterna a los 47 años y en su tía materna. La otra paciente (n° 145) portadora de la mutación 9254del5 pertenece a una familia con un caso de varón afecto de cáncer de mama (abuelo paterno), lo cual es muy característico de mutaciones en *BRCA2*.

La mutación Q1994X, se localizó en la paciente n° 70. Esta paciente es la única que no tiene antecedentes de cáncer de mama ni ovario en su familia.

La delección 9204del14, localizada en el exón 23 de la paciente n° 78, genera un desplazamiento en la pauta de lectura que trunca la proteína en la misma posición que en el caso de la mutación 9254del5. Esta paciente tiene antecedentes familiares de cáncer de mama y ha sido incluida en el grupo de "alto riesgo" (madre diagnosticada de cáncer de mama a los 40 años, tía materna con cáncer de mama bilateral a los 36 y 46 años, y una prima de la madre diagnosticada también de cáncer de mama a los 59 años).

La mutación Y3006X, fue detectada en la paciente n° 120 con antecedentes de cáncer de ovario en la familia (tía materna a los 70 años), pero sin otros antecedentes de cáncer en la familia. Esta mutación también ha sido localizada por nuestro grupo en una familia de "alto riesgo" no incluida en este estudio por no cumplir los criterios de edad menor de 41 años. Esta mutación fue detectada en tres miembros de la familia diagnosticadas de cáncer de mama (dos hermanas y la madre). El

hecho de encontrar una mutación nueva en dos pacientes aparentemente no emparentados de una misma área sugiere que la mutación puede ser también característica de nuestra zona.

Finalmente detectamos una mutación en la secuencia de consenso de ajuste (Mount y cols. 1982) correspondiente al exón 2 (295+2 T/C). La mutación se encontró en la paciente nº1, afecta de cáncer de mama a los 35 años; su madre había sido diagnosticada de cáncer de ovario a los 61 años y se encontró la misma mutación.

En 4 de las 6 mujeres con cáncer de mama menores de 41 años con mutación en *BRCA2*, ésta aparece en el exón 23, lo que supone que un 66.7% de las mutaciones truncantes localizadas en este gen se han encontrado en dicho exón.

2. MUTACIONES DE SIGNIFICADO INCIERTO: MUTACIONES DE SENTIDO ERRÓNEO

La detección de mutaciones de cambio de sentido es importante ya que se ha relacionado con la enfermedad en alguna de ellas (Vallo-Christersson y cols. 2001, Morris y cols. 2002). La falta de funcionalidad en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, no permite discernir las mutaciones variantes que no alteran la funcionalidad de la proteína. Únicamente para la región perteneciente al dominio BRCT de *BRCA1* se ha desarrollado un test funcional que permite detectar las mutaciones patogénicas basándose en la actividad transcripcional de este dominio (Vallo-Christersson y cols. 2001), pero dado que la región abarca sólo unos 300 pares de bases, el test no es útil para la mayor parte de las mutaciones.

Un total de 14 variantes de sentido erróneo (11.3%) en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, fueron encontradas en la muestra de mujeres con cáncer

de mama diagnosticadas antes de los 41 años, de las cuales 8 fueron encontradas en el gen *BRCA1* (5.6%) y 6 en *BRCA2* (4.8%) (Tabla 12).

Nueve de estas 14 alteraciones (S1512I, Y105C, R841W, G1706A y D67Y en *BRCA1* y A75P, V2728I, V2728L y R2108H en *BRCA2*) han sido previamente descritas en pacientes con cáncer de mama, apareciendo reflejadas en la base de datos del BIC como variantes de significado incierto. Una de ellas, *BRCA2* V2728I, ha sido identificada únicamente en población española (en dos ocasiones), a diferencia del resto que aparecen descritas en distintas poblaciones. Tres alteraciones encontradas en el gen *BRCA1* (P871L, Q356R y R841W) han sido caracterizadas previamente en población general y han sido clasificadas como polimorfismos (Durocher y cols. 1996, Dunning y cols. 1997, Dong y cols. 1998, Dunning y cols. 1999).

Las dos únicas nuevas mutaciones de sentido erróneo que han sido identificadas en nuestro laboratorio son la variante P1812A encontrada en *BRCA1* y la variante G2044A en el gen *BRCA2*. La variante P1812A en *BRCA1* se encontró en la paciente n°128. Esta paciente pertenece a una familia de "alto riesgo" ya que cinco miembros de su familia presentaron cáncer de mama y/u ovario, tres de ellas antes de los 50 años (su madre se diagnosticó de cáncer de mama a los 52 años y de ovario a los 63 años, una tía materna se diagnosticó de cáncer de mama a los 46 años, la abuela materna de cáncer de mama a los 50 años, la tía abuela materna cáncer de mama a los 50 años y la hija de ésta cáncer de ovario a los 50 años). La otra mutación variante es G2044A en el gen *BRCA2*, localizada en las pacientes n°70 y n°123. De estas dos pacientes, únicamente la paciente n°123 tiene antecedentes de cáncer de mama en la familia, sin cumplir criterios de "alto riesgo". Estas dos alteraciones se buscaron en 100 muestras que provenían de cordones umbilicales con resultado negativo.

En algunas pacientes encontramos más de una alteración. Las variantes de *BRCA1* R841W y G1706A fueron detectadas en la misma mujer (paciente n° 23). Esta paciente pertenece a una familia de "alto riesgo", ya que su abuela paterna se diagnosticó de cáncer de mama, y su tía materna de cáncer de ovario. La alteración en *BRCA1* P871L fue detectada en la paciente n°1, que también presentaba la mutación *BRCA1* 2080delA, y cumplía criterios de "alto riesgo" por haber sido su madre diagnosticada de cáncer de ovario. El cambio *BRCA2* G2044A se identificó en la paciente n°70, en la que la mutación *BRCA2* Q1994X había sido detectada; esta mujer no presenta antecedentes familiares conocidos de cáncer de mama ni de ovario.

La mutación variante en *BRCA2* V2728L, localizada en la paciente n°134, presente en la única mujer que ha padecido carcinoma de mama contralateral, no ha sido localizada en sus dos hermanas que también se diagnosticaron de carcinoma de mama.

Algunas de las variantes descritas más frecuentes de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, no fueron detectadas en el estudio, ya que únicamente se secuenciaron los patrones anómalos encontrados en cada gel (20 muestras por gel).

IV.2. FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES *BRCA1* Y *BRCA2* SEGÚN LA HISTORIA FAMILIAR DE CÁNCER DE MAMA/OVARIO

Se recogieron las historias familiares oncológicas de las mujeres incluidas en el estudio, con el fin de analizar la asociación entre la detección de mutaciones en *BRCA* y los antecedentes familiares de cáncer de mama o de ovario (Tabla 12).

Las mutaciones definitivas 2080delA (paciente n°15) en *BRCA1* y 9204del14 (paciente n°78), 9254 del5 (pacientes n°127 y n°145), Y3006X (paciente n°120) y 295+2 T/C (paciente n°1) en el gen *BRCA2*, aparecen en familias con antecedentes de cáncer de mama u ovario de las cuales las pacientes n°15, 78, 145 y 1 se encuentran en el grupo que cumplen los criterios de "alto riesgo" (definido como mujeres con antecedentes familiares de 1° grado de cáncer de mama /ovario, o un varón en la familia diagnosticado de cáncer de mama). La mutación Q1994X (paciente n°70), fue la única alteración que se localizó en una paciente sin antecedentes familiares de cáncer de mama u ovario.

Las alteraciones de sentido erróneo Y105C (paciente n°119), R841W y G1706A (paciente n°23), D67Y (paciente n°75), P871L (paciente n°15), P1812A (paciente n°128) y Q356R (paciente n°13) en el gen *BRCA1* y G2044A (pacientes n°70 y n°123), A75P (paciente n° 54), V2728I (paciente n°57), V2728L (paciente n°134) y R2108H (paciente n°122) en *BRCA2* se encontraron en mujeres con antecedentes de cáncer de mama u ovario, aunque únicamente cuatro de ellas tenían familiares de primer grado afectos y fueron incluidas en el grupo de "alto riesgo": tres en el gen *BRCA1* (pacientes n°13, 15 y 128) y una (paciente n°134) en el gen *BRCA2*.

En la tabla 13, podemos ver la distribución de las mujeres portadoras de mutaciones patogénicas en *BRCA1/BRCA2* respecto a las no portadoras, según sus antecedentes familiares, teniendo en cuenta el grado del familiar afecto de cáncer de mama/ovario.

Tabla 13. Distribución de las pacientes portadoras de mutaciones patogénicas según el grado del familiar afecto de cáncer de mama/ovario.

		Familiares 1° grado (1)	Familiares 2° grado (2)	Familiares 3° grado (3)	Otros familiares (≥ 4° grado) (4)	No antec. Familiar (5)	Total
PORTADORAS	BRCA1	1 (4 %)	0	0	0	0	1 (0.8%)
	BRCA2	2 (8%)	3 (8.8%)	0	0	1	6 (4.8%)
	TOTAL	3 (12%)	3 (8.8%)	0	0	1 (1.9%)	7 (5.6%)
NO PORTADORAS		22 (88%)	31 (91.2%)	10	4 (100%)	50 (98.1%)	117 (94.4%)
TOTAL		25	34	10	4	51	124

(1) Familiares de 1° grado: padres, hermanos e hijos.

(2) Familiares de 2° grado: abuelos y tíos.

(3) Familiares de 3° grado: tíos abuelos y primos.

(4) Resto de familiares: ≥ 4° grado.

(5) No antecedentes familiares de cáncer de mama ni ovario.

Con la intención de buscar en nuestro grupo, qué mujeres tienen un riesgo aumentado de presentar mutación en *BRCA1/BRCA2* respecto al resto, hemos analizado varios grupos:

- grupo de mujeres denominado "alto riesgo" frente al grupo de mujeres que no cumplen este criterio
- mujeres que presentan antecedentes de cáncer de mama/ovario en familiares de 1° grado respecto al resto del grupo de pacientes seleccionadas
- mujeres que presentan antecedentes de cáncer de mama/ovario en familiares de 1 y 2° grado respecto al resto del grupo de pacientes seleccionadas
- mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama/ovario (cualquier grado) frente al grupo de mujeres sin antecedentes familiares de cáncer de mama
- mujeres con dos o más familiares afectados de cáncer de mama/ovario
- mujeres con tres o más familiares afectados de cáncer de mama/ovario

- mujeres que presentan antecedentes de cáncer de ovario en la familia (independientemente del grado) respecto al resto del grupo de pacientes seleccionadas

Para analizar el grupo de mujeres de "alto riesgo", las mujeres se distribuyeron en cuatro subgrupos en función de los antecedentes familiares. El grupo de "alto riesgo" lo formaban las mujeres con al menos un familiar de primer grado afecto de cáncer de mama u ovario, o un varón en la familia diagnosticado de cáncer de mama. En el segundo grupo se agruparon las pacientes con familiares afectados de cáncer de mama u ovario, que no cumplían los criterios de "alto riesgo". El tercer grupo está constituido por las mujeres sin antecedentes conocidos de cáncer de mama u ovario, y el último grupo por dos mujeres adoptadas y por tanto con antecedentes familiares desconocidos.

En la tabla 14 se resume como se distribuyen las portadoras y no portadoras en función de los antecedentes familiares.

Tabla 14. Distribución de las pacientes portadoras de mutaciones patogénicas según antecedentes familiares.

		Alto riesgo (1)	Familia afecta no alto riesgo (2)	Sin antecedentes conocidos (3)	Familia desconocida (4)	Total
PORTADORAS	BRCA1	1 (0.3 %)	0	0	0	1 (0.8%)
	BRCA2	3 (11.6%)	2 (4.3%)	1 (2%)	0	6 (4.8%)
	TOTAL	4 (15.4%)	2 (4.3%)	1 (2%)	0	7 (5.6%)
NO PORTADORAS		22 (84.6%)	45 (95.7%)	48(98%)	2 (100%)	117 (94.4%)
TOTAL		26	47	49	2	124

(1)Criterios de "alto riesgo" definido como mujeres con antecedentes familiares de 1° grado de cáncer de mama /ovario, o un varón en la familia diagnosticado de cáncer de mama.

(2)Antecedentes familiares de cáncer de mama/ovario pero que no cumplen los criterios de "alto riesgo".

(3)No antecedentes familiares conocidos de cáncer de mama/ovario.

(4)Pacientes adoptadas que no conocían sus antecedentes familiares.

En 4 de las 26 mujeres de "alto riesgo" (15.4%) se localizaron mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* de las cuales 3 (11.6%) corresponden a mutaciones en *BRCA2* y una (3.8%) a *BRCA1*. De las 47 mujeres con algún caso de cáncer de mama u ovario (sin cumplir criterios de "alto riesgo") aparecen dos mutaciones en *BRCA2* que truncan la proteína (4.3%). Mientras que entre las 49 mujeres sin antecedentes de cáncer de mama u ovario, sólo aparece una mutación truncante en el gen *BRCA2* (Q1994X) que constituye el 2% de las mutaciones (Tabla 14).

Podemos observar que hay una proporción mayor de mutaciones definitivas entre el grupo de mujeres de "alto riesgo" de cáncer de mama, 15.4% (95% IC: 4.4-34.9) mientras que en el resto de las pacientes es de 3.1% (95% IC: 0.6-8), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.037$). Solamente una de las 49 mujeres sin antecedentes familiares de cáncer de mama u ovario es portadora de una mutación definitiva, lo cual indica que padecer cáncer de mama antes de los 41 años no es en sí mismo, un buen indicador de la presencia de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, el porcentaje de mutaciones encontrado en el subgrupo que hemos denominado "alto riesgo" es de 15.4%, lo que implica que las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama menores de 41 años con familiares de 1° grado afectados de cáncer de mama u ovario, o mujeres con cáncer de mama menores de 41 años con antecedentes familiares de cáncer de mama en el varón, tienen un riesgo mucho mayor. El riesgo relativo (RR) de ser portadoras de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* es 4.92, por lo que en este subgrupo podría ser interesante realizar el estudio genético.

Respecto al subgrupo de mujeres que presentan familiares de primer grado afectados de cáncer de mama/ovario (Tabla 15), el 12% de las mujeres con cáncer de mama menores de 41 años con al menos un familiar de 1° grado afecto de cáncer de mama/ovario, presentan mutación en *BRCA*; mientras que el 4.1% de las mujeres con mutaciones en

BRCA no tienen familiares de 1° grado afectos de cáncer de mama/ovario. Esta diferencia no tiene significación estadística ($p=0.131$), por tanto, considerar únicamente la presencia de familiares de 1° orden afectos de cáncer de mama/ovario no es por sí mismo un buen indicador de la presencia de mutaciones *BRCA1* o *BRCA2*.

Tabla 15. Distribución de las pacientes portadoras de mutaciones patogénicas según los antecedentes familiares de 1° grado.

		Antecedentes de 1° grado (1)	Sin antecedentes de 1° grado (2)	Familia desconocida (3)	Total
PORTADORAS	<i>BRCA1</i>	1 (4 %)	0	0	1 (0.8%)
	<i>BRCA2</i>	2 (8%)	4 (4.1%)	0	6 (4.8%)
	TOTAL	3 (12%)	4 (4.1%)	0	7 (5.6%)
NO PORTADORAS		22 (88%)	93 (95.9%)	2 (100%)	117 (94.4%)
TOTAL		25	97	2	124

(1)Familiares de 1° grado: padres, hermanos e hijos.

(2)No antecedentes de cáncer de mama/ovario en familiares de 1° grado.

(3)Pacientes adoptadas que no conocían sus antecedentes familiares.

Hemos estudiado, así mismo, el subgrupo de mujeres que presentan antecedentes familiares de 1° y 2° grado afectos de cáncer de mama/ovario, en comparación con las pacientes que no los presentan (Tabla 16). El 0.9% de las mujeres con cáncer de mama menores de 41 años con familiares de 1° y 2° grado afectos de cáncer de mama/ovario, presentan mutación en *BRCA*; mientras que el 5.5% de las mujeres con mutaciones en *BRCA* no tienen antecedentes familiares de 1° y 2° grado afectos de cáncer de mama/ovario. Esta diferencia no alcanza significación estadística ($p=0.6161$), por tanto, presentar antecedentes familiares de 1° y 2° grado no son un buen indicador de la presencia de mutación en *BRCA1* o *BRCA2* (Tabla 16).

Tabla 16. Distribución de las pacientes portadoras de mutaciones patogénicas según los antecedentes familiares de 1° y/o 2° grado.

		Antecedentes de 1° y 2° grado (1)	Sin antecedentes de 1° y 2° grado (2)	Familia desconocida (3)	Total
PORTADORAS	BRCA1	0	1	0	1 (0.8%)
	BRCA2	1 (0.9%)	5 (4.5%)	0	6 (4.8%)
	TOTAL	1 (0.9%)	6 (5.5%)	0	7 (5.6%)
NO PORTADORAS		10 (90.9%)	105 (94.5%)	2 (100%)	117 (94.4%)
TOTAL		11	111	2	124

(1) Familiares de 1° grado (padres, hermanos e hijos) y 2° grado (abuelos y tíos) afectados de cáncer de mama/ovario.

(2) No existen antecedentes familiares conocido de 1° y 2° grado.

(3) Pacientes adoptadas que no conocían sus antecedentes familiares.

También hemos analizado si el presentar un familiar afecto de cáncer de mama/ovario (independientemente del grado), aumenta la probabilidad de presentar mutación en el gen *BRCA1* o *BRCA2* (Tabla 17). El 8.2% de las mujeres con familiares afectados de cáncer de mama/ovario presentan mutación en el gen *BRCA*, respecto al 2% de las mujeres que no tienen ningún familiar afecto de cáncer de mama ni ovario. Esta diferencia no alcanza significación estadística ($p=0.115$). Por tanto, presentar un solo familiar (independientemente del grado) diagnosticado de cáncer de mama/ovario, no basta para realizar un estudio genético en las mujeres con cáncer de mama menores de 41 años.

Tabla 17. Distribución de las portadoras de mutaciones patogénicas según los antecedentes familiares de cáncer de mama/ovario.

		Antecedentes de cualquier grado (1)	Sin antecedentes (2)	Familia desconocida (3)	Total
PORTADORAS	BRCA1	1 (1.4 %)	0	0	1 (0.8%)
	BRCA2	5 (6.8%)	1 (2%)	0	6 (4.8%)
	TOTAL	6 (8.2%)	1 (2%)	0	7 (5.6%)
NO PORTADORAS		67 (91.8%)	48 (98%)	2 (100%)	117 (94.35%)
TOTAL		73	49	2	124

- (1) Al menos un familiar afecto de cáncer de mama/ovario, independientemente del grado familiar.
- (2) Ningún antecedente conocido de cáncer de mama/ovario.
- (3) Pacientes adoptadas que no conocían sus antecedentes familiares.

Por tanto, podríamos considerar que las mujeres que presentan aumento de la probabilidad de mutación en *BRCA* serán aquellas menores de 41 años que forman parte del grupo que hemos denominado de "alto riesgo".

Respecto al número de familiares afectados de cáncer de mama/ovario y su relación con la presencia de mutación *BRCA*, lo hemos analizado formando dos grupos distintos. Por una parte, hemos analizado si presentar dos o más familiares con cáncer de mama/ovario es suficiente para realizar un estudio de mutaciones en *BRCA*, y por otra parte si lo es, presentando tres o más familiares con cáncer de mama/ovario

El 47.5% de las 124 mujeres de nuestra muestra al menos tienen dos familiares diagnosticados de cáncer de mama/ovario. Si analizamos las mujeres que presentan mutación, el 5.1% tienen dos familiares afectados, respecto al 6.3% de mujeres que no presentan estos antecedentes. Si analizamos las diferencias entre estos dos grupos, no se encuentra significación estadística ($p=0.292$), es decir, en nuestra muestra presentar dos o más familiares afectados de cáncer de mama/ovario no predice la presencia de mutación en *BRCA* (Tabla 18).

Tabla 18. Distribución de las pacientes portadoras de mutaciones patogénicas según los antecedentes familiares con ≥ 2 familiares afectados de cáncer de mama/ovario.

		≥ 2 familiares (1)	Si estos antecedentes (2)	Familia desconocida (3)	Total
PORTADORAS	BRCA1	0	0	0	1 (0.8%)
	BRCA2	3 (5.1%)	4 (6.1%)	0	6 (4.8%)
	TOTAL	3 (5.1%)	4 (6.3%)	0	7 (5.6%)
NO PORTADORAS		56 (94.9%)	59 (93.6%)	2 (100%)	117 (94.4%)
TOTAL		59	63	2	24

(1) Dos o más familiares con cáncer de mama/ovario, independientemente del grado familiar.

(2) Pacientes que no presentan dos o más familiares con cáncer de mama/ovario.

(3) Pacientes adoptadas que no conocían sus antecedentes familiares.

Un 13 % de las pacientes tienen tres o más familiares afectados de cáncer de mama/ovario (incluyendo a la paciente). Las pacientes que presentan mutación dentro de este grupo son el 12.5% comparado con el 4.7% de las mujeres con tres o más familiares de cáncer de mama que no presentan mutación. Estas diferencias no alcanzan significación estadística ($p=0.2121$) (Tabla 19). Por tanto, en nuestra muestra, presentar tres o más familiares con cáncer de mama (independientemente del grado) no es suficiente para realizar el estudio genético.

Tabla 19. Distribución de las pacientes portadoras de mutaciones patogénicas según los antecedentes familiares con ≥ 3 familiares afectados de cáncer de mama/ovario.

		≥ 3 familiares (1)	Sin estos antecedentes (2)	Familia desconocida (3)	Total
PORTADORAS	BRCA1	0	0	0	1 (0.8%)
	BRCA2	2 (12.5%)	5 (4.6%)	0	6 (4.8%)
	TOTAL	2 (12.5%)	5 (4.7%)	0	7 (5.6%)
NO PORTADORAS		14 (87.5%)	101 (95.3%)	2 (100%)	117 (94.4%)
TOTAL		16	106	2	124

(1) Tres o más familiares con cáncer de mama/ovario, independientemente del grado familiar.

(2) Pacientes que no presentan tres o más familiares con cáncer de mama/ovario.

(3) Pacientes adoptadas que no conocían sus antecedentes familiares.

Una consideración especial merece el cáncer de ovario. Únicamente ocho del total de las 124 pacientes con cáncer de mama diagnosticadas antes de los 41 años, tienen antecedentes de cáncer de ovario en la familia, de las cuales tres son portadoras de mutaciones definitivas (1 en *BRCA1* y 2 en *BRCA2*) (Tabla 20). Por tanto, tres de las ocho mujeres con antecedentes de cáncer de ovario presentan mutaciones en alguno de estos dos genes (37.5%, 95%IC: 8.5-75.5)), mientras que únicamente 4 de las 114 restantes (3.5%) presentan mutación sin tener algún familiar afecto de cáncer de ovario. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0.005$). El riesgo relativo es de 10.71. Este dato indica que la presencia de cáncer de ovario en las familias de mujeres afectas de cáncer de mama menores de 41 años, es un buen marcador de riesgo de la presencia de mutaciones en los genes *BRCA*.

Tabla 20. Distribución de las pacientes portadoras de mutaciones patogénicas según antecedentes familiares de cáncer de ovario (independientemente del grado familiar).

		Familiares con c. Ovario (1)	No antecedentes de c. Ovario (2)	Familia desconocida (3)	Total
PORTADORAS	<i>BRCA1</i>	1	0	0	1 (0.8%)
	<i>BRCA2</i>	2 (25%)	4 (3.5%)	0	6 (4.8%)
	TOTAL	3 (37.5%)	4 (3.5%)	0	7 (5.6%)
NO PORTADORAS		5 (62.5%)	110 (96.5%)	2 (100%)	117 (94.4%)
TOTAL		8	114	2	124

(1) Pacientes con familiares diagnosticadas de cáncer de ovario, independientemente del grado familiar.

(2) Pacientes que no tienen antecedentes de cáncer de ovario.

(3) Pacientes adoptadas que no conocían sus antecedentes familiares.

Respecto a la presencia de cáncer de mama bilateral al diagnóstico, en varios trabajos se ha relacionado con la presencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*. En el grupo de 124 pacientes que hemos

estudiado, sólo dos pacientes en las que no se ha detectado mutación, presentaban cáncer de mama bilateral.

Durante el tiempo de seguimiento de las 124 pacientes, que alcanza una mediana de 80 meses, sólo se ha detectado cáncer de mama contralateral en una mujer (apareció a los 10 años del diagnóstico).

En nuestro grupo de pacientes, sólo una mujer presentaba antecedentes de cáncer de mama en el varón (el abuelo paterno), sin otros antecedentes de cáncer de mama/ovario en la familia. En esta mujer se detectó una mutación patogénica.

IV.3. HISTORIA FAMILIAR DE OTROS TIPOS DE TUMORES Y SU RELACIÓN CON LAS MUTACIONES *BRCA1* Y *BRCA2*

El 65.3% de las familias de mujeres con cáncer de mama menores de 41 años de nuestra muestra, tienen tumores distintos al cáncer de mama/ovario. En tres de las siete mujeres en las que se localizaron mutaciones patogénicas aparecen casos de otros tipos de cánceres en la familia (Tabla 21).

Tabla 21. Número de familiares con tumores distintos al cáncer de mama/ovario, según la presencia o no de mutación en BRCA.

<i>Tumor</i>	Mutación <i>BRCA</i>	no mutación	Total
Colon	1	17	18
Gástrico	2	16	17
Hepatocarcinoma	0	13	16
Pulmón	1	13	14
Próstata	0	13	13
ORL	0	12	12
LAM/LAL	1	7	8
Endometrio	0	6	6
Vejiga	0	5	5
SNC	0	5	5
Esófago	0	4	4
Renal	0	3	3
Testículo	0	3	3
Páncreas	0	2	2
Sarcoma	0	1	1
Melanoma	0	1	1
Tiroides	0	1	1
1° desconocido	0	1	1
Tumor de Wilms	0	1	1
TOTAL	5	124	129

Como vemos en la tabla anterior, en nuestra muestra se han localizado más tumores diferentes al cáncer de mama/ovario, entre las pacientes que no presentan mutación que entre las que se ha detectado mutación en *BRCA*. Sin embargo, para realizar este estudio, se debería disponer del número de total de familiares de 1°, 2° y 3° grado de todas las pacientes, dato que no disponemos.

En nuestra muestra, sólo hemos encontrado una paciente con mutación en *BRCA1*, por lo que no se puede realizar ningún estudio comparativo, debido al número tan bajo de mutaciones en *BRCA1* detectadas. Esta paciente tenía como antecedente el diagnóstico de cáncer de ovario en su madre y no tenía más familiares afectados con otros tipos de tumor.

Por otra parte, hemos analizado la presencia de tumores diferentes al cáncer de mama/ovario, entre sólo los familiares de 1° grado de las mujeres con mutación en *BRCA2*, ya que en la literatura, como se ha comentado en la Introducción, existen varios estudios semejantes (Tabla 22).

Entre las 6 pacientes con mutación en *BRCA2*, tres tienen antecedentes familiares (de cualquier grado) de otros tumores, lo que supone el 50% (Tabla 21) ; y sólo 1 de ellas tiene familiares de 1° grado, por tanto el 16.7% (Tabla 22). Estos tumores son un linfoma en la pacientes n° 70 en un familiar de 3° grado (prima paterna); en la paciente n° 127, un familiar de 2° grado (abuelo materno) con cáncer de pulmón; y la paciente n° 145 con un familiar de 1° grado (su padre) diagnosticado de cáncer gástrico, y dos familiares de 2° grado (su abuela paterna y su abuelo materno) diagnosticados de carcinoma gástrico y de cáncer de colon respectivamente.

De las 117 pacientes en las que no se ha detectado mutación en *BRCA2*, 78 (66.7%) tienen antecedentes de otros tumores en la familia; y 30 (25.6%) tienen familiares de 1° grado. Trece mujeres (11.1%) tienen antecedentes de cáncer de próstata en la familia, de ellas 3 (2.6%) tienen antecedentes familiares de 1° grado de cáncer de próstata, 7 tienen familiares de 2° grado con cáncer de próstata y 3 con familiares de 3 ó 4° grado. Los tumores más frecuentes que hemos observado en los familiares

de 1° grado son tumores gástricos (6/117), colon (5/117) y hepatocarcinoma (5/117).

Tabla 22. Número de familiares de 1° grado con tumores distintos al cáncer de mama/ovario, según la presencia o no de mutación en BRCA2.

<i>Tumor</i>	Mutación <i>BRCA2</i>	no mutación	Total familiares 1° grado
Colon	0	5	5
Gástrico	1	5	6
Hepatocarcinoma	0	5	5
Pulmón	0	2	2
Próstata	0	3	3
ORL	0	1	1
LAM/LAL	0	2	2
Endometrio	0	1	1
Vejiga	0	1	1
SNC	0	1	1
Esófago	0	1	1
Renal	0	1	1
Testículo	0	0	0
Páncreas	0	0	0
Sarcoma	0	0	0
Melanoma	0	1	1
Tiroides	0	1	1
1° desconocido	0	1	1
Tumor de Wilms	0	0	0
TOTAL	1	31	32

Con los datos disponibles, debido a la baja frecuencia de mutaciones detectada en *BRCA2*, no es posible establecer en nuestra muestra, una conclusión respecto a la relación de otros tumores diferentes al cáncer de mama/ovario con la presencia de mutaciones en *BRCA2*.

IV.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y EVOLUTIVAS DE LAS PACIENTES. DIFERENCIAS ENTRE LOS CASOS ESPORÁDICOS Y LOS RELACIONADOS CON MUTACIÓN *BRCA*

En una base de datos se recogieron las principales características clínicas e histopatológicas de los tumores de las diferentes mujeres incluidas en el estudio y se compararon las de las mujeres portadoras de mutaciones patogénicas con las del resto.

Como se ha comentado en la Introducción (Correlaciones genotipo/fenotipo), los tumores de mama asociados a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* no tienen un fenotipo propio, aunque existen características del tumor que aparecen con mayor frecuencia en los cánceres asociados a *BRCA1* y *BRCA2*. Los tumores asociados a mutaciones en *BRCA2* tienen un fenotipo más heterogeneo que los relacionados con *BRCA1*, y por tanto es más difícil establecer una correlación entre las características del tumor y las mutaciones en este gen. El hecho de que la mayor parte de los tumores de las portadoras de mutaciones sea causado por mutaciones en el gen *BRCA2* (donde las características clínico-patológicas son más confusas que en *BRCA1*), y debido a que el número de portadoras es bajo, el análisis comparativo de la muestra tiene limitaciones.

En la tabla 23 se comparan las características tumorales de las mujeres portadoras y no portadoras de mutaciones definitivas. Como podemos ver, no existen diferencias en la edad de diagnóstico del tumor entre los dos grupos (portadoras y no portadoras), aunque debido a que la muestra, ya ha sido seleccionada por padecer cáncer de mama en menores de 41 años, parece lógico que no haya diferencias entre los dos grupos, y más aún, si tenemos en cuenta que la muestra no es lo suficientemente grande para permitir una distribución por edades.

Tabla 23. Características clínico-patológicas de las pacientes.

CARACTERÍSTICAS	PORTADORAS		NO PORTADORAS		p
	N°	%	N°	%	
Pacientes	7		117		
Edad mediana (rango)	36 (31-38)		36 (21-40)		
Estadío					0.0005
I	0		42	35.6%	
II	5	71.4%	60	51.3%	
III	2	28.6%	13	11.1%	
IV	0		2	1.7%	
Tamaño tumoral					0.097
Menos o igual a 2cm	1	14%	53	45.3%	
Más de 2 cm	6	86%	61	52.1%	
Desconocido	0		3	2.5%	
Afectación ganglionar					0.077
Negativo	1	14%	55	47%	
Positivo	6	86%	58	49.5%	
Desconocido	0		4	3.4%	
Tipo histológico					0.821
Carcinoma ductal	6	85.7%	97	83%	
Carcinoma medular	0		5	4.3%	
Otros	1	14.3%	12	10.2%	
Desconocido	0		3	2.5%	
Grado histológico					0.822
I	2	28%	20	17%	
II-III	3	43%	41	35%	
Desconocido	2	28%	56	47.8%	
Receptor hormonal					0.648
Positivo (> 10 fmol/mg)	4	57%	61	52.1%	
Negativo (< 10 fmol/mg)	1	14%	34	29%	
Desconocido	2	28%	22	18.8%	
Cáncer contralateral	0		1	0.8%	0.808
Cáncer bilateral	0		2	1.7%	0.731

Hemos encontrada diferencias según el estadio, ya que ninguna de las pacientes con mutación fue diagnosticada en estadio I, versus el 35.6% de las mujeres que no presentaban mutación. Tampoco se diagnosticó ningún tumor en estadio IV, respecto al 1.7% de las mujeres sin mutación.

El 86% de los tumores de las pacientes portadoras de mutación presentan un tamaño mayor de 2 cm, versus el 52.1% en las no portadoras ($p=0.097$). El 86% de las pacientes portadoras tienen infiltración ganglionar axilar versus el 49.5% de las no portadoras ($p=0.077$). El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal infiltrante, que está presente en el 85.7% de las portadoras, versus el 83% de las no portadoras. Ninguna de las pacientes portadoras de mutación presenta carcinoma medular, versus el 4.3% de las no portadoras. Respecto al grado histológico, ninguna de las pacientes con mutación presentaban grado histológico III. El 14% de las pacientes portadoras de mutación presentaban receptores hormonales negativos, versus el 29% de las no portadoras.

Respecto a la supervivencia, ha fallecido una de las siete mujeres (14.3%) que presentan mutación en *BRCA*, versus 13 de 117 (11.11%) de las pacientes sin mutación. Esta diferencia no alcanza significación estadística ($p= 0.7966$). La paciente con mutación falleció a los 67 meses y la mediana de supervivencia de las pacientes con mutación es de 95 meses.

IV.5. UTILIDAD DE LOS MODELOS DE PREDICCIÓN DE PROBABILIDAD DE MUTACIÓN EN *BRCA*

En el apartado de Introducción, se han descrito los modelos más utilizados, que estiman la probabilidad de que una mujer tenga una mutación en los genes *BRCA1/BRCA2*. Hemos analizado cual es la probabilidad de presentar mutación en *BRCA1/BRCA2* en nuestra muestra de 124 mujeres, según cada uno de los métodos, y la sensibilidad y

especificidad de cada uno de ellos en nuestra muestra. Hemos asumido que se debe realizar el test genético si la probabilidad es mayor o igual al 10%, ya que es lo recomendado por la mayor parte de los centros para esta población.

En la Tabla 24 podemos ver el resultado de la aplicación de cada uno de los modelos predictivos de mutación *BRCA1/2*. El modelo de Couch (sólo para *BRCA1*), el modelo Myriad II para la detección de probabilidad de mutación *BRCA1/2* y el modelo *BRCAPRO* para la detección de la probabilidad de mutación *BRCA1/2*.

Tabla 24. Resultado de la aplicación del modelo de Couch, MyriadII y *BRCAPRO* para la detección de mutación *BRCA1/2*.

nº	COUCH	MYRIAD II	<i>BRCAPRO</i>
1	.435	.204	.187
9	.077	.383	.958
12	.174	.199	.614
13	.050	.199	.359
15	.550	.204	.387
16	.174	.199	.615
17	.077	.105	.930
18	.032	.105	.105
21	.032	.105	.356
22	.077	.105	.136
23	.435	.204	.139
24	.550	.204	.505
26	.021	.105	.035
27	.174	.105	.053
28	.174	.105	.058
29	.174	.105	.051
30	.077	.105	.028
31	.174	.105	.067
32	.117	.105	.038
33	.174	.105	.056
34	.117	.105	.044
35	.174	.105	.142
36	.032	.105	.074
38	.077	.105	.030
40	.117	.105	.040
41	.050	.105	.060
43	.117	.105	.037
44	.174	.105	.037

45	.032	.105	.043
46	.117	.105	.046
47	.117	.105	.033
52	.117	.105	.030
53	.174	.105	.047
54	.032	.105	.039
55	.117	.105	.033
56	.117	.105	.036
57	.117	.105	.037
58	.077	.105	.149
59	.174	.105	.040
60	.117	.199	.243
61	.174	.105	.052
62	.077	.105	.029
63	.174	.105	.063
67	.032	.105	.046
68	.174	.105	.057
70	.117	.105	.041
71	.032	.105	.041
72	.077	.105	.122
73	.117	.105	.037
74	.032	.105	.063
75	.117	.105	.044
76	.050	.105	.066
77	.117	.105	.034
78	.571	.511	.964
79	.050	.105	.053
80	.032	.105	.051
81	.032	.105	.040
82	.021	.105	.061
83	.174	.105	.040
84	.117	.105	.031
85	.174	.105	.068
86	.117	.105	.036
87	.174	.199	.384
88	.117	.105	.033
89	.050	.105	.157
90	.032	.105	.043
91	.117	.383	.624
92	.117	.105	.034
93	.050	.105	.068
94	.117	.383	.826
95	.174	.105	.050
96	.050	.105	.068
97	.032	.105	.054
98	.174	.105	.052
99	.050	.105	.066
100	.174	.105	.053
101	.117	.105	.037
102	.174	.105	.039
104	.117	.105	.038

105	.174	.105	.051
106	.021	.105	.136
107	.077	.105	.031
108	.117	.105	.035
109	.077	.105	.105
110	.117	.105	.040
111	.174	.105	.051
112	.117	.105	.044
113	.117	.105	.043
114	.117	.105	.049
115	.550	.204	.270
116	.032	.105	.058
117	.021	.105	.036
118	.077	.105	.034
119	.077	.105	.027
120	.435	.204	.050
121	.050	.105	.055
122	.117	.105	.043
123	.174	.105	.054
124	.174	.105	.045
126	.117	.105	.034
127	.077	.199	.191
128	.545	.511	.973
129	.117	.199	.961
130	.117	.199	.929
131	.174	.105	.043
132	.117	.105	.030
134	.050	.383	.990
136	.077	.105	.031
137	.174	.105	.057
138	.117	.105	.044
140	.250	.204	.943
141	.050	.105	.051
142	.117	.199	.144
143	.077	.105	.020
144	.032	.105	.133
145	.117	.105	.132
146	.117	.105	.040
147	.077	.105	.031
148	.174	.105	.051
149	.117	.105	.032
150	.077	.105	.031
151	.174	.105	.057
154	.050	.199	.357
155	.117	.105	.044

Los valores están expresados como probabilidad, no como porcentaje.

Con el fin de comprobar la utilidad de cada uno de los métodos predictivos en nuestra muestra, hemos estudiado la sensibilidad y la especificidad de cada uno de ellos, así como del grupo de "alto riesgo" de nuestra muestra de 124 pacientes.

Según el **modelo de Couch**, en el que se tiene en cuenta para calcular la probabilidad de mutación en *BRCA1*, la edad media del cáncer de mama en la familia, y la presencia de cáncer de mama sólo, o cáncer de mama y de ovario en la familia; la sensibilidad de éste método en nuestra muestra es del 100% (en nuestra muestra únicamente hemos localizado una mutación en *BRCA1*) y la especificidad del 38%, asumiendo que se realice el test genético si la probabilidad de detectar mutación es mayor del 10% (Tabla 25).

Tabla 25. Número de pacientes que detecta el modelo de Couch en nuestra muestra, según la detección o no de mutación, considerando una probabilidad mayor o igual al 10%.

	Probabilidad $\geq 10\%$	Probabilidad $< 10\%$
Mutación <i>BRCA1</i>	1	0
No mutación <i>BRCA1</i>	76	47
TOTAL	77	47

El modelo de **Frank (Myriad II)** para la detección de *BRCA1/BRCA2*, tiene en cuenta la presencia de cáncer de mama en la familia en menores de 50 años, la presencia de cáncer de ovario en algún familiar, la presencia en la paciente de cáncer de mama bilateral o cáncer de mama y de ovario, y la presencia en la paciente de cáncer de mama y edad menor de 50 años; si consideramos realizar el test si la probabilidad es mayor del 10%, la sensibilidad es del 71% y la especificidad del 84% (Tabla 26).

Tabla 26. Número de pacientes que detecta el modelo de Frank (MyriadII) en nuestra muestra, según la detección o no de mutación, considerando una probabilidad mayor al 10%.

	Probabilidad >10%	Probabilidad ≤10%
Mutación <i>BRCA1/2</i>	5	2
No mutación <i>BRCA1/2</i>	18	99
TOTAL	23	101

El modelo desarrollado por Parmigiani, **BRCAPRO**, en el que se tiene en cuenta la edad del desarrollo del cáncer en la paciente, la incidencia acumulada de cáncer de mama y ovario en las pacientes portadoras de mutación en *BRCA1/BRCA2*, y la presencia de cáncer de mama/ovario en familiares de 1° y 2° orden; la sensibilidad es del 71% y la especificidad del 75%, considerando la realización del test si la probabilidad es $\geq 10\%$ (Tabla 27).

Tabla 27. Número de pacientes que detecta el modelo BRCAPRO en nuestra muestra, según la detección o no de mutación, considerando una probabilidad mayor o igual al 10%.

	Probabilidad $\geq 10\%$	Probabilidad <10%
Mutación <i>BRCA1/2</i>	5	2
No mutación <i>BRCA1/2</i>	29	88
TOTAL	34	90

En nuestra muestra, según el grupo de "alto riesgo" de presentar cáncer de mama/ovario debido mutación en *BRCA1/BRCA2*, la sensibilidad es del 57% y la especificidad del 81% (Tabla 28).

Tabla 28. Número de pacientes según el grupo de "alto riesgo" en nuestra muestra, según la detección o no de mutación.

	Alto riesgo (*)	No alto riesgo
Mutación <i>BRCA1/2</i>	4	3
No mutación <i>BRCA1/2</i>	22	95
TOTAL	26	98

(*)Criterios de "alto riesgo" definido como mujeres con antecedentes familiares de 1° grado de cáncer de mama /ovario, o un varón en la familia diagnosticado de cáncer de mama.

En la Tabla 29 se resume la sensibilidad y especificidad de cada uno de los métodos aplicada a nuestra muestra de 124 pacientes, según la probabilidad de detectar mutación *BRCA*.

Tabla 29. Sensibilidad y especificidad de cada uno de los métodos aplicados en nuestra muestra, según la detección o no de mutación.

	Couch	Myriad II	<i>BRCAPRO</i>	"Alto riesgo"
Sensibilidad	100%	71%	71%	57%
Especificidad	38%	84%	75%	81%

V. DISCUSIÓN

Hemos analizado la prevalencia de mutaciones *BRCA1* y *BRCA2* en una muestra hospitalaria de 124 pacientes con cáncer de mama diagnosticado antes de 41 años. La muestra no fue seleccionada por la historia familiar de cáncer e incluye a mujeres con cáncer de mama infiltrante, diagnosticadas y tratadas en el Hospital Clínico Universitario de Valencia desde Enero-89 a Diciembre-99.

V.1.PREVALENCIA DE LAS MUTACIONES EN LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2* EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA MENORES DE 41 AÑOS

Hemos localizado siete mujeres portadoras de mutaciones definitivas en los genes *BRCA* entre las 124 mujeres seleccionadas, lo que representa el 5.6%. Esta frecuencia global es muy similar a la encontrada tanto por Peto y cols. (1999) en población inglesa, que detectaron 15 portadoras de mutación en los genes *BRCA* en una muestra de 254 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama antes de los 36 años, como por Loman y cols. (2001) en mujeres del sur de Suecia, quienes encontraron que un 6.8% de las 234 mujeres con cáncer de mama menores de 41 años eran portadoras de mutaciones patogénicas en los genes *BRCA*. Otros estudios similares realizados en población estadounidense y turca han encontrado unas frecuencias que varían entre 5 y 10% (Malone y cols. 2000, Yazici y cols. 2000). Todos estos estudios incluyendo el aquí presentado, indican que la frecuencia de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* es baja entre las mujeres seleccionadas únicamente por la edad.

Características de la muestra

Se seleccionaron 124 pacientes, de una muestra de 245 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama antes de los 41 años, incluidas en la base de datos de cáncer de mama del Servicio de Oncología Médica y Hematología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. El análisis de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* se realizó por tanto, en el 50.6% de las mujeres. La razón más importante para no obtener más muestras fue que las pacientes habían muerto, estaban muy enfermas o rehusaron a dar sangre para la realización del estudio.

En el estudio de Loman y cols. (2001), incluyeron a 262 pacientes y el estudio de mutaciones se realizó en 234, lo que constituye el 89%; este es el estudio con el índice de inclusión más alto. Peto y cols. (1999), incluyeron a 1399 pacientes menores de 46 años (los divide en dos grupos: menores de 36 años y de 36 a 45 años), el estudio mutacional se realizó sólo en 617 pacientes (44%). Como en nuestro estudio, la razón fundamental de esta baja inclusión era que las pacientes habían fallecido o estaban muy enfermas para poder obtener la muestra necesaria para realizar el estudio. En el estudio de Southey y cols. (1999), de 640 mujeres australianas diagnosticadas de cáncer de mama antes de los 41 años, se seleccionaron 91, por lo que el índice de inclusión fue del 14%. Malone y cols. (1998), han publicado resultados de un estudio poblacional en el que el análisis de *BRCA1* y *BRCA2* se determinó en mujeres con cáncer de mama menores de 35 años. En 203 pacientes (66%) de 306 se realizó el estudio mutacional. El estudio publicado por el Anglian Breast Cancer Study Group (2000), es el estudio con más pacientes incluido hasta el momento; en este estudio un total de 1435 casos (51%) de 2805 se seleccionaron para realizar el estudio mutacional de *BRCA1* y *BRCA2*. En la Tabla 30 se resumen los principales estudios con el porcentaje de pacientes incluido.

Tabla 30. Principales estudios y porcentaje de pacientes sobre las que se ha realizado el análisis mutacional.

Estudios	Nºtotal de pacientes	Nºpacientes con estudio genético	%
Loman (2001)	262	234	89
Peto (1999)	1399	617	44
Southey (1999)	640	91	14
Malone(1998)	306	203	66
Anglian Breast Cancer (2000)	2805	1435	51
Nuestra muestra	245	124	50.6

Por tanto, podemos ver que en la mayoría de los estudios el porcentaje de mujeres sobre el que se puede realizar el análisis genético es entre el 44 y el 66%, esta selección puede enmascarar la verdadera distribución de la supervivencia, así como la historia familiar entre mujeres en las que se ha realizado el análisis mutacional y entre las que no se ha realizado.

Análisis mutacional e inclusión en los estudios de mutaciones patogénicas y mutaciones de significado incierto

En nuestro estudio de 124 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama antes de los 41 años, se identificaron un total de 7 (5.6%) mutaciones patogénicas: 1 mutación en *BRCA1* y 5 mutaciones en *BRCA2* (dos pacientes presentaban la misma mutación); y 14 variantes de sentido erróneo: 8 en *BRCA1* y 6 en *BRCA2* (Tabla 12).

El estudio mutacional se realizó sobre toda la región codificante de *BRCA1* y *BRCA2*, como en los principales estudios (Peto y cols. 1999, Loman y cols. 2001), en contraste con otros estudios en los que el análisis

mutacional se restringió a mutaciones fundadoras (Wagner y cols. 1996, Neuhausen y cols. 1998, Thorlacius y cols. 1997, Abeliovich y cols. 1997).

Hemos analizado, por tanto, la totalidad de la región codificante de ambos genes, así como las zonas flanqueantes de los exones, mediante el sistema TT-SSCP. Esta estrategia permite la detección de mutaciones puntuales independientemente de su efecto (sin sentido o sentido erróneo), así como de pequeñas deleciones e inserciones. Hay mutaciones que no pueden ser detectadas mediante esta estrategia utilizada u otras similares, como las mutaciones localizadas en el interior de los intrones capaces de alterar la estabilidad del ARN, así como los grandes reordenamientos genómicos que incluyen los genes diana. Además, las regiones promotoras de los genes *BRCA1* y *BRCA2* no se han incluido.

En este estudio, se ha considerado únicamente como mutación significativa a aquellas que truncan la proteína, ya que estas alteraciones son patogénicas. Las variantes de significado incierto o sentido erróneo no se han considerado mutaciones patogénicas, ya que hoy en día no hay ningún test funcional en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que permita discernir las mutaciones que truncan la proteína, de las mutaciones variantes que no alteran la funcionalidad de la proteína, a excepción de la región perteneciente al dominio BRCT de *BRCA1*.

En el trabajo de Loman (2001), también se ha realizado el estudio de la región codificante de ambos genes, sin embargo se han incluido las variantes de sentido erróneo con alta probabilidad de estar asociada a la enfermedad. Tres de estas mutaciones se encontraban en la región perteneciente al dominio BRCT de *BRCA1*, en donde existe, como ya se ha comentado, un test funcional que permite detectar las mutaciones patogénicas basándose en la actividad transcripcional de este dominio. También se ha considerado mutación patogénica cuando su localización en los residuos conservados de la proteína están en los dominios

funcionales importantes; y si existe cosegregación con familiares enfermos de cáncer de mama u ovario. Si las mutaciones de sentido erróneo no se hubiesen incluido, la probabilidad de ser portador de una mutación en *BRCA1* sería de 4.75% (11 mutaciones en 234 pacientes) y 6.8% (16 en 234) para el análisis de ambos genes de *BRCA*. Si se incluyen las mutaciones que truncan la proteína y las de sentido erróneo probablemente patogénicas, asciende a 8.9%.

Por tanto, en nuestro estudio hemos realizado el análisis de toda la región codificante, como en los principales estudios y hemos tenido en cuenta solamente las mutaciones que truncan la proteína.

Diferencias en la distribución de las mutaciones *BRCA1* y *BRCA2*

En nuestra población las mutaciones en el gen *BRCA2* tienen una proporción mayor que en el gen *BRCA1* (4.8% versus 0.8%), siendo las diferencias entre la cantidad de mutaciones localizadas en ambos genes estadísticamente significativa ($p=0.03$), lo cual indica que la prevalencia de mutaciones en nuestra muestra es mayor en el gen *BRCA2*, aunque hay que tener en cuenta que las mutaciones encontradas son pocas para obtener una potencia estadística suficiente.

En estudios realizados en población estadounidense (Malone y cols. 2000), sueca (Loman y cols. 2001) y turca (Yazici y cols. 2002) se ha encontrado una mayor contribución del gen *BRCA1* respecto a *BRCA2*. Sin embargo, en dos trabajos publicados en la población inglesa, la frecuencia de mutaciones es similar en los dos genes (Peto y cols. 1999, Pharoah y cols. 2000). En la Tabla 31 se puede ver la diferencia entre *BRCA1* y *BRCA2* en los principales estudios.

Tabla 31. Principales estudios de prevalencia de BRCA1 y BRCA2.

Estudios	%mutaciones <i>BRCA1</i>	%mutaciones <i>BRCA2</i>	N° pacientes
Malone (2000)	5.9	3.4	203
Loman (2001)	6.8	2.1	234
Peto (1999)	3.5	2.4	617
Pharoah (2000)	0.7	*	1435
Diez (1999)	1.3	*	159
De la Hoya (2001)	0	*	36
De San José (2003)	0.7	5.8	136
Gomendio (1999)	*	0	93
Nuestro estudio	0.8	4.8	124

* no se realizó estudio de este gen

En el trabajo de Malone y cols. (2000), las mutaciones en el gen *BRCA1* son más frecuentes que en *BRCA2*, tanto en las pacientes menores de 35 años no seleccionadas por su historia familiar, como en el grupo de mujeres menores de 45 años con familiares de 1° grado afectados de cáncer de mama; pero parece que la frecuencia de mutaciones en *BRCA1* aumenta a medida que disminuye la edad al diagnóstico, la presencia de más de 3 familiares afectados, y la presencia de carcinoma de ovario en la familia.

En la población sueca (Loman y cols. 2001) las mutaciones en el gen *BRCA1* tienen una proporción mayor que las mutaciones en el gen *BRCA2* (6.8% versus 2.1%). Esta diferencia de proporción la explican debido a la inclusión de las mutaciones de sentido erróneo causantes de enfermedad, pero sobre todo debido a la existencia de las mutaciones fundadoras en *BRCA1*.

En el estudio británico (Peto y cols. 1999) la frecuencia de las mutaciones observada fue de 3.5% y 2.4% para *BRCA1* y *BRCA2*

respectivamente, incluyendo únicamente las mutaciones que truncan la proteína; por tanto, la contribución es similar en ambos genes.

En nuestro estudio, llama la atención la detección de una sola mutación patogénica en el gen *BRCA1* (0.8% de la muestra). La mutación encontrada en *BRCA1* (2080delA) ha sido descrita 14 veces en la base de datos del BIC, pero no se había descrito previamente en la población española.

Un resultado similar al nuestro ha sido descrito por Pharoah y cols (2000), ya que en 1435 mujeres inglesas menores de 55 años, el 0.7% de las pacientes eran portadoras de mutación en *BRCA1*.

En otros estudios realizados en población española, la contribución de mutaciones en el gen *BRCA1* es muy baja. Díez y cols (1999) analizaron 10 fragmentos del gen *BRCA1* en 159 mujeres con cáncer de mama menores de 41 años, encontrando que sólo dos pacientes (1.3%) presentaban mutaciones en este gen. Por otra parte, de la Hoya y cols (2001), no encontraron mutaciones en *BRCA1* en un grupo de 36 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama u ovario antes de los 45 años. En un trabajo publicado recientemente (De Sanjose y cols. 2003), en el que se analizan ambos genes en una población de 136 mujeres con cáncer de mama menores de 46 años, de las áreas de Gerona y Tarragona, se localizó una mutación en *BRCA1*, lo que constituye en 0.7%. Estos trabajos, junto a nuestros resultados, sugieren que *BRCA1* sólo explica una pequeña proporción del cáncer de mama en mujeres jóvenes españolas. Aunque se necesitan estudios con muestras más amplias para probar esta idea.

Respecto a las mutaciones encontradas en *BRCA2*, en nuestra muestra han sido 6 de las 7 mutaciones patogénicas en un total de 124 pacientes (4.8%). Este porcentaje es aproximadamente el doble del

encontrado en población inglesa (2.4%), sueca (2.1%) y americana (2.7%) (Peto y cols. 1999, Loman y cols. 2001, Krainer y cols. 1997).

En población española, en el trabajo comentado anteriormente (De Sanjose y cols. 2003), en el que se analizan ambos genes en 136 mujeres con cáncer de mama menores de 46 años, se localizaron 8 mutaciones en *BRCA2* (5.8%). En otro estudio, Gomendio y cols. (1999) han realizado un cribaje del gen *BRCA2* entre 93 mujeres españolas con cáncer de mama sin antecedentes familiares de 1° grado y no encontraron mutaciones. La mediana de edad entre las mujeres de esta muestra es de 54 años. Nosotros hemos encontrado 4 mutaciones (4.1%) entre las 97 mujeres sin antecedentes familiares de 1° grado. La diferencia principal entre ambos estudios es el criterio de selección de las mujeres; en el trabajo de Gomendio y cols. (1999), las pacientes fueron seleccionadas consecutivamente sin límite de edad, mientras que las mujeres incluidas en nuestro estudio son todas menores de 41 años. La diferencia en el porcentaje de mutaciones detectadas puede deberse a una mayor penetrancia de *BRCA2* a edad temprana, o a una menor supervivencia de los portadores de mutaciones *BRCA2*, aunque serán necesarios estudios más amplios para clarificar los resultados.

Mutaciones prevalentes del área mediterránea

En *BRCA2* hemos encontrado 2 mutaciones (9254del5 e Y3006X) que podrían ser características de nuestra área geográfica y podrían estar incrementado la proporción de mutaciones *BRCA2* respecto a las mutaciones *BRCA1*. Aunque esto podría explicar la mayor proporción de mutaciones encontradas en *BRCA2*, no explicaría sin embargo, la baja prevalencia de mutaciones encontradas en *BRCA1*.

La mutación 9254del5 aparece en dos mujeres de la muestra aparentemente no relacionadas (Tabla 12), lo que indica que puede ser

más prevalente en nuestra área. En un estudio poblacional previo se describió esta alteración como una posible mutación fundadora, al encontrarla en dos familias no emparentadas (Neuhausen y cols. 1998). Estas dos familias aunque fueron detectadas en Francia tenían un origen español. La mutación ha sido localizada repetidas veces en España (BIC, Osorio y cols. 2000, Llorca y cols. 2002, Díez y cols. 2003)). Todos estos hechos apuntan a que la mutación 9254del5 sea una mutación fundadora característica de nuestra área geográfica. La mayor parte de las mujeres en las que ha sido encontrada la mutación 9254del5 pertenecen al área mediterránea española, donde muy probablemente tenga su origen y la prevalencia sea mayor.

Con el fin de verificar si se trata de una mutación fundadora, se ha llevado a cabo un estudio cooperativo entre varios grupos españoles (Díez y cols. 2003), en el cual se ha buscado específicamente la mutación en una amplia muestra de 180 mujeres con cáncer de mama familiar y en 300 mujeres con cáncer de mama diagnosticado antes de los 41 años. Los datos obtenidos apoyan la idea de un origen único relativamente antiguo.

La mutación Y3006X, localizada en el exón 23 de *BRCA2* (Tabla 12), fue también encontrada en otra paciente, estudiada por nosotros, que al no cumplir los criterios de diagnóstico a edad temprana, no fue incluida en el estudio de esta tesis. Esta paciente pertenece a un grupo de familias de "alto riesgo" que está reclutándose en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. La variante Y3006X no se ha descrito previamente en la bibliografía pero podría tratarse también de una mutación frecuente en nuestra área.

En cuatro pacientes de las seis (66.7%) en las que fueron identificadas mutaciones en el gen *BRCA2*, las mutaciones fueron localizadas en el exón 23. La acumulación de mutaciones en el exón 23 que detectamos en nuestra muestra no ha sido previamente descrita en la

bibliografía, lo que parece indicar que es un hecho aislado que se debe más a las características de nuestra población que a la presencia de un punto caliente en esta zona. Muy probablemente la causa de esta mayor proporción de mutaciones en el exón 23 sea la aparición de las 2 mutaciones (9254del5 e Y3006X) que, podrían estar de forma más frecuente representadas en nuestra población. La identificación de mutaciones *BRCA* más prevalentes en la población del área mediterránea permite diseñar estrategias de cribado, que faciliten el estudio molecular de los genes *BRCA* en los grupos de riesgo.

V.2. FRECUENCIA DE LAS MUTACIONES *BRCA1* Y *BRCA2* SEGÚN LA HISTORIA FAMILIAR DE CÁNCER DE MAMA/OVARIO

Se recogió información de los antecedentes familiares de cáncer (mama, ovario y otros tipos de tumores) de las 124 mujeres incluidas en el estudio, así como su edad al diagnóstico. Se identificaron los familiares de 1° grado (madre/padre y hermanos), los de 2° grado (abuelos y tíos), los de 3° grado (tíos abuelos y primos) y los de mayor de 3° grado (primos segundos, primos de los padres...). Cada mujer se clasificó de acuerdo a su historia familiar de cáncer de mama u ovario, según los criterios descritos en el apartado de Métodos .

La necesidad de establecer un grupo de pacientes sobre las que realizar un estudio genético deriva de las ventajas que supone (pronóstico individual y familiar, medidas profilácticas aconsejadas), así como al elevado coste y limitaciones técnicas actuales.

Entre los grupos analizados, únicamente el grupo que hemos denominado "alto riesgo", constituido por las mujeres que tienen al menos un familiar de 1° grado con cáncer de mama u ovario, junto con aquellas

que tienen algún familiar varón con cáncer de mama, el análisis de *BRCA* tiene significación estadística ($p=0.037$) (Tabla 32).

En el grupo de "alto riesgo", en 4 de las 26 mujeres (15.4%) se localizaron mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. De las 47 mujeres con antecedentes de cáncer de mama/ovario en la familia, pero que no cumplían criterios de "alto riesgo", aparecen dos mutaciones en *BRCA 2* (4.3%). Entre las 49 mujeres sin antecedentes de cáncer de mama u ovario, sólo aparece una mutación en el gen *BRCA2* (Tabla 14).

Podemos observar, por tanto, que hay una proporción mayor de mutaciones patogénicas entre el grupo de mujeres de "alto riesgo" de cáncer de mama, 15.4% (95% IC: 4.4-34.9) mientras que en el resto de las pacientes es de 3.1% (95% IC: 0.6-8), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0.037$). Solamente una de las 49 mujeres sin antecedentes familiares de cáncer de mama/ovario es portadora de una mutación patogénica. El riesgo relativo de ser portadora de mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2* es 4.92, por lo que en este subgrupo sería interesante realizar el estudio genético.

En el resto de subgrupos estudiados, el análisis estadístico no alcanza significación (Tabla 32).

Respecto al grupo de mujeres con al menos un familiar de primer grado afecto de cáncer de mama u ovario, el 12% presentan mutación en *BRCA*, respecto al 4.1% de las mujeres con mutaciones en *BRCA* sin antecedentes familiares de primer grado. Esta comparación no tiene significación estadística ($p=0.131$), aunque probablemente sea debido al bajo número de la muestra y a las pocas mutaciones detectadas, ya que cuando a este grupo le sumamos las familias con antecedentes de cáncer de mama en el varón (grupo denominado "alto riesgo"), sí se alcanza la significación estadística.

Tabla 32. Comparación de cada uno de los grupos analizados y el porcentaje de pacientes con mutaciones.

Grupos analizados	% de pacientes con mutación <i>BRCA</i>	<i>p</i>
Alto riesgo (*)	15.4	0.037
No alto riesgo (*)	3.1	
Familiares de 1° grado con c. M/O	12	0.131
No antec de 1° grado	4.1	
Familiares de 1° y 2° grado con c. M/O	0.9	0.6161
No antec familiares de 1° y 2° grado	5.5	
Cualquier familiar afecto de c. M/O	8.2	0.115
No familiares con c. mama	2	
≥2 familiares con C. M/O	5.1	0.292
1 familiar o ninguno con c. mama	6.3	
≥3 familiares con c. M/O	12.5	0.2121
2 o menos familiares con c. mama	4.7	

(*) "Alto riesgo": mujeres menores de 41 años con antecedentes familiares de 1° grado de cáncer de mama/ovario, o un varón en la familia con cáncer de mama (independientemente del grado).

El 0.9% de las mujeres con cáncer de mama menores de 41 años con familiares de 1 y 2° grado afecto de cáncer de mama u ovario, presentan mutación en *BRCA*; mientras que el 5.5% de las mujeres con mutaciones en *BRCA* no tienen familiares de 1 y 2° grado afectados de cáncer de mama u ovario ($p=0.6161$).

En el grupo con al menos un familiar afecto de cáncer de mama u ovario (independientemente del grado), el 8.2% de las mujeres presentan mutación en el gen *BRCA*, versus el 2% de las mujeres que no tienen ningún familiar ($p=0.115$).

El 47.5% de las pacientes tienen al menos dos familiares diagnosticados de cáncer de mama. Las mujeres que presentan mutación son el 5.1% versus el 6.3% de las pacientes que no presentan mutación. Si analizamos las diferencias entre el número de familiares afectados y la presencia de mutación en *BRCA*, no tiene significación estadística ($p=0.292$).

Respecto al número de familiares afectados de cáncer de mama/ovario, un 13 % de las pacientes tienen más de tres familiares afectados de cáncer de mama/ovario (incluyendo a la paciente). Las pacientes que presentan mutación dentro de este grupo son el 12.5% comparado con el 4.7% de las mujeres con tres o más familiares de cáncer de mama que no presentan mutación ($p=0.2121$).

Podemos concluir, que padecer cáncer de mama antes de los 41 años, en sí mismo, no es un buen indicador de la presencia de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, el porcentaje de mutaciones encontrado en el subgrupo que hemos denominado "alto riesgo" es de 15.4%, lo que implica que las mujeres diagnosticadas de cáncer de mama menores de 41 años con familiares de 1° grado afectados de cáncer de mama u ovario, o con antecedentes familiares de cáncer de mama en el varón, tienen un riesgo mucho mayor de presentar mutación *BRCA* ($RR=4.92$), y es en este subgrupo en el que se debería recomendar realizar un análisis genético.

Por el contrario, presentar familiares de segundo grado, o de cualquier grado en la familia (excepto primer grado), o presentar dos o más familiares afectados, no siendo ninguno de primer grado, no predice un riesgo aumentado de presentar mutación en *BRCA* en nuestra muestra de mujeres estudiada.

Cáncer de mama bilateral/contralateral

Además del diagnóstico de cáncer de mama a edad temprana, y la presencia de cáncer de mama u ovario en la familia, el carcinoma de mama bilateral es actualmente un criterio para realizar el estudio de mutaciones en los genes *BRCA*. En nuestra muestra ninguna de las 7 pacientes portadoras de mutaciones presentaba carcinoma de mama bilateral al diagnóstico. De las 117 pacientes en las que no se ha detectado mutación, dos mujeres fueron diagnosticadas de carcinoma de mama bilateral. (Tabla 33).

Respecto al carcinoma de mama contralateral, ninguna de las 7 mujeres con mutación en *BRCA1* o *BRCA2* lo ha presentado, con una mediana de seguimiento de 80 meses; sin embargo, en el grupo de pacientes en las que no se ha localizado mutación, 1 de 117 mujeres ha presentado cáncer de mama contralateral (Tabla 33). La paciente que presentó carcinoma de mama contralateral (a los 33 y 43 años) presentaba una mutación de significado incierto en *BRCA2* exón 18: 8401 G/C, V2728L; esta paciente pertenece a una familia de "alto riesgo" con su madre diagnosticada de carcinoma de mama bilateral, dos hermanas diagnosticadas de cáncer de mama a los 43 y 46 años, y la abuela materna también diagnosticada de cáncer de mama. La mutación V2728L se encuentra en un residuo no completamente conservado entre las especies, pero los aminoácidos que cambian son muy similares, por lo que se podría considerar que esta mutación puede ser la causante de la enfermedad; sin embargo se realizó el estudio mutacional en dos hermanas con cáncer de mama y en ninguna de ellas se localizó esta mutación, por lo que consideramos que no es responsable de la enfermedad.

Tabla 33. Pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama bilateral o contralateral, según la detección o no de mutación en *BRCA1/2*.

	C.mama bilateral/contralateral	No c. mama bilateral ni contralateral	TOTAL
Mutación <i>BRCA</i>	0	7	7
No mutación	3	114	117
TOTAL	3	121	124

En el estudio de Loman se diagnosticaron 18 carcinomas de mama contralaterales (6.9%) en las 262 pacientes estudiadas. El 66% de las pacientes con carcinoma de mama contralateral, presentaban mutación en *BRCA* o tenían al menos un familiar de 1° grado afecto de cáncer de mama, lo que indica una relación estrecha entre la presencia de carcinoma de mama contralateral y el riesgo hereditario. La historia familiar positiva fue mayor entre las pacientes con carcinoma de mama contralateral que entre las que no lo tuvieron.

En nuestro estudio, las tres pacientes con cáncer de mama bilateral/contralateral tienen familiares de 1° grado afectados de cáncer de mama, aunque en ninguna se encontró mutación en los genes *BRCA*. Por lo que según nuestro estudio, presentar carcinoma de mama bilateral o contralateral, fuera de los criterios definidos como "alto riesgo", no es suficiente para realizar el análisis mutacional.

Cáncer de ovario

Las mutaciones en el gen *BRCA1* se han relacionado con un aumento del cáncer de mama y ovario, sin embargo para *BRCA2* la situación es más compleja, y se ha estimado que la probabilidad de desarrollar carcinoma de ovario a lo largo de la vida es menor que para

pacientes con mutaciones de *BRCA1*. Se ha sugerido que en *BRCA2* existe un dominio denominado OCCR (Ovarian Cancer Cluster Region) donde las mutaciones parece que confieren un riesgo más elevado de padecer cáncer de ovario.

Ocho de las 124 pacientes incluidas en la muestra (6.4%), tienen antecedentes familiares de carcinoma de ovario, de las cuales tres son portadoras de mutaciones definitivas (*BRCA1* 2080del-A, *BRCA2* 295+2 T/C y *BRCA2* Y3006X) (Tabla 34). Por tanto, 3 de 7 mujeres con mutaciones en estos genes (42.9%) tienen antecedentes de cáncer de ovario en la familia, mientras que solamente 5 de las 117 restantes (3.4%) tienen algún familiar afecto. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0.005$). Esto indica que la presencia de cáncer de ovario entre las familias de mujeres diagnosticadas de cáncer de mama menores de 41 años, es un buen indicador de riesgo de la presencia de mutaciones en los genes *BRCA*, con un riesgo relativo de 10.71.

Tabla 34. Pacientes con antecedentes familiares (de cualquier grado) de carcinoma de ovario, según la detección o no de mutación en *BRCA1/2*.

	Antecedentes c.ovario	No antecedentes	TOTAL
Mutación <i>BRCA</i>	3	4	7
No mutación	5	112	117
TOTAL	8	116	124

Sin embargo, hay trabajos con resultados contradictorios. Loman y cols. (2001), describen que la frecuencia de cáncer de ovario en las mujeres con mutación en *BRCA1* es del 50% (8 de las 16 pacientes con mutación), sin embargo de las 5 mujeres con mutación en *BRCA2* ninguna tenía antecedentes familiares de cáncer de ovario.

En el trabajo de Peto y cols. (1999), de 6 pacientes con al menos un familiar de 1° ó 2° grado con cáncer de ovario, en 3 se detectaron mutaciones en *BRCA1* y no se detectó ninguna mutación en *BRCA2*.

Malone y cols (2000), detectan que las mutaciones de *BRCA1* en familias con antecedentes de cáncer de ovario son más prevalentes que las mutaciones en *BRCA2* (21.4% versus 3.6%). Respecto a *BRCA2*, el 4.8% de mutaciones se localizaron en mujeres con antecedentes familiares de cáncer de ovario versus 3.8% en mujeres sin ese antecedente.

Cáncer de mama en el varón

Estudios previos han sugerido que el carcinoma de mama en el varón podría estar ligado a la presencia de mutación en *BRCA2* (Friedman y cols. 1997). En nuestro estudio, solamente 1 de las 124 mujeres tiene antecedentes de cáncer de mama en el varón (abuelo materno), y esta mujer presenta una mutación en *BRCA2*. En el estudio de Malone y cols. (2000), 5 de las 386 mujeres tienen antecedentes de cáncer de mama en el varón. De éstas, 1 (20%) presenta mutación en *BRCA2* y ninguna presenta mutación en *BRCA1*. Por tanto, aunque la presencia de cáncer de mama en el varón es poco frecuente, se debería aconsejar realizar el estudio mutacional en *BRCA*, comenzando por *BRCA2*.

V.3.HISTORIA FAMILIAR DE OTROS TUMORES Y SU RELACIÓN CON LAS MUTACIONES *BRCA1* Y *BRCA2*

Se han relacionado las mutaciones en *BRCA1*, con un aumento del riesgo de padecer cáncer de páncreas, endometrio y próstata (Thompson y cols. 2002). En nuestra muestra, únicamente hemos encontrado una paciente con mutación en *BRCA1*, por lo que no se puede realizar ningún estudio comparativo. Esta paciente tenía como antecedente el

diagnóstico de cáncer de ovario en su madre, y no tenía otros antecedentes conocidos de cáncer.

El Breast Cancer Linkage Consortium (1999) demostró la existencia de un riesgo aumentado de padecer cáncer de próstata y cáncer de páncreas en portadores de mutación *BRCA2*, así como evidencia de un aumento de otros tumores en los familiares de 1° grado, como el carcinoma de orofaringe, estómago, melanoma, vesícula biliar y vías biliares. Nosotros no hemos podido realizar un estudio comparativo, ya que el número de mutaciones observado es pequeño. Entre las 6 pacientes con mutación en *BRCA2*, sólo 1 de ellas tenía un familiar de 1° grado (16.7%) afecto de un tumor distinto al cáncer de mama/ovario (carcinoma gástrico).

V.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y EVOLUTIVAS DE LAS PACIENTES. DIFERENCIAS ENTRE LOS CASOS ESPORÁDICOS Y LOS DEBIDOS A MUTACIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad muy heterogénea, con diferentes tipos histológicos que confieren características clínicas singulares. Se han publicado algunos trabajos que buscan las características propias de los tumores presentes en las mujeres portadoras de mutación en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Como se describe en el apartado "Características clínico-patológicas de los cánceres debidos a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*" de la Introducción, se ha visto que los tumores de mama relacionados con mutación en *BRCA1* presentan un mayor grado histológico y generalmente son de tipo medular, con receptores de estrógeno y progesterona negativos; además suelen ser tumores aneuploides (Marcus y cols. 1996, Marcus y cols. 1997, Armes y cols. 1998, Loman y cols. 1998, Agnarsson y cols. 1998, Robson y cols. 1998,

Verhoog y cols. 1998). Los tumores relacionados con *BRCA2* son mucho más heterogéneos y por tanto es más difícil encontrar un perfil propio. En algún estudio se ha encontrado un aumento de los tipos histológicos lobular y túbulo-tubular (Breast Cancer Linkage Consortium. 1997, Lakhani y cols. 1998, Armes y cols. 1998, Eisinger y cols. 1999). Tanto en portadores de mutaciones *BRCA1* como *BRCA2*, el cáncer de mama contralateral es más frecuente, así como su aparición suele ser en edades más precoces, a diferencia de los tumores de mama esporádicos en mujeres de edad más avanzada (Marcus y cols. 1997, Robson y cols. 1998, Verhoog y cols. 1999, Verhoog y cols. 2000).

Con el fin de analizar la situación en nuestra muestra, recogimos en una base de datos las características clínicas de todas las pacientes incluidas en el estudio, y se compararon los datos de las pacientes portadoras de mutaciones con las no portadoras. La mayor parte de las mutaciones definitivas encontradas en nuestra muestra se localizan en *BRCA2*, donde las características histológicas y clínicas son más heterogéneas que en *BRCA1*. Esto, sumado al bajo número de portadoras, dificulta el análisis destinado a definir las características tumorales propias de las pacientes con mutación.

Únicamente en el estadio, hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, entre el grupo de pacientes con mutación en *BRCA*, respecto al grupo sin mutación, ya que ninguna paciente con mutación se diagnosticó en estadio I, versus el 35.6% de las mujeres que no presentaban mutación. También hemos observado ciertas "tendencias": la presencia de tumores con un tamaño mayor de 2 cm y la infiltración de los ganglios axilares se encuentran en una proporción mayor entre las pacientes portadoras de mutación en *BRCA* (86% versus 52.1% y 86% versus 49.5% respectivamente) (Tabla 23). Por tanto, serán necesarios estudios, con una muestra mayor, para poder determinar las

características clínicas propias de los tumores relacionados con mujeres españolas portadoras de mutaciones en los genes *BRCA1* ó *BRCA2*.

Debido a que las mujeres de nuestra muestra ya han sido seleccionadas por padecer cáncer de mama a una edad temprana, no se observa una edad de aparición menor en las portadoras de mutación frente a las no portadoras, siendo en ambos grupos la mediana de edad al diagnóstico de 36 años. Se ha descrito que las mutaciones en *BRCA2* tienen una menor penetrancia a edades más precoces, siendo las portadoras de mutaciones en *BRCA1* las que expresan el cáncer a edades más tempranas (Ford y cols. 1998, Peto y cols. 1999). En nuestro estudio no es posible realizar esta comparación ya que únicamente disponemos de una portadora de mutación en *BRCA1*. Por otra parte, Gomendio y cols (1999), no encontraron ninguna mutación en *BRCA2* entre 93 mujeres españolas sin familiares afectados de 1º grado de cáncer de mama u ovario, seleccionadas sin límite de edad y con una mediana de edad de 54 años. En nuestro estudio, hemos encontrado 4 mutaciones entre las 96 mujeres sin antecedentes de 1º grado. Dado que todas nuestras pacientes son menores de 41 años, la diferencia entre el estudio de Gomendio y cols. (1999), y el nuestro puede indicar que las mutaciones en *BRCA2* están asociadas con una aparición más temprana del cáncer de mama en nuestra población. Esto se puede confirmar con un estudio recientemente publicado, en el que De Sanjosé y cols (2003), analizan la presencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* en 136 mujeres menores de 46 años, del área de Gerona y Tarragona, comparando la presencia de mutaciones en el grupo de menores de 41 años, y en el grupo de 41-45 años. Como en nuestro estudio, sólo encontraron una mutación en *BRCA1*, y el resto en *BRCA2*. En el grupo de mujeres menores de 41 años (62 mujeres) se localizaron 7 mutaciones (11.6%), frente al grupo de 41 a 45 años (74 mujeres) en las encontraron 2 mutaciones (2.7%). Esto parece confirmar que las mutaciones en *BRCA2* están asociadas con la aparición de cáncer de mama a una edad precoz.

V.5. UTILIDAD DE LOS MODELOS DE PREDICCIÓN DE PROBABILIDAD DE MUTACIÓN *BRCA1* Y *BRCA2*

Lo más importante de la valoración del riesgo de predisposición hereditaria al cáncer de mama debido a mutaciones en los genes *BRCA*, es personalizar las estrategias en el manejo de cada mujer. Esto permitirá incrementar la supervivencia en las mujeres de alto riesgo y disminuir el gasto y las complicaciones en las mujeres con un riesgo bajo de presentar mutación *BRCA*.

Hoy en día, las estrategias en el manejo de las familias que presentan mutación *BRCA1* o *BRCA2*, están bien establecidas. Las mujeres portadoras de mutación de *BRCA1* o *BRCA2* tienen un riesgo de desarrollar cáncer de mama entre el 50-80% a los 70 años y entre 10-40% de desarrollar cáncer de ovario. Las medidas profilácticas, como la ooforectomía, reduce el riesgo de cáncer de ovario cerca del 90% y del cáncer de mama en casi un 50% (Hartmann y cols. 2001, Meijers-Heijboer y cols. 2001, Rebbeck y cols. 2002), por tanto, estaría indicado en aquellas mujeres que no deseen tener más hijos. Otras opciones son la mastectomía profiláctica, la administración de tamoxifeno (Narod y cols. 2000), el uso de contraceptivos orales (Walker y cols. 2002), e intensificar la vigilancia (Brekelmans y cols. 2001).

Como ya se ha comentado en la Introducción, los modelos más utilizados son el modelo de Couch, Frank y *BRCA*PRO. Cada modelo se ha desarrollado a partir de una metodología y una población con unas características específicas, lo que hace que cada uno de los modelos sea válido en una población de características semejantes a las del modelo seleccionado.

Cuando se decide realizar un test genético, se tiene que considerar la probabilidad de encontrar una mutación germinal específica, así como el test adecuado para cada persona concreta y su familia. No existen guías establecidas para decidir a qué personas hay que realizar el análisis genético. La Sociedad Americana de Oncología Clínica recomienda que si la probabilidad de mutación *BRCA* estimada es mayor del 10%, se debe considerar realizar un test genético (ASCO, 1996).

En el análisis realizado según el **modelo de Couch** (sólo calcula la probabilidad de mutación en *BRCA1*), la sensibilidad de éste método en nuestra muestra es del 100%, ya que en nuestra muestra únicamente hemos localizado una mutación en *BRCA1*, y la especificidad del 38%. Este modelo se realizó a partir de una muestra de 169 mujeres con cáncer de mama e historia familiar de cáncer de mama y/u ovario, y es útil con uno o más casos de cáncer de mama, familias judías Ashkenazi, y familias con múltiples miembros afectados de cáncer de mama/ovario. Por tanto, en nuestra muestra que no tiene múltiples miembros afectados en una familia, no es un buen modelo predictivo.

Según el modelo de **Frank (Myriad II)** para la detección de *BRCA1* o *BRCA2*, realizado a partir de una muestra de 238 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama antes de los 50 años o con cáncer de ovario, con al menos un familiar de 1° o 2° grado con cáncer de mama antes de los 50 años o cáncer de ovario. Considerando que debemos realizar el análisis genético si la probabilidad de detectar mutación es mayor del 10%, la sensibilidad es del 71% y la especificidad del 84%. Este método no es aplicable a mujeres con cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años.

Según el modelo desarrollado por Parmigiani, **BRCAPRO**, para la detección de *BRCA1* o *BRCA2*, teniendo en cuenta a las pacientes con una probabilidad mayor del 10%, la sensibilidad es del 71% y la

especificidad del 75%. Este modelo es más complejo de realizar, ya que requiere un programa estadístico específico (en los anteriores se puede extraer de una tablas), pero se puede considerar más completo, ya que tiene en cuenta a los familiares de 1° y 2° orden.

Existe otro modelo, español, desarrollado por de la Hoya (2002), a partir de 102 familias españolas, con al menos tres casos de cáncer de mama u ovario, y al menos uno diagnosticado antes de los 50 años. En nuestra muestra no es aplicable este método, ya que los antecedentes familiares de cáncer de mama/ovario son muy escasos.

También hemos analizado en nuestra muestra, el grupo de "alto riesgo" de presentar cáncer de mama hereditario debido a mutación *BRCA1/BRCA*. En este subgrupo la sensibilidad es del 57% y la especificidad del 81%.

En general, estos modelos estiman una probabilidad similar y pueden ayudar a identificar pacientes que se beneficiarán de la realización del test genético para determinar la presencia de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*.

VI. CONCLUSIONES

1. La frecuencia de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en nuestra muestra de mujeres españolas con cáncer de mama diagnosticado antes de los 41 años es de 5.6%. Esta cifra es similar a la encontrada en otras poblaciones de nuestro entorno.

2. En la muestra analizada, las mutaciones se distribuyen de una manera desigual entre los genes *BRCA1* y *BRCA2*. La mayor parte de las mutaciones definitivas encontradas (6 de 7) se localizaron en el gen *BRCA2* (85.7%) y sólo una se localizó en *BRCA1*. La mayor parte de las mutaciones caracterizadas en *BRCA2* (66.7%) se encuentran localizadas en el interior del exón 23.

3. Las pacientes con familiares de primer grado con cáncer de mama u ovario, o con un varón afecto de cáncer de mama en su familia, forman un grupo, clasificado de "alto riesgo", donde se encuentran mutaciones *BRCA* en un porcentaje (15.4%) significativamente mayor ($p=0.037$) al resto de las pacientes (3.1%). En consecuencia, es aconsejable realizar el estudio molecular de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes con las características que permiten incluirlas en el grupo de "alto riesgo".

4. Los antecedentes familiares de cáncer de ovario son significativamente mayores ($p= 0.005$) entre las portadoras de mutaciones en *BRCA* (37.5%) que entre las no portadoras (3.5%). Esto indica que los antecedentes familiares de cáncer de ovario constituyen un indicador de riesgo de ser portador de mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2*.

5. Las mujeres portadoras de mutación *BRCA* se diagnostican en estadios más avanzado que las mujeres no portadoras.

6. Los métodos predictivos de mutación en *BRCA1* y *BRCA2*, Myriad II y *BRCAPRO* , son útiles para seleccionar pacientes en nuestra muestra

7. Considerando la alta proporción de pacientes diagnosticadas de cáncer de mama menores de 41 años con historia familiar de cáncer de mama u ovario, y la baja frecuencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, otros factores genéticos actualmente desconocidos deben jugar un papel importante. Deben existir genes todavía no caracterizados que puedan explicar el cáncer de mama en mujeres jóvenes.

8. Estos resultados no hacen aconsejable un estudio molecular de los genes *BRCA* de manera rutinaria en mujeres con cáncer de mama por el único hecho de haberlo desarrollado a una edad temprana.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abeliovich, D., Kaduri, L., Lerer, I., Weinberg, N., Amir, G., Sagi, M., Zlotogora, J., Heching, N. & Peretz, T. (1997) The founder mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. *Am J Hum Genet*, **60**: 505-14.

Agnarsson, B.A., Jonasson, J.G., Bjornsdottir, I.B., Barkardottir, R.B., Egilsson, V. & Sigurdsson, H. (1998) Inherited BRCA2 mutation associated with high grade breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, **47**: 121-7.

Agoff SN, Mendelin JE, Grieco VS, Garcia RL. (2002). Unexpected gynecologic neoplasms in patients with proven or suspected BRCA-1 or -2 mutations: implications for gross examination, cytology, and clinical follow-up. *Am J Surg Pathol*, **26**:171-8.

American Society of Clinical Oncology (1996). Special article: Statement of the American Society of Clinical Oncology: Genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*, **14**: 1730-36.

American Society of Clinical Oncology (2003). American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*, **21**: 2397-2406.

Anderson, S.F., Schlegel, B.P., Nakajima, T., Wolpin, E.S. & Parvin, J.D. (1998) BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat Genet*, **19**: 254-6.

Anglian Breast Cancer Study Group (2000) Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases.. *Br J Cancer*, **83**: 1301-8.

Ansquer Y, Gautier C, Fourquet A, Asselain B, Stoppa-Lyonnet D. (1998) Survival in early-onset BRCA1 breast-cancer patients. Institut Curie Breast Cancer Group. *Lancet*, **352**:541.

Armes, J.E., Egan, A.J., Southey, M.C., Dite, G.S., McCredie, M.R., Giles, G.G., Hopper, J.L. & Venter, D.J. (1998) The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age

40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population-based study. *Cancer*, **83**: 2335-45.

Armstrong, K., Weber, B., Ubel, P.A., Guerra, C. & Schwartz, J.S. (2002) Interest in BRCA1/2 testing in a primary care population. *Prev Med*, **34** (6): 590-5.

Baldwin, R.L., Nemeth, E., Tran, H., Shvartsman, H., Cass, I., Narod, S. & Karlan, B.Y. (2001) BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res* 2000, **60**: 5329-33.

Barros, F., Lareu, M.V., Salas, A. & Carracedo, A. (1997) Rapid and enhanced detection of mitochondrial DNA variation using single-strand conformation analysis of superposed restriction enzyme fragments from polymerase chain reaction-amplified products. *Electrophoresis*, **18**: 52-4.

Berry DA, Parmigiani G, Sanchez J, Schildkraut J, Winer E (1997). Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history. *Natl Cancer Inst*, **89**(3):227-38.

Ben David, Y., Chetrit, A., Hirsh-Yechezkel, G., Friedman, E., Beck, B.D., Beller, U., Ben-Baruch, G., Fishman, A., Levavi, H., Lubin, F., Menczer, J., Piura, B., Struewing, J.P. & Modan, B. (2002) Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. *J Clin Oncol* 2002 Jan 15;20(2):463-6, **20**: 463-6.

Berry DA, Iversen ES, Gudbjartsson DF, Hiller EH, Garber JE, Peshkin BN, Lerman C, Watson P, Lynch HT, Hilsenbeck SG, Rubinstein WS, Hughes KS, Parmigiani G (2002). BRCAPRO Validation, Sensitivity of Genetic Testing of BRCA1/BRCA2, and Prevalence of Other Breast Cancer Susceptibility Genes. *JCO*, **1**: 2701-2712.

Bignell, G.R., Canzian, F., Shayeghi, M., Stark, M., Shugart, Y.Y., Biggs, P., Mangion, J., Hamoudi, R., Rosenblatt, J., Buu, P., Sun, S., Stoffer, S.S., Goldgar, D.E., Romeo, G., Houlston, R.S., Narod, S.A., Stratton, M.R. & Foulkes, W.D. (1997) Familial nontoxic multinodular thyroid goiter locus maps to chromosome 14q but does not account for familial nonmedullary thyroid cancer. *Am J Hum Genet*, **61**: 1123-30.

Borg, A., Dorum, A., Heimdal, K., Maehle, L., Hovig, E. & Moller, P. (1999) BRCA1 1675delA and 1135insA account for one third of Norwegian familial breast-ovarian cancer and are associated with later disease onset than less frequent mutations. *Dis Markers*, **15**: 79-84.

Bork, P., Blomberg, N. & Nilges, M. (1996) Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat Genet*, **13**: 22-3.

Borresen, A.L., Andersen, T.I., Garber, J., Barbier-Piriaux, N., Thorlacius, S., Eyfjord, J., Ottestad, L., Smith-Sorensen, B., Hovig, E., Malkin, D. & . (1992) Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer Res*, **52**: 3234-6.

Breast Cancer Information Core (BIC): http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic

Breast Cancer Linkage Consortium (1997). Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. *Lancet*, **349**: 1505-10.

Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risk in BRCA2 mutation carriers. (1999). *J Natl Cancer Inst*, **91**:1310-16.

Brekemans CT, Seynaeve C, Bartels CC, Tilanus-Linthorst MM, Meijers-Heijboer EJ, Crepin CM, van Geel AA, Menke M, Verhoog LC, van den Ouweland A, Obdeijn IM, Klijn JG (2001). Effectiveness of breast cancer surveillance in BRCA1/2 gene mutation carriers and women with high familial risk. *J Clin Oncol*, **19**:924-30.

Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL. (2002). Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst*, **18**: 1365-72

Brown, M.A., Lo, L.J., Catteau, A., Xu, C.F., Lindeman, G.J., Hodgson, S. & Solomon, E. (2002) Germline BRCA1 promoter deletions in UK and Australian familial breast cancer patients: Identification of a novel deletion consistent with BRCA1:psiBRCA1 recombination. *Hum Mutat*, **19**: 435-42.

Callebaut, I. & Mornon, J.P. (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett*, **400**: 25-30.

Catteau, A., Harris, W.H., Xu, C.F. & Solomon, E. (1999) Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene*, **18**: 1957-65.

Chan, K.Y., Ozcelik, H., Cheung, A.N., Ngan, H.Y. & Khoo, U.S. (2002) Epigenetic factors

controlling the BRCA1 and BRCA2 genes in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res* , **62**: 4151-6.

Chaves FJ, Real JT, Garcia-Garcia AB, Civera M, Armengod ME, Ascaso JF, Carmena R. (2001) Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in a South European outbred population: influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor gene mutations on treatment response to simvastatin in total, LDL, and high-density lipoprotein cholesterol. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**:4926-32

Chen, J., Silver, D.P., Walpita, D., Cantor, S.B., Gazdar, A.F., Tomlinson, G., Couch, F.J., Weber, B.L., Ashley, T., Livingston, D.M. & Scully, R. (1998) Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell*, **2**: 317-28.

Claus, E.B., Risch, N. & Thompson, W.D. (1991) Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet*, **48**: 232-42.

Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. (1996) The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*: **77**, 2318-24.

Colditz, G.A., Rosner, B.A. & Speizer, F.E. (1996) Risk factors for breast cancer according to family history of breast cancer. For the Nurses' Health Study Research Group. *J Natl Cancer Inst*, **88**: 365-71.

Colgan TJ, Murphy J, Cole DE, Narod S, Rosen B. (2001). Occult carcinoma in prophylactic oophorectomy specimens: prevalence and association with BRCA germline mutation status. *Am J Surg Pathol*, **25**: 1283-9

Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. & Elledge, S.J. (1999) Requirement of ATM-dependent phosphorylation of BRCA1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*, **286**: 1162-6.

Couch, F.J., DeShano, M.L., Blackwood, M.A., Calzone, K., Stopfer, J., Campeau, L., Ganguly, A., Rebbeck, T. & Weber, B.L. (1997) BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med*, **336**: 1409-15.

Couch, F.J., Farid, L.M., DeShano, M.L., Tavtigian, S.V., Calzone, K., Campeau, L., Peng, Y., Bogden, B., Chen, Q., Neuhausen, S., Shattuck-Eidens, D., Godwin, A.K., Daly, M., Radford,

D.M., Sedlacek, S., Rommens, J., Simard, J., Garber, J., Merajver, S. & Weber, B.L. (1996) BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet*, **13**: 123-5.

Crook, T., Crossland, S., Crompton, M.R., Osin, P. & Gusterson, B.A. (1997) p53 mutations in BRCA1-associated familial breast cancer. *Lancet*, **350**: 638-9.

Davis, P.L., Miron, A., Andersen, L.M., Iglehart, J.D. & Marks, J.R. (1999) Isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter. *Oncogene*, **18**: 6000-12.

De la Hoya, M., Perez-Segura, P., Van Orsouw, N., Diaz-Rubio, E. & Caldes, T. (2002) Spanish family study on hereditary breast and/or ovarian cancer: analysis of the BRCA1 gene. *Int J Cancer*, **91**: 137-40.

De la Hoya M, Osorio A, Godino J, Sulleiro S, Tosar A, Perez-Segura P, Fernandez C, Rodriguez R, Diaz-Rubio E, Benitez J, Devilee P, Caldes T (2002). Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and cancer phenotype in Spanish breast/ovarian cancer families: implications for genetic testing. *Int J Cancer*, **97**: 466-7.

De Sanjose S, Leone M, Berez V, Izquierdo A, Font R, Brunet JM, Louat T, Vilardell L, Borrás J, Viladiu P, Bosch FX, Lenoir GM, Sinilnikova OM (2003). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: a population-based study. *Int J Cancer*, **106**: 588-93.

Deffenbaugh, A.M., Frank, T.S., Hoffman, M., Cannon-Albright, L. & Neuhausen, S.L. (2002) Characterization of common BRCA1 and BRCA2 variants. *Genet Test*, **6**: 119-21.

Den Dunnen, J.T. & van Ommen, G.J. (1999) The protein truncation test: A review. *Hum Mutat*, **14**: 95-102.

Diez, O., Osorio, A., Robledo, M., Barroso, A., Domenech, M., Cortes, J., Albertos, J., Sanz, J., Brunet, J., SanRoman, J.M., Alonso, M.C., Baiget, M. & Benitez, J. (1999) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Jewish mutations in Spanish breast cancer patients. *Br J Cancer*, **79**: 1302-3.

Diez, O, del Rio E, Domenech M, Hernandez EM, Sanz J, Brunet J, Alonso MC, Baiget M. (1999). Mutations in the BRCA1 gene in young Spanish women with breast cancer. *Med Clin (Barc)*. **112**: 51-4

Diez O, Osorio A, Duran M, Martinez-Ferrandis JI, de la Hoya M, Salazar R, Vega A, Campos B, Rodriguez-Lopez R, Velasco E, Chaves J, Diaz-Rubio E, Jesus Cruz J, Torres M, Esteban E, Cervantes A, Alonso C, San Roman JM, Gonzalez-Sarmiento R, Miner C, Carracedo A, Eugenia Armengod M, Caldes T, Benitez J, Baiget M (2003). Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat*, **22**: 301-12.

Dobrovic, A. & Simpfendorfer, D. (1997) Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res*, **57**: 3347-50.

Dong, J., Chang-Claude, J., Wu, Y., Schumacher, V., Debatin, I., Tonin, P. & Royer-Pokora, B. (1998) A high proportion of mutations in the BRCA1 gene in German breast/ovarian cancer families with clustering of mutations in the 3' third of the gene. *Hum Genet*, **103**: 154-61.

Dunning, A.M., Chiano, M., Smith, N.R., Dearden, J., Gore, M., Oakes, S., Wilson, C., Stratton, M., Peto, J., Easton, D., Clayton, D. & Ponder, B.A. (1997) Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Hum Mol Genet*, **6**: 285-9.

Dunning, A.M., Healey, C.S., Pharoah, P.D., Teare, M.D., Ponder, B.A. & Easton, D.F. (1999) A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**: 843-54.

Durocher, F., Shattuck-Eidens, D., McClure, M., Labrie, F., Skolnick, M.H., Goldgar, D.E. & Simard, J. (1996) Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. *Hum Mol Genet*, **5**: 835-42.

Easton, D., Ford, D. & Peto, J. (1993) Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surv*, **18**: 95-113.

Easton, D.F., Ford, D. & Bishop, D.T. (1995) Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, **56**: 265-71.

Easton, D.F., Steele, L., Fields, P., Ormiston, W., Averill, D., Daly, P.A., McManus, R., Neuhausen, S.L., Ford, D., Wooster, R., Cannon-Albright, L.A., Stratton, M.R. & Goldgar, D.E. (1997) Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome

13q12-13. *Am J Hum Genet*, **61**: 120-8.

Eisinger, F., Jacquemier, J., Nogues, C., Birnbaum, D. & Sobol, H. (1999) Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer*, **85**: 2291-5.

Eisinger, F., Nogues, C., Birnbaum, D., Jacquemier, J. & Sobol, H. (1998) BRCA1 and medullary breast cancer. *JAMA*, **280**: 1227-8.

Euhus DM, Smith K, Robinson L, Stucky A, Olopade OI, Cummings S, Garber JE, Chittenden A, Mills GB, Rieger P, Esserman L, Crawford B, Hughes KS, Roche CA, Ganz PA, Seldon J, Fabian CJ, Klemp J, Tomlinson G (2002). Pretest Prediction of BRCA1 or BRCA2 Mutation by Risk Counselors and the Computer Model BRCAPRO. *J Natl Cancer Inst*, **94**: 844-851.

FitzGerald, M.G., MacDonald, D.J., Krainer, M., Hoover, I., O'Neil, E., Unsal, H., Silva-Arrieto, S., Finkelstein, D.M., Beer-Romero, P., Englert, C., Sgroi, D.C., Smith, B.L., Younger, J.W., Garber, J.E., Duda, R.B., Mayzel, K.A., Isselbacher, K.J., Friend, S.H. & Haber, D.A. (1996) Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer. *N Engl J Med*, **334**: 143-9.

Ford, D., Easton, D.F., Bishop, D.T., Narod, S.A. & Goldgar, D.E. (1994) Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet*, **343**: 692-5.

Ford, D., Easton, D.F. & Peto, J. (1995) Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet*, **57**: 1457-62.

Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D.T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., Sobol, H., Teare, M.D., Struewing, J., Arason, A., Scherneck, S., Peto, J., Rebbeck, T.R., Tonin, P., Neuhausen, S., Barkardottir, R., Eyfjord, J., Lynch, H., Ponder, B.A., Gayther, S.A., Zelada-Hedman, M. & . (1998) 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**: 676-89.

Frank TS, Manley SA, Olopade OI, Cummings S, Garber JE, Bernhardt B, Antman K, Russo D, Wood ME, Mullineau L, Isaacs C, Peshkin B, Buys S, Venne V, Rowley PT, Loader S, Offit K, Robson M, Hampel H, Brenner D, Winer EP, Clark S, Weber B, Strong LC, Thomas A, et al. (1998). Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol*, **16**:2417-25.

Friedman, L.S., Gayther, S.A., Kurosaki, T., Gordon, D., Noble, B., Casey, G., Ponder, B.A. & Anton-Culver, H. (1997) Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population. *Am J Hum Genet*, **60**: 313-9.

Frost MH, Schaid DJ, Sellers TA, Slezak JM, Arnold PG, Woods JE, Petty PM, Johnson JL, Sitta DL, McDonnell SK, Rummans TA, Jenkins RB, Sloan JA, Hartmann LC. (2000). Long-term satisfaction and psychological and social function following bilateral prophylactic mastectomy. *JAMA*, 284: 319-24.

Fuks, F., Milner, J. & Kouzarides, T. (1998) BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene*, **17**: 2531-4.

Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L.M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y. & . (1994) BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, **266**: 120-2.

Gaffney DK, Brohet RM, Lewis CM, Holden JA, Buys SS, Neuhausen SL, Steele L, Avizonis V, Stewart JR, Cannon-Albright LA. (1998) Response to radiation therapy and prognosis in breast cancer patients with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Radiother Oncol*, **47**:129-36.

Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, Mulvihill JJ. (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst*, **81**: 1879-86.

Gayther, S.A., Warren, W., Mazoyer, S., Russell, P.A., Harrington, P.A., Chiano, M., Seal, S., Hamoudi, R., van Rensburg, E.J., Dunning, A.M. & . (1995) Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. *Nat Genet*, **11**: 428-33.

Garcia-Garcia, A.B., Real, J.T., Puig, O., Cebolla, E., Marin-Garcia, P., Martinez Ferrandis, J.I., Garcia-Sogo, M., Civera, M., Ascaso, J.F., Carmena, R., Armengod, M.E. & Chaves, F.J. (2001) Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Spain: Ten novel LDLR mutations and population analysis. *Hum Mutat*, **18**: 458-9.

Gomendio, B., Silva, J.M., Garcia, J.M., Provencio, M., Espana, P. & Bonilla, F. (1999) Low incidence of germline BRCA2 gene mutations among Spanish breast cancer patients. *Oncology*, **57**: 173-4.

Gowen, L.C., Johnson, B.L., Latour, A.M., Sulik, K.K. & Koller, B.H. (1996) BRCA1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet*, **12**: 191-4.

Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B. & King, M.C. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, **250**: 1684-9.

Hartmann, L.C., Schaid, D.J., Woods, J.E., Crotty, T.P., Myers, J.L., Arnold, P.G., Petty, P.M., Sellers, T.A., Johnson, J.L., McDonnell, S.K., Frost, M.H. & Jenkins, R.B. (1999) Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *N Engl J Med*, **340**: 77-84.

Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ, Frank TS, Soderberg CL, Sitta DL, Frost MH, Grant CS, Donohue JH, Woods JE, McDonnell SK, Vockley CW, Deffenbaugh A, Couch FJ, Jenkins RB (2001). Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, **93**:1633-7.

Hentze, M.W. & Kulozik, A.E. (1999) A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell*, **96**: 307-10.

Holt, J.T., Thompson, M.E., Szabo, C., Robinson-Benion, C., Arteaga, C.L., King, M.C. & Jensen, R.A. (1996) Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nat Genet*, **12**: 298-302.

Hoskins KF, Stopfer JE, Calzone KA, Merajver SD, Rebbeck TR, Garber JE, Weber BL (1995). Assessment and counseling for women with a family history of breast cancer. A guide for clinicians. *JAMA*, **273**: 577-85.

Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Beeson L, van den Brandt PA, Folsom AR, Fraser GE, Goldbohm RA, Graham S, Howe GR, et al. (1996). Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis. *N Engl J Med* **334**:356-61

Jemal A, Ram C., Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer E.J., Thun M.J (2004). Cancer Statistics, 2004 . *Cancer J Clin*, **54**:8-24.

Jensen, D.E., Proctor, M., Marquis, S.T., Gardner, H.P., Ha, S.I., Chodosh, L.A., Ishov, A.M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Minna, J., Borodovsky, A., Schultz, D.C., Wilkinson, K.D., Maul, G.G., Barlev, N., Berger, S.L., Prendergast, G.C. & Rauscher, F.J., 3rd (1998) BAP1: a

novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*, **16**: 1097-112.

Johannsson, O.T., Ranstam, J., Borg, A. & Olsson, H. (1998) Survival of BRCA1 breast and ovarian cancer patients: a population-based study from southern Sweden. *J Clin Oncol*, **16**: 397-404.

Kauff N. D., Satagopan J. M., Robson M. E., Scheuer L., Hensley M., Hudis C. A., Ellis N. A., Boyd J., Borgen P. I., Barakat R. R., Norton L., Castiel M., Nafa K., Offit K (2002). Risk-reducing Salpingo-oophorectomy in Women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *N Engl J Med*, **346**: 1609-1615

Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, **386**: 761, 763.

Koonin, E.V., Altschul, S.F. & Bork, P. (1996) BRCA1 protein products ... Functional motifs. *Nat Genet*, **13**: 266-8.

Krainer, M., Silva-Arrieta, S., FitzGerald, M.G., Shimada, A., Ishioka, C., Kanamaru, R., MacDonald, D.J., Unsal, H., Finkelstein, D.M., Bowcock, A., Isselbacher, K.J. & Haber, D.A. (1997) Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer. *N Engl J Med*, **336**: 1416-21.

Kwiatkowska, E., Teresiak, M., Breborowicz, D. & Mackiewicz, A. (2002) Somatic mutations in the BRCA2 gene and high frequency of allelic loss of BRCA2 in sporadic male breast cancer. *Int J Cancer*, **98**: 943-5.

Lakhani, S.R., Jacquemier, J., Sloane, J.P., Gusterson, B.A., Anderson, T.J., van de Vijver, M.J., Farid, L.M., Venter, D., Antoniou, A., Storer-Isser, A., Smyth, E., Steel, C.M., Haites, N., Scott, R.J., Goldgar, D., Neuhausen, S., Daly, P.A., Ormiston, W., McManus, R., Scherneck, S., Ponder, B.A., Ford, D., Peto, J., Stoppa-Lyonnet, D., Easton, D.F. & . (1998) Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst*, **90**: 1138-45.

Lancaster, J.M., Wooster, R., Mangion, J., Phelan, C.M., Cochran, C., Gumbs, C., Seal, S., Barfoot, R., Collins, N., Bignell, G., Patel, S., Hamoudi, R., Larsson, C., Wiseman, R.W., Berchuck, A., Iglehart, J.D., Marks, J.R., Ashworth, A., Stratton, M.R. & Futreal, P.A. (1996) BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat Genet*, **13**: 238-40.

Langston, A.A., Malone, K.E., Thompson, J.D., Daling, J.R. & Ostrander, E.A. (1996) BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med*, **334**: 137-42.

Levine DA, Gemignani ML. (2003). Prophylactic surgery in hereditary breast / ovarian cancer syndrome. *Oncology*, 17:932-41.

Li, S., Chen, P.L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C.K., Sharp, Z.D. & Lee, W.H. (1999) Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage. *J Biol Chem*, **274**: 11334-8.

Liaw, D., Marsh, D.J., Li, J., Dahia, P.L., Wang, S.I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K.M., Tsou, H.C., Peacocke, M., Eng, C. & Parsons, R. (1997) Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet*, **16**: 64-7.

Llort, G., Munoz, C.Y., Tuser, M.P., Guillermo, I.B., Lluch, J.R., Bale, A.E. & Franco, M.A. (2002) Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain. *Hum Mutat*, **19**: 307.

Loman, N., Johannsson, O., Bendahl, P., Dahl, N., Einbeigi, Z., Gerdes, A., Borg, A. & Olsson, H. (2002) Prognosis and clinical presentation of BRCA2-associated breast cancer. *Eur J Cancer*, **36**: 1365-73.

Loman, N., Johannsson, O., Bendahl, P.O., Borg, A., Ferno, M. & Olsson, H. (1998) Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer*, **83**: 310-9.

Loman, N., Johannsson, O., Kristoffersson, U., Olsson, H. & Borg, A. (2002) Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **93**: 1215-23.

Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Jr., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A. & . (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, **250**: 1233-8.

Malone, K.E., Daling, J.R., Neal, C., Suter, N.M., O'Brien, C., Cushing-Haugen, K., Jonasdottir, T.J., Thompson, J.D. & Ostrander, E.A. (2000) Frequency of BRCA1/BRCA2 mutations in a population-based sample of young breast carcinoma cases. *Cancer*, **88**: 1393-402.

Malone, K.E., Daling, J.R., Thompson, J.D., O'Brien, C.A., Francisco, L.V. & Ostrander, E.A. (1998) BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. *JAMA*, **279**: 922-9.

Marcus, J.N., Watson, P., Page, D.L., Narod, S.A., Lenoir, G.M., Tonin, P., Linder-Stephenson, L., Salerno, G., Conway, T.A. & Lynch, H.T. (1996) Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. *Cancer*, **77**: 697-709.

Marcus, J.N., Watson, P., Page, D.L., Narod, S.A., Tonin, P., Lenoir, G.M., Serova, O. & Lynch, H.T. (1997) BRCA2 hereditary breast cancer pathophenotype. *Breast Cancer Res Treat*, **44**: 275-7.

Meijers-Heijboer, H., van Geel, B., van Putten, W.L., Henzen-Logmans, S.C., Seynaeve, C., Menke-Pluymers, M.B., Bartels, C.C., Verhoog, L.C., van den Ouweland, A.M., Niermeijer, M.F., Brekelmans, C.T. & Klijn, J.G. (2001) Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med*, **345**: 159-64.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W. & . (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, **266**: 66-71.

Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, **16**: 1215.

Milner, J., Ponder, B., Hughes-Davies, L., Seltmann, M. & Kouzarides, T. (1997) Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature*, **386**: 772-3.

Morris, J.R., Keep, N.H. & Solomon, E. (2002) Identification of residues required for the interaction of BARD1 with BRCA1. *J Biol Chem*, **277**: 9382-6.

Mount, S.M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res*, **10**: 459-72.

Narod, S., Ford, D., Devilee, P., Barkardottir, R.B., Eyfjord, J., Lenoir, G., Serova, O., Easton, D. & Goldgar, D. (1995) Genetic heterogeneity of breast-ovarian cancer revisited. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, **57**: 957-8.

Narod, S.A., Ford, D., Devilee, P., Barkardottir, R.B., Lynch, H.T., Smith, S.A., Ponder, B.A., Weber, B.L., Garber, J.E., Birch, J.M. & . (1995) An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, **56**: 254-64.

Narod SA, Brunet JS, Ghadirian P, Robson M, Heimdal K, Neuhausen SL, Stoppa-Lyonnet D, Lerman C, Pasini B, de los Rios P, Weber B, Lynch H; Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. (2000). Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. *Lancet*, 356:1876-81.

Nathanson, K.L. & Weber, B.L. (2002) "Other" breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail. *Hum Mol Genet*, **10**: 715-20.

Neuhausen, S.L., Godwin, A.K., Gershoni-Baruch, R., Schubert, E., Garber, J., Stoppa-Lyonnet, D., Olah, E., Csokay, B., Serova, O., Laloo, F., Osorio, A., Stratton, M., Offit, K., Boyd, J., Caligo, M.A., Scott, R.J., Schofield, A., Teugels, E., Schwab, M., Cannon-Albright, L., Bishop, T., Easton, D., Benitez, J., King, M.C., Goldgar, D. & . (1998) Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent BRCA2 mutations in 111 families: results of an international study. *Am J Hum Genet*, **62**: 1381-8.

Newman, B., Mu, H., Butler, L.M., Millikan, R.C., Moorman, P.G. & King, M.C. (1998) Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of American women. *JAMA*, **279**: 915-21.

Oddoux, C., Struewing, J.P., Clayton, C.M., Neuhausen, S., Brody, L.C., Kaback, M., Haas, B., Norton, L., Borgen, P., Jhanwar, S., Goldgar, D., Ostrer, H. & Offit, K. (1996) The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nat Genet*, **14**: 188-90.

Osorio, A., Barroso, A., Martinez, B., Cebrian, A., San Roman, J.M., Lobo, F., Robledo, M. & Benitez, J. (2001) Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or ovarian cancer Spanish families. *Br J Cancer*, **82**: 1266-70.

Osorio, A., Robledo, M., Albertos, J., Diez, O., Alonso, C., Baiget, M. & Benitez, J. (1998) Molecular analysis of the six most recurrent mutations in the BRCA1 gene in 87 Spanish breast/ovarian cancer families. *Cancer Lett*, **123**: 153-8.

Papelard, H., de Bock, G.H., van Eijk, R., Vliet Vlieland, T.P., Cornelisse, C.J., Devilee, P. & Tollenaar, R.A. (2001) Prevalence of BRCA1 in a hospital-based population of Dutch breast cancer patients. *Br J Cancer*, **83**: 719-24.

Peelen, T., van Vliet, M., Petrij-Bosch, A., Mieremet, R., Szabo, C., van den Ouweland, A.M., Hogervorst, F., Brohet, R., Ligtenberg, M.J., Teugels, E., van der Luijt, R., van der Hout, A.H., Gille, J.J., Pals, G., Jedema, I., Olmer, R., van Leeuwen, I., Newman, B., Plandsoen, M., van der Est, M., Brink, G., Hageman, S., Arts, P.J., Bakker, M.M., Devilee, P. & . (1997) A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet*, **60**: 1041-9.

Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Warren, W., Rahman, N., Easton, D.F., Evans, C., Deacon, J. & Stratton, M.R. (1999) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **91**: 943-9.

Pharoah PD, Lipscombe JM, Redman KL, Day NE, Easton DF, Ponder BA (2000). Familial predisposition to breast cancer in a British population: implications for prevention. *Eur J Cancer*, **36**:773-9.

Pharoah, P.D., Antoniou, A., Bobrow, M., Zimmern, R.L., Easton, D.F. & Ponder, B.A. (2002) Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet*, **31**: 33-6.

Phillips, K.A., Nichol, K., Ozcelik, H., Knight, J., Done, S.J., Goodwin, P.J. & Andrulis, I.L. (1999) Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 mutations. *J Natl Cancer Inst*, **91**: 469-73.

Porter, D.E., Cohen, B.B., Wallace, M.R., Smyth, E., Chetty, U., Dixon, J.M., Steel, C.M. & Carter, D.C. (1994) Breast cancer incidence, penetrance and survival in probable carriers of BRCA1 gene mutation in families linked to BRCA1 on chromosome 17q12-21. *Br J Surg*, **81**: 1512-5.

Rahman, N. & Stratton, M.R. (1998) The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu Rev Genet*, **32**: 95-121.

Rajan, J.V., Marquis, S.T., Gardner, H.P. & Chodosh, L.A. (1997) Developmental expression of BRCA2 colocalizes with BRCA1 and is associated with proliferation and differentiation in multiple tissues. *Dev Biol*, **184**: 385-401.

Rice, J.C., Ozcelik, H., Maxeiner, P., Andrulis, I. & Futscher, B.W. (2001) Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis*, **21**: 1761-5.

Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van't Veer L, Garber JE, Evans G, Isaacs C, Daly MB, Matloff E, Olopade OI, Weber BL; Prevention and Observation of Surgical End Points Study Group (2002). Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med*, **346**:1616-22.

Roa, B.B., Boyd, A.A., Volcik, K. & Richards, C.S. (1996) Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet*, **14**: 185-7.

Robson, M., Gilewski, T., Haas, B., Levin, D., Borgen, P., Rajan, P., Hirschaut, Y., Pressman, P., Rosen, P.P., Lesser, M.L., Norton, L. & Offit, K. (1998) BRCA-associated breast cancer in young women. *J Clin Oncol*, **16**: 1642-9.

Rubin, S.C., Benjamin, I., Behbakht, K., Takahashi, H., Morgan, M.A., LiVolsi, V.A., Berchuck, A., Muto, M.G., Garber, J.E., Weber, B.L., Lynch, H.T. & Boyd, J. (1996) Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1. *N Engl J Med*, **335**: 1413-6.

Saurin, A.J., Borden, K.L., Boddy, M.N. & Freemont, P.S. (1996) Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci*, **21**: 208-14.

Schubert, E.L., Lee, M.K., Mefford, H.C., Argonza, R.H., Morrow, J.E., Hull, J., Dann, J.L. & King, M.C. (1997) BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. *Am J Hum Genet*, **60**: 1031-40.

Scully, R., Anderson, S.F., Chao, D.M., Wei, W., Ye, L., Young, R.A., Livingston, D.M. & Parvin, J.D. (1997) BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 5605-10.

Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J. & Livingston, D.M. (1997) Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*, **90**: 425-35.

Serova, O.M., Mazoyer, S., Puget, N., Dubois, V., Tonin, P., Shugart, Y.Y., Goldgar, D., Narod, S.A., Lynch, H.T. & Lenoir, G.M. (1997) Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer-susceptibility genes? *Am J Hum Genet*, **60**: 486-95.

Shattuck-Eidens, D., Oliphant, A., McClure, M., McBride, C., Gupte, J., Rubano, T., Pruss, D., Tavtigian, S.V., Teng, D.H., Adey, N., Staebell, M., Gumpfer, K., Lundstrom, R., Hulick, M., Kelly, M., Holmen, J., Lingenfelter, B., Manley, S., Fujimura, F., Luce, M., Ward, B., Cannon-Albright, L., Steele, L., Offit, K., Thomas, A. & . (1997) BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations. Risk factor analysis and implications for genetic testing. *JAMA*, **278**: 1242-50.

Siddique, H., Zou, J.P., Rao, V.N. & Reddy, E.S. (1998) The BRCA2 is a histone acetyltransferase. *Oncogene*, **16**: 2283-5.

Sidransky, D., Tokino, T., Helzlsouer, K., Zehnbauer, B., Rausch, G., Shelton, B., Prestigiacomo, L., Vogelstein, B. & Davidson, N. (1992) Inherited p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res*, **52**: 2984-6.

Smith, C.A., Moss, J.E., Gough, A.C., Spurr, N.K. & Wolf, C.R. (1992) Molecular genetic analysis of the cytochrome P450-debrisoquine hydroxylase locus and association with cancer susceptibility. *Environ Health Perspect*, **98**: 107-12.

Smith, S.A., Easton, D.F., Evans, D.G. & Ponder, B.A. (1992) Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. *Nat Genet*, **2**: 128-31.

Smith, T.M., Lee, M.K., Szabo, C.I., Jerome, N., McEuen, M., Taylor, M., Hood, L. & King, M.C. (1996) Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res*, **6**: 1029-49.

Sng, J.H., Chang, J., Feroze, F., Rahman, N., Tan, W., Lim, S., Lehnert, M., van der Pool, S. & Wong, J. (2002) The prevalence of BRCA1 mutations in Chinese patients with early onset breast cancer and affected relatives. *Br J Cancer*, **82**: 538-42.

Somasundaram, K., Zhang, H., Zeng, Y.X., Houvras, Y., Peng, Y., Wu, G.S., Licht, J.D., Weber, B.L. & El-Deiry, W.S. (1997) Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1. *Nature*, **389**: 187-90.

Southey, M.C., Tesoriero, A.A., Andersen, C.R., Jennings, K.M., Brown, S.M., Dite, G.S., Jenkins, M.A., Osborne, R.H., Maskiell, J.A., Porter, L., Giles, G.G., McCredie, M.R., Hopper, J.L. & Venter, D.J. (1999) BRCA1 mutations and other sequence variants in a population-based sample of Australian women with breast cancer. *Br J Cancer*, **79**: 34-9.

Spillman, M.A. & Bowcock, A.M. (1996) BRCA1 and BRCA2 mRNA levels are coordinately elevated in human breast cancer cells in response to estrogen. *Oncogene*, **13**: 1639-45.

Stratton, M.R., Ford, D., Neuhasen, S., Seal, S., Wooster, R., Friedman, L.S., King, M.C., Egilsson, V., Devilee, P., McManus, R. & . (1994) Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q. *Nat Genet*, **7**: 103-7.

Struewing, J.P., Abeliovich, D., Peretz, T., Avishai, N., Kaback, M.M., Collins, F.S. & Brody, L.C. (1995) The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat Genet*, **11**: 198-200.

Struewing, J.P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S.M., Berlin, M., McAdams, M., Timmerman, M.M., Brody, L.C. & Tucker, M.A. (1997) The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, **336**: 1401-8.

Swensen, J., Hoffman, M., Skolnick, M.H. & Neuhausen, S.L. (1997) Identification of a 14 kb deletion involving the promoter region of BRCA1 in a breast cancer family. *Hum Mol Genet*, **6**: 1513-7.

Szabo, C.I. & King, M.C. (1997) Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet*, **60**: 1013-20.

Tavtigian, S.V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S., Thorlacius, S., Offit, K., Stoppa-Lyonnet, D., Belanger, C., Bell, R., Berry, S., Bogden, R., Chen, Q., Davis, T., Dumont, M., Frye, C., Hattier, T., Jammulapati, S., Janecki, T., Jiang, P., Kehrer, R., Leblanc, J.F., Goldgar, D.E. & . (1996) The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet*, **12**: 333-7.

Teng, D.H., Bogden, R., Mitchell, J., Baumgard, M., Bell, R., Berry, S., Davis, T., Ha, P.C., Kehrer, R., Jammulapati, S., Chen, Q., Offit, K., Skolnick, M.H., Tavtigian, S.V., Jhanwar, S., Swedlund, B., Wong, A.K. & Kamb, A. (1996) Low incidence of BRCA2 mutations in breast carcinoma and other cancers. *Nat Genet*, **13**: 241-4.

Thakur, S., Zhang, H.B., Peng, Y., Le, H., Carroll, B., Ward, T., Yao, J., Farid, L.M., Couch, F.J., Wilson, R.B. & Weber, B.L. (1997) Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol Cell Biol*, **17**: 444-52.

Thompson, D., Szabo, C.I., Mangion, J., Oldenburg, R.A., Odefrey, F., Seal, S., Barfoot, R., Kroeze-Jansema, K., Teare, D., Rahman, N., Renard, H., Mann, G., Hopper, J.L., Buys, S.S., Andrulis, I.L., Senie, R., Daly, M.B., West, D., Ostrander, E.A., Offit, K., Peretz, T., Osorio, A., Benitez, J., Nathanson, K.L., Sinilnikova, O.M., Olah, E., Bignon, Y.J., Ruiz, P., Badzioch, M.D., Vasen, H.F., Futreal, A.P., Phelan, C.M., Narod, S.A., Lynch, H.T., Ponder, B.A., Eeles, R.A., Meijers-Heijboer, H., Stoppa-Lyonnet, D., Couch, F.J., Eccles, D.M., Evans, D.G., Chang-Claude, J., Lenoir, G., Weber, B.L., Devilee, P., Easton, D.F., Goldgar, D.E. & Stratton, M.R. (2002) Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 827-31.

Thompson D, Easton DF (2002).Cancer incidence in BRCA1 mutations carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium. *J Natl Cancer Inst*, **94**: 1358-65.

Thorlacius, S., Sigurdsson, S., Bjarnadottir, H., Olafsdottir, G., Jonasson, J.G., Tryggvadottir, L., Tulinius, H. & Eyfjord, J.E. (1997) Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population. *Am J Hum Genet*, **60**: 1079-84.

Tonin, P., Ghadirian, P., Phelan, C., Lenoir, G.M., Lynch, H.T., Letendre, F., Belanger, D., Monte, M. & Narod, S.A. (1995) A large multisite cancer family is linked to BRCA2. *J Med Genet*, **32**: 982-4.

Turchetti, D., Cortesi, L., Federico, M., Bertoni, C., Mangone, L., Ferrari, S. & Silingardi, V. (2002) BRCA1 mutations and clinicopathological features in a sample of Italian women with early-onset breast cancer. *Eur J Cancer*, **36**: 2083-9.

Vallon-Christersson, J., Cayan, C., Haraldsson, K., Loman, N., Bergthorsson, J.T., Brondum-Nielsen, K., Gerdes, A.M., Moller, P., Kristoffersson, U., Olsson, H., Borg, A. & Monteiro, A.N. (2001) Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet*, **10**: 353-60.

Vega, A., Campos, B., Bressac-De-Paillerets, B., Bond, P.M., Janin, N., Douglas, F.S., Domenech, M., Baena, M., Pericay, C., Alonso, C., Carracedo, A., Baiget, M. & Diez, O. (2002) The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the

transcript. *Hum Mutat*, **17**: 520-1.

Verhoog, L.C., Berns, E.M., Brekelmans, C.T., Seynaeve, C., Meijers-Heijboer, E.J. & Klijn, J.G. (2001) Prognostic significance of germline BRCA2 mutations in hereditary breast cancer patients. *J Clin Oncol*, **18**: 119S-24S.

Verhoog, L.C., Brekelmans, C.T., Seynaeve, C., Dahmen, G., van Geel, A.N., Bartels, C.C., Tilanus-Linthorst, M.M., Wagner, A., Devilee, P., Halley, D.J., van den Ouweland, A.M., Meijers-Heijboer, E.J. & Klijn, J.G. (1999) Survival in hereditary breast cancer associated with germline mutations of BRCA2. *J Clin Oncol*, **17**: 3396-402.

Verhoog, L.C., Brekelmans, C.T., Seynaeve, C., Meijers-Heijboer, E.J. & Klijn, J.G. (2001) Contralateral breast cancer risk is influenced by the age at onset in BRCA1-associated breast cancer. *Br J Cancer*, **83**: 384-6.

Verhoog, L.C., Brekelmans, C.T., Seynaeve, C., van den Bosch, L.M., Dahmen, G., van Geel, A.N., Tilanus-Linthorst, M.M., Bartels, C.C., Wagner, A., van den Ouweland, A., Devilee, P., Meijers-Heijboer, E.J. & Klijn, J.G. (1998) Survival and tumour characteristics of breast-cancer patients with germline mutations of BRCA1. *Lancet*, **351**: 316-21.

Wagner, T.M., Moslinger, R., Zielinski, C., Scheiner, O. & Breiteneder, H. (1996) New Austrian mutation in BRCA1 gene detected in three unrelated HBOC families. *Lancet*, **347**: 1263.

Walker GR, Schlesselman JJ, Ness RB (2002). Familial history of cancer, oral contraceptive use, and ovarian cancer risk. *Am J Obstet Gynecol* **186**:8-14.

Wang, H., Shao, N., Ding, Q.M., Cui, J., Reddy, E.S. & Rao, V.N. (1997) BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene*, **15**: 143-57.

Wong, A.K., Pero, R., Ormonde, P.A., Tavtigian, S.V. & Bartel, P.L. (1997) RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene BRCA2. *J Biol Chem*, **272**: 31941-4.

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. & Micklem, G. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, **378**: 789-92.

Wooster, R., Neuhausen, S.L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D. & . (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, **265**: 2088-90.

Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X.L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M. & Baer, R. (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet*, **14**: 430-40.

Xu, C.F., Brown, M.A., Chambers, J.A., Griffiths, B., Nicolai, H. & Solomon, E. (1995) Distinct transcription start sites generate two forms of BRCA1 mRNA. *Hum Mol Genet*, **4**: 2259-64.

Xu, C.F., Chambers, J.A. & Solomon, E. (1997) Complex regulation of the BRCA1 gene. *J Biol Chem*, **272**: 20994-7.

Yang, Q., Yoshimura, G., Nakamura, M., Nakamura, Y., Suzuma, T., Umemura, T., Mori, I., Sakurai, T. & Kakudo, K. (2002) BRCA1 in non-inherited breast carcinomas (Review). *Oncol Rep*, **9**: 1329-33.

Yano, K., Morotomi, K., Saito, H., Kato, M., Matsuo, F. & Miki, Y. (2001) Nuclear localization signals of the BRCA2 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **270**: 171-5.

Yarden, R.I. & Brody, L.C. (1999) BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 4983-8.

Yazici, H., Bitisik, O., Akisik, E., Cabioglu, N., Saip, P., Muslumanoglu, M., Glendon, G., Bengisu, E., Ozbilen, S., Dincer, M., Turkmen, S., Andrulis, I.L., Dalay, N. & Ozelik, H. (2002) BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish breast/ovarian families and young breast cancer patients. *Br J Cancer*, **83**: 737-42.

Yazici H, Glendon G, Yazici H, Burnie SJ, Saip P, Buyru F, Bengisu E, Andrulis IL, Dalay N, Ozelik H. (2002). BRCA1 and BRCA2 mutations in Turkish familial and non-familial ovarian cancer patients: a high incidence of mutations in non-familial cases. *Hum Mutat*, **20**:28-34

Zhong, Q., Chen, C.F., Li, S., Chen, Y., Wang, C.C., Xiao, J., Chen, P.L., Sharp, Z.D. & Lee, W.H. (1999) Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science*, **285**: 747-50.