

Mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* en familias estudiadas en el Programa de Consejo Genético en el Cáncer de la Comunidad Valenciana



Eva Esteban Cardeñosa^a, Pascual Bolufer Gilabert^a, Sarai Palanca Suela^a, Eva Barragán González^a, Silvestre Oltra Soler^b, Isabel Chirivella González^c, Ángel Segura Huerta^d, Carmen Guillén Ponce^e, Eduardo Martínez de Dueñas^f, Dolores Cuevas Cuerda^g y Dolores Salas Trejo^h, en representación del Grupo de Asesoramiento en Cáncer Hereditario de la Comunidad Valenciana

^aLaboratorio de Biología Molecular. Servicio de Biopatología Clínica. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

^bUnidad de Genética. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

^cUnidad de Consejo Genético en Cáncer. Hospital Clínico Universitario. Valencia.

^dUnidad de Consejo Genético en Cáncer. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

^eUnidad de Consejo Genético en Cáncer. Hospital General. Elche. Alicante.

^fUnidad de Consejo Genético en Cáncer. Consorcio Hospital Provincial. Castellón.

^gServicio de Protocolización e Integración Asistencial. Dirección General de Asistencia Sanitaria. Agencia Valenciana de Salud. Valencia.

^hOficina del Plan de Cáncer. Dirección General de Salud Pública. Conselleria de Sanitat. Valencia. España.

FUNDAMENTO Y OBJETIVO: El objetivo del estudio ha sido conocer las peculiaridades del espectro mutacional de los genes *BRCA1* y *BRCA2* de la Comunidad Valenciana en relación con el resto de España y relacionar las mutaciones con las características de las familias seleccionadas.

PACIENTES Y MÉTODO: Se han estudiado las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* en 147 familias con historia de cáncer de mama y/o de ovario. Su detección se realizó amplificando las zonas codificantes y las zonas vecinas que flanquean *BRCA1* y *BRCA2* mediante reacción en cadena de la polimerasa, detección de la formación de heterodúplex mediante electroforesis en geles sensibles a los cambios de conformación y caracterización de los mismos mediante secuenciación.

RESULTADOS: Se identificaron 24 mutaciones patogénicas diferentes en 50 de las 147 familias (34,0%; 23 en *BRCA1* y 27 en *BRCA2*). La mayor incidencia se registró en familias con cáncer de mama y ovario, y con más de 3 de casos de cáncer de mama. Las mutaciones más frecuentes en *BRCA1* fueron c.187_188delAG, c.2080delA y c.3889_3890delAG, y en *BRCA2*, c.9254_9258delATCAT y c.9204delCATCAGATTTATAT. Se describieron 5 mutaciones patogénicas (p.Y1429X en *BRCA1* y c.1835insT, c.5025delT, c.6722delT y p.Q3156X en *BRCA2*) que no constan en otros estudios españoles ni en el Breast Cancer Information Core Database. Entre ellas, c.1835insT y c.5025delT son recurrentes y pudieran ser mutaciones propias de la población de la Comunidad Valenciana.

CONCLUSIONES: Se han detectado mutaciones patogénicas en *BRCA1* o *BRCA2* en el 34,0% de las familias. Las mutaciones c.1835insT y c.5025delT, de nueva descripción, son recurrentes y propias de la Comunidad Valenciana. El estudio aporta 5 nuevas mutaciones patológicas al espectro mundial y otras 5 al espectro de mutaciones español de *BRCA1* y *BRCA2*.

Palabras clave: Cáncer de mama familiar. *BRCA1*. *BRCA2*. Mutaciones patogénicas. Programa de Consejo Genético en el Cáncer. Comunidad Valenciana.

BRCA1 and *BRCA2* mutations in families studied in the Program of Genetic Counselling in Cancer of the Valencian Community (Spain)

BACKGROUND AND OBJECTIVE: The objective of the present study was to investigate the mutational spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* in the Valencian Community, comparing this spectrum with that reported in Spain. We also analyze the association of the mutations with the family history of the selected families.

PATIENTS AND METHOD: We analyzed the mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* in 147 families with history of breast and/or ovarian cancer. The detection was based on the amplification of in frame and flanking regions of *BRCA1* and *BRCA2* genes by polymerase chain reaction, detection of the heteroduplex formed by conformation-sensitive gel electrophoresis and their characterization by sequencing.

RESULTS: We identified 24 different pathogenic mutations in 50 out of the 147 families (34.0%; 23 in *BRCA1* and 27 in *BRCA2*). The higher incidence of pathogenic mutations was observed in families with breast and ovarian cancer or with more than 3 cases of breast cancer. The most frequent mutations in *BRCA1* were the c.187_188delAG, c.2080delA and the c.3889_3890delAG, whereas for *BRCA2* the mutations with higher prevalence was observed for c.9254_9258delATCAT and the c.9204delCATCAGATTTATAT. We detected 5 pathogenic mutations (p.Y1429X in *BRCA1* and c.1835insT, c.5025delT, c.6722delT and p.Q3156X in *BRCA2*) not reported in the Breast Cancer Information Core Database. Among them, the *BRCA2* mutations c.1835insT and c.5025delT were recurrent and seemed to be characteristic of the population the Valencian Community.

CONCLUSIONS: We detected pathogenic mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes in 34.0% of the families studied. The mutations c.1835insT and c.5025delT were 2 new recurrent pathogenic mutations in *BRCA2* that seemed to be characteristic of the population of the Valencian Community. The study reports 5 new pathogenic mutations to the world spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* mutations and other 5 mutations to the Spanish spectrum.

Key words: Familial breast cancer. *BRCA1*. *BRCA2*. Pathogenic mutations. Program of Genetic Counselling in Cancer. Valencian Community.

La Fundación para Investigación La Fe concedió a Sarai Palanca Suela (licenciada en Farmacia, especialista en Análisis Clínicos) el contrato para investigación que hizo posible su participación en el presente estudio.

Correspondencia: Dr. P. Bolufer Gilabert.
Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Biopatología Clínica.
Escuela de Enfermería (7.ª planta). Hospital Universitario La Fe.
Avda. Campanar, 21. 46009 Valencia. España.
Correo electrónico: bolufer_pas@gva.es

Recibido el 15-11-2006; aceptado para su publicación el 13-3-2007.

El cáncer de mama (CM) es un problema de salud pública en los países desarrollados. De hecho, una de cada 9 mujeres lo presentará a lo largo de su vida¹. En la Comunidad Valenciana la incidencia estimada de CM es de 50,22 casos por cada 100.000 mujeres (1.349 nuevos casos al año) y representa la primera causa de muerte por tumores malignos (Servicio de Epidemiología, Dirección General de Salud Pública)².

Desde el descubrimiento de los genes de susceptibilidad al CM y cáncer de ovario (CO), *BRCA1*³ y *BRCA2*⁴, se sabe que un 5% de los casos de CM pueden explicarse por la existencia de mutaciones patogénicas en dichos genes. El modelo de predisposición genética que siguen los genes *BRCA1* y *BRCA2* es de tipo autosómico dominante de alta penetrancia, en el que la herencia de una única mutación en alguno de estos 2 genes confiere un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad a lo largo de la vida (un 45-85% de riesgo de CM y un 11-63% de CO)^{5,6}.

El espectro de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* puede tener amplias diferencias en las distintas comunidades debido a la diversidad étnica de éstas⁷. Algunas poblaciones o grupos étnicos presentan mutaciones fundadoras, procedentes de un antepasado común, que aparecen de forma recurrente en la mayoría de las familias con CM/CO hereditario de esas poblaciones^{8,9}. En España se ha publicado el espectro de mutaciones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes con historia familiar de CM¹⁰, pero son escasos los estudios efectuados en las diferentes comunidades que permitan conocer el espectro mutacional propio de cada una de ellas¹¹⁻¹³.

Por otro lado, la proporción de familias en las que se detecta una mutación patogénica en *BRCA1* o *BRCA2* es muy variable y depende de los criterios que se apliquen para la selección de pacientes¹⁴. Así diversos estudios han tratado de relacio-

nar la carga familiar en CM/CO con la proporción de mutaciones detectadas¹⁵ buscando con ello criterios que procuren la detección del máximo número de casos positivos para estas mutaciones, a la vez que se minimizan los casos negativos. Con el objeto de conocer las peculiaridades del espectro mutacional de los genes *BRCA1* y *BRCA2* de la población de la Comunidad Valenciana en relación con la del resto de España y evaluar la relación de la presencia de tales mutaciones con la carga familiar en CM/CO, en el presente estudio se analizan los resultados del primer año de funcionamiento del Programa de Consejo Genético en el Cáncer de la Comunidad Valenciana (Orden de 3 de marzo de 2005 de la Conselleria de Sanitat; Diari Oficial de la Generalitat Valenciana núm. 4.969/183/2005).

Pacientes y métodos

Familias y pacientes

El Laboratorio de Biología Molecular del Hospital La Fe (laboratorio de referencia en la Comunidad Valenciana para los estudios de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*), durante el primer año de funcionamiento del Programa de Consejo Genético en Cáncer (desde marzo de 2005 hasta febrero de 2006), analizó 290 muestras de individuos pertenecientes a 147 familias no relacionadas. Estos sujetos fueron seleccionados por las 4 Unidades de Consejo Genético en Cáncer (UCGC) de acuerdo con los criterios establecidos en el Programa de Consejo Genético en Cáncer para el CM/CO familiar² (casos únicos con CM y CO; CM primario bilateral en menores de 40 años, CM en menores de 30 años, CM y CO; familias con 2 casos de CM en parientes de primer grado: al menos un CM en menores de 50 años o bilateral, 2 o más CO, CM y CO en 2 familiares, CM en mujer y CM en varón; familias con 3 o más casos de CM, al menos 2 de primer grado).

Antes de la realización de la prueba genética se informó a los pacientes del objetivo del estudio y de las repercusiones y limitaciones de las pruebas genéticas. Todos ellos firmaron el documento de consentimiento informado elaborado por la Conselleria de Sanitat, que contempla los principios éticos de la Declaración de Helsinki¹⁶.

Como casos índices representativos de cada familia se seleccionó, cuando fue posible, a los individuos más jóvenes diagnosticados de CM y/o CO.

En el presente estudio la carga familiar de CM/CO se ha catalogado en 5 tipos: el tipo 1 corresponde a familias con casos de CM y CO en un mismo individuo o en varios; el tipo 2, a familias con casos de CM entre los que hay algún varón afectado; el tipo 3, a familias con 3 o más casos de CM; el tipo 4, a familias con menos de 3 casos de CM, y el tipo 5, a familias con casos únicos de CM diagnosticados en edad temprana.

En las familias cuyo caso índice presentaba una mutación patológica en alguno de los 2 genes analizados, se realizaron estudios de segregación familiar y el análisis de mutaciones se amplió tanto a familiares afectados de CM y/o CO como a familiares sanos.

Muestras y extracción del ADN

Para el estudio de mutaciones se extraen a cada paciente 3 ml de sangre periférica anticoagulada con K₃-ácido edético (EDTA). El ADN leucocitario se extrae directamente a partir de 500 µl de la sangre empleando el MagNA Pure LC DNA Isolation Kit-Large Volume, automatizado en el robot MagNA Pure LC System (Roche Diagnostics). La extracción de ADN se realiza por triplicado: se utiliza una alícuota para el estudio y las 2 restantes se almacenan en un banco de ADN en previsión de la aparición de nuevos genes que predispongan al CM/CO.

Estudio mutacional de los genes *BRCA1* y *BRCA2*

En primer lugar se procede a la amplificación de los exones codificantes y regiones intrónicas que flanquean los genes *BRCA1* y *BRCA2* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (14 reacciones de PCR múltiples para amplificar los 22 exones de *BRCA1* y 17 reacciones de PCR múltiples para amplificar los 26 exones de *BRCA2*), empleando los cebadores y condiciones descritos en el Breast Cancer Information Core (BIC)¹⁷.

La detección de mutaciones se realiza mediante el procedimiento de electroforesis en gel sensible a la conformación¹⁸, que se basa en la diferente migración electroforética de los fragmentos de homodúplex y heterodúplex de ADN. Para la formación de los homodúplex/heterodúplex, el ADN amplificado por PCR se desnaturaliza y renaturaliza empleando un gradiente lento de temperaturas que van desde 98 hasta 25 °C. Posteriormente cada muestra se somete a electroforesis en geles medianamente desnaturizantes a 230 voltios (cubeta PROTEAN Ili Cell, Bio Rad) durante 16-18 h. La carrera electroforética discrimina la migración de los fragmentos de homodúplex de la de los fragmentos de heterodúplex, y las bandas de homodúplex/heterodúplex se visualizan tras la tinción argéntica del gel. La aparición de heterodúplex en un fragmento de ADN implica la existencia de un cambio en la secuencia del ADN del gen objeto de estudio.

Secuenciación y descripción de los cambios nucleotídicos

La caracterización de los productos de PCR que presentan heterodúplex se realiza mediante su secuenciación. Para ello se procede a la eliminación de cebadores remanentes de la PCR mediante ExoSAP-IT (USB Corporation), para posteriormente realizar la reacción de secuenciación empleando los reactivos y siguiendo las instrucciones del equipo ABI Prism BigDye Terminator, versión 1.1 (Applied Biosystems). Tras la reacción de secuenciación se procede a la precipitación de los productos de ADN generados y a su electroforesis en el secuenciador ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer).

En el estudio de mutaciones se toman como referencia las secuencias de los genes *BRCA1* y *BRCA2* del GenBank (U14680 y U43746, respectivamente). Las alteraciones moleculares encontradas se designan siguiendo la nomenclatura de Den Dunen y Paalman¹⁹.

Interpretación de los resultados

Se consideran mutaciones patológicas las alteraciones detectadas en la secuencia de *BRCA1* y/o *BRCA2* que causan cambios en el marco de lectura (mutaciones *frameshift*), señales de parada en la sin-

tesis proteica (mutaciones sin sentido o *nonsense*), mutaciones que afectan a la unión intrón-exón (mutaciones de tipo *splicing*) y las mutaciones *missense* que originen un cambio de aminoácido que afecte a la funcionalidad de la proteína codificada. Se clasifican como polimorfismos las variantes en la secuencia que no modifican el riesgo de aparición del CM/CO, y se catalogan como variantes de efecto desconocido (VED) aquellos cambios cuya influencia en la susceptibilidad a presentar CM/CO no está aún establecida. En todos los casos la mutación detectada se consulta en el BIC¹⁷ para averiguar si ha sido descrita con anterioridad y conocer su significado patológico.

Análisis estadístico

Para el análisis de la asociación de la incidencia de las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* con los tipos de familias se aplicó el contraste de la χ^2 de Pearson tomando como significación estadística los valores de p por las 2 colas inferiores a 0,05.

Resultados

Las familias más representativas del estudio fueron aquellas con más de 3 casos de CM (tipo 3; 34,0%), las que presentaron 2 casos de CM (tipo 4; 27,2%) y aquellas con CM y CO (tipo 1; 27,2%) (tabla 1). De las 147 familias, 50 (34,0%) presentaron mutaciones patológicas (23 en *BRCA1* y 27 en *BRCA2*) (tablas 2 y 3). En el gen *BRCA1* se detectaron 7 mutaciones *frameshift* (c.187_188delAG, c.1623_1627delITAAA, c.2072_2075delGAAA, c.2080delA, c.3450_3453delCAAG, c.3889_3890delAG y c.4280_4281delTC), 2 *nonsense* (p.S1262X y p.Y1429X), una de *splicing* (c.331+1G → A) y una mutación *missense* (p.A1708E) (tabla 2). En el gen *BRCA2* se encontraron 9 mutaciones *frameshift* (c.1835insT, c.3036_3039delACAA, c.3492insT, c.5025delT, c.5164_5167delGAAA, c.6503_6504delTT, c.6722delT, c.9206_9219del14 y c.9254_9258delATCAT), 3 *nonsense* (p.E1308X, p.Y3006X y p.Q3156X) y una de *splicing* (c.199+2T → C) (tabla 3). Prácticamente la totalidad de las mutaciones patológicas detectadas (23/24) generan una proteína BRCA de menor tamaño molecular debido a que generan un codón de parada prematuro.

En el gen *BRCA1* se detectaron 5 mutaciones patológicas que se presentaron de forma recurrente en varias familias. Destaca la mutación c.187_188delAG, presente en 7 de las 23 familias *BRCA1* positivas (el 30,4% de las familias con mutación patológica en *BRCA1*, tabla 2). Las otras mutaciones con mayor presencia en

TABLA 1

Tipos de familias remitidas por las Unidades de Consejo Genético para el estudio de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*

Unidad de Consejo Genético	Tipos familiares					
	Total	Tipo 1 (CM + CO)	Tipo 2 (CM en varón)	Tipo 3 (≥ 3 CM)	Tipo 4 (< 3 CM)	Tipo 5 (CM único)
Consorcio H. Provincial (Castellón)	13	3 (23,1)	0 (0,0)	7 (53,8)	2 (15,4)	1 (7,7)
H. Clínico (Valencia)	69	16 (23,18)	2 (2,9)	19 (27,5)	26 (37,7)	6 (8,7)
H. La Fe (Valencia)	40	13 (32,5)	1 (2,5)	14 (35,0)	9 (22,5)	3 (7,5)
H. General de Elche (Alicante)	25	8 (32,0)	2 (8,0)	10 (40,0)	3 (12,0)	2 (8,0)
Total	147	40 (27,2)	5 (3,4)	50 (34,0)	40 (27,2)	12 (8,2)

Los resultados se expresan como número de caso (porcentaje del total). CM: cáncer de mama; CO: cáncer de ovario.

TABLA 2

Familias con mutaciones patogénicas en *BRCA1*

Familia	Tipo de familia	Exón/intrón	Cambio en ADNc	Cambio en proteína	Tipo de mutación	Referencias
F-LF00109	≥ 3 CM	2	c.187_188delAG	Stop39	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00034	CM + CO	2	c.187_188delAG	Stop39	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00198	CM + CO	2	c.187_188delAG	Stop39	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00018	CM + CO	2	c.187_188delAG	Stop39	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00059	CM + CO	2	c.187_188delAG	Stop39	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-EL00061	CM + CO	2	c.187_188delAG	Stop39	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CL00080	CM único	2	c.187_188delAG	Stop39	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00089	≥ 3 CM	I-5	c.331+1G → A	-	Splicing	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00197	CM + CO	I-5	c.331+1G → A	-	Splicing	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CA00007	≥ 3 CM	11	c.1623_627delTTAAA	Stop505	Frameshift	BIC ¹⁷ No descrita en España
F-LF00013	≥ 3 CM	11	c.1623_1627delTTAAA	Stop505	Frameshift	BIC ¹⁷ No descrita en España
F-EL00010	CM + CO	11	c.2072_2075delGAAA	Stop699	Frameshift	BIC ¹⁷ No descrita en España
F-CA00006	CM + CO	11	c.2080delA	Stop671	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CA00009	CM + CO	11	c.2080delA	Stop671	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CA00010	CM + CO	11	c.2080delA	Stop671	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CL00131	CM + CO	11	c.3450_3453delCAAG	Stop1115	Frameshift	BIC ¹⁷ No descrita en España
F-LFGC	≥ 3 CM	11	c.3889_3890delAG	Stop1265	Frameshift	BIC ¹⁷ Infante et al, 2006 ²⁰
F-CL00082	≥ 3 CM	11	c.3889_3890delAG	Stop1265	Frameshift	BIC ¹⁷ Infante et al, 2006 ²⁰
F-CL00088	≥ 3 CM	11	c.3889_3890delAG	Stop1265	Frameshift	BIC ¹⁷ Infante et al, 2006 ²⁰
F-LF00030	CM + CO	11	c.3904C → A	p.S1262X	Nonsense	BIC ¹⁷ No descrita en España
F-EL00011	CM + CO	12	c.4280_4281delTC	Stop1389	Frameshift	BIC ¹⁷ No descrita en España
F-CL00086	CM + CO	13	c.4406C → A	p.Y1429X	Nonsense	Nueva descripción
F-LF00098	≥ 3 CM	18	c.5242C → A	p.A1708E	Missense	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰

ADNc: ADN complementario; BIC: Breast Cancer Information Core; CM: cáncer de mama; CO: cáncer de ovario; I: intrón.

nuestra población fueron la c.2080delA y c.3889_3890delAG, cada una de ellas presente en 3 familias.

En el gen *BRCA2* las 2 mutaciones patogénicas con mayor frecuencia fueron las que afectan al exón 23: la c.9254_9258delATCAT, detectada en 5 familias, y c.9206_9219delCATCAGATTTATAT (c.9206_9219del14), detectada en 4 familias (tabla 3).

Las mutaciones patogénicas de *BRCA1* tuvieron una asociación significativa con el tipo familiar (p < 0,001; tabla 4). Así, las mutaciones en *BRCA1* tuvieron una mayor presencia en las familias de tipo 1 (CM y CO) y de tipo 3 (≥ 3 casos de CM), en las que presentaron una incidencia del 60,9 y el 38,8%, respectivamente. No se observó asociación de las mutaciones en el gen *BRCA2* con el tipo familiar, aunque hubo una proporción mayor de mutaciones en las familias de tipo 3. Asimismo, se observó una asociación significativa de la incidencia de mutaciones con el tipo familiar (p < 0,001; ta-

bla 4), principalmente debida al escaso porcentaje de mutaciones detectadas en las familias de tipo 4 (3/30; 7,5%; tabla 4). El espectro de mutaciones detectadas se completó con diferentes VED y polimorfismos. Se encontraron 21 VED diferentes, 8 en *BRCA1* y 13 en *BRCA2* (tabla 5). El cambio intrónico c.744+14C → T y la mutación *missense* c.4813G → A (p.G1529R) de *BRCA2* se detectaron de forma recurrente en 2 familias no relacionadas. Asimismo, en *BRCA1* y *BRCA2* se detectaron 22 polimorfismos que habían sido descritos con anterioridad (tabla 6)^{10,17}.

Discusión

El presente estudio es el primero en aportar el espectro global de mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* en el CM y CO hereditario de la Comunidad Valenciana, ya que en las publicaciones anteriores^{12,13} el número de familias fue mucho más reducido y los criterios de selección aplicados no fueron los habituales para estos estudios.

En la población valenciana se han detectado 13 mutaciones puntuales de *BRCA1* y *BRCA2* no descritas en BIC¹⁷ ni en el estudio más amplio efectuado en población española¹⁰ o en estudios posteriores²⁰⁻²². En el gen *BRCA1* se han encontrado 4 mutaciones nuevas, una mutación patogénica *nonsense* (c.4406C → A, p.Y1429X), 2 VED intrónicas (c.200-55T → C; c.200_19insTG) y una VED *missense* (p.E914G) (tablas 2 y 5). En el gen *BRCA2* se describen por vez primera 3 mutaciones *frameshift* y una *nonsense* (tabla 3), presentándose de forma recurrente 2 de estas mutaciones (c.1835insT en 2 familias y c.5025delT en 3 familias). Además, en este gen se han detectado 5 nuevas VED, 4 *missense* (p.K2128E, p.F2234L, p.T2607T, p.D2723V) y una intrónica (c.9484+5T → C) (tabla 5). Estas nuevas aportaciones al espectro de mutaciones ratifican la altísima variabilidad genética que presentan *BRCA1* y *BRCA2*.

La descripción por primera vez en población española de otras 5 mutaciones pato-

TABLA 3

Familias con mutaciones patogénicas en *BRCA2*

Familia	Tipo de familia	Exón/intrón	Cambio en ADNc	Cambio en proteína	Tipo de mutación	Referencias
F-CL00078	CM + CO	I-2	c.199+2T → C	–	Splicing	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CL00032	≥ 3 CM	10	c.1835insT	Stop542	Frameshift	Nueva descripción
F-LF00014	≥ 3 CM	10	c.1835insT	Stop542	Frameshift	Nueva descripción
F-EL00044	CM único	11	c.3036_3039delACAA	Stop958	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CA00036	≥ 3 CM	11	c.3492insT	Stop1098	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00033	CM + CO	11	c.3492insT	Stop1098	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00031	≥ 3 CM	11	c.3492insT	Stop1098	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-EL00035	≥ 3 CM	11	c.4150G → T	p.E1308X	Nonsense	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CL00040	CM + CO	11	c.4150G → T	p.E1308X	Nonsense	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00016	CM + CO	11	c.5025delT	Stop1616	Frameshift	Nueva descripción
F-CL00081	≥ 3 CM	11	c.5025delT	Stop1616	Frameshift	Nueva descripción
F-CL00004	≥ 3 CM	11	c.5025delT	Stop1616	Frameshift	Nueva descripción
F-LF00021	CM + CO	11	c.5164_5167delGAAA	Stop1668	Frameshift	BIC ¹⁷ Infante et al, 2006 ²⁰
F-CL00033	< 3 CM	11	c.6503_6504delTT	Stop2099	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00063	CM único	11	c.6722delT	Stop2167	Frameshift	Nueva descripción
F-LF00106	≥ 3 CM	23	c.9206_9219del14	Stop2975	Frameshift	Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00200	≥ 3 CM	23	c.9206_9219del14	Stop2975	Frameshift	Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CL00019	≥ 3 CM	23	c.9206_9219del14	Stop2975	Frameshift	Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00009	CM en varón	23	c.9206_9219del14	Stop2975	Frameshift	Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CL00015	CM + CO	23	c.9246C → A	p.Y3006X	Nonsense	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CL00021	CM en varón	23	c.9246C → A	p.Y3006X	Nonsense	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00135	≥ 3 CM	23	c.9254_9258delATCAT	Stop3015	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-LF00060	≥ 3 CM	23	c.9254_9258delATCAT	Stop3015	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CL00034	≥ 3 CM	23	c.9254_9258delATCAT	Stop3015	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-EL00031	≥ 3 CM	23	c.9254_9258delATCAT	Stop3015	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CL00092	< 3 CM	23	c.9254_9258delATCAT	Stop3015	Frameshift	BIC ¹⁷ Diez et al, 2003 ¹⁰
F-CL00009	< 3 CM	25	c.9694C → T	p.Q3156X	Nonsense	Nueva descripción

ADNc: ADN complementario; BIC: Breast Cancer Information Core; CM: cáncer de mama; CO: cáncer de ovario; I: intrón.

TABLA 4

Mutaciones patogénicas en *BRCA1* y *BRCA2* en cada tipo familiar

Genes		Tipos familiares					Total positivos	χ ² ; p
		1 CM + CO (n = 40)	2 CM varón (n = 5)	3 ≥ 3 CM (n = 50)	4 < 3 CM (n = 40)	5 CM único (n = 12)		
<i>BRCA1</i>	<i>BRCA1</i> positivos (%) ^a	14 (60,9)	0 (0,0)	8 (38,8)	0 (0,0)	1 (4,3)	23 (100)	20,23; < 0,001
<i>BRCA2</i>	<i>BRCA2</i> positivos (%) ^b	6 (22,2)	2 (7,4)	14 (51,8)	3 (11,1)	2 (7,4)	27 (100)	8,12; NS
<i>BRCA</i>	<i>BRCA1</i> + <i>BRCA2</i> positivos (%) ^c	20 (40,0)	2 (4,0)	22 (44,0)	3 (6,0)	3 (6,0)	50 (6,0)	13,09; 0,01
	<i>BRCA1</i> + <i>BRCA2</i> positivos/n (%)	20/40 (50,0)	2/5 (40,0)	22/50 (44,0)	3/40 (7,5)	3/12 (25,0)	50/147 (34,0)	19,92; < 0,001

CM: cáncer de mama; CO: cáncer de ovario; n: total de casos en cada tipo de familia; NS: no significativo. ^a*BRCA1* positivos/total *BRCA1* positivos. ^b*BRCA2* positivos/total *BRCA2* positivos. ^c*BRCA1* + *BRCA2* positivos/total positivos.

génicas de *BRCA1* (c.1623_1627delTTAA, c.2072_2075delGAAA, c.3450_3453delCAAG, p.S1262X, c.4280_4281delTC; tabla 2) y 4 VED en *BRCA2* (p.T1354M, p.G1529R, p.V1643A, c.9877-20C → T; tabla 5) indica que el espectro mutacional de cada área geográfica de nuestro país presenta sus peculiaridades. El conocimiento de estas mutaciones específicas, y en particular las que se presentan en forma recurrente, podría facilitar la estrategia

metodológica del estudio de *BRCA1* y *BRCA2*, mejorando la relación coste/tiempo empleado en el rastreo de ambos genes. En nuestra población cabe destacar la recurrencia de 2 de las mutaciones de nueva descripción (c.1835insT en 2 familias y c.5025delT en 3 familias). Este hecho puede ser un primer indicio de su posible carácter fundacional en nuestra población, que deberá confirmarse con un mayor número de familias portadoras de

esas mutaciones que haga factible el estudio de haplotipos que permita obtener resultados definitivos.

Junto a las peculiaridades mutacionales propias de nuestra población aparecen rasgos comunes con el resto de la población española, lo que indica la movilidad e interrelación entre las poblaciones de las diversas partes geográficas del país. Así, la mutación *frameshift* c.187_188delAG del *BRCA1*, propia de la población judía as-

TABLA 5

Familias con variantes de efecto desconocido en *BRCA1* o *BRCA2*

Gen	Familia	Tipo de familia	Exón/intrón	Descripción mutación	Tipo de mutación	Otras referencias
<i>BRCA1</i>	F-CA00055	≥ 3 CM	I-2	c.200-55T → C c.200-19insTG c.200-14C → T	Intrónica Intrónica Intrónica	Nueva descripción Nueva descripción BIC ¹⁷
	F-CL00133	< 3 CM	I-2			Díez et al, 2003 ¹⁰ BIC ¹⁷
	F-EL00045	CM + CO	5	c.318G → T (p.D67Y)	Missense	Díez et al, 2003 ¹⁰ BIC ¹⁷
	F-CL00112	CM único	11	c.2640C → T (p.R841W)	Missense	Díez et al, 2003 ¹⁰ BIC ¹⁷
	F-CL00004	≥ 3 CM	11	c.2852A → G (p.E914G)	Missense	Nueva descripción
	F-CL00205	CM + CO	11	c.3827T → G (p.N1236K)	Missense	BIC ¹⁷
	F-CL00141	≥ 3 CM	11	c.4155G → A (p.E1346K)	Missense	Díez et al, 2003 ¹⁰ BIC ¹⁷
<i>BRCA2</i>	F-EL00018	< 3 CM	I-6	c.744+14C → T	Intrónica	Díez et al, 2003 ¹⁰ Infante et al, 2006 ²⁰
	F-LF00123	CM único	I-6	c.744+14C → T	Intrónica	Infante et al, 2006 ²⁰
	F-CL00053	CM + CO	10	c.1379C → T (p.S384F)	Missense	BIC ¹⁷
	F-CL00086	CM + CO	11	c.4289C → T (p.T1354M)	Missense	Díez et al, 2003 ¹⁰ BIC ¹⁷
	F-CL00049	< 3 CM	11	c.4813G → A (p.G1529R)	Missense	No descrita en España BIC ¹⁷
	F-LF00060	≥ 3 CM	11	c.4813G → A (p.G1529R)	Missense	No descrita en España BIC ¹⁷
	F-EL00062	CM en varón	11	c.5156T → C (p.V1643A)	Missense	No descrita en España BIC ¹⁷
	F-CL00050	< 3 CM	11	c.6610A → G (p.K2128E) c.6928T → C (p.F2234L)	Missense Missense	Nueva descripción Nueva descripción
	F-LF00112	CM único	17	c.8048C → T (T2607I)	Missense	Nueva descripción
	F-CL00095	CM + CO	18	c.8396A → T (p.D2723V)	Missense	Nueva descripción
	F-EL00037	CM en varón	18	c.8410G → C (p.V2728L)	Missense	Díez et al, 2003 ¹⁰
	F-CL00037	≥ 3 CM	18	c.8410G → C (p.V2728L)	Missense	Díez et al, 2003 ¹⁰
	F-LF00031	≥ 3 CM	I-24	c.9484+5T → C	Intrónica	Nueva descripción
	F-LF00142	≥ 3 CM	I-25	c.9876+9A → C	Intrónica	BIC ¹⁷
	F-CL00088	≥ 3 CM	I-26	c.9877-20C → T	Intrónica	Díez et al, 2003 ¹⁰ BIC ¹⁷ No descrita en España

BIC: Breast Cancer Information Core; CM: cáncer de mama; CO: cáncer de ovario; I: intrón.

quenazí, que en la población valenciana se ha detectado en el 30% de las familias con mutaciones en *BRCA1* (7 de 23 familias; tabla 2), es también una de las más recurrentes en nuestra población, al igual que sucede en otras áreas geográficas de nuestro país^{10,13}. En el gen *BRCA2* la mutación más frecuente en la Comunidad Valenciana ha sido la c.9254_9258delATCAT, situada en el exón 23 de este gen, que se presenta en 5 familias no relacionadas. Esta mutación se ha catalogado como una mutación fundadora en las poblaciones del área de Cataluña y de la Comunidad Valenciana, habiéndose comprobado en un estudio realizado en 12 familias que la mutación mantiene un origen común que se remonta a 92 generaciones²³.

La elevada prevalencia de mutaciones observada en la Comunidad Valenciana, que se cifra en un 34,0%, es claramente superior al 12-25% descrito en la población española^{10,21,24} o en el resto de poblaciones^{25,26}. Esta elevada prevalencia de mutaciones en nuestra población podría deberse a un sesgo en la selección de los pacientes, dada la participación mayoritaria de familias con más de 3 CM (tipo 3) y con CM y CO (tipo 1; tabla 1), que son los grupos que se asocian con la mayor incidencia de mutaciones, según lo publicado sobre grupos familiares^{26,27}. De hecho, el 84% (42/50) de las muta-

ciones patogénicas encontradas se han presentado en 20 familias de tipo 1 y 22 en el tipo 3 (tabla 4). La aplicación de modelos genéticos y/o empíricos predictivos de riesgo, tales como BRCAPRO²⁸, BOADICEA²⁹ o Myriad II³⁰, podría esclarecer si la mayor incidencia detectada en nuestra población se corresponde con el mayor riesgo de la población estudiada.

En los grupos familiares se pone de manifiesto la alta incidencia de mutaciones en las familias con CM y CO, que se asocian principalmente con mutaciones en *BRCA1* y también tienen cierta incidencia en *BRCA2* (un 60,9% de las mutaciones en *BRCA1* y un 22,2% en *BRCA2* en las familias tipo 1; tabla 4). Nuestros resultados validan la asociación de las mu-

TABLA 6

Polimorfismos detectados en los genes *BRCA1* y *BRCA2*

Gen	Exón/intrón	Polimorfismo	Tipo de variación	
<i>BRCA1</i>	I-8	c.667-58delT	Intrónica	
	11	c.1186A → G (p.Q356R)	Missense	
	11	c.2196G → A (p.D693N)	Missense	
	11	c.2201C → T (p.S694S)	Silenciosa	
	11	c.2430T → C (p.L771L)	Silenciosa	
	11	c.3667A → G (p.K1183R)	Missense	
	11	c.4427T → C (p.S1436S)	Silenciosa	
	I-14	c.5194-53C → T	Intrónica	
	15	c.4654G → T (p.S1512I)	Missense	
	16	c.4956A → G (p.S1613G)	Missense	
	17	c.5194-53C → T	Intrónica	
	I-20	c.5396+48-59dup12	Intrónica	
	<i>BRCA2</i>	I-1	c.-26G → A	UTR
		I-8	c.909+56C → T	Intrónica
		10	c.1093A → C (p.N289H)	Missense
		11	c.2166C → T (p.S646S)	Silenciosa
		11	c.3199A → G (p.N991D)	Missense
11		c.3624A → G (p.K1132K)	Silenciosa	
11		c.5972C → T (p.T1915M)	Missense	
14		c.7470A → G (p.S2414S)	Silenciosa	
I-16		c.8033-14T → C	Intrónica	
27		c.10462A → C (p.I3412V)	Missense	

I: intrón; UTR: región no traducida.

taciones en *BRCA2* con el CM del varón, tal como refleja el hecho de que los 2 únicos casos de familias con CM en varón presenten mutaciones en dicho gen. La menor incidencia de mutaciones se ha observado en familias de tipo 4, con menos de 3 CM (3/40 familias; 7,5%; tabla 4). Este hecho subraya la relevancia de la incidencia de CM familiar en el mayor riesgo de presentar mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2*.

En resumen, en el 34,0% de las familias estudiadas de la Comunidad Valenciana se han identificado mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2*. Estas mutaciones están asociadas con las familias tipo 1 (CM y CO) y tipo 4 (más de 3 CM). Las mutaciones recurrentes más frecuentes han sido la c.187_188delAG en *BRCA1* y la c.9254_9258delATCAT en *BRCA2*. El estudio aporta 13 nuevas mutaciones al espectro mundial de *BRCA1/BRCA2* y 9 nuevas mutaciones al espectro español. El estudio aporta 5 nuevas mutaciones patológicas al espectro mundial y otras 5 de *BRCA1* y *BRCA2* al espectro de mutaciones español.

Agradecimiento

Queremos manifestar nuestro agradecimiento a Virginia González Anguix (técnico especialista de laboratorio) y Enrique Lerma Alejos (ATS-DUE) por su interés y excelente quehacer en los estudios moleculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FESEO (Federación de Sociedades Españolas de Oncología), editores. Tercer libro blanco de la Oncología en España. Madrid: Ergon; 2002.
2. Programa de Consejo Genético en el Cáncer. Grupo de Cáncer Hereditario. Plan Oncológico. Comunidad Valenciana. Valencia: Conselleria de Sanitat; 2003.
3. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science*. 1994;266:66-71.
4. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature*. 1995;378:789-92.
5. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in *BRCA1*-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1995;56:265-71.
6. Antoniou AC, Easton DF. Polygenic inheritance of breast cancer: implications for design of association studies. *Genet Epidemiol*. 2003;25:190-202.
7. Szabo CI, King MC. Population genetics of *BRCA1* and *BRCA2*. *Am J Hum Genet*. 1997;60:1013-20.
8. Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S, et al. Common origins of *BRCA1* mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet*. 1994;8:392-8.
9. Neuhausen SL, Mazoyer S, Friedman L, Stratton M, Offit K, Caligo A, et al. Haplotype and phenotype analysis of six recurrent *BRCA1* mutations in 61 families: results of an international study. *Am J Hum Genet*. 1996;58:271-80.
10. Díez O, Osorio A, Durán M, Martínez-Ferrandis JI, De la Hoya M, Salazar R, et al. 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*. 2003;22:301-12.
11. Velasco Sampedro E, Esteban Cardeñosa E, Infante Sanz M, Durán Domínguez M, Lastra Aras E, García Girón C, et al. Estudio molecular de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en 153 familias con cáncer de mama de Castilla y León (España): identificación de nueve variantes de efecto desconocido no descritas. *Med Clin (Barc)*. 2002;119:441-5.
12. Martínez-Ferrandis JI, Vega A, Chirivella I, Marín-García P, Insa A, Lluch A, et al. Mutational analysis of *BRCA1* and *BRCA2* in Mediterranean Spanish women with early-onset breast cancer: identification of three novel pathogenic mutations. *Hum Mutat*. 2003;22:417-8.
13. Bolufer P, Munárriz B, Santaballa A, Velasco E, Lerma E, Barragán E. Mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes con historia familiar de cáncer de mama. *Med Clin (Barc)*. 2005;124:10-2.
14. Malone KE, Daling JR, Thompson JD, O'Brien C, Francisco LV, Ostrander EA. *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*. 1998;279:922-9.
15. De la Hoya M, Osorio A, Godino J, Sulleiro S, Tosar A, Pérez-Segura P, et al. Association between *BRCA1* and *BRCA2* mutations and cancer phenotype in Spanish breast/ovarian cancer families: implications for genetic testing. *Int J Cancer*. 2002;97:466-71.
16. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects [versión 2004]. Disponible en: <http://www.wma.net/e/policy/pdf/17c.pdf>
17. The Breast Cancer Information Core Database, BIC. Disponible en: <http://research.nhgri.nih.gov/bic/Member/index.shtml>
18. Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10325-9.
19. Den Dunnen JT, Paalman MH. Standardizing mutation nomenclature: why bother? *Hum Mutat*. 2003;22:181-2.
20. Infante M, Durán M, Esteban-Cardeñosa C, Velasco E. High proportion of novel mutations of *BRCA1* and *BRCA2* in breast/ovarian cancer patients from Castilla-León (central Spain). *J Hum Genet*. 2006;51:611-7.
21. Velasco E, Infante M, Durán M, Esteban-Cardeñosa E, Lastra E, García-Girón C, et al. Rapid mutation detection in complex genes by heteroduplex analysis with capillary array electrophoresis. *Electrophoresis*. 2005;26:2539-52.
22. Salazar R, Cruz-Hernández JJ, Sánchez-Valdivieso E, Rodríguez CA, Gómez-Bernal A, Barco E, et al. *BRCA1-2* mutations in breast cancer: identification of nine new variants of *BRCA1-2* genes in a population from central Western Spain. *Cancer Lett*. 2006;233:172-7.
23. Campos B, Díez O, Odeffrey F, Doménech M, Moncoutier V, Martínez-Ferrandis JI, et al. Haplotype analysis of the *BRCA2* 9254delATCAT recurrent mutation in breast/ovarian cancer families from Spain. *Hum Mutat*. 2003;21:452.
24. De la Hoya M, Pérez-Segura P, Van Orsouw N, Díaz-Rubio E, Caldes T. Spanish family study on hereditary breast and/or ovarian cancer: analysis of the *BRCA1* gene. *Int J Cancer*. 2001;91:137-40.
25. Malone KE, Daling JR, Neal C, Suter NM, O'Brien C, Cushing-Haugen K, et al. Frequency of *BRCA1/BRCA2* mutations in a population-based sample of young breast carcinoma cases. *Cancer*. 2000;88:1393-402.
26. Ozcelik H, Knight JA, Glendon G, Yazici H, Carson N, Ainsworth PJ, et al. Individual and family characteristics associated with protein truncating *BRCA1* and *BRCA2* mutations in an Ontario population based series from the Cooperative Family Registry for Breast Cancer Studies. *J Med Genet*. 2003;40:e91.
27. Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulick M, Ward BE, Lingenfelter B, et al. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2*: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol*. 2002;20:1480-90.
28. Parmigiani G, Bery DA, Aguilar O. Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes *BRCA1* and *BRCA2*. *Am J Hum Genet*. 1998;62:148-58.
29. Antoniou AC, Pharoah PPD, Smith P, Easton DF. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:1580-90.
30. Frank TS, Manley SA, Olopade OI, Cummings S, Garber JE, Berhardt B, et al. Sequence analysis of *BRCA1* and *BRCA2*: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Med Genet*. 1998;16:2417-25.