

Fundamentos de genética en el cáncer de mama

F. Palau

Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC. Valencia

INTRODUCCIÓN

El cáncer es, en esencia, una enfermedad genética en la que se afectan genes concretos y puede haber alteraciones epigenéticas que modulan la expresión de estos genes. Hay tres tipos de genes involucrados en el proceso de la tumorigénesis: los oncogenes, los genes supresores de tumor y los genes estabilizadores o reparadores. Al contrario de lo que ocurre en las enfermedades mendelianas, como las distrofias musculares o las hemofilias, donde una enfermedad o cada una de sus variantes clínicas se debe a mutaciones en un gen concreto, no hay defectos en genes únicos que “causen” cáncer. Sin embargo, podemos distinguir entre el cáncer que padecen individuos sin ningún antecedente familiar, es decir, casos esporádicos que son la mayoría, y el cáncer familiar hereditario en el que sí existen antecedentes familiares y se sospecha que los individuos enfermos son portadores de una mutación hereditaria en la línea germinal. Estas familias comparten algunas características como son: múltiples individuos afectados en la misma familia, edad de inicio temprana y frecuente afectación multifocal o bilateral. En estos casos sí que hay una relación entre un gen y el cáncer, aunque en muchas ocasiones las mutaciones en estos genes no son completamente penetrantes y no todos los individuos portadores manifiestan la enfermedad. El cáncer de mama es común en la población y los estudios poblacionales indican que hasta un 10% de las mujeres desarrollarán cáncer de mama a lo largo de la vida. En el cáncer de mama se reconoce un fuerte componente genético: el riesgo de una mujer de desarrollarlo se incrementa hasta tres veces más si se tiene un familiar de primer grado afectado; este incremento puede ser de hasta diez veces si hay más de un familiar de primer grado, y aún puede ser mayor si estos familiares tienen menos de 40 años. Este es el caso del cáncer de mama familiar debido a mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

En la genética del cáncer de mama hereditario hay que tener en cuenta aspectos genealógicos –fundamentales para

establecer el riesgo *a priori*–, los genes involucrados y su patología molecular, el diagnóstico molecular, el consejo genético y manejo clínico de los pacientes, mayoritariamente mujeres aunque, más raramente, también varones. Otro aspecto importante a reconocer son las distintas formas sindrómicas en las que se puede presentar el cáncer de mama. Entre estos síndromes cabe reseñar el síndrome de cáncer de mama/ovario hereditario (HBOC en las siglas inglesas) debido a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, el síndrome de Cowden causado por mutaciones en el gen *PTEN*, y el síndrome de Li-Fraumeni debido a mutaciones en el gen de la proteína p53, todos ellos con herencia autonómica dominante. Otros síndromes que asocian cáncer de mama son el síndrome de Peutz-Jeghers, el síndrome de Bloom, el síndrome de Werner y el xeroderma pigmentosum.

El síndrome de cáncer de mama/ovario hereditario tiene una expresión variable y afecta a familias con sólo cánceres de mama o cánceres de ovario, o bien con ambos cánceres de mama y de ovario. Un diagnóstico de HBOC debe considerarse cuando dos o más familiares de primer grado padecen un cáncer de mama y/o de ovario, especialmente si se han diagnosticado a una edad temprana, si hay enfermedad multifocal o bilateral y/o si en una misma mujer concurren ambos cánceres, de mama y de ovario. A pesar de la expresión ubicua tanto de *BRCA1* como *BRCA2*, sus mutaciones predisponen predominantemente a cáncer de mama y de ovario. La pérdida de los genes *BRCA1* o *BRCA2* probablemente permita la acumulación de otras mutaciones que son directamente responsables del desarrollo de la neoplasia. Consistente con esta hipótesis, está el hecho de que los carcinomas de mama o de ovario de pacientes con mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2* muestran inestabilidad cromosómica y mutaciones frecuentes en otros genes supresores.

La transmisión mendeliana de las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, como ya se ha dicho, es autonómica dominante. Sin embargo, los tumores de las pacientes muestran pérdida del alelo sano, habitualmente por delección. Esto quiere decir que se necesita la inactivación de ambos alelos para que se desarrolle el tumor, siguiendo la hipótesis de los dos hitos o eventos de Knudson (Fig. 1), ejemplificada

Correspondencia: Francesc Palau. Instituto de Biomedicina de Valencia. CSIC, Valencia.

originalmente en el modelo del retinoblastoma. Una primera mutación, hereditaria con carácter dominante, se transmitiría de progenitores a hijos e hijas, y una segunda mutación, somática, afectaría a las funciones reguladas por estos genes. El mecanismo molecular de *BRCA1* y *BRCA2* involucra la reparación del DNA, de ahí que se les califique como genes estabilizadores, pero, al mismo tiempo, tendrían un comportamiento genético celular recesivo, requiriendo la inactivación de ambos alelos, típico de los genes supresores de tumores, para que se expresara el fenotipo tumoral.

El gen *BRCA1* se extiende más de 80 kb de DNA genómico del cromosoma 17q21 y codifica un transcrito de 7,8 kb compuesto por 22 exones. Se han descrito más de 600 mutaciones diferentes, la mayoría de la cuales se han encontrado en unas pocas familias. Sólo algunas mutaciones

son frecuentes en determinadas poblaciones como es el caso de los judíos de origen ashkenazi. El gen *BRCA2*, localizado en el cromosoma 13q12.3, codifica una transcrito de 10,4 kb compuesto por 27 exones. Se han descrito aproximadamente 450 mutaciones asociadas a cáncer de mama. Un número importante de mutaciones en estos genes inducen la aparición de un codón de parada por tratarse de una mutación sin sentido (*nonsense*) o una mutación con pérdida de la pauta de lectura (*frameshift*), lo que probablemente conduce a la traducción de una proteína truncada no funcional, haciendo aparente su carácter patogénico. Sin embargo, se han descrito que hasta un tercio de variantes moleculares encontradas en *BRCA1* o *BRCA2* no tienen un significado clínico evidente y no se pueden definir directamente como patológicas.

BRCA1 codifica para una proteína de 1.863 aminoácidos y 220 kDa. Está localizada en el núcleo y contiene residuos fosforilados. El producto de *BRCA2* es una proteína de 3.418 aminoácidos y 380 kDa. También se encuentra en el núcleo y contiene residuos fosforilados. Ambas proteínas tienen una expresión tisular obicua y se cree que la integridad genómica mediante la regulación de la reparación del DNA, especialmente la reparación de roturas de la doble cadena, transactivación transcripcional y el ciclo celular. La pérdida completa de la función de tanto *BRCA1* como *BRCA2*, observables en ratones *knock-out* homocigotos, suponen letalidad embrionaria. Las células derivadas de los embriones de ratón deficientes para *BRCA1* o *BRCA2* son defectuosas para reparar su DNA dañado. Hay diversas evidencias experimentales que sugieren que ambos genes participan en la misma ruta metabólica.

El diagnóstico molecular del cáncer de mama hereditario requiere de la puesta a punto en el laboratorio de varias técnicas para el análisis de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. En la mayoría de los casos (85-90%) la patología molecular se debe bien a mutaciones puntuales (substitución, deleción o inserción o de un nucleótido), bien pequeñas mutaciones (deleción o inserción de dos o más nucleótidos, pero siempre menos de 20 bases nucleotídicas) (Tablas I y II). El análisis de estas mutaciones requiere una aproximación que

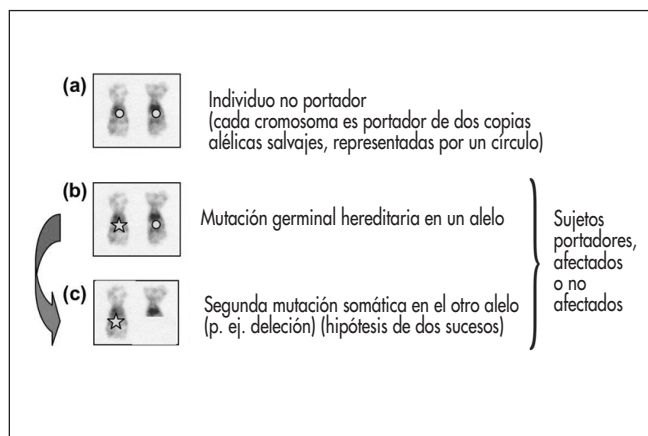


Fig. 1. Esquema de la hipótesis de dos sucesos ("two-hits") de Knudson en relación con los genes supresores de tumores. La primera mutación (estrella amarilla) en uno de los dos cromosomas puede encontrarse en la línea germinal (y ser hereditaria como es el caso del cáncer de mama por *BRCA 1* o *BRCA2*) o bien ser somática y no hereditaria. La segunda mutación se produce siempre en células somáticas portadoras de la primera mutación y frecuentemente es una deleción completa o parcial del gen o del cromosoma. Las presencia de las dos mutaciones favorece el desarrollo tumoral.

Tabla I. Tipos de mutación

Sustituciones de nucleótidos (mutaciones puntuales)	Deleciones e inserciones
Mutaciones con cambio de sentido (substituciones de aminoácidos) [<i>missense</i>]	Deleción o adición de un número pequeño de bases
Mutaciones sin sentido (codones de parada prematuros) [<i>nonsense</i>]	Si el número de bases no es múltiple de 3 se produce pérdida de la pauta de lectura [<i>frameshift</i>]
Mutaciones en el procesado del RNA (destrucción de sitios consenso de <i>splicing</i> , sitios de formación de la secuencia cap, sitios de poliadenilación o creación de sitios crípticos de <i>splicing</i>). El proceso anormal de <i>splicing</i> conduce a menudo a la aparición de codones de parada prematuros	Si el número de bases es múltiple de 3 se produce pérdida o ganancia de codones y, subsecuentemente, de aminoácidos en el producto transcrito
Mutaciones reguladoras que afectan los sitios de unión de factores de transcripción, control transcripcional u otros aspectos de la expresión génica	Reordenamientos génicos grandes: deleciones, inversiones, duplicaciones, fusiones
	Inserción de elementos L1 o Alu (interrumpen la secuencia codificante o trastocan la transcripción)
	Mutaciones dinámicas por expansión inestable de secuencias repetitivas, normalmente de trinucleótidos

Tabla II. Nomenclatura de los cambios o mutaciones de la secuencia de DNA y de las proteínas

Sustituciones de nucleótidos

Se empieza con "c." (cDNA o región codificante de exones) o "g." (genómico), si es necesario. La adenina A del codón de iniciación ATG ocupa el lugar +1; e inmediatamente precedente es -1. No hay cero. Para los cambios en intrones no codificantes cuando se dispone sólo de la secuencia del cDNA, se especifica el número intrón n mediante la expresión IVS_n (*intervening sequence*) o el número de la posición del exón más cercano:

g.1162G>A – se reemplaza una G (guanina) por una A (adenina) en la posición 1162 del gen considerando su secuencia completa o genómica

c.487C>T – se reemplaza una C (citosina) por una T (timina) en la posición 487 del cDNA

IVS3-2G>T o *c.385-2G>T* – sustitución de una G por una T en la posición -2 del intrón 3 o respecto del nucleótido 385 del exón 4 del cDNA que sigue al intrón 3

Sustituciones de aminoácidos

Si es necesario se empieza con "p." para indicar que es una proteína. Se usa preferentemente el código de una letra:

p.T157P o *p.Thr157Pro* – reemplaza una treonina en la posición 157 por una prolina (la metionina iniciadora es el aminoácido 1)

p.Q163X o *p.Glu1163Stop* – la glutamina 163 se reemplaza por un codón de parada

Deleciones e inserciones

Se emplea *del* para deleciones e *ins* para inserciones, colocándose tras el cambio de la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, y a continuación se pueden indicar los nucleótidos delecionados o insertados o duplicados:

p.F508del – deleción de la fenilalanina en el residuo 508 de la proteína

c.187_188del o *c.187_188del AG* – deleción de dos nucleótidos empezando en el nt 187 y acabando en el 188 del cDNA

c.863_864insA – inserción de una adenina entre los nt 863 y 864 del cDNA

implica una técnica de rastreo de mutaciones mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR en las siglas inglesas) de cada uno de los exones y regiones intrónicas flanqueantes y, en aquellos fragmentos del producto amplificado donde se observe un patrón anómalo con respecto al gen normal o silvestre, realizar la secuenciación de ambas hebras de DNA en un secuenciador automático de DNA. Estas técnicas permiten analizar tanto la presencia de mutaciones patogénicas como de polimorfismos del DNA. Entre las técnicas de rastreo o *screening* cabe destacar el análisis conformacional de las cadenas sencillas (SSCP) (Fig. 2A), el análisis de heterodúplex, la cromatografía líquida de alta eficacia desnaturante (dHPLC) (Fig. 2B), el test de la proteína truncada (PPT) o el análisis de alelos mediante oligonucleótidos específicos (ASO). El método más utilizado clásicamente por los laboratorios ha sido el sistema de SSCP, aunque esto es variable en función del tipo de mutaciones que más frecuentemente se encuentran en cada gen mutante. En los últimos años, el sistema basado en dHPLC ha ido ganando adeptos por el nivel de sensibilidad cercano al 100%, cuando con los otros métodos este variaba entre el 70 y el 90%. No obstante, el dHPLC requiere un equipamiento todavía caro y un esfuerzo por poner a punto las con-

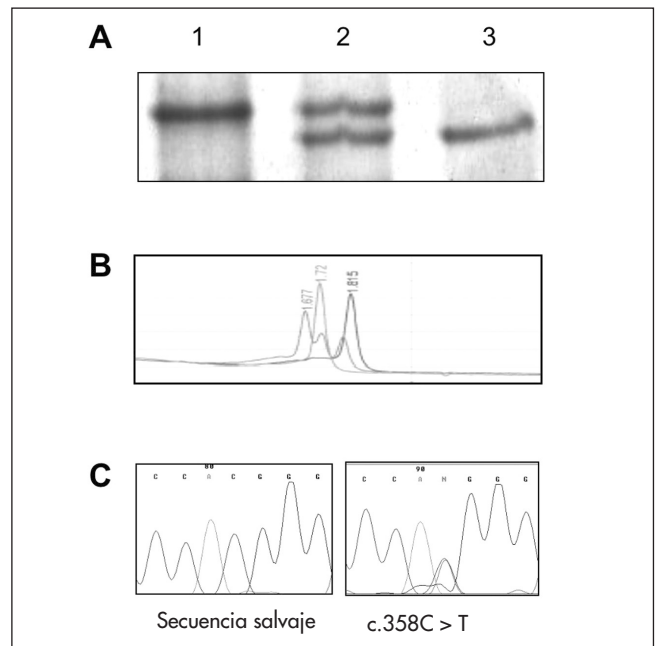


Fig. 2. Métodos de análisis genético de la molécula de DNA para búsqueda de mutaciones. Las imágenes que se muestran son ejemplos, no relacionados con los genes BRCA.

A: Técnica de SSCP en la que se analiza la conformación de las cadenas sencillas de DNA de un producto de PCR en un gel de archilamida no desnaturante. Esta técnica se basa en el hecho de que las cadenas sencillas de DNA tienen tendencia a plegarse y formar estructuras complejas. La movilidad de tales estructuras en geles no desnaturantes depende no sólo del tamaño del producto sino también de su conformación, la cual está condicionada por la secuencia de DNA. Se muestra el análisis del polimorfismo +49A/G del gen CTL4 en el cromosoma 2. Los productos de individuos que son homocigotos para un alelo (carril 1, GG, y carril 3, AA) muestran un patrón de una única banda, aunque esta es diferente para cada tipo de homocigoto; el carril del individuo heterocigoto muestra un patrón de dos bandas (genotipo AG).

B: Método de dHPLC. Es un método que se basa en el análisis de heterodúplex. Muchas mutaciones o polimorfismos ocurren en forma heterocigota en los individuos. Tras desnaturar el producto de PCR que contiene estos cambios, el DNA puede conformarse como una doble hebra de dos moléculas idénticas (idéntico alelo) o distintas (presencia de los dos alelos). En la figura se muestra el resultado de un análisis de tres individuos distintos para el polimorfismo CT61A/G del gen CTL4. Uno de ellos es homocigoto para el alelo A (línea naranja), otro homocigoto para el alelo G (línea azul) y el tercero heterocigoto (línea verde).

C: Secuenciación directa del DNA. Se indica una parte de la secuenciación de un exón en una muestra control (salvaje o silvestre) y de un paciente portador de una sustitución de una citosina (pico azul) por una timina (pico rojo) en la posición 358 del cDNA en uno de los dos alelos del gen. Esta cambio confirma que el individuo es portador de una mutación patogénica.

diciones adecuadas para el análisis de cada fragmento de PCR en el que se pretende rastrear la presencia de mutaciones. Con todo, tras el rastreo de todos los exones, hay que secuenciar el fragmento con un patrón anómalo. La secuenciación de DNA

(Fig. 2C) es la técnica *gold standard* por tener una sensibilidad del 100% y el resultado técnico es definitivo, de manera que se puede plantear como aproximación diagnóstica la secuenciación completa del gen entero hecha en sentido 5'-3' y 3'-5', o sea, secuenciando ambas hebras de DNA y en los dos sentidos del gen. Hay que comentar que, en ocasiones, los cambios en la cadena de DNA suponen una sustitución de un aminoácido por otro o son cambios en las regiones flanqueantes intrónicas. En ambos casos, máxime si se trata de cambios que no se han descrito en la literatura, puede no haber evidencia de que el cambio sea una mutación patogénica y sea responsable de la patología del cáncer mama. En este caso es muy conveniente comentar con el laboratorio la situación global, teniendo en cuenta la historia familiar, el cambio encontrado en el DNA y el posible análisis de segregación del cambio en el conjunto de la familia.

Hay pacientes y familias en los que la mutación es de mayor tamaño (p. ej., la delección de uno o varios exones y regiones intrónicas intermedias) y la secuenciación de DNA no sirve como técnica de análisis (se secuenciaría siempre el alelo normal y nunca podríamos saber que hay una delección grande en alelo mutado). En estos casos, es importante tener en cuenta la disponibilidad de técnicas que permiten investigar la presencia de estas delecciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. En los últimos años ha tomado auge una técnica de aplicación universal para la búsqueda de delecciones y duplicaciones especifi-

cas de distintos genes que causan enfermedades genéticas. Esta técnica se denominada "amplificación múltiple de sondas dependiente de ligazón" o MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (Fig. 3). En este método se amplían y analizan todos los exones del gen. Para ello se diseñan dos sondas pequeñas de DNA específicas para cada exón, las cuales contienen cebadores universales derivados del plásmido M13 (Fig. 3A-1); posteriormente se procede a la hibridación múltiple y ligazón de las sondas de manera que en el caso de que haya DNA molde (no hay delección) la hibridación podrá tener lugar (situación a), mientras que si no hay DNA molde por delección no se podrá producir la reacción de hibridación (situación b) o si hay una duplicación las sondas hibridarán con dos copias del molde (Fig. 3A-2); tras esta fase del proceso se produce la reacción en cadena mediante los cebadores universales (Fig. 3A-3) y después se procede al análisis visual de los fragmentos (Fig. 3A-4). En el caso de que haya una delección de alelo del gen, se podrá observar un pico de tamaño reducido y si lo que hay es una duplicación parcial de unos de los dos alelos del gen se observará un pico más alto que el control. En la figura 3B se muestra el resultado de un análisis del gen *BRCA1* en dos muestras de DNA, una con delección para el exón 13 y otra para el exón 22.

El conocimiento de todos estos hechos genéticos y los aspectos del diagnóstico molecular son fundamentales en la consulta de consejo genético con el fin de comunicar a las

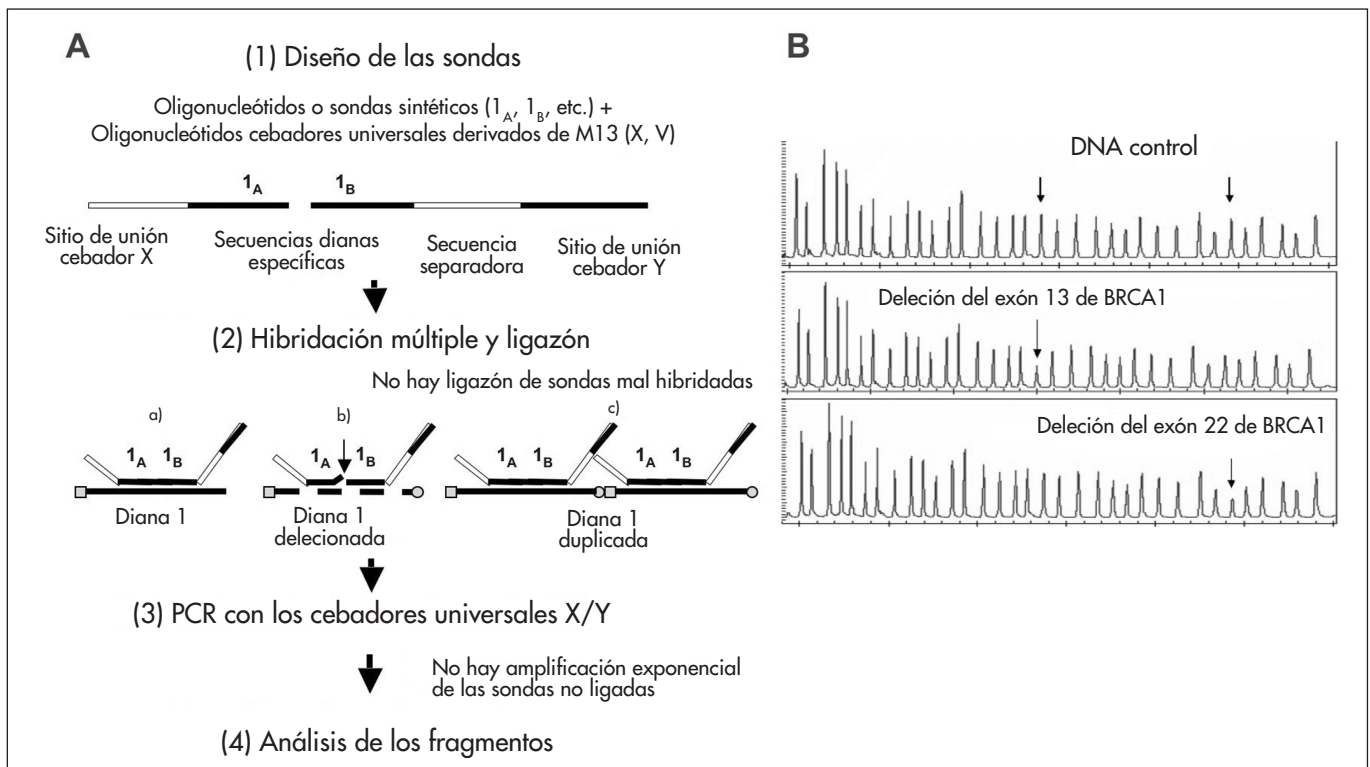


Fig. 3. Esquema representativo del proceso en el que se basa la técnica de MLPA para la detección de delecciones o duplicaciones. La muestra de DNA a analizar se hibrida con un conjunto de sondas que, par a par, se complementan con los fragmentos diana de interés (habitualmente los exones de un gen). Si el DNA molde está presente en copia doble (diploide para autosomas y mujeres XX) o sencilla en genes de varones XY (diana 1 en el esquema), el par de sondas específicas 1A y 1B hibridan perfectamente con el molde y se habrá amplificación con los cebadores universales X/Y, produciendo una cantidad de producto determinada (a); en el caso de que haya delección de un alelo sólo se amplificará el alelo presente y la cantidad de producto será menor, aproximadamente la mitad (b); si hay una duplicación se obtendrá mayor cantidad de producto (c).

pacientes los riesgos que hay de transmisión de la mutación y de recurrencia de la enfermedad. Es muy importante informar a cada persona que solicita el consejo genético acerca del riesgo *a priori* en función de la historia familiar y de la estructura del árbol genealógico, los posibles estudios genéticos en los genes conocidos, *BRCA1* y *BRCA2*, las técnicas disponibles y la sensibilidad y limitaciones de las mismas, y las medidas preventivas que pudieran aportarse en función de los resultados obtenidos y de la experiencia de los oncólogos y genetistas para cada situación clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. *BRCA1* and *BRCA2* hereditary breast/ovary cancer. GeneReviews: <http://www.genetests.org/>.
2. Díez O, Osorio A, Durán M, et al. Análisis of *BRCA1* and *BRCA2* genes in spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effect. *Hum Mutat* 2003; 22: 301-12.
3. Eccles DM. Hereditary cancer: guidelines in clinical practice. *Breast and ovarian cancer genetics*. *Ann Oncol* 2004; 15 (Supl. 4): iv133-iv138.
4. Eng C, Hampel H, de la Chapelle A. Genetic testing for cancer predisposition. *Annu Rev Med* 2000; 52: 371-400.
5. 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; Mutation in brief #659 online.
6. Nussbaum RL, McInnes RR, Wilard HF. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2001.
7. Scully R, Livingston DM. In search of the tumor-suppressor functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *Nature* 2000; 408: 429-32.
8. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*, 3rd ed., Londres: Garland Science; 2004.
9. Zhou B-BS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408: 433-9.