



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**DETECCIÓN DE ALGUNAS MUTACIONES COMUNES EN LOS GENES
BRCA1 Y *BRCA2* EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA DEL TIPO
HEREDITARIO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller NIGMET CONSIGLIERE JACIR como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor(a)(es):

Dra.: Antonietta Porco
Dra.: Guillermina Alonso

Caracas, Venezuela
MAYO - 2010

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar esta oportunidad en la que culmina una etapa importante de mi vida para agradecerle a DIOS y a todas aquellas personas que con su calidad humana, su cariño, sus enseñanzas, su apoyo incondicional y su amistad, me han acompañado a llegar hasta aquí hoy.

... Gracias MAMI por tu amor, tu paciencia y por estar siempre conmigo, apoyándome, dándome fortaleza y enseñándome cada día a seguir adelante, superar cada etapa de la vida y ser una mejor persona.

... Gracias PAPI por haber sido parte de mi vida, no tienes idea de cuanto te extraño, pero tendré siempre presente tu valor, tu paciencia y tu amor para seguir adelante.

... Gracias TEACH ANTONIETTA por abrirme las puertas del laboratorio, por que sin usted este trabajo no habría sido posible, por su firmeza, su cariño, su apoyo, sus consejos y su don de enseñarnos cada día a ser mejores científicos.

... Gracias PROFE GUILLERMINA por guiarme cuando lo necesite para seguir adelante con la carrera, que grato es tener una directora de escuela que este siempre pendiente de sus estudiantes. Nunca olvidare sus clases de genética donde decía: “El ADN es perfecto”.

... Gracias KARLE por tu paciencia al enseñarme a trabajar en el laboratorio, por introducirme en este tema tan complejo y del que pude aprender muchísimo, por tu gran apoyo, cariño y dedicación.

... Gracias DANI por darme aliento cada vez que siento que desfallezco, por tu presencia, tu compañía, tu apoyo incondicional y tu comprensión, contigo he compartido gran parte de este viaje maravilloso.

... Gracias CARO y SILVIA por hacerme sentir desde el primer día parte del laboratorio, parte de un equipo de trabajo muy especial y por estar siempre pendientes de mi y mis

experimentos.

... Gracias a MI FAMILIA, esos seres queridos que me han acompañado durante mi vida, brindándome su apoyo incondicional, que no puedo enumerar por que se me acaban las páginas, a los que están y los que estuvieron también.

... Gracias JACKYTA por prestarme tus libros de biología con los que estudié toda la carrera.

... Gracias ANA por ser tan especial conmigo, por brindarme tu amistad desde el primer día de la carrera, por acompañarme cada día a vivir una nueva experiencia en la universidad, por compartir conmigo horas de estudio y diversión también.

... Gracias AMIGOS: Mariale, Andre, Marymary, Karina, Daniela, Arturo, Ruben, Luce, Esme, Florit, Giannina, Vane, Vero, Sonia, Juan, Ale, Nestor, entre muchos otros con los que he compartido este camino, por su amistad y su cariño, por todas esas experiencias y triunfos compartidos.

... Gracias a los AMIGOS del LAB y de la USB: Vane, May-Li, Roybel, Franciel, Hanser, Maylin, Shayla, Lissette, Suhail, Francia por los momentos compartidos haciendo amenos los días de trabajo.

... Gracias a los JURADOS de esta tesis, por sus observaciones.

... Gracias a la UCV, por permitirme ser parte de la casa que vence las sombras.

... Gracias a los Profesores de Biología, por su paciencia y sus enseñanzas.

... Gracias a la USB por permitirme trabajar en sus instalaciones.

... Gracias a las Profes Mercedes y Carmen, por abrirme las puertas del museo y apoyarme.

... Gracias Iselen por despertar mi interés por la ciencia.

RESUMEN

El cáncer de mama es la quinta causa de muerte a nivel mundial y la segunda entre las mujeres, en las cuales, el 10% son del tipo hereditario, debido principalmente a mutaciones germinales en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Se han detectado más de 1600 mutaciones en estos genes, siendo las deleciones e inserciones las que tienen un comprobado efecto patológico. Algunas mutaciones se han detectado más comúnmente en grupos étnicos particulares. En Venezuela no se han realizado estudios de este tipo y es por ello, que en el presente trabajo se procedió a la determinación de la presencia de mutaciones debidas a inserciones o deleciones en los genes *BRCA1* (c.943ins10, c.1135insA, c.1623del5, c.2080delA, c.2552delC, c.3450del4, c.3875del4 y c.5083insC) y *BRCA2* (c.3036del4, c.3492insT, c.6696delTC y c.9254del5), más comúnmente encontradas en la población española, italiana, africana y latinoamericana en general; poblaciones de gran influencia en la composición actual de nuestra población. Además, se analizó la presencia de las mutaciones encontradas con mayor frecuencia en la población mundial general, con efecto fundador en la población Judía-Ashkenazi (c.185delAG y c.5382insC para el gen *BRCA1* y c.6174delT en *BRCA2*). Para llevar a cabo este estudio, a partir del ADNg aislado de 48 muestras de sangre de pacientes venezolanos con cáncer de mama del tipo hereditario, diagnosticadas por el Centro Clínico de Estereotáxia (CECLINES), se procedió inicialmente a la detección de las mutaciones mediante PCR y electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Con esta técnica se logró evaluar las mutaciones de origen Judío-Ashkenazi, las cuales no estuvieron presentes en la muestra poblacional analizada. Debido a dificultades en la estandarización de esta técnica para evaluar el resto de las mutaciones se procedió al uso de la técnica de SSCP (Conformación de Polimorfismos de cadena Sencilla). Con el uso de ambas metodologías, en total, se detectaron 7 mutaciones diferentes distribuidas en 8 pacientes. Cinco de las mutaciones detectadas se hallan en el exón 11 del gen *BRCA1*; c.1128_1136insA, p.P871L, p.K1183R y p.S694S, ya reportadas previamente, y c.951_952insA, mutación descrita por primera vez en este estudio. En *BRCA2* se detectaron las mutaciones c.2733insA y c.3036_3039del4 en el exón 11, de las cuales, la primera no ha sido reportada y la segunda si esta reportada en BIC (Breast Cancer Information Core). Este estudio constituyó el primero realizado en Venezuela para la evaluación del espectro mutacional de *BRCA1/2* en el país, mediante estudios posteriores, será posible establecer la población con mayor riesgo de padecer la enfermedad, con la finalidad de aumentar la vigilancia médica en pro de la detección temprana de la enfermedad, y la aplicación del consejo genético en las pacientes portadoras.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNdc	ADN doble cadena
ADNcs	ADN cadena sencilla
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
AR	Alto Riesgo
BRCA	Brast Cancer (gen)
BIC	Breast Cancer Information Core
CM	Cáncer de mama
CO	Cáncer de ovario
CSGE	Conformational Sensitive Gel Electrophoresis
CTP	Codón de terminación Prematuro
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
FMPA	Fluorescent Multiplex PCR Analysis
HRM	Hingh Resolution Melting Analysis
LOH	Pérdida de Heterocigosidad
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RE	Receptores de Estrógenos
SSCP	Single Strand Conformation Polimorfism

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad genética multifactorial que puede afectar diversos tejidos del organismo. El tipo de cáncer más común en las mujeres es el que afecta la mama, representando la quinta causa de muerte a nivel mundial (Figura 1) (www.cancerresearchuk.org), el cual, puede ser esporádico o del tipo hereditario. El cáncer de mama (CM) del tipo hereditario representa aproximadamente el 10 % de los casos, y se ha observado que está asociado a mutaciones germinales en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Miki y col., 1994), las cuales incrementan la predisposición para el desarrollo de la enfermedad durante el transcurso de la vida (Hall y col., y Friedman y col., 1994).

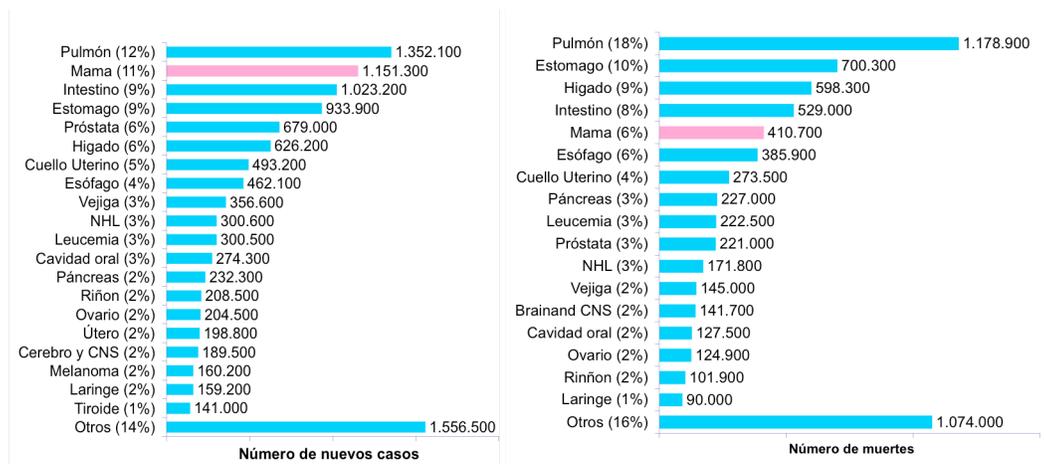


Figura 1- Casos de cáncer más comúnmente diagnosticados (izquierda), y número de muertes (derecha) estimadas en ambos sexos a nivel mundial para el 2002 por el centro de investigación del cáncer del Reino Unido (<http://www.cancerresearchuk.org>).

Los genes *BRCA1* y *BRCA2* deben su nombre a las siglas en inglés de **B**reast **C**áncer, ambos genes son de gran tamaño, con funciones biológicas comunes durante la reparación de daños ocurridos en la replicación del ADN. Así que, mutaciones que provoquen la pérdida de la función de estas proteínas resultarán en la acumulación de mutaciones, con una proliferación celular descontrolada, y en consecuencia, conllevando al desarrollo del tumor (Lozano y col., 2000).

Para que ocurra el desarrollo del tumor, ambos alelos, en cualquiera de los genes, *BRCA1* o *BRCA2* deben estar afectados (genes supresores de tumor). La predisposición a sufrir la patología incrementa al heredar un alelo alterado de cualquiera de estos dos genes (Osorio y col, 2002).

De las aproximadamente 1600 mutaciones que han sido reportadas en los genes *BRCA1/2*, asociadas al desarrollo del cáncer de mama; existen algunas que se presentan con mayor frecuencia en algunas poblaciones. La mayoría de las mutaciones que han mostrado un efecto patológico son aquellas debidas a inserciones o deleciones en cualquiera de estos genes. Así, las mutaciones más comúnmente reportadas a nivel mundial son c.185_186delAG y c.5382insC en el gen *BRCA1* y c.6174delT en el gen *BRCA2*. Otras mutaciones de este tipo, más comunes y de interés en este trabajo debido a su prevalencia en determinadas poblaciones, además de las ya mencionadas, son; c.2080delA, c.1623del5 y c.3450del4 en *BRCA1* y c.3036del4 y c.9254del5 en *BRCA2* encontradas en la población española; 943ins10 en el gen *BRCA1* encontradas en la población africana; en la población italiana se han detectado: c.3875del4 y 5083del19 en el gen *BRCA1* y c.6696delTC en el gen *BRCA2*; y en la población Latinoamérica en general las mutaciones c.2552delC y c.1135insA para el gen *BRCA1* y en el gen *BRCA2* c.3992insT. Debido al origen étnico de la población venezolana, la búsqueda de estas mutaciones resulta interesante, las cuales deberían ser las primeras a ser evaluadas, para determinar su presencia, antes de iniciar la búsqueda de otras mutaciones. Es por lo expuesto anteriormente, que en este trabajo se propone realizar por primera vez en Venezuela la detección de dichas mutaciones, específicamente en mujeres con cáncer de mama del tipo hereditario, y con esta información, contribuir, en la medida de lo posible, con el diagnóstico precoz de la predisposición a sufrir cáncer de mama.

II. ANTECEDENTES

1. El Cáncer

Actualmente, según la Sociedad Americana del Cáncer (<http://www.cancer.org>), entre los hispanos adultos, el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades del corazón. Además, anualmente se ha incrementado considerablemente el número de casos diagnosticados (Figura 2). Esta enfermedad se describió hace aproximadamente 30 años, como la representación de la expresión fenotípica celular, producto de daños genéticos adquiridos somáticamente, resultando en el acortamiento del ciclo celular, dando lugar a un incremento en la velocidad de la división celular y proliferación (Daly, 2003). Este proceso, se asocia en ocasiones a la presencia de predisposiciones hereditarias en genes que controlan la división y muerte de las células, ya que, en las células normales, existen numerosos factores y genes que regulan la proliferación, que en las células cancerosas están alterados (Lozano y col., 2000).

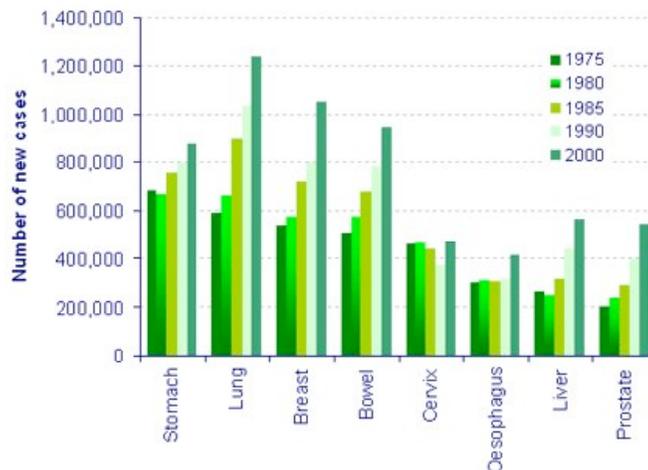


Figura 2.- Número de nuevos casos de cáncer diagnosticados anualmente en ambos sexos, estimados a nivel mundial, por el centro de investigación del cáncer del Reino Unido (<http://www.cancerresearchuk.org>).

Entre los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer están; la exposición de las células a radiación ionizante, luz ultravioleta o agentes químicos endógenos y exógenos, los cuales, producen una variedad de lesiones en el ADN. Estas lesiones incluyen; ruptura de hebra sencilla o de la doble hebra, alteración de las bases y entrecruzamiento inter e intra hebra y entre proteínas del ADN. Por su parte, también pueden ocurrir errores durante la síntesis de ADN, que pueden conllevar a la inserción de bases incorrectas, o la adición o delección de secuencias de bases. Para mantener la integridad genética, las células han desarrollado un proceso de reparación múltiple que disminuye o elimina los efectos de estas lesiones, por lo tanto, la reparación del ADN juega un papel determinante en el establecimiento de mutaciones que puedan aumentar la predisposición al cáncer, poniendo en evidencia que un cambio genético es el evento primario en la transformación maligna (Tannock, 1998).

La carcinogénesis es un proceso de proliferación celular carente de regulación génica, que conduce en primer lugar a la expansión y heterogeneidad clonal de las células, dando origen a un tumor. La neoplasia o tumor puede definirse como una masa anómala de tejido cuyo crecimiento excede y no está coordinado con el de los tejidos normales, y persiste de un modo excesivo, después del cese de los estímulos que provocan el cambio (Lozano y col., 2000).

Se sabe que las células normales del cuerpo humano habitan en un microambiente complejo; interdependiente, regulando la proliferación. De hecho, éstas se reproducen únicamente cuando el ambiente vecino o circundante se los indica. Tal colaboración asegura

que cada tejido mantenga un tamaño y una arquitectura aprobada de acuerdo a las necesidades corporales (Weinberg y col., 1996). En contraste, las células cancerosas violan este esquema, ya que no se ven afectadas por los controles normales de la proliferación y autorregulan su reproducción. Además poseen la propiedad o habilidad de migrar del sitio inicial, invadiendo tejidos vecinos y formando masas tumorales en distintas regiones del organismo. Los tumores compuestos por tales células malignas se tornan cada vez más agresivos con el tiempo, y se vuelven letales cuando interrumpen los tejidos y órganos necesarios para la supervivencia del organismo como un todo. Los tumores se originan de una célula ancestral común, que en cierto punto, inició un programa de reproducción inapropiada, mucho antes de que el tumor sea palpable. Dicha transformación maligna se debe a la acumulación de mutaciones en genes específicos, es decir, que deben ocurrir mutaciones en diversos genes que controlan la proliferación celular. Las alteraciones en otro tipo de genes podrían participar en la creación de células malignas, si permiten específicamente, que la proliferación celular se torne invasiva o capaz de propagarse a través del cuerpo (metástasis) (Weinberg y col., 1996).

1.1. Aspectos Genéticos del Cáncer

Se han identificado dos grupos de genes, cuyas alteraciones juegan un papel primordial en el desarrollo del tumor, estos son; los oncogenes y los genes supresores de tumor (Ponz, 1994). El producto de la expresión de estos genes participan normalmente en la diferenciación celular y su expresión está regulada por hormonas y factores de transcripción.

En la mayoría de los tumores se encuentra una variedad de anormalidades cromosómicas. Esta diversidad de cambios cromosómicos es el resultado de errores espontáneos durante la replicación del ADN y la división celular. Si el cambio adquirido le

confiere a la célula una ventaja selectiva, entonces, la célula anormal y su progenie persistirán (Tannock, 1998).

1.1.1. Oncogenes

Un oncogen (del griego *ogkos* = tumor, hinchazón) se puede definir como el alelo mutado de un gen normal llamado protooncogen, capaz de promover el desarrollo de cáncer. Los protooncogenes son genes que codifican para proteínas, que normalmente, juegan un papel esencial en procesos intracelulares, como el control del crecimiento, proliferación y diferenciación. Estas proteínas pueden actuar como, factores de crecimiento, receptores de superficie celular para estos factores, componentes citoplasmáticos de señalización y proteínas nucleares denominadas factores de transcripción; que reciben información desde los receptores y modifican la expresión de genes implicados en la regulación de la proliferación. El producto de los protooncogenes ejerce un control positivo sobre el ciclo celular en presencia de un estímulo. Cuando estos se encuentran mutados se ejerce un control positivo del ciclo celular constante, carente de regulación. Por lo tanto, la presencia de un alelo mutado es suficiente para originar la pérdida del control de la proliferación (Tannock, 1998), por lo que, los oncogenes actúan de forma dominante. Carcinógenos químicos, físicos, bacterianos o virales pueden conducir a la activación de estos protooncogenes (Ponz., 1994). En las células cancerosas se han descrito varios tipos de mutaciones, y todas ellas pueden llevar, en principio a la activación de protooncogenes, entre las que se encuentran; las mutaciones puntuales, las translocaciones cromosómicas, la pérdida de material cromosómico, mutagénesis de inserción y expansión de secuencias repetidas (Tannock, 1998).

La pérdida de la especialización de una célula portadora de una mutación en un protooncogen produce; la pérdida de equilibrio entre la proliferación y quiescencia, con ausencia de respuesta a factores de diferenciación terminal, lo que implica un incremento del crecimiento, y escape de las células del mecanismo de senescencia proliferativa, y conlleva a la ausencia de apoptosis e inmortalidad celular (Lozano y col., 2000).

1.1.2. Genes oncosupresores

Los genes oncosupresores, también denominados supresores de tumor, oncogenes recesivos o antioncogenes, se pueden definir como genes que dan origen a proteínas que bloquean la progresión del ciclo celular, o contrarrestan el efecto activador de los factores de crecimiento. Estos ejercen un control negativo sobre el ciclo celular. Cuando son inactivados o están ausentes, se pierde entonces la regulación de las vías de crecimiento y diferenciación, y aumenta la probabilidad de transformación neoplásica. Entre los efectos de dicha inactivación están; la inducción de la diferenciación terminal, mantenimiento de la estabilidad genómica, disipación de los mecanismos de senescencia, inducción de la apoptosis, regulación del crecimiento celular, inhibición de proteasas, estimulación de la actividad metilasa del ADN, regulación de la angiogénesis y facilitación de la comunicación celular; en conclusión se encargan de restringir el crecimiento neoplásico. A diferencia de los protooncogenes, no se encuentran presentes durante el desarrollo del cáncer, es su ausencia y no su activación lo que permite el desarrollo de tumores (Ponz, 1994).

Las mutaciones en los genes supresores de tumor son recesivas a nivel celular (célula fenotípicamente normal), y en heterocigocidad su presencia puede ser enmascarada por el alelo normal, pero el alelo mutado puede ser transmitido a las células de línea germinal. Durante la vida adulta, sin embargo, una mutación, o la pérdida del alelo normal puede

inactivar completamente el gen, resultando en un crecimiento descontrolado y ocurrencia de cáncer en uno o mas órganos (Ponz, 1994).

La diferencia entre tumores originados a través de una predisposición heredada o por mecanismos esporádicos, es que en los primeros, la mutación inicial ocurre en las células germinales, mientras que en los cánceres de tipo esporádico, las mutaciones ocurrirán en células somáticas. Es por ello que, individuos que no han heredado la predisposición genética, tienen un riesgo más bajo de padecer la enfermedad, dado que es menos probable que todas las mutaciones ocurran al azar en la misma célula somática (Daly, 2003).

2. Cáncer de Mama

Tal y como se mencionó anteriormente, el CM es la quinta causa de muerte a nivel mundial, siendo una enfermedad muy común entre las mujeres y representando un problema de salud pública. Se ha determinado que una de cada 2500 mujeres americanas padece CM en edades entre los 20-30 años, entre los 30-40 años el riesgo es de 1 de cada 63 y de los 40 años en adelante, una de cada 23 mujeres tiene probabilidad de padecer la enfermedad. A pesar de que el riesgo de padecimiento aumenta con la edad, la probabilidad de morir de ella es igual a cualquier edad. Es por ello que la detección temprana y el tratamiento reducen altamente el riesgo de morir a causa de CM (Osorio y col., 2002). Se ha determinado que sólo el 10% de los casos de CM se deben a una susceptibilidad heredada, donde el 80% de éstas, se debe a mutaciones germinales en los genes *BRCA1* o *BRCA2* (Miki y col., 1994). La presencia de mutaciones en los genes *BRCA* no es determinante, pero si predisponente para el padecimiento de CM, de hecho, la expresión de la enfermedad depende de una serie de factores tales como el sexo, la edad y factores ambientales, además de otros factores

genéticos (Hall, 1990 y Friedman y Lory, 1994).

Esta enfermedad es producto de formación de tumores en el tejido mamario. Las mamas o glándulas mamarias son estructuras pareadas que se encuentran en el pecho, cuya función es la secreción de leche durante la lactancia. Embriológicamente, estas estructuras evolucionaron de un linaje de glándulas de leche que se extienden desde los brazos hasta las piernas del embrión. En el hombre, las glándulas mamarias se encuentran generalmente quiescentes, pero, si son estimuladas por determinadas hormonas son capaces de crecer e incluso de secretar leche (Osorio y col., 2002).

Cada mama femenina (Figura 3) está cubierta por piel, contiene cantidades variables de grasa y el tejido glandular mamario. Cada una, presenta el tejido glandular dividido en 15 o 20 lóbulos separados por tejido graso y ligamentoso. Las células glandulares se agrupan en racimos en los lóbulos mamarios, denominándolos alvéolos mamarios (Osorio y col., 2002).

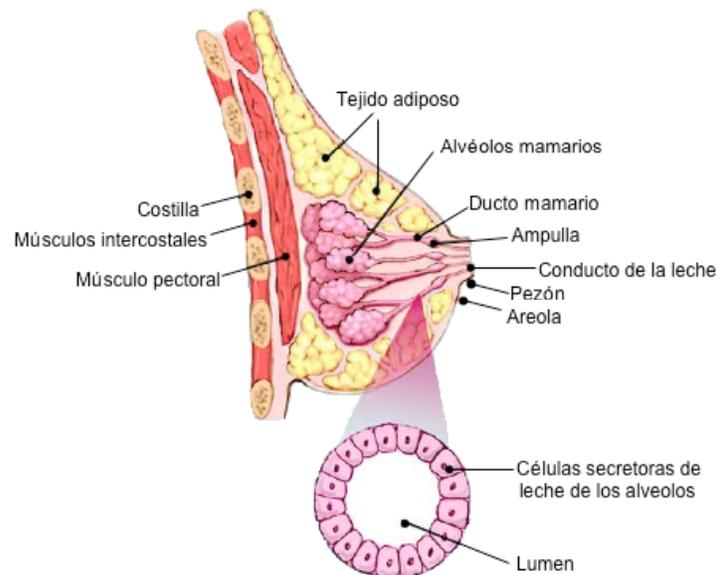


Figura 3.- Corte longitudinal de la mama de una mujer adulta, indicando las partes que la componen (Tomado y modificado de www.breastcancer.org).

En la etapa antes de la pubertad, el tejido glandular de la mama femenina se encuentra inactivo, pero cuando los ovarios comienzan a secretar estrógenos el alveolo y los ductos se desarrollan. Durante el ciclo menstrual, cuando los niveles de estrógenos y progesterona son altos, el tejido glandular experimenta crecimiento. Durante el embarazo, el incremento en los niveles de estas hormonas en la sangre, en conjunto con hormonas adrenales y la hormona del crecimiento causan el crecimiento del tejido glandular, los ductos y las ramificaciones (Osorio y col., 2002).

2.1. Cáncer de Mama de Tipo Esporádico

La mayoría de los casos de CM son del tipo esporádico (90 %); caracterizados por que no exhiben un patrón familiar hereditario, es causado por la adquisición de daños genéticos en las células mamarias durante la vida de la mujer, o dicho de otro modo, por la acumulación de mutaciones somáticas. Estas mutaciones somáticas se atribuyen a errores cometidos durante la división celular en respuesta a factores ambientales (agentes carcinogénicos). Una gran variedad de genes se encuentran comúnmente mutados, o mal regulados en el CM esporádico y se han implicado con el progreso de la enfermedad. Entre estos genes se tienen a los genes supresores de tumor, oncogenes, genes que codifican para factores de crecimiento y receptores de los mismos, moléculas intracelulares de señalización, reguladores del ciclo celular, reguladores de la apoptosis y moléculas de adhesión. Las alteraciones encontradas frecuentemente incluyen (<http://info.cancerresearchuk.org>):

- Sobre-expresión de receptores del factor de crecimiento epidérmico EGFR, HER-3/neu, ERBB3 y ERBB4.
- Amplificación del gen MYC.

- Mutación y sobre-expresión de las moléculas de señalización intracelular h-Ras y c-Src.
- Mutación e inactivación de los reguladores del ciclo celular p53 y RB1.
- Reducción de la expresión de la molécula de adhesión E-cadherina.
- Amplificación del gen EMSY.

De las alteraciones anteriormente mencionadas, las somáticas asociadas al CM del tipo esporádico se encuentran mayormente en el gen supresor de tumor p53 (también conocido como TP53) y representan entre el 12-46% de los casos. Por su parte, el 10-15%, se debe a procesos del tipo epigenéticos, ya que se encargan de activar y/o desactivar ciertos genes según sea el caso, generándose un descontrol al haber un patrón erróneo de metilación (Dobrovic y Simpfendorfer, 1997).

2.2. Cáncer de Mama de Tipo Hereditario

El CM del tipo hereditario se caracteriza por un inicio temprano y bilateralidad, es decir, presencia en ambos senos. Estudios de segregación sugieren que la predisposición tiene una herencia autosomal dominante con penetrancia incompleta. Se estima que mutaciones estructurales en los genes *BRCA1* y *BRCA2* corresponden aproximadamente al 80% en las familias con incidencia elevada o de alto riesgo (Tannock, 1998).

Diversos estudios han demostrado que el riesgo para una mujer de sufrir CM, cuya madre ha padecido la enfermedad, es 1,8 veces mayor que la población general, si su hermana ha padecido la enfermedad el riesgo es 2,3 veces mayor y si ambas (madre y

hermana) lo han padecido, el riesgo es 2,5 veces mayor (Osorio y col., 2002).

2.2.1. Genes *BRCA* de Susceptibilidad para el Cáncer de Mama

El primer gen de susceptibilidad para el CM fue identificado por Hall y colaboradores en 1990, el cual fue denominado *BRCA1* (por las siglas en inglés Breast Cancer). Está localizado en la banda 21 del brazo largo (q) del cromosoma 17 (Figura 4), y fue ubicado a través de un análisis de ligamiento de 23 familias Caucásicas con 146 casos de CM. En 1994, Friedman y colaboradores confirmaron a *BRCA1* como un gen de susceptibilidad para el CM a través del análisis de mutaciones germinales en las familias originales.

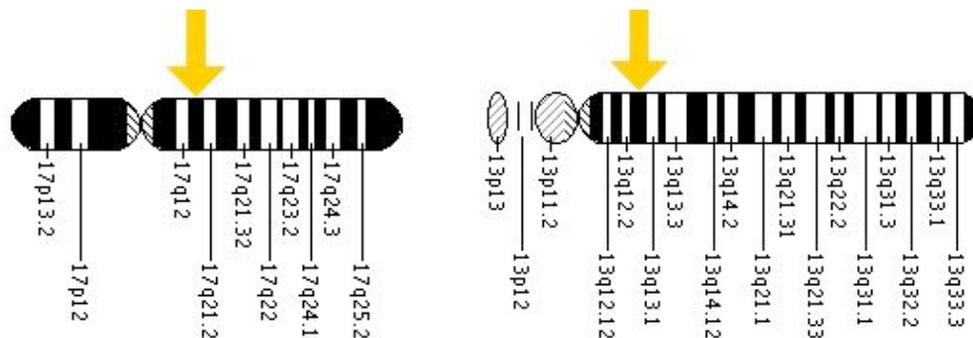


Figura 4.- Ubicación de los genes *BRCA* y *BRCA2*: A la izquierda, esquema del cromosoma 17, donde a través de una flecha se indica la ubicación del gen *BRCA1* (Extraído de: <http://promega.files.wordpress.com/2009/03/brca1.jpeg>). A la derecha el esquema del cromosoma 13, indicando la ubicación del gen *BRCA2* a través de una flecha (Extraído de: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=brca1> y de: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=palb2>).

Por su parte, Wooster y colaboradores (1994) localizaron un segundo gen de predisposición para el Cáncer de Mama, llamado *BRCA2*. Éste se ubica entre las bandas 12-13 del brazo largo (q) del cromosoma 13 (Figura 4), y también fue localizado mediante de un análisis de ligamiento en 15 familias con múltiples casos de CM de inicio temprano que no estuviesen ligados con *BRCA1*. En 1995 los mismos autores detectaron 6 mutaciones

germinales diferentes en este gen.

Los genes *BRCA1* y *BRCA2* tienen estructuras primarias diferentes. El gen *BRCA1*, (Figura 5), está compuesto de 24 exones distribuidos a lo largo de 82 Kpb de ADN genómico (Miki y col. 1994) y codifica una proteína de 1.863 residuos aminoacídicos. Presenta un dominio RING N-Terminal que ha sido implicado en interacciones proteína-proteína. La región C-Terminal tiene 95 residuos, dominios BRCT, que se han encontrado también en otras proteínas involucradas en la reparación del ADN y la regulación del ciclo celular. El gen *BRCA2* (Figura 5) está compuesto de 27 exones distribuidos a lo largo de 84 Kb de ADN genómico. Éste da origen a una proteína de 3.418 residuos, la cual, presenta 8 motivos llamados repeticiones BRC de 30-40 aminoácidos, codificados en el exón 11. Estos motivos son secuencias conservadas en diferentes especies de mamíferos, lo que sugiere una función esencial. Las repeticiones BRC median la unión de *BRCA2* con RAD51, una proteína esencial para la reparación del ADN y la recombinación genética en mamíferos, por lo que se ha sugerido que *BRCA1* y *BRCA2* responden de alguna manera al daño del ADN (Venkitaraman, 2001). Los ARNm de *BRCA1* y *BRCA2* se expresan preferentemente durante la fase tardía G1 y la fase S del ciclo celular (Welsh y col., 2000).

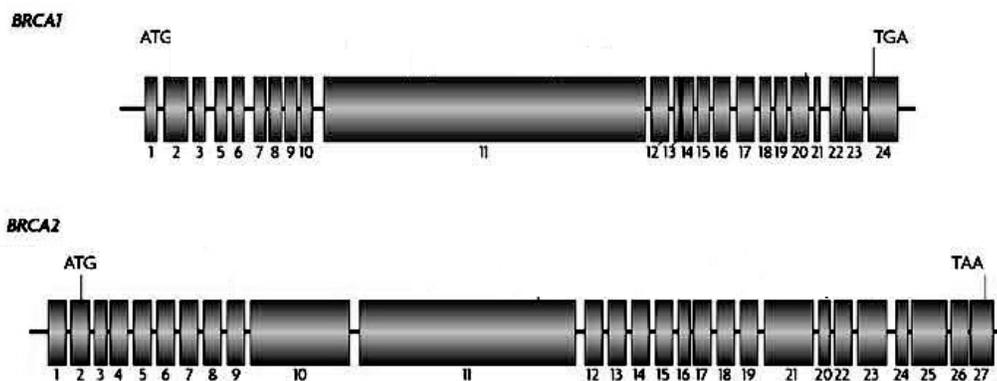


Figura 5.- Estructura de los genes *BRCA1* y *BRCA2*: En la parte superior, *BRCA1* con sus 24 exones y *BRCA2* en la parte inferior con sus 27 exones. (Tomado de Fackenthal y col., 2007)

A pesar de las diferencias en la secuencia y estructura proteica de ambos genes, BRCA1 y BRCA2 tienen funciones biológicas comunes, localización subcelular similar y se expresan en muchos tejidos en forma dependiente del ciclo celular, ya que, se encuentran en mayores niveles durante la fase S, lo que sugiere una función durante la replicación del ADN. Estas proteínas están presentes en el núcleo de células somáticas y en las células meióticas se encuentran en el complejo sinaptonémico (Venkitaraman, 2001). Entre las funciones biológicas que cumplen los genes *BRCA1* y *BRCA2*, y que conducen finalmente a la afirmación de que son genes supresores de tumor, están (Welch y col., 2000):

- Mantenimiento de la estabilidad genómica, a través de la participación en la recombinación homóloga, la transcripción acoplada y la reparación de rupturas en la doble hebra. La participación de los genes *BRCA* en estos procesos se determinó a través de interacciones con proteínas involucradas en la reparación del ADN, como RAD51.
- Son requeridos para la proliferación normal en la embriogénesis temprana y están sobre-regulados durante el desarrollo del epitelio mamario en la pubertad, el embarazo y la lactancia. En adultos, la pérdida de *BRCA1* y *BRCA2* en el epitelio mamario u ovárico conduce a la formación de tumor.
- El dominio RING de BRCA1 facilita la transferencia de ubiquitina a proteínas celulares marcadas para la degradación.
- Participan en la regulación transcripcional donde *BRCA1* forma un complejo

con la ARN polimerasa II y tanto BRCA1 y BRCA2 interactúan con reguladores transcripcionales.

- Participan en la recombinación homóloga y la reparación del ADN, lo cual relaciona el mantenimiento de la integridad del genoma con la función supresora de tumor, esto se determinó gracias a la observación de fuertes interacciones bioquímicas de BRCA1 y BRCA2 con proteínas involucradas en dichos procesos.

Debido a los procesos en los que participan las proteínas *BRCA1* y *BRCA2*, alteraciones en cualquiera de estos genes pueden ocasionar daños, conllevando al desarrollo de un tumor. Algunas de las interacciones en las que se ven asociadas estas proteínas se muestran en la Figura 6. BRCA1 forma parte del complejo para la sobrevivencia del genoma, llamado BASC, compuesto a su vez por proteínas de gran importancia para la reparación del ADN (MRE11, RAD50 y NBS1, entre otras) (Nathanson y col., 2001). *BRCA1* se asocia también a la holoenzima ARN polimerasa II, la quinasa ATR reguladora del ciclo celular, el complejo moldeador de la cromatina (SWI/SNF), la proteína de la anemia de Fanconi (FANC2), entre otras proteínas asociadas. BRCA2 por otro lado, presenta menos interacciones, una de ellas es la unión con la proteína RAD51, que participa en la reparación de la doble hebra de ADN mediante recombinación homóloga (Liu y West, 2002). Así, las células que poseen la proteína *BRCA2* alterada acumulan errores en su estructura cromosómica. El papel de BRCA1 y BRCA2 en la reparación de la doble hebra por recombinación homóloga es diferente, *BRCA2* interviene más directamente, controlando el transporte intracelular de RAD51, sin embargo, el modo de acción de *BRCA1* en este

proceso aún no está claro. BRCA1 contribuye en la respuesta al daño del ADN a través de enzimas que alteran la cromatina y la estructura del ADN, debido a su asociación con SWI/SNF y con reguladores de histonas y helicasas (Venkitaraman, 2001). Mutaciones que inducen a la pérdida de la función de BRCA1 y BRCA2, conllevan a una disminución en la habilidad de la célula para reparar daños en el ADN, resultando en la acumulación de mutaciones somáticas, segregación cromosómica anormal y aneuploidía.

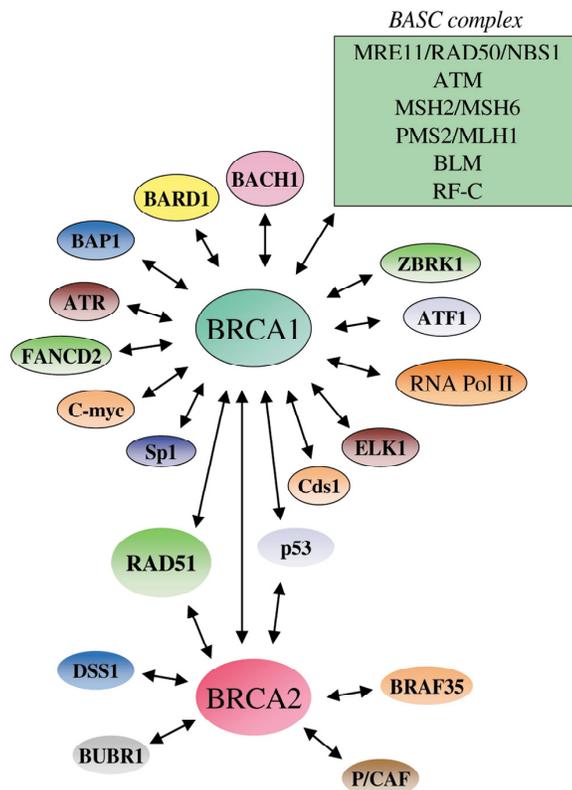


Figura 6-. Interacciones de BRCA1 y BRCA2: Representación esquemática de las interacciones de BRCA1 y BRCA2 con otras proteínas o complejos proteico. Tomado de: Liu y West, 2002.

2.2.2. Pérdida de Heterocigosidad

Dada la condición de estos genes de ser supresores de tumor, el desarrollo de un tumor debido a la pérdida de la función de las proteínas BRCA tendrá lugar cuando ambos alelos de uno de los genes estén alterados. Por lo tanto, la adquisición de mutaciones en los genes *BRCA* de las células germinales del organismo y su consecuente transferencia a las siguientes generaciones, confiere al individuo descendente una mayor probabilidad de desarrollar CM durante su vida, ya que bastará la adquisición de una nueva mutación o la inactivación del alelo normal para que ocurra la pérdida total de la función del gen, resultando en la multiplicación celular descontrolada y la aparición del tumor. Entre los diversos mecanismos por los cuales puede darse la inactivación del alelo normal de los genes, el más comúnmente detectado en los genes *BRCA* es la llamada Pérdida de Heterocigosidad (LOH de sus siglas en inglés: Lost of Heterozygosity), según lo reportado por Osorio y colaboradores (2002). La pérdida de heterocigosidad en una célula heterocigótica puede tener lugar por dos modalidades distintas (Figura 7). Una de ellas es por segregación anormal de los cromosomas, originándose células aneuploides, donde la monosómica morirá y en la trisómica (dos copias del alelo mutado y una del normal) ocurrirá la pérdida de uno de los cromosomas, pudiendo quedar, entonces, una célula homocigótica para el alelo mutado. La otra forma por la que podría generarse una célula homocigótica para el alelo mutado mediante LOH sería la recombinación mitótica, donde, durante la duplicación de los cromosomas ocurre la recombinación homóloga entre las cromátidas.

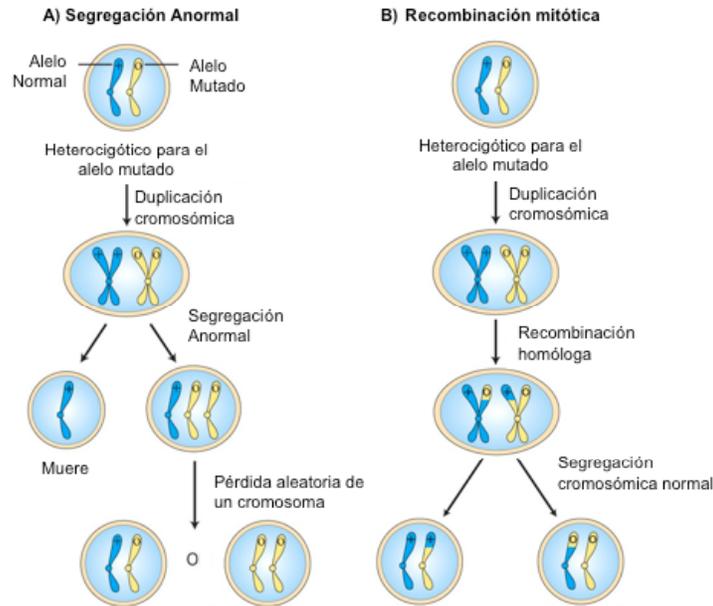


Figura 7.- Pérdida de Heterocigosidad (LOH). Se esquematizan los dos mecanismos por los cuales puede ocurrir: segregación anormal o recombinación mitótica. (Tomado de Lodish y col., 2000).

2.2.3. Mutaciones en los Genes *BRCA1* y *BRCA2*

La respuesta celular al daño en el ADN involucra la activación de los puntos de regulación y la maquinaria reparadora del ADN. Un daño en el mismo, conduce a fallos en dichos procesos, lo que incrementa la sensibilidad del individuo a los agente genotóxicos, como por ejemplo los rayos X (Venkitaraman, 2001).

Se han identificado un gran número de mutaciones diferentes en los genes *BRCA1/2*, mas de 1600 (BIC), sin embargo, algunas familias presentan mutaciones idénticas, lo que ha sido asociado a un efecto fundador (Tannock, 1998). Por su parte, la frecuencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* es mucho menor en los casos de cáncer de mama del tipo esporádico (Tannock, 1998).

Las mutaciones identificadas en genes *BRCA* incluyen; deleciones, inserciones y mutaciones puntuales, en donde se han encontrado mutaciones específicas para diversos

grupos étnicos (Tabla I). La base de datos del Breast Cáncer Information Core (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>), indica que las mutaciones con el mayor número de registros hasta la fecha son la c.185_186delAG del exón 2 del gen *BRCA1*; con 1980 registros, la c.5382insC del exón 20 del gen *BRCA1*; con 1063 registros y la c.6174delT del exón 11 del gen *BRCA2*, con 1087 registros. Así mismo, se ha determinado que estas tres mutaciones son fundadoras para la población Judía-Ashkenazi. La población Judía-Ashkenazi es originaria del norte y este de Europa, aunque, estas mismas mutaciones han sido detectadas en Judíos de diversos orígenes geográficos, así como también en poblaciones no Judías (Kuperstein y col., 2000). Dado a que estas mutaciones se deben a inserciones o deleciones, Kuperstein y colaboradores (2000) desarrollaron un método rápido para su detección, como se explicará mas adelante, y de interés en este trabajo.

La primera migración documentada de judíos a España data del siglo VI, donde la población judía y su cultura crecieron hasta la primera conversión masiva forzada de judíos españoles al cristianismo, durante el visigodo cristiano en el siglo VII. El judaísmo español floreció nuevamente entre los siglos X y XI. A principios del siglo XII España se había convertido en el centro del pensamiento judío, cultura y hogar, con el 90% de la población judía. Las restricciones culturales y religiosas tuvieron lugar con la reconquista cristiana, que culminó con la expulsión de los judíos no convertidos en 1492 bajo el mando de Fernando e Isabel. No se sabe cuantos de los aproximadamente 160.000 judíos exiliados emigraron hacia las Américas durante la inquisición, dado que muchos de ellos mantuvieron oculta sus identidades. Es por esto que las familias españolas y e incluso hispanoamericanas sean posiblemente descendientes de aquellos judíos que emigraron al nuevo mundo (Weitzel, 2005).

Tabla I. Mutaciones debidas a pequeñas deleciones e inserciones y sustituciones encontradas para las distintas poblaciones, en los genes BRCA1 y BRCA2.
 *Nomenclatura según están reportadas en la base de datos del BIC.

Autor	Año	Población	Gen	Exón	Mutación
Jeffrey N.	2005	México/España	BRCA1	2	185delAG
		México	BRCA1	11	943ins10
				11	1205del56
				11	2415delAG
				11	2552delC
				11	2925del4
		Cuba	BRCA2	11	3492insT
				9	957del4
		México/Este Europa	BRCA1	11	1135insA
		Colombia	BRCA2	20	5382insC
		Guatemala		11	3417del4
		El Salvador		11	5164del4
18	8550insT				
		23	9254del5		
Schubert y col.	1997	Puerto Rico	BRCA2	9	995del5
		Holanda		10	1529del4
		Alemania		10	2034insA
		Irlanda		11	3034del4
		Judía-Ashkenazi		11	6425delTT
Martínez J.I.	2003	España/Mediterráneo	BRCA1	11	2080delA
			BRCA2	23	9204-9217del14
				11	9254del5
Nedelcu, R.	2002	Italia	BRCA1	11	3875del4
				16	5083del19
			BRCA2	20	5382insC
Baudi, F.	2001	Italia	BRCA1	11	6696delTC
Blesa, J.R.	2000	España/Mediterráneo	BRCA1	11	1623del5
				11	3450del4
					S1613G
					A1708Q
Duran, M.	2003	España	BRCA2	11	5898delIT
				11	5146-5149delTATG
				11	3036del4
				10	1538del4
				25	9538delAA
				11	3992insT
					Q235X
					K3038X
				11	E1308X
11	S2219X				
Campos, B.	2003	España	BRCA2	23	9254del5
Simard y col.	1994	Canadá	BRCA1	2	185delAG
					128insA
					1293del40
				11	3121delA

				11	4184del4
				20	5382insC
Shih y col.	2000	Judías Ashkenazi	<i>BRCA1</i>	2	185delAG
				20	5382insC
			<i>BRCA2</i>	11	6174delT
Kauff y col.	2002	Judías Ashkenazi	<i>BRCA2</i>	5	1982delA
				10	2082insA
					9325insA
Yassaee y col.	2002	Irán	<i>BRCA1</i>	2	185delAG
					81-182insT
Güran y col.	2005	Turquía	<i>BRCA1</i>	2	185delAG
Gorski y col.	2000	Polonia	<i>BRCA1</i>	2	185delAG
				20	5382insC
				11	3819del5
					4135delA
					61G>C
Ladopoulou y col.	2002	Grecia	<i>BRCA1</i>	20	5382insC
					5586G>
					R175X
Cipollini y col.	2004	Holanda	<i>BRCA1</i>	11	2804delAA
		Italia	<i>BRCA1</i>	20	5083del19
				11	1499insA
			<i>BRCA2</i>	20	8765delAG
		Islandia	<i>BRCA2</i>	9	995del5
		Suecia	<i>BRCA1</i>	11	3171ins5
	11		1806C>T		
Jara y col.	2002	Chile	<i>BRCA1</i>	2	185delAG
Mucha y col.	2005	Brasil	<i>BRCA1</i>	20	5382insC
			<i>BRCA2</i>		S2219X
					C1290Y
Machado y col.	2007	Portugal	<i>BRCA2</i>		156_157insAlu
Tommasi y col.	2005	Italia	<i>BRCA1</i>		4566delA
				20	5382insC
				11	P871L
				11	K1183R
				16	S1613G
				11	E1038G
Deng y col.	2003	China	<i>BRCA1</i>		3870del4
					E867R
				11	P871L
				13	S1436S
				11	L771L
Panguluri y col.	1999	Afroamericana	<i>BRCA1</i>	11	943ins10
				11	3450del4
				11	K1183R
					L564P
Velasco y col.	2002	España	<i>BRCA1</i>	11	S694S
				11	1135insA
				11	L771L
				18	G1706E
				18	A1708E

Estudios relacionados con la detección de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* no se han realizado en Venezuela. Es del conocimiento general, que la población actual de Venezuela es el producto de la mezcla entre una población amerindia original, con genes europeos y africanos en distinta proporción. En un estudio realizado por Rodriguez-Larralde y colaboradores en 2001, se determinó que en la población venezolana el aporte genético predominante es el de origen español en un 58 %, seguido del amerindio con un 28,5 % y el 12,6 % restante de origen africano, es decir, que en Venezuela existe un proceso de mestizaje importante, cuyo mayor aporte genético es el español (Rodriguez y col., 2001). Es por ello que resulta interesante, analizar en la población venezolana, además de las mutaciones anteriormente mencionadas (Judías), otras mutaciones comunes de origen europeo, como español e italiano, así como también de origen africano y latinoamericano en general, especialmente deleciones o inserciones, que pueden ser detectadas por el método descrito por Kuperstein y colaboradores, (2000).

Entre las mutaciones en los genes *BRCA1* para poblaciones, como la española, la italiana, la africana y la latinoamericana en general, se encuentran: c.943ins10, c.1135insA, c.1623del5, c.2080delA, c.2552delC, c.3450del4 y c.3875del4 en el exón 11 y c.5083del19 en el exón 16. A su vez, en el gen *BRCA2* se presentan las mutaciones c.3036del4, c.3992insT y c.6696delTC en el exón 11 y c.9254del5 en el 23. Tal como se puede apreciar en la Tabla I, estas mutaciones han sido encontradas en poblaciones específicas, y algunas de ellas se han catalogado como fundadoras en las poblaciones encontradas.

Entre los estudios donde se han reportado estas mutaciones, están los realizados en

Costa de Marfil (Stoppa-Lyonnet y col., 1997), Bahamas y los Estados Unidos (Panguluri y col., 1999), encontrando la mutación c.943ins10 en el gen *BRCA1*. La mutación se debe a la inserción de 10 nucleótidos en el exón 11 del gen, y da origen a un codón de terminación en el triplete 289 del ARNm. La mutación se debe específicamente a la duplicación (de 10 pb) en un motivo de secuencias repetidas. La mutación se designa “c.943ins10”, por ser el sitio más probable para la inserción en el ARNm (U14680). Meford y colaboradores (1999), determinaron, a través de un análisis de genotipo en 5 familias, que la mutación es fundadora para la población Africana.

Por su parte, Blesa y colaboradores (2000) analizaron completamente la región codificante del gen *BRCA1* en 51 mujeres españolas (26 de alto riesgo y 25 de bajo riesgo), identificando 7 mutaciones de cambio de sentido y tres mutaciones sin sentido, diferentes; c.185_186delAG (4 veces), c.3450del4 (2 veces) y c.1623del5, principalmente en mujeres de alto riesgo. La mutación c.623del5, produce un cambio en el marco de lectura que resulta en la terminación prematura de la traducción en el codón 505 del ARNm. La mutación c.3450del4 produce igualmente un cambio en el marco de lectura y la terminación de la traducción en el codón 1115 del mensajero. Por su parte, la mutación c.185_186delAG produce un codón de terminación de la transcripción en el codón 39 del ARNm. Al determinar la penetrancia de las mutaciones en el gen *BRCA1*, encontraron que esta corresponde al 0,8. La penetrancia es un índice que estima las veces en las que un alelo determinado de un gen produce el fenotipo con el que se le ha asociado.

La otra mutación de interés para este estudio fue la encontrada por Baudi y colaboradores (2001) a partir del estudio realizado con 24 pacientes de familias con cáncer de mama y/u ovario del sur de Calabria, en Italia, en los cuales encontraron, la mutación

c.5083del19 en 4 oportunidades, respecto de 6 de las mutaciones encontradas en el estudio; confirmándola como mutación fundadora para esa población a través de un análisis de haplotipo. Esta mutación genera un cambio en el marco de lectura, provocando la terminación prematura de la transcripción en el codón 1670 del mensajero. Posteriormente Nedelcu y colaboradores (2002), encontraron la mutación en 5 familias, correspondiendo al 21,7% de mutaciones encontradas en *BRCA1*, confirmándola además como una mutación fundadora. Estos autores reportaron además la presencia de las mutaciones c.1135insA, c.3875del4 (en dos familias) y c.5382insC (en dos familias) en el gen *BRCA1*. También encontraron las mutaciones c.3036del4 y c.6696delTC (en dos familias) del exón 11 del gen *BRCA2*. Todas estas mutaciones generan un cambio en el marco de lectura, generando secuencias de terminación en los codones 345, 1262, 1829, 959 y 2174, respectivamente.

Por su parte, en el 2003, Martínez y colaboradores realizaron un análisis de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en 124 mujeres españolas diagnosticadas con CM de inicio temprano. Estos autores identificaron 6 mutaciones patogénicas, una en *BRCA1* y 5 en *BRCA2*. De las mutaciones encontradas, las de importancia para este estudio son; c.2080delA en *BRCA1* y c.9254del5 en *BRCA2*, ya que son debidas a deleciones y han sido reportadas varias veces para esa población. Estas mutaciones generan un cambio en el marco de lectura, produciendo la terminación prematura de la transcripción en los codones 700 y 3016 del ARNm cada gen, respectivamente.

Otro análisis mutacional del gen *BRCA2* fue realizado por Duran y colaboradores (2003) en 150 pacientes con CM en Castilla-León (España). Este estudio permitió la identificación de 10 mutaciones distintas que conducen a la síntesis de proteínas truncadas en el gen *BRCA2*. La mutación encontrada con mayor prevalencia en pacientes no

relacionados fue c.3036del4 (también conocida como c.3034del4, ya que no pueden distinguirse mediante secuenciación). Esta mutación genera un cambio en el marco de lectura del ADN y la terminación prematura de la traducción en el codón 959. Hasta la fecha, esta mutación, ha sido reportada 105 veces en la base de datos del CM (Breast Cancer Information Core database), por lo que fue considerada para el presente estudio.

Finalmente, en el 2006 Weitzel y colaboradores realizaron un estudio de 110 pacientes de origen hispano no relacionadas, con historia familiar de CM y CO, donde las mutaciones más comúnmente encontradas fueron c.185_186delAG y c.2552delC en el gen *BRCA1*, lo que sugiere un efecto fundador inclusive para la población Latinoamericana/Caribeña, donde también estuvieron presentes las mutaciones. La mutación c.2552delC genera también un triplete de terminación de la traducción en el codón 345 del ARNm.

2.2.3.1. Métodos para la detección de mutaciones

La detección de mutaciones causantes de patologías en humanos, ha sido una de las áreas de mayor interés en la biología molecular. El gran aporte de conocimientos en esta área, en los últimos años ha estado acompañado por el desarrollo tecnológico de equipos que permiten al investigador alcanzar respuestas cada vez más acertadas a sus interrogantes. Gracias a esto, se han desarrollado técnicas que permiten hacer una evaluación general de un genoma, un gen o una secuencia particular, para identificar posibles variaciones presentes, valiéndose posteriormente de la secuenciación como herramienta para caracterizar dicha región y determinar cuales son las variaciones presentes. La base general de las técnicas desarrolladas para la búsqueda de variaciones genéticas en secuencias nucleotídicas está en

la electroforesis en geles de poliacrilamida, principalmente por su poder de resolución.

En este sentido, una de las primeras técnicas desarrolladas para la detección de mutaciones fue la denominada DGGE (Denaturing Gradiente Gel Electrophoresis), propuesta por Fischer y Lerman en 1983. Esta metodología permite la migración de moléculas de ADN en una matriz de poliacrilamida en gradiente desnaturizante y de concentraciones crecientes (Figura 8-C). Las moléculas se exponen a un medio que contiene un agente químico que promueve la desnaturalización gradual del fragmento que contiene la secuencia en estudio, cambios en la secuencia del fragmento resultan en patrones de corrida variados, que a su vez estarán determinados por la región menos estable de la molécula. La DGGE surgió inicialmente como una modificación de la TGGE (de las siglas en inglés de Electroforesis en Geles en Gradiente de Temperatura), en esta última metodología, el gradiente desnaturizante se obtiene mediante la variación de la temperatura del gel durante la corrida (Rosenbaun y Riesner, 1987).

Otra técnica comúnmente utilizada es un protocolo para la detección de heteroduplex y es la llamada CSGE (Conformational Sensitive Gel Electrophorésis) y es útil para la búsqueda de mutaciones en genes largos y multiexónicos. La detección de mutaciones en el ADNdc mediante CSGE se basa en que, el sólo cambio de una base puede producir cambios conformacionales en la doble hélice (Figura 8-A). Un cambio de una base generará una región de no apareamiento (*loop*) entre la hebra portadora de la mutación y la que no la porta, lo que causara la migración diferencial de las moléculas de heteroduplex y homoduplex. Un heteroduplex está formado por la hibridación entre un ADN control y su homólogo portador de una mutación. Los heteroduplex se generan aumentando la temperatura en la muestra para separar las hebras de ADN y luego permitir su

renaturalización con otra hebra disminuyéndola. Cuando un paciente es homocigótico para la región de estudio se generaran homoduplex y cuando el paciente es heterocigótico se generarán heteroduplex y homoduplex (Korkko y col., 1998). Estas moléculas presentan una movilidad electroforética aberrante que permite diferenciarlas en electroforesis en geles ligeramente desnaturizantes (Ganguly y col., 1993).

Existe otra técnica que es la más ampliamente utilizada para la detección de mutaciones, la SSCP (Single-Strand Conformation Polymorfism). Esta metodología fue descrita por primera vez por Orita y colaboradores en 1989. Con esta técnica, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, es posible separar fragmentos de ADNsc según la conformación espacial que pueda adoptar cada hebra, que es específica de su composición nucleotídica, debida a la hibridación de distintas regiones de un segmento de ADN replegado sobre si mismo (Figura 8-B) (Estrada y col., 2005). Así, un fragmento de ADNcs debería tener una determinada movilidad electroforética, mientras que la hebra complementaria tendría otra. Por lo tanto, un producto de PCR de un paciente homocigótico podrá presentar de una a dos bandas en la corrida electroforética. Por el contrario, en una muestra de un paciente heterocigótico se podría obtener hasta 4 bandas en el gel. El número de bandas puede ser variable por la existencia de más de un estado posible de conformación para dicha secuencia, teniendo en mayor proporción los estados más estables. Esto se obtiene variando, al igual que en el caso anterior, la temperatura de la muestra antes de la corrida para promover la desnaturización del ADNdc y luego la renaturalización sobre si mismo, durante la corrida.

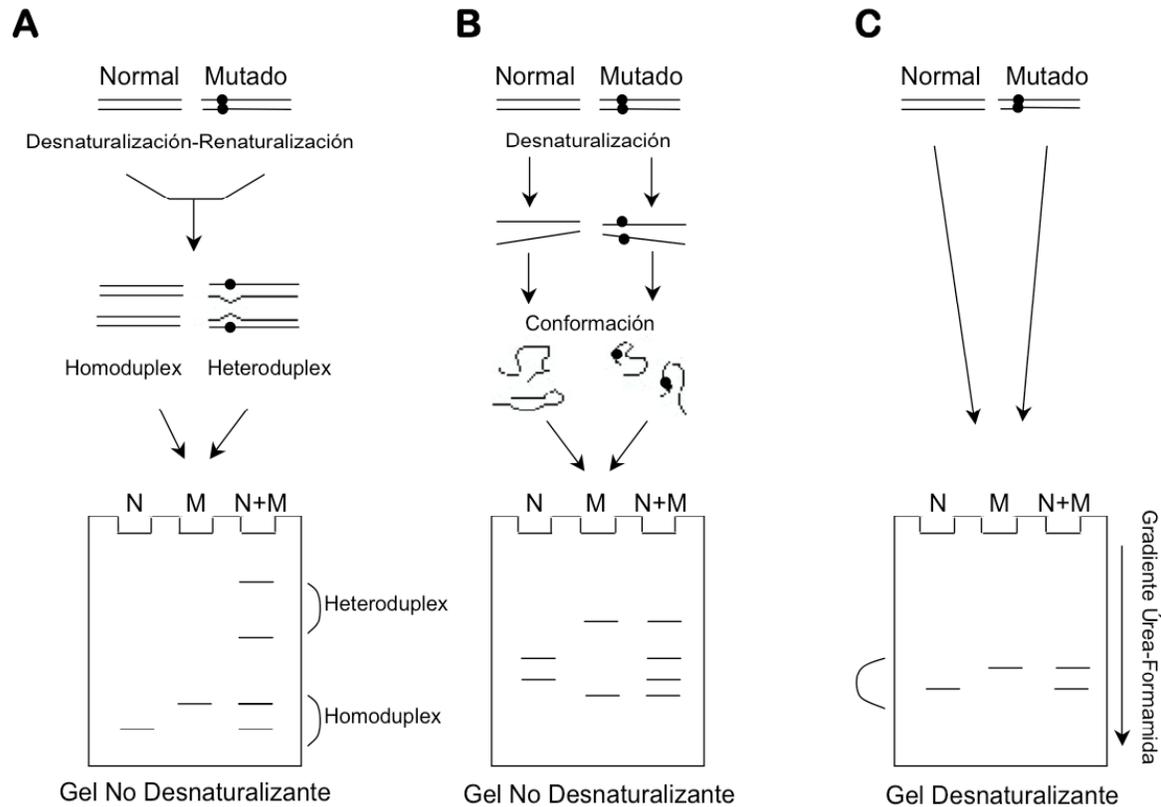


Figura 8.- Representación esquemática comparativa de distintas técnicas para la detección de mutaciones basadas en la utilización de electroforesis en geles de poliacrilamida. En la Figura (A) se muestra el esquema de una CSGE, en la (B) una SSCP y en la (C) una DGGE. (Tomado y modificado de: Gasser y col. 2007).

Otra de las técnicas empleadas para la detección de mutaciones es el HRM (**H**igh **R**esolution **M**elting **A**alysis). Este es un método relativamente nuevo para el análisis de ADN, el cual, se utilizó por primera vez en 2002 en las universidades de Utah y Idaho (Reed y col., 2007). Esta metodología depende de la habilidad de evaluar y almacenar las intensidades de fluorescencia como una función de la temperatura de fusión de los productos de PCR. El comportamiento de la temperatura de fusión o desnaturalización (T_m , temperatura de *melting*) en los productos de PCR es monitoreado mediante cambios en la fluorescencia, observada durante la desnaturalización del ADNdc por calentamiento. Las

muestras heterocigóticas de ADN resultan en una curva con variaciones respecto a la muestra homocigótica usada como referencia. Las alteraciones en la forma de la curva de desnaturalización se deben al cambio de una o más bases. Los mutantes homocigóticos se detectan por presentar un cambio en la T_m , mas que como un cambio en la forma de la curva (Leener y col., 2008). Para la generación de la curva de fusión, la muestra se va calentando progresivamente, detectando constantemente la fluorescencia. El ADNdc fluorescerá fuertemente a bajas temperaturas (se utiliza un fluoróforo saturante). A medida que la temperatura se incrementa la fluorescencia disminuye, lentamente a principio y luego a una temperatura dada, caerá rápidamente, reflejando la desnaturalización del ADNdc en ADNsc (Reed y col., 2007). Un estudio realizado por Leener y colaboradores (2008) determinó que la HRM es tan o más sensible como las técnicas mencionadas anteriormente (DGGE, TGGE y CSGE). Sin embargo, la ventaja respecto a las anteriores es un menor procesamiento post-PCR donde no se invierte mucho tiempo y una mejor relación costo-efectividad.

Una técnica de análisis rápido de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, debidas a pequeñas deleciones o inserciones, es la FMPA (**F**luorescent **M**ultiplex **P**CR **A**nalysis), desarrollada por Kuperstein y colaboradores (2000). Ésta se basa en la realización de una PCR-Múltiple, donde, se analizan las muestras de pacientes portadores y no portadores de las mutaciones del tipo inserción/delección. Los autores llevaron a cabo el estudio para el análisis de las mutaciones en dos poblaciones distintas, la población Judía-Ashkenazi (c.185_186delAG y c.5382insC en *BRCA1* y c.6174delT en *BRCA2*) y la población francesa canadiense (c.2953del3+C y c.3768insA en *BRCA1* y c.2816insA, c.6503delTT y c.8765delAG en *BRCA2*). La técnica empleada se basa en la amplificación a través de una PCR múltiple de todos los fragmentos contentivos de las mutaciones a analizar y su posterior

electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, donde se podrá detectar la presencia o ausencia de las mutaciones debido a cambios en la corrida electroforética, debido a variaciones del tamaño de los fragmentos analizados según la mutación que este presente. En la Figura 9 se muestra parte de los resultados obtenidos en el estudio de los autores, donde se pueden apreciar los cambios en la movilidad electroforética de los fragmentos en pacientes portadores de la mutación, ya sea con un desplazamiento hacia arriba en caso de ser una inserción o como un desplazamiento por debajo de los fragmentos de los pacientes no portadores, debido a la delección de nucleótidos.

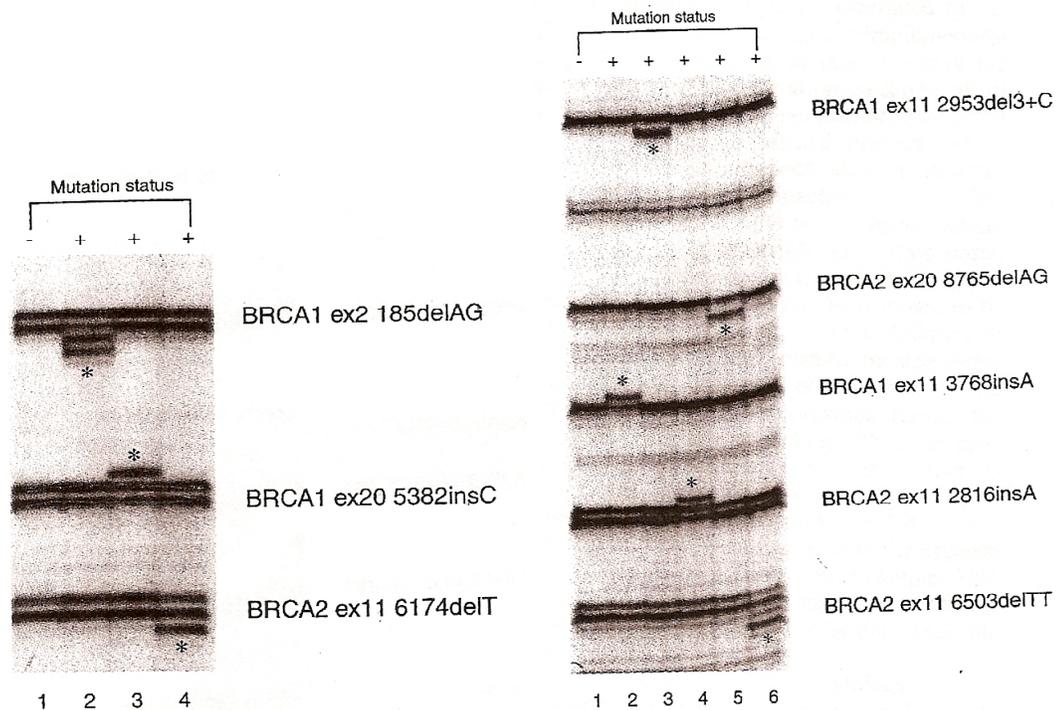


Figura 9.- Gel de FMPA obtenido por Kuperstein y colaboradores: Se muestran dos resultados obtenidos por Kuperstein y colaboradores luego del análisis de los productos de PCR en los geles desnaturalizantes de poliacrilamida, para cada una de las poblaciones. A la izquierda el resultado obtenido para las tres mutaciones evaluadas en la población Judía-Ashkenazi y a la derecha el resultado de las 5 mutaciones evaluadas en la población francesa canadiense. En cada caso se enumeraron los carriles y se indica mediante un signo positivo aquellos individuos portadores de las mutaciones y con un signo negativo los individuos normales donde esta ausente la mutación. En cada caso se indica además el fragmento correspondiente a cada banda. Por ejemplo, a la izquierda, la mutación c.185_186delAG para la población Judía-Ashkenazi, se muestra en el primer carril un paciente no portador de la mutación, en el segundo carril se tiene un paciente portador de la mutación y se observa un cambio en la movilidad electroforética, debido a que la delección de 2pb origina un producto de PCR 2 nucleótidos mas pequeño que el correspondiente al alelo normal por lo cual tiene una mayor movilidad (Kuperstein y col. 2000).

Otra técnica empleada para la detección de mutaciones patológicas, es la prueba para la detección de proteínas truncadas (PTT de **P**rotein **T**runcation **T**est) que permite la detección específica de variantes que produzcan la terminación temprana de las proteínas y se ha utilizado como herramienta de búsqueda de mutaciones antes de la aplicación de métodos como los anteriormente mencionados (SSCP y CSGE). La PTT consiste en un análisis a través de un sistema de transcripción-traducción *in vitro* del ADN que finalmente detectará proteínas de menor tamaño en relación a un control normal. Se lleva a cabo mediante la amplificación del fragmento de interés (ADNc), introduciendo mediante una reacción de PCR, una región promotora y una secuencia de iniciación de la traducción con su respectivo ATG en marco de lectura, se transcribe este producto a través de una ARN polimerasa y se traduce en un sistema *in vitro*, evaluando el producto final en una SDS-PAGE (**S**odium-**D**odecyl-**S**ulfate-**P**oly-**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis), para discriminar los productos proteicos según su tamaño (Roest y col. 1993). Un método, que no se basa en la separación mediante electroforesis en geles de poliacríamida, ha sido también utilizado en la búsqueda de alteraciones genéticas, como la cromatografía líquida de alta resolución (DHPLC de **D**enaturing **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**romatography) (Han y col., 2006 y Song y col., 2006), técnica que presenta el mismo principio básico de la CSGE, en cuanto a la detección de cambios conformacionales del ADNc mediante la formación de homoduplex y heteroduplex. Su diferencia radica en la forma en que se detectan, ya que esta se lleva a cabo en columnas cromatográficas de poliestireno-divinilbenceno, utilizando el acetato de trietilamonio como fase líquida y un solvente orgánico (acetonitrilo) como eluyente, midiendo constantemente la absorbancia de las eluciones a 250 nm de longitud de onda.

Finalmente, la secuenciación del ADN es el método más preciso para la detección de mutaciones, este es un método ampliamente conocido y utilizado, que permite la determinación de la secuencia nucleotídica de un fragmento de ADN. En el método enzimático, propuesto por Sanger (1977) se emplean 2,3-dideoxynucleótidos (ddNTP) que actúan como terminadores específicos de la reacción de polimerización del ADN. Actualmente, se lleva a cabo en un sólo tubo de reacción, donde cada ddNTP está marcado con un fluoróforo distinto, que permite su posterior identificación mediante electroforesis que discriminen los fragmentos obtenidos por tamaño. Aunque este método es el mejor en la detección de mutaciones no siempre son prácticas, debido a su costo.

Dada la gran importancia que tiene el CM desde el punto de vista médico, así como el conocer las causas de la enfermedad, aunado a los avances en el área de la genética molecular para el estudio de las enfermedades humanas, se han incrementado las investigaciones que permiten la detección e identificación de mutaciones asociados a muchos grupos étnicos o poblaciones del mundo, innovando así en el desarrollo de posibles *tests* o exámenes clínicos que permitan la determinación de la población en riesgo, pudiendo así incrementar los esfuerzos del personal especializado en la prevención y control a tiempo de la enfermedad. Sin embargo, en Venezuela aún no se han realizado estudios de este tipo, por lo que se hace importante la detección de las mutaciones presentes en esta población, así como el establecimiento de técnicas sencillas que permitan llevar a cabo dicha determinación. Es por ello que en el laboratorio de Genética Molecular Humana B (LGMHB) de la Universidad Simón Bolívar (USB), en conjunto con el Centro Clínico de Estereotaxia (CECLINES), se está llevando a cabo un proyecto relacionado con la detección de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en mujeres venezolanas con cáncer de mama

del tipo hereditario, con la finalidad de detectar cuales son las mutaciones más comunes presentes en Venezuela. Específicamente, en este trabajo, se propone realizar la detección de mutaciones comunes, del tipo deleción o inserción, mayormente presentes en poblaciones que están asociadas al origen étnico de la población venezolana, con el fin de desarrollar a fututo, un posible método diagnóstico.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar el ADN_g obtenido a partir de las muestras de sangre de mujeres venezolanas diagnosticadas con CM del tipo hereditario por el Centro Clínico de Estereotaxia (CECLINES) para determinar la presencia de mutaciones debidas a pequeñas deleciones o inserciones, en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, a través de Reacciones en Cadena de la Polimerasa múltiples y electroforesis en geles desnaturalizantes.

Objetivos Específicos

- Estandarización de las técnicas de la PCR múltiple y electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, para el análisis de mutaciones debidas a inserciones y deleciones, en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.
- Analizar el ADN genómico de pacientes venezolanas con CM del tipo hereditario para detectar la presencia de las mutaciones más comunes (Judías-Ashkenazi) en los genes *BRCA1* (c.185_186delAG y c.5382insC) y *BRCA2* (c.6174delT).
- Análisis del exón 11 del gen *BRCA1* (c.2080delA, c.1623del5 y c.3450del4) y los exones 10, 11 y 23 del gen *BRCA2* (c.3036del4, c.3492insT y c.9254del5) del ADN genómico de pacientes venezolanas con CM para determinar la

presencia de mutaciones de origen español, con efecto fundador.

- Análisis del exón 11 y 16 del gen *BRCA1* (c.3875del4 y c.5083del19) y del exón 11 del gen *BRCA2* (c.6696TC) del ADN genómico de pacientes venezolanas con CM para determinar la presencia de mutaciones de origen italiano, con efecto fundador.
- Análisis del exón 11 del gen *BRCA1* (c.943ins10) del ADN genómico de pacientes venezolanas con CM para determinar la presencia de mutaciones de origen africano, con efecto fundador.
- Análisis del exón 11 del gen *BRCA1* (c.2552delC y c.1135insA) del ADN genómico de pacientes venezolanas con CM para determinar la presencia de mutaciones de origen latinoamericano, con efecto fundador.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con el objetivo propuesto en este trabajo se realizaron PCRs para la amplificación de fragmentos de los exones 2, 11, 16 y 20 del gen *BRCA1* y en los exones 11, y 23 de *BRCA2*, que contienen las regiones de interés para la detección de las mutaciones (las mutaciones a analizar y los cebadores se muestran en la Tabla II), a partir de muestras de ADN extraído a partir de un volumen de sangre de los pacientes seleccionados. Estos productos fueron posteriormente analizados de dos maneras; a través del análisis por tamaño de los productos de PCR, mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (FMPA); para la detección de mutaciones de tipo delección o inserción, y mediante el análisis de la conformación de polimorfismos de cadena sencilla (SSCP). Esto permitió además, hacer una comparación de las técnicas empleadas.

1. Obtención de las muestras y selección de los pacientes

En el presente estudio se analizaron muestras de sangre de 47 pacientes del sexo femenino y 1 del sexo masculino, previo consentimiento informado (Anexos), suministrados por CECLINES; diagnosticados con CM del tipo hereditario, por la presencia de al menos un criterio de inclusión. Los criterios que fueron aplicados para la caracterización del CM como del tipo hereditario y la inclusión de las pacientes en el estudio, son:

- Presencia de CM y/u ovario en parientes de primer grado
- Desarrollo de CM y/u ovario a edades tempranas (antes de los 45 años)
- Presencia de CM bilateral

- Incidencia de CM en individuos del sexo masculino
- Mas de tres (3) casos de CM en la familia

Mediante la técnica de venopunción, se obtuvo, de cada paciente, una muestra de sangre total periférica, de aproximadamente 5 mL, en un tubo con anticoagulante (7,5 nM de EDTA) para el aislamiento de ADN genómico que posteriormente se procesó según el plan de trabajo mostrado en la Figura 10.

2. Aislamiento del ADN genómico

La extracción de ADN es un paso básico en la biología molecular y en la ingeniería genética, esta práctica es ampliamente empleada en el diagnóstico clínico. Debido al gran tamaño del ADN humano (6.600 Mb), se dificulta su obtención de manera íntegra, sin embargo, se ha estimado que a través de distintos procedimientos de extracción se pueden obtener tamaños entre 20-50 Kb, los cuales son adecuados para los análisis posteriores como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), debido al tamaño del fragmento a amplificar (Sambrook y col., 1989).

El protocolo de aislamiento de ADN genómico empleado, está basado en la metodología desarrollada por Bowen y Keeney (2003), que utiliza como herramienta la centrifugación diferencial, tomando en cuenta el principio de la precipitación salina. A 700 μ L de sangre fresca o congelada se le agrega, en un tubo eppendorf de 1,5 mL, un volumen igual (700 μ L) de Buffer de Lisis Celular (10 mM de Tris-HCl a pH 8, 11 % p/v de Sacarosa, 5 mM de MgCl₂, 1 % v/v de Tritón X-100), se mezcla brevemente en el vortex y se incuba a temperatura ambiente (TA) por 2 minutos. Posteriormente, se centrifuga durante

5 min a 2000 x g a TA y se descarta el sobrenadante. Al sedimento obtenido se le añaden nuevamente 500 μ L de Buffer de Lisis Celular, se mezcla con el vortex brevemente y se centrifuga por 2 min a 2000 x g a TA, descartando nuevamente el sobrenadante. En la siguiente etapa del aislamiento se lisan los núcleos, exponiendo entonces, el material genético, para ello se agrega 300 μ l de Buffer de Lisis Nuclear (10 mM de Tris-HCl a pH 8, 10 mM de EDTA, 10 mM de Citrato de Sodio, 1 % p/v de SDS) y se resuspende el sedimento con la pipeta, a continuación se agregan 100 μ L de NaCl a 5,3 M y 500 μ L de Cloroformo y se mezcla por inversión hasta que se forme una emulsión uniforme. Se centrifuga durante 5min a 2000 x g a TA (para separar la fase acuosa y orgánica) y posteriormente se toman 300-350 μ L de la fase acuosa (superior) y se mezclan en un nuevo tubo con 600-700 μ L de Etanol Absoluto frío. Se invierte la solución suavemente hasta observar la formación de la malla blanca de ADN y se centrifuga por 10 min a 12.000 x g a TA. Finalmente se descarta el sobrenadante, se dejar secar el etanol completamente y se resuspende el sedimento (ADN) en aproximadamente 100 μ L de agua estéril durante 1 hora a TA. Finalmente, para determinar la eficacia del proceso de extracción y la integridad del ADN aislado, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0,8 %.

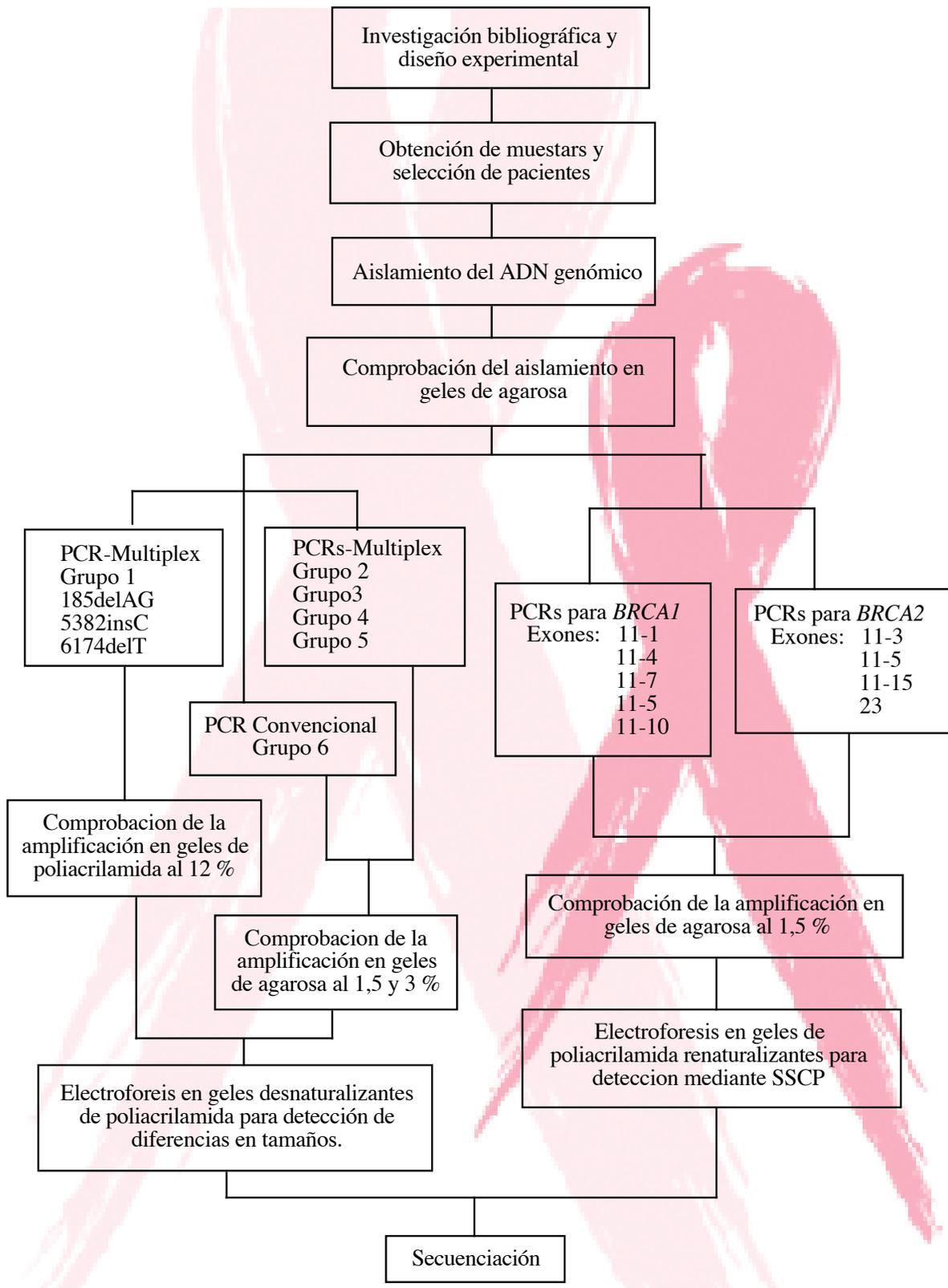


Figura 10.- Plan de trabajo y orden de actividades realizadas para la obtención de los resultados y análisis final de los mismos.

3. Electroforesis en geles de agarosa

El gel de agarosa al se prepara con buffer TAE al 0,5 X (Tris-Acetato-EDTA) y se le añade 0,5 μL de SYBR-safe por cada 10 mL de solución. La cantidad de agarosa que se agrega depende de la concentración (expresada en porcentaje peso/volumen) que se desee. Una vez gelidificada la agarosa se coloca en la cámara de electroforesis, se añade buffer de corrida TAE al 0,5 X hasta que cubra el gel y se cargan 6 μL de la muestra de ADN, mezclado con buffer de carga (Azul de bromofenol y Xilen cianol), en los bolsillos del gel. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando una cámara horizontal (LabNet XL ULTRA V2) a un voltaje constante de 100 mV durante 15 min. Finalmente se visualiza el gel en un transiluminador de luz UV y se fotografía para el registro digital de los resultados.

4. Amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la obtención de grandes cantidades de las regiones de ADN de interés, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como herramienta de amplificación directa de los fragmentos de ADN a estudiar. En esta técnica se aplican tres conceptos básicos del proceso de replicación natural del ADN. En primer lugar se aplica la desnaturalización del mismo, para la obtención de cadenas sencillas, que permitirá la hibridación de un oligonucleótido particular, específico para la región adyacente a la de interés, denominado “Cebador”. A continuación, actúa la ADN polimerasa en el proceso de elongación de la hebra molde a partir del extremo 3'-OH libre del oligonucleótido (Luque y Herráez, 2001).

Así mismo, PCR-Múltiple es el término empleado cuando se usan más de un par de

cebadores en una única PCR, con lo cual se pretende amplificar varios segmentos del ADN molde simultáneamente y con esto se ahorra en tiempo y en reactivos. En este caso debe procurarse que los productos amplificados no sean del mismo tamaño para poder separarlos mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Particularmente, esta variación de la técnica se empleó en la determinación de mutaciones por tamaño (FMFA). Por el contrario, para la detección de mutaciones mediante SSCP se realizaron ampliificaciones convencionales.

4.1. Condiciones de la PCR

- **PCRs Múltiples**

Para el análisis de mutaciones de origen Judío-Ashkenazi (c.185_186delAG, c.5382insC y c.6174delT) se realizaron dos PCRs, una múltiple para la amplificación de los fragmentos posiblemente contentivos de las mutaciones c.185_186delAG y c.5382insC del gen *BRCA1* y una PCR convencional para la amplificación de la región posiblemente contentiva de la mutación c.6174delT del gen *BRCA2*. Las reacciones se llevaron a cabo en 25 μ L de volumen final, con la acción de la enzima Taq Polimerasa (2,5 U/ μ L), en Buffer de PCR 1X (200 mM de Tris-HCl pH 8,4, 500 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de di-Nucleótidos-Tri-Fosfato (dNTPs), 50 ng de cada cebador (Sentido y Antisentido) 185delAG, 100 ng de cada cebador 5382insC y 1 μ M de cada cebador 6174delT. La reacción para los fragmentos 185delAG y 5382insC (Tabla II), se llevó a cabo mediante una PCR *Touch Down*, que permite aumentar la especificidad de la reacción y la del fragmento 6174delR mediante los ciclos convencionales de amplificación (ver sección 4.2, más adelante). La eficacia de estas ampliificaciones se determinó a través de corridas electroforéticas en geles

de poliacrilamida al 12 %, debido a las diferencias en los tamaños de los fragmentos esperados, a aplicando la técnica de tinción con plata para su observación.

Tabla II. Secuencia de los cebadores (sentido (F) y antisentido (R)) a utilizar, tamaño de los amplicones esperados, para cada una de las mutaciones a evaluar en cada uno de los genes correspondientes. En colores se indican la separación de los grupos para las PCR múltiples. (*) La nomenclatura indicada en la tabla corresponde a la reportada por la base de datos del BIC.

Gen	Exón	Mutación (*)	Secuencia del Cebador	Ta del Cebador	Tamaño del amplicón	Población
BRCA1	2	185delAG	F: TCTTCGCGTTGAAGAAGTACA R: TAATACACTCTTGTGCTGACT	60 °C	90pb	Judía-Ashkenazi
	11-1	943ins10	F: CCAAGGTGTATGAAGTATGT R: GGTAGATCTGAATGCTGATC	57 °C	442pb	Africana
		1135insA				Española
	11-4	1623del5	F: GTTCCTCCAAATCAGTAGAGAG R: CTGCTTTCAAACGAAAGCTG	56 °C	415pb	Española
			F: CCTAACCAATAGAATCACTCG R: GAAGTTAACAAATGCACCTGGTTC			
	11-5	2080delA	F: CTGGAAGTTAGCACTCTAGG R: GCAGAAGAGGAATGTGCAAC	56 °C	296pb	Latina
			F: AACAGAGGGCCAAAATTGAA R: GAGTCCTAGCCCTTTCACCC			
	11-10	3450del4	F: AAAGCGTCCAGAAAGGAGAGC R: CCAGGTAATATTGGCAAAGGC	56 °C	301pb	Italiana
			F: AATCTTAACAGAGACCAGAAC R: ACAACATTCTGGAAAGAGTT			
	16	5083del19	F: GGAAGAAACCACCAAGGTCC R: TGTCAACTTGAGGGAGGGAG	60 °C	77pb	Judía-Ashkenazi
			20			
BRCA2	11-3	3036del4	F: AAGATGTATGTGCTTTAAATG R: GTTTATGTTCTTGCAGAGGAG	52 °C	407pb	Española
			F: GCTCTCTGAACATAACATTAAG R: CTGATCTTCATGCATAATG			
	11-5	3492insT	F: CTGCAAATACTTGTGGGAT R: TAATGAAGCATCTGATACCT	60 °C	68pb	Judía-Ashkenazi
			F: ATGTTGAAGGTGGTTCTTCAG R: AGTGTCACCTTGTTGAGAACAT			
	11-15	6696delTC	F: AAATGATAATCACTTCTTCC R: GTGCTTGTTAGTTTATGGA	50 °C	270	Española
			23			

Grupo 1 **Grupo 2** **Grupo 3** **Grupo 4** **Grupo 5** **Grupo 6**

Las mutaciones de origen español, italiano, africano y latino se amplificaron según los grupos indicados en la tabla II, en 25 μL de volumen final, con la acción de la enzima Taq Polimerasa (0,075 U/ μL), en Buffer de PCR 1X (20 mM de Tris-HCl pH 8,4 y 50 mM de KCl); 3,0 mM / 3,0 mM / 2,5 mM / 2,5 mM de MgCl_2 para cada grupo (2, 3, 4 y 5 respectivamente), 0,6 μM / 0,4 μM de di-Nucleótidos-Tri-Fosfato (dNTPs), 0,75 μM cada uno de los cebadores Sentido y Antisentido en cada reacción y 1 μL de 1 ADN_g aislado. Se comprobó la eficacia de las amplificaciones por PCR a través de geles de agarosa al 2,5 % (sección 3). Las mutaciones originarias de las poblaciones española, italiana, africana y latinoamericana, difieren de 50 a más nucleótidos, por lo que la utilización de un gel de agarosa al 3 % es suficiente para la evaluación de la correcta amplificación

- **PCRs Convencionales**

Las amplificaciones por PCR se realizan en este caso de manera individual para cada fragmento. En 20 μL de volumen final, con la acción de 0,025 U/ μL de la enzima Taq Polimerasa, en Buffer de PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4 y 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 μM de di-Nucleótidos-Tri-Fosfato (dNTPs), 1 μM cada uno de los cebadores sentido y antisentido, añadiendo, finalmente, 1 μL del ADN_g aislado. Bajo estas condiciones se llevaron a cabo las amplificaciones de los fragmentos a ser posteriormente evaluados mediante SSCP, al igual que para la detección de la mutación c.5083del19 del exón 16 del gen *BRCA1*. La detección de esta última mutación se realizó, mediante una electroforesis simple en geles de poliacrilamida, técnica con la que es posible detectar diferencias de tamaño de 19 pares de bases.

4.2. Ciclos de Amplificación

- **PCRs Convencionales**

En el Termociclador de Applied Biosystems (2720) se llevaron a cabo las amplificaciones de las regiones de interés, comenzando con un calentamiento a 94 °C por 600 s. La desnaturalización se da durante 40 s. a 94 °C, la hibridación; por 90 s. A las *Ta* establecidas en la tabla II, y la elongación a 72 °C durante 40 s., estos tres ciclos se repiten consecutivamente 36 veces. El paso final de elongación se extiende durante 300 s. y se mantiene posteriormente a 4 °C.

- **PCRs *Touch Down***

Las reacciones de PCR “Touch Down” se llevaron a cabo en un Termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient), iniciando con un calentamiento a 94 °C por 600 s. La desnaturalización tiene lugar a 94 °C durante 40 s., la hibridación a 5 °C por encima de la *Ta* de cada cebador indicada en la Tabla II, por 90 s., la elongación a 72 °C durante 40 s. luego, para el tercer ciclo; estos tres pasos se repiten 9 veces, descendiendo en cada uno la temperatura de hibridación en 1 °C. A continuación, se aplica una secuencia de 12 repeticiones, a las mismas temperaturas de desnaturalización y elongación ya establecidas, colocando la temperatura de hibridación según la tabla II, igualmente por 90 s. finalmente se extiende el paso último de elongación durante 50 s. y se mantiene a 4 °C.

5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La composición del gel para las electroforesis de comprobación de la PCR se basa en el tamaño de los fragmentos esperados en cada reacción. Por tal motivo la evaluación de la correcta amplificación de las PCR del grupo 1 se realizó en un gel al 12 % de poliacrilamida, mientras que la detección de la mutación del grupo 6 se realizó en un gel al 10 % de concentración final de poliacrilamida.

Se preparan 7 mL de un gel de poliacrilamida (Acrilamida:Bisacrilamida), TAE 1X (2 M de Tris Base, 5,6 % de Ácido acético glacial, 0,05 M de EDTA pH=8), 0,04 % de APS y 0,1 % de TEMED (agregar justo antes de servir el gel en los vidrios). Una vez preparada la mezcla se sirve entre los vidrios previamente ensamblados, insertando el peine inmediatamente. Debe dejarse un volumen pequeño de solución en el frasco donde se prepare la mezcla para comprobar la polimerización y saber cuando el gel ha polimerizado completamente. Una vez que el gel ha polimerizado, se remueve el peine y se lavan los pozos aplicando agua a presión con una inyectora. Se colocan los vidrios con el gel dentro de la cámara de electroforesis vertical (C.B.S Scientific Co. MGV-102) y se agrega suficiente cantidad de buffer de corrida TAE 1X. Se debe pre-correr el gel durante 15min aproximadamente a 200 V y 30 mA, para eliminar los radicales libres producto de la polimerización, que puedan afectar negativamente la corrida. Posteriormente se cargan 5 μ L de cada uno de los productos de la PCR a analizar previamente mezclados con el buffer de carga (5 % de Glicerol, 0,04 % de Azul de bromofenol y 0,04 % de Xilen cianol). Finalmente, la corrida electroforética se lleva a cabo a 200 V, 30 mA, durante 45 min.

6. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, para el análisis por tamaño (FMPA)

Esta técnica se empleó para el análisis de los productos de PCRs múltiples obtenidos tanto para los fragmentos contentivos de las mutaciones de origen Judío-Ashkenazi, como para las de origen europeo y latinoamericano en general, con lo cual se pretendió la detección de mutaciones del tipo delección/inserción. Para este análisis se aplicó la metodología propuesta por Kuperstein y colaboradores en el 2000, y estandarizada según las condiciones propuestas por Sambrook, y colaboradores (1989) y modificada de acuerdo a las disponibilidades del laboratorio. Para ello se elaboraron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 8% (TBE 1X, 7 M de Urea, 0,05 % de APS y 0,12 % de TEMED) en condiciones desnaturalizantes, con buffer de carga a base de formamida. Se mezclan la Urea, el TBE, la Acrilamida:Bisacrilamida (96,4 : 3,6) y el H₂O desionizada, en baño de María a 37 °C con agitación constante, para ayudar a disolver la urea. Una vez disuelta completamente la urea se deja enfriar por 15 minutos y finalmente se enrasa hasta 50 mL con H₂O desionizada. Se añaden el APS y el TEMED, justo antes de servir el gel entre los vidrios. Es importante dejar un volumen pequeño de solución en el frasco donde se prepare la mezcla para comprobar la polimerización.

Los vidrios llevan un tratamiento especial para facilitar el proceso de revelado. El vidrio que presenta la mella se trata con solución repelente, y el vidrio sin la mella se trata con solución adherente (0,3 % de Bind Silane, 95 % de Etanol y 0,5 % de Ácido acético), eliminando el exceso con Etanol al 95 %, para facilitar la separación posterior del gel. Una vez preparados los vidrios, éstos se ensamblan según las indicaciones de la cámara (Cámara de Secuenciación de ADN C.B.S. Scientific Co. SG-400-20), se sirve el gel entre los

vidrios y se inserta el peine inmediatamente, se deja polimerizar por 1 hora. Una vez que el gel haya polimerizado, se remueve el peine y se lavan los pozos aplicando agua a presión con una inyectora. Se procede a colocar el gel dentro de la cámara, agregando suficiente cantidad de buffer de corrida TBE 1X (0,089 M de Tris base pH=8, 0,089 M de Ácido Bórico y 0,002 M de EDTA). Se debe pre-correr el gel durante media hora mínimo a 2700 V, 100 mA y 80 w (donde lo importante es que la potencia se mantenga constante) y finalmente se cargan las muestras a analizar previamente diluidas y mezcladas en proporción 1:1 con el buffer de carga a base de formamida (Formamida al 98%, 10 mM de EDTA y 0,05% de Azul de Bromofenol). La corrida electroforética se lleva a cabo a 10 °C, 2700 V, 100 mA, 80 w por aproximadamente 1 hora 30 minutos, igualmente procurando mantener la potencia constante. El mismo se revelará mediante la técnica de tinción con plata, a diferencia de la propuesta de los autores a través de la fluorescencia emitida por el Cy-5, ya que el mismo no se encuentra disponible en el laboratorio. El procedimiento para la tinción con plata será el mismo que el explicado anteriormente para el revelado de geles de poliacrilamida.

7. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones renaturalizantes, para el análisis por conformación (SSCP)

El análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla en productos de PCR, consiste en la amplificación de la región de interés del ADN_g, mediante PCR convencional, cuyo producto será desnaturalizado y visualizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, detectando las mutaciones como alteraciones en la movilidad de las hebras sencillas. En condiciones no desnaturalizantes, el ADN simple cadena adopta una estructura que está determinada por las interacciones intramoleculares y así por su

secuencia. Las mutaciones detectadas pueden ser caracterizadas finalmente a través de la amplificación (PCR) de la muestra para determinación de la secuencia.

La corrida electroforética para la SSCP (BioRad DCode™ Universal Mutation Detection System) se lleva a cabo de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El ensamblaje de los vidrios para la preparación del gel, de 20 x 20 cm y 0,75 mm, se realiza a cabo sobre una superficie limpia, colocando el vidrio rectangular grande primero, luego los espaciadores derecho e izquierdo de igual grosor a lo largo de los bordes laterales del vidrio. Se coloca el vidrio pequeño sobre los espaciadores de manera que quede al ras con el borde inferior del vidrio grande y se ajusta el sándwich de vidrios con dos grapas especiales y una base de alineamiento provistas por la cámara de SSCP.

Se preparan 30 mL de solución de poliacrilamida (Acilamida:Bisacrilamida 29:1 al 8 %; TBE 0,5 X; 0,1 % de Persulfato de amonio y 0,14 % de TEMED), se vierte la misma entre los vidrios y se inserta el peine, por último se deja polimerizar por aproximadamente 60 min. Finalizado este tiempo se retiran los vidrios de la base de alineamiento, se remueven los peines y se lavan los pozos con agua desionizada a presión con una inyectora. Se colocan los geles en la base de corrida, con los vidrios pequeños hacia adentro y se introducen en la cámara de corrida electroforética. Se llenan las cavidades superior e inferior con aproximadamente 7 L de buffer de corrida TBE 0,5 X.

La cámara de SSCP consta también de un enfriador (el cual debe ser llenado con una solución Etilen Glicol al 50 %), un modulo de control y estructuras de cerámica en el interior del tanque para el enfriamiento del buffer de corrida, permitiendo así mantener la temperatura de la corrida constante y uniforme. En el enfriador se coloca una temperatura

aproximada de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en el módulo de control se estable una temperatura de $18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Antes de cargar las muestras se lleva a cabo una pre-corrída por 15 min. (1 gel) o 30 min. (2 geles) bajo las siguientes condiciones: 30 W constante, 56 mA, 200 V.

Los productos de PCR se mezclan 1:1 con buffer de carga para SSCP (Formamida desionizada al 95 %; 0,05 % de Azul de Bromofenol; Xilen Cianol al 0,05 % y 10 mM de NaOH) y se desnaturaliza la mezcla a $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min., finalizado este tiempo deben colocarse inmediatamente en hielo por 10 min. Se cargan las muestras y se da inicio a la corrida electroforética bajo las siguientes condiciones: 30 W constante, 56 mA, 200 V, durante aproximadamente 15 horas. Una vez terminada la corrida electroforética se sacan los geles de la cámara y se procede a su revelado mediante la tinción con plata explicada anteriormente.

8. Revelado de los geles de poliacrilamida

Una vez finalizada la corrida electroforética, se procede a teñir el gel con plata para la visualización de las bandas de ADN de interés, procedimiento que se lleva a cabo en tres pasos, primero la fijación con una solución de ácido acético glacial al 0,1 % por 15 min. El segundo paso es la impregnación con una solución de nitrato de plata al 0,15 %, igualmente durante 15 min y por último la impregnación con una solución de formaldehído al 14,8 % e hidróxido de sodio al 1,5 %, hasta que se observan las bandas en color marrón a la intensidad deseada. Entre los pasos uno y dos, dos y tres se realizan dos lavados cortos con agua desionizada antes de agregar la siguiente solución, y al final se detiene el revelado con agua corriente.

9. Secuenciación

Aquellas muestras en las que fue posible observar variaciones en la movilidad electroforética en los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y en la SSCP, la presencia de las mutaciones fue corroborada a través de la secuenciación completa del fragmento que presentó el cambio, para lo cual, se preparó la muestra de forma adecuada para ser secuenciada por el U.E.G.F. (Unidad de Estudios Genéticos y Forenses) del IVIC (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas). Para ello se requirió de la amplificación mediante PCR el(los) fragmento(s) que se desea(n) secuenciar en un volumen final de reacción de 35 μ L, verificando la amplificación en electroforesis en agarosa, para poder así purificar el producto empleando el kit ChargeSwitch PCR Clean-Up de Invitrogen, el cual se basa en la utilización de perlas magnéticas. Verificando finalmente la purificación del producto en un gel de agarosa. Los resultados de las secuencias y electroferogramas se analizaron con MacVector 11.1, contrastándolas con la secuencia patrón tomada del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para cada uno de los genes: *BRCA1* (MIM113705) y *BRCA2* (MIM600185), mediante alineamientos múltiples.

Tabla III-. Lista y características del grupo de pacientes con CM seleccionados en este estudio.

Código Muestra	Criterios que presenta
Pacientes:	
CM001	Establecimiento temprano/ 1 caso de CO familiar
CM003	Establecimiento temprano/ 1 pariente de 2º grado con CM
CM007	1 pariente de 1º grado y 2 de 2º grado con CM
CM008	Establecimiento temprano / 1 pariente de 2º grado con CM
CM012	Establecimiento temprano / 1parientes de 1º grado y 1 de 2º grado con CM
CM014	1 pariente de 2º grado con CM
CM017	2 parientes de 2º grado y 1 de 3º grado con CM
CM018	1 pariente de 1º y 2 de 2º grado con CM
CM019	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado con CM
CM020	1 pariente de 1º grado y 1 pariente de 2º grado con CM
CM021	2 parientes de 1º grado con CM
CM022	1 pariente de 1º grado y 1 pariente de 2º con CM
CM023	Establecimiento temprano / 1parientes de 1º grado y 1 de 2º grado con CM
CM025	Establecimiento temprano / 1 pariente de 2º grado con CM
CM028	CM en parientes masculinos / 1 pariente de 2º grado con CM
CM032	1 parientes de 1º grado y 1 pariente de 2º grado con CM / Cáncer de cuello Uterino (personal)
CM033	Establecimiento temprano / 1 pariente de 3º grado con CM
CM034	1 pariente de 1º grado con CM
CM035	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado con CM
CM038	1 pariente de 1º, de 2º y de 3º grado con CM / Cáncer de colon (personal)
CM039	Establecimiento temprano / 1 pariente de 2º grado
CM040	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado y 1 de 3º grado con CM
CM043	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado y 2 de 3º grado con CM
CM044	1 pariente de 1º grado y 1 pariente de 2º grado con CM
CM045	1 pariente de 1º, de 2º y de 3º grado con CM
CM047	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado con CM
CM050	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado con CM
CM053	Bilateralidad / 1 pariente de 1º grado y 1 de 2º grado con CM
CM054	Paciente masculino / Cáncer de próstata (personal)
CM057	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado con CM
CM058	Establecimiento temprano / 1 caso de CO familiar / 1 pariente de 3º grado con CM
CM061	1 pariente de 1º grado y 2 de 2º grado con CM
CM062	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado y 2 de 3 grado con CM
CM063	1 pariente de 1º grado y 1 pariente de 2º grado con CM
CM065	Establecimiento temprano / 1 pariente de 3º grado con CM
CM066	Establecimiento temprano
CM067	Establecimiento temprano
CM068	3 parientes de 2º grado y 1 de 3º grado con CM / 1 caso de CO familiar
CM069	Bilateralidad / 1 pariente de 1º grado
CM070	Bilateralidad
CM072	Establecimiento temprano
CM073	Establecimiento temprano / Cáncer de cuello Uterino (personal)
CM075	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado con CM / Cáncer de colon familiar
CM076	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado con CM
CM079	Bilateralidad
CM081	Establecimiento temprano / Bilateralidad / CM en parientes masculinos / Cáncer de colon familiar
Controles:	
CM046	Establecimiento temprano / CM en parientes masculinos
CM055	Establecimiento temprano / 1 pariente de 1º grado y 1 de 3º grado con CM

V. RESULTADOS

1. Obtención de muestras y selección de pacientes

Para la realización del presente trabajo se planteó la detección de mutaciones más comunes en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, asociadas a un riesgo incrementado para el desarrollo del CM del tipo hereditario, en mujeres venezolanas diagnosticadas con esta patología. Para ello, dado que se ha establecido que las mutaciones en estos genes están asociadas a orígenes étnicos particulares, y partiendo de la presunción que se encontrarán con mayor frecuencia aquellas mutaciones fundadoras de los grupos étnicos mayormente influyentes en la población venezolana, tales como el español, el italiano, el africano y el amerindio (Rodríguez-Larralde y colaboradores, 2001), se requirió de una investigación bibliográfica previa que permitió identificar cuáles eran dichas mutaciones (Tabla I) y seleccionar de ellas las más importantes debidas a deleciones o inserciones (según al diseño experimental inicial); a ser evaluadas en la población de estudio, las cuales se presentaron en la Tabla II. Una vez seleccionadas las mutaciones a evaluar se seleccionaron los cebadores más adecuados, disponibles en el laboratorio, para la amplificación de las regiones contentivas de las mutaciones de interés en cada uno de los genes (Tabla II).

A continuación, se seleccionaron 46 pacientes denominados de “alto riesgo” (AR) en base a la presencia de al menos uno de los criterios de inclusión, descritos en la metodología. Se seleccionaron además 2 pacientes portadoras de mutaciones conocidas, que se utilizaron como controles positivos en la detección de mutaciones según el tamaño de los fragmentos amplificados por PCR, dado que presentan mutaciones de deleción/inserción y permitirán determinar la efectiva separación de fragmentos que difieren en unas pocas pares de bases en la FMPA. El primer control utilizado fue la muestra de la paciente CM046, debido a que

presenta la mutación c.3036_3039del4 (ACAA) en el exón 11 del gen *BRCA2*. El segundo control empleado fue la muestra de la paciente CM055, portadora de la mutación c.1128_1136insA en el exón 11 del gen *BRCA1*. Así mismo, estos controles fueron empleados para evaluar la presencia de mutaciones en el resto de los exones de interés en este trabajo.

La selección de las muestras a analizar en este estudio se hizo a partir de un grupo de 82 muestras de pacientes diagnosticadas con CM por CECLINES que habían sido enviadas al laboratorio de Genética Molecular Humana B de la USB. Como se muestra en la Tabla III, la característica predominante en estas pacientes fue el establecimiento temprano (edad promedio = 46 años) y la presencia de CM en parientes de primer grado, así como la presencia de CM en tres generaciones. Entre los criterios menos observados se encuentran la bilateralidad y la presencia de CM en individuos del sexo masculino.

2. Aislamiento del ADN genómico

Una vez establecida la población de estudio, se procedió al aislamiento del ADNg de los 46 pacientes y los 2 controles (Tabla III) diagnosticados con CM y clasificadas como de *alto riesgo* (AR) o del *tipo hereditario*, a partir de las muestras de sangre periférica. Una vez realizado el aislamiento del ADNg, éste fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 %; en los cuales se verificó el rendimiento de la extracción y se observó la integridad del mismo. En la Figura 11 se puede apreciar el resultado de la corrida electroforética del ADNg aislado de las muestras de sangre de algunos de los pacientes analizados. En cada carril se observa una banda intensa, que corresponde al ADNg, e indica que hubo un buen rendimiento. Las características visuales de estas bandas indican que en su

mayoría, el ADNg aislado esta íntegro. Esto fue observado en todas las muestras analizadas.

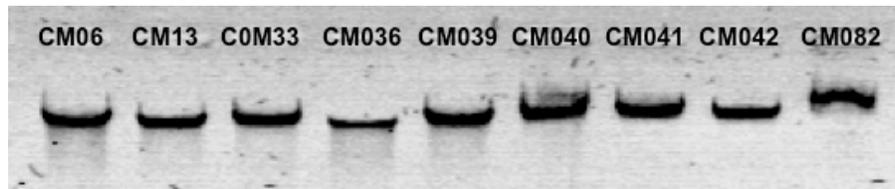


Figura 11-. Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% del ADNg aislado a partir de algunas de las pacientes seleccionadas, con cáncer de mama del tipo hereditario.

3. Detección de mutaciones en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

- **Detección de mutaciones comunes de origen Judío-Ashkenazi**

Una vez realizada la extracción del ADNg, se procedió en primer lugar a la estandarización de las reacciones de amplificación (PCR) que permitieran la detección de mutaciones de tipo delección o inserción en los genes *BRCA1/2*, a través de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, aplicando la técnica propuesta por Kuperstein y colaboradores (2000).

Para la evaluación de la presencia de las mutaciones más comunes para la población general, que a su vez son originarias de la población Judía-Ashkenazi: c.185_186delAG y c.5382insC (*BRCA1*) y c.6174delT (*BRCA2*), se empleó el juego de cebadores propuestos por Kuperstein y colaboradores (2000) (Tabla II). Se probaron las condiciones de PCR propuestas por estos autores, basada en la realización de una PCR múltiple, que permite la amplificación de los tres fragmentos de interés en una sola reacción, y se observó una menor intensidad de amplificación en el fragmento de menor tamaño (c.6174delT / *BRCA2*), tal

como se puede apreciar en la Figura 12-A. Esto a su vez dificultaba la visualización de las bandas en los geles desnaturalizantes. Para optimizar los resultados se separó la reacción de PCR en dos, amplificando en la primera reacción los fragmentos correspondientes al gen *BRCA1*, y en la segunda al fragmento del gen *BRCA2*. Finalmente se mezclaron los productos para su posterior visualización mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, con lo cual, fue posible observar mejores resultados tal y como se muestra en la Figura 12-B.

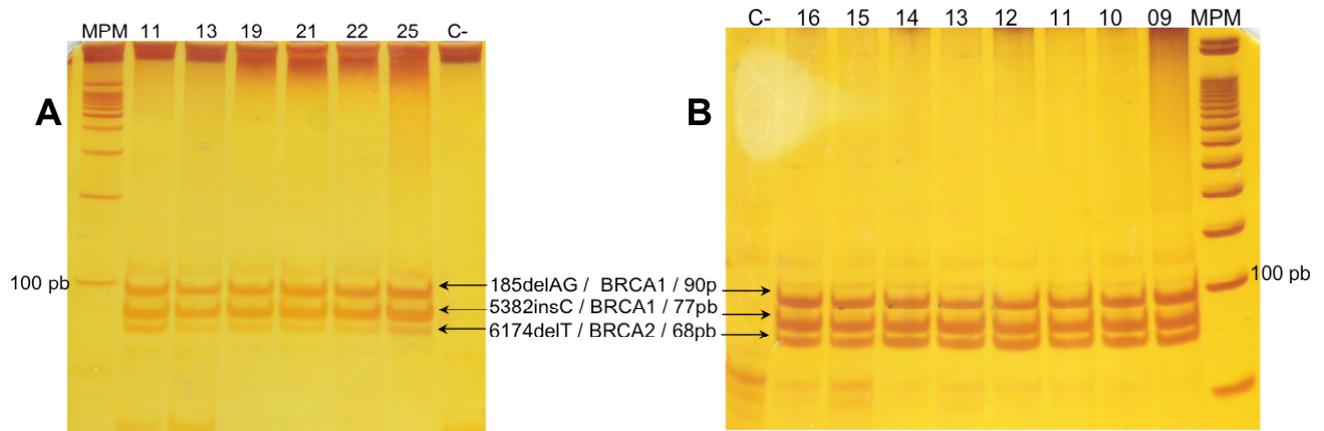


Figura 12.- Registro fotográfico del resultado de dos electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, de productos de la PCR del grupo 1: con los tres (3) fragmentos contentivos de las mutaciones de origen Judío-Ashkenazi para algunos de los pacientes evaluados. (A) PCR-Múltiple (185delA, 5382insC y 6174delT): En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb, en los carriles 2 al 7 e observan las muestras de los pacientes evaluados y en el último carril se encuentra el control negativo de la reacción de PCR. (B) Mezcla de PCR Múltiple (185delAG y 5382insC) y PCR convencional (6174delT): En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb, en los carriles 2 al 8 se observan las muestras de los pacientes evaluados y en el último carril se encuentra el control negativo de la reacción de PCR.

Posteriormente y, luego de estandarizadas las PCRs, se procedió al análisis para determinar la presencia de las mutaciones antes mencionadas, a través de una modificación de la técnica propuesta por Kuperstein y colaboradores (2000), tomando en cuenta la propiedad de los geles empleados en la técnica de secuenciación, que permiten la detección

de cambios de tamaño del ADN debidos a mutaciones de tipo delección y/o inserción de hasta 1 pb. Durante este proceso se realizaron varias pruebas, hasta llegar a las condiciones adecuadas, indicadas en la sección 6 de la metodología, que permitieron detectar estas diferencias. Entre los parámetros de corrida variados se tiene la proporción Acrilamida:Bisacrilamida, la concentración final de poliacrilamida en el gel, la intensidad de corriente y la cantidad de muestra cargada.

En la Figura 13 se pueden observar los resultados obtenidos en algunas de las muestras analizadas. En la misma se aprecian tres grupos de bandas. El primer grupo (superior), compuesto por dos bandas, corresponde a la región donde se ha localizado la mutación c.185_186delAG en el exón 2 de *BRCA1*, de 90 pb. El segundo grupo de bandas corresponde a la región donde fue identificada la mutación c.5382insC en el exón 20 de *BRCA1* y el tercer y último grupo, la región donde se ha detectado la mutación c.6171delT en el exón 11 de *BRCA2*. En cada uno de estos casos es posible observar dos bandas, y esto se debe a la adición no templada y al azar de una adenina al final de la replicación en el extremo 3'OH por parte de la Taq ADN polimerasa, con lo cual se origina entonces una banda de 90 pb en aquella copia donde no se agregó la adenina y uno de 91 pb en aquella copia donde si se agregó. De la misma manera ocurre para los otros fragmentos estudiados, por lo que siempre se espera la presencia de cómo mínimo dos bandas por fragmento amplificado. En el caso de la banda donde se ha localizado la mutación c.5382insC, se observan 3 bandas, donde una de ellas, probablemente se deba a la amplificación de una secuencia inespecífica. Luego de realizar los análisis, en las 48 pacientes venezolanas (47 mujeres y 1 hombre), diagnosticados con CM y enmarcados dentro del grupo de AR o del tipo hereditario; no se detectó la presencia de las mutaciones más comunes debidas a

deleción y/o inserción, de origen Judío-Ashkenazi.

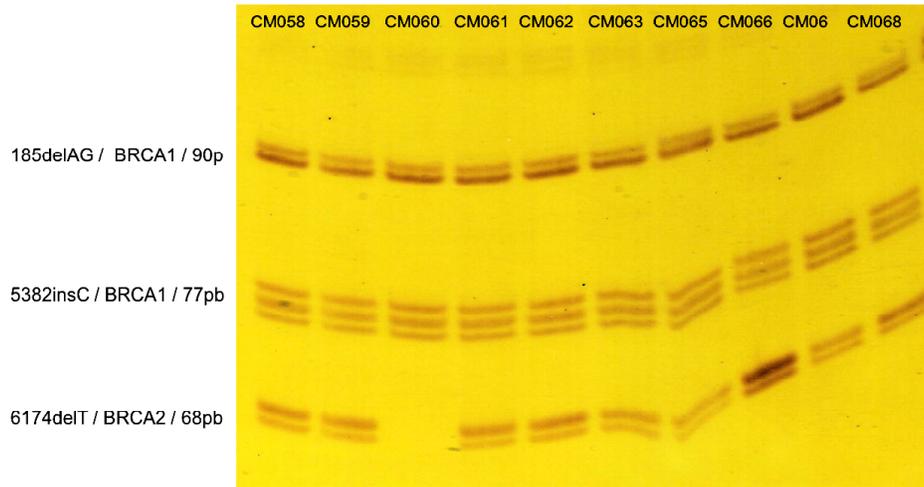


Figura 13-. Registro fotográfico del resultado de una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, de los fragmentos de ADN, donde se han localizado las mutaciones comunes fundadoras para la población Judía-Ashkenazi, de algunos de los pacientes en estudio.

- **Detección de mutaciones de origen europeo, italiano, africano y latino-americano**

Además de investigar la presencia de las mutaciones comunes de origen Judío-Ashkenazi, en este trabajo, se propuso estudiar la presencia de mutaciones comunes originarias de poblaciones como la española, italiana y latinoamericanas en general. Se procedió entonces con la metodología utilizada anteriormente, partiendo de la amplificación de las regiones de interés para posterior análisis por tamaño mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Para ello, se establecieron una serie de grupos para la elaboración de las PCRs múltiples para los análisis posteriores. Estos grupos se basaron en las temperaturas de alineamiento de los cebadores a utilizar y en los tamaños de los fragmentos esperados. Estas PCRs se estandarizaron de acuerdo a lo propuesto en la sección 4 de la metodología y se modificaron durante el proceso según fuera

necesario. En la Figura 14 se muestra el resultado, de las PCR de cuatro de los grupos múltiples durante el proceso de estandarización. En cada carril se corrió el producto de amplificación de la muestra de ADN_g de algunas de las pacientes en estudio. En cada caso, se probaron diversas concentraciones de magnesio y diversas temperaturas de hibridación, hasta obtener bandas de igual intensidad en cada reacción múltiple, tal como se muestra en la figura. En el grupo 2 se logró la amplificación del exón 11-1 del gen *BRCA1* y los exones 11-15 y 23 de *BRCA2*, observando bandas de igual intensidad, a 3 mM de Mg⁺² y 53 °C de temperatura de hibridación. Para el grupo 3 se aplicó una PCR *touch down* con 3 mM⁺² de Mg y se logró la amplificación simultánea de los exones 11-5, 11-10 y 11-7 del gen *BRCA1* obteniendo igual cantidad de producto de cada fragmento en cada reacción. Por su parte, para el grupo 4 se muestra un resultado del proceso de estandarización (Figura 14-C), donde se probaron dos concentraciones distintas de Mg⁺², 2 y 2,5 mM y se pueden apreciar bandas de intensidad desigual, por lo que posteriormente se planteó la amplificación mediante una PCR *touch down* al igual que en el caso anterior, tal como se mencionó en la metodología. Finalmente, el grupo 5, cuyo resultado se muestra en la Figura 13-D se observan las bandas producto de la amplificación de los fragmentos 11-5 y 11-3 del gen *BRCA2* con adecuada intensidad de bandas a una concentración de 2,5 mM de Mg⁺² y 52 °C de temperatura de hibridación.

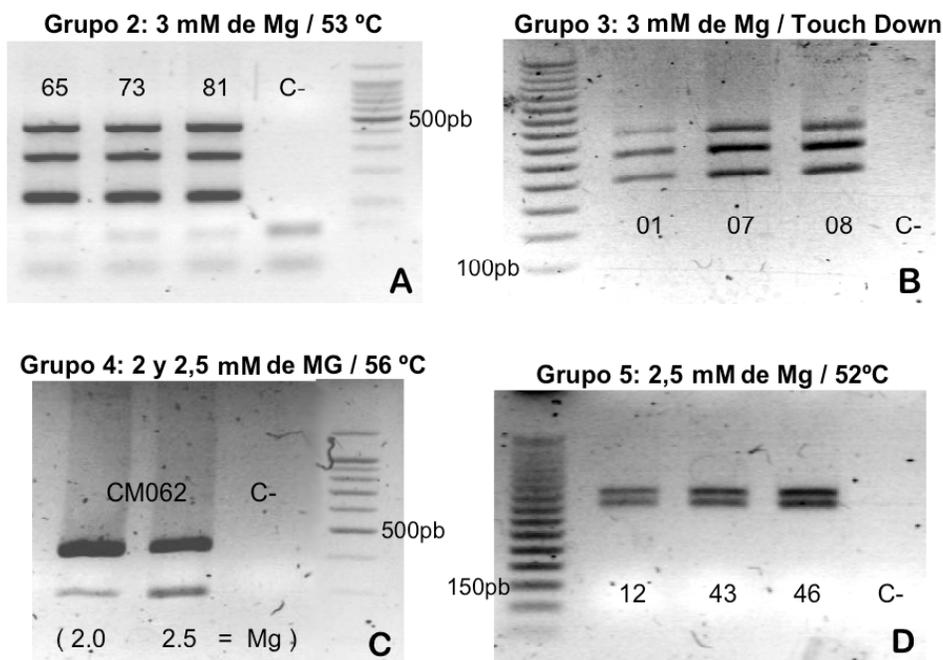


Figura 14.- Registro fotográfico de algunas electroforesis en geles de agarosa al 2,5 %, donde se evaluó el resultado de cuatro PCRs múltiples durante el proceso de estandarización, a diversas condiciones. Se muestra el marcador de peso molecular en el primero o el último carril de cada según se indica. En los carriles siguientes se muestran los productos de PCR de las muestras de algunas pacientes y el respectivo control negativo de cada reacción. En la imagen se indica a que grupo de PCR corresponde cada gel y las condiciones de concentración de magnesio y temperatura de alineamiento evaluadas.

Una vez realizadas las PCRs múltiples, se procedió a la estandarización de la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes para la detección de las mutaciones de origen español, italiano, africano y latinoamericano. Esto se llevó a cabo mediante la realización de varias pruebas, principalmente con los grupos 1 y 5. Las pruebas consistieron en la variación de parámetros que pueden afectar la efectividad de separación de los fragmentos obtenidos en cada grupo producto de la amplificación por PCR en el gel de poliacrilamida. Entre los parámetros que fueron modificados se tienen, la concentración de poliacrilamida de los geles, el tiempo de corrida, la temperatura, la fuerza iónica del buffer de corrida y el proceso de desnaturalización.

Se utilizaron específicamente los grupos 1 y 5 para la estandarización de la FMPA ya que en ellos se amplificaron los fragmentos 11-1 de *BRCA1* (grupo 1) y 11-3 de *BRCA2* (grupo 5), que poseen las regiones donde fueron identificadas mutaciones en las muestras de las pacientes CM055 y CM046, respectivamente, y como se mencionó anteriormente, se utilizaron como controles. De esta manera, la presencia de tales mutaciones en esos fragmentos, permitió establecer si la resolución de los geles obtenidos era la adecuada para la detección de las mutaciones de interés.

Inicialmente se probaron tres concentraciones diferentes en el gel de poliacrilamida, 4%, 6% y 8% y los resultados se pueden apreciar en la Figura 15. Tal como se observa en la figura, los mejores resultados se obtuvieron empleando un gel al 8% de poliacrilamida. A una menor concentración, las bandas están menos definidas y los fragmentos de menor tamaño muestran un mayor desplazamiento respecto a las de mayor tamaño y se dificulta la evaluación de todas las bandas en un mismo gel, ya que las más pequeñas se salen del gel durante la corrida y las más grandes quedan a un nivel muy superior del gel en el que hay menor resolución. En la Figuras 15-C y 16-A es posible apreciar una variación en la corrida electroforética en la banda de mayor tamaño correspondiente a la muestra de la paciente CM068. Este fragmento pertenece al exón 11-1 del gen *BRCA1*, región que fue enviada a secuenciar, según el protocolo propuesto en la metodología. El resultado de la secuenciación mostró la inserción de una adenina entre los nucleótidos 30752 y 30753 del ADN_g (MIM113705), la cual se denomina c.951_952insA (U14680) según BIC (Tabla IV). Esta mutación se evidencia en el electroferograma de la Figura 15-C, donde se aprecia la presencia de dobles picos a partir del lugar donde ocurrió la inserción, debido al corrimiento del marco de lectura del alelo portador de la mutación y a la presencia de la secuencia del

alelo normal de la paciente. Esta mutación de cambio de sentido genera un codón de parada en el triplete 286 del ARN mensajero maduro y no ha sido reportada previamente en BIC. La variación en la movilidad que fue observada con la muestra CM068, no se detectó en el gel al que se le efectuaron las modificaciones mencionadas y que se muestra en la Figura 16-B.

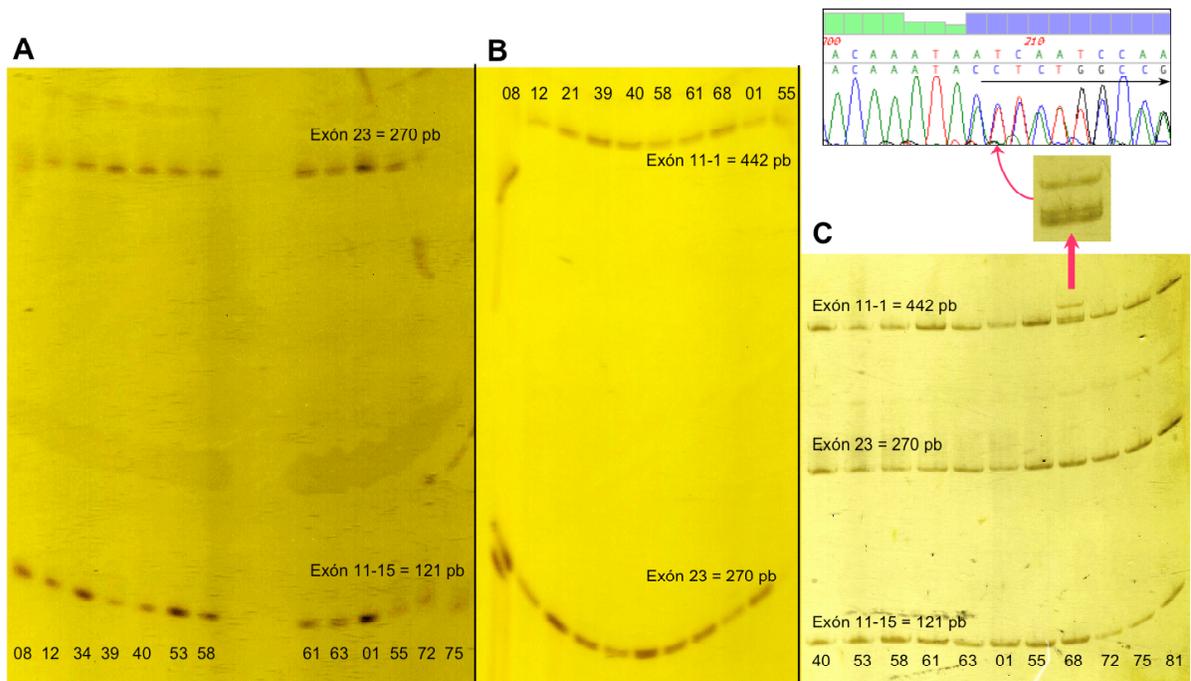


Figura 15.- Registro fotográfico del resultado de tres electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, para los fragmentos contentivos de las mutaciones seleccionadas en el grupo 2 de PCR y electroferograma de una variante. En la Figura A se observa un gel al 4%, en la B un gel al 6% y en la Figura C un gel al 8% de concentración de poliacrilamida. Las bandas de mayor tamaño (442pb), en cada uno de los geles, corresponden al fragmento del exón 11-1 del gen BRCA1, la segunda banda de 270pb, corresponde al exón 23 del gen BRCA2 y la banda más pequeña de 121pb, corresponde a la región 11-15 del exón 11 del gen BRCA2. Cada carril se identifica con el número de la paciente analizada (CM0__). En la figura C se muestra además una sección del electroferograma obtenido del exón 11-1 de la muestra CM068 en donde se encontró la mutación c.951_952insA.

Entonces, en base a los resultados anteriores, en los que no se observó separación en 1pb en la muestra control, se procedió a variar los demás parámetros. La fuerza iónica de la corrida se varió mediante la adición de una sal de fosfato de sodio (100mM) al buffer que se

encuentra en la parte inferior de la cámara. Para asegurar la correcta desnaturalización de las bandas se procedió al calentamiento previo de las muestras. Por último, la temperatura del gel durante la corrida se reguló mediante la colocación de una placa de aluminio a uno de los vidrios que sostienen el gel.

En la Figuras 16 se muestra la comparación de los resultados de un gel antes y después de aplicar las medidas antes mencionadas. De igual manera, en la corrida electroforética que se muestra en la Figura 16-B se pueden observar los productos de la amplificación de los tres fragmentos del grupo 2. También puede verse la doble banda, en los fragmentos de menor tamaño, correspondientes a la adenina agregada por la Taq ADN polimerasa al final de la replicación en el extremo 3'OH. La conservación de este extremo es beneficiosa ya que, como se mencionó anteriormente, sirve como control de la efectividad de separación para la detección de diferencias de 1pb, en las electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Sin embargo, este resultado no fue reproducible y además, no todas las bandas del mismo grupo se resolvieron de igual manera en el gel. En la corrida electroforética del gel mostrada en Figura 16-A también se puede apreciar un ligero efecto sonrisa, igual al observado en la corrida electroforética mostrada en la Figura 15, producto del incremento desigual de la temperatura. Este efecto fue eliminado, tal como se observa en la Figura 16-B, mediante la utilización de la placa de aluminio.

En las bandas correspondientes al grupo 5 de la Figura 16-B, se puede notar la presencia de un cambio en la movilidad electroforética en la banda de menor tamaño (de 407 pb) en la muestra de la paciente CM046, utilizada como control, la cual posee una mutación en el exón 11-3 del gen *BRCA2*. Se puede apreciar la presencia de 3 bandas en lugar de 2, lo cual se debe a la delección de cuatro nucleótidos, del 21684 al 21687 (ACAA) del ADNg

en el exón 11 del gen *BRCA2* (MIM600185) que fue identificada previamente en esta muestra. Este fragmento fue secuenciado y en la Figura 16 se muestra parte del electroferograma, donde se confirma la presencia de la delección, observándose los dobles picos correspondientes al corrimiento del marco.

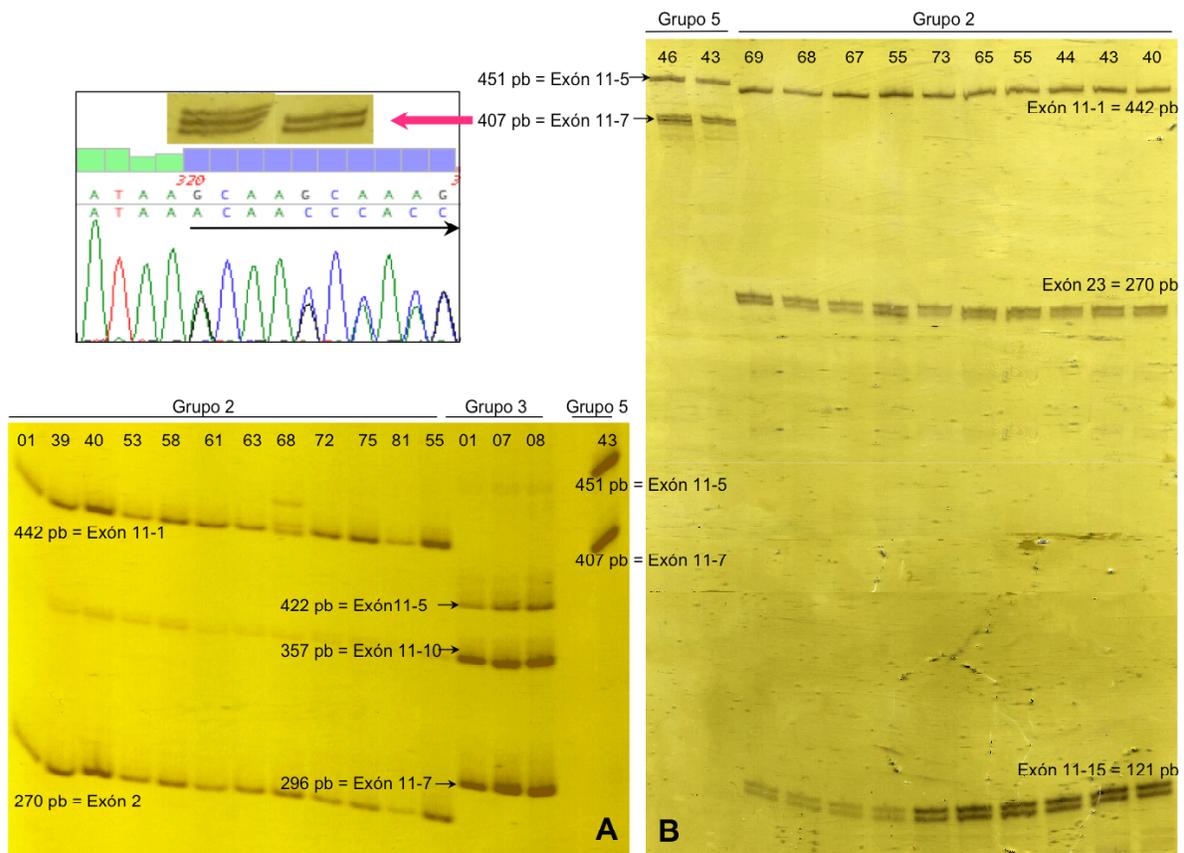


Figura 16.- Registro fotográfico de dos electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes para la detección de mutaciones de tipo delección e inserción y electroferograma de una variante. En la Figura A se muestra un gel realizado bajo las condiciones iniciales propuestas por Kuperstein y colaboradores (2000), donde se muestran los fragmentos de interés de algunas de las pacientes de alto riesgo, para los grupos de PCR múltiple 2, 3 y 5. En la Figura B se aprecia un gel realizado bajo las modificaciones propuestas por Lang y Burger (1990), donde se muestran los fragmentos contentivos de mutaciones de algunas de las pacientes de alto riesgo, para los grupos de PCR múltiples 2 y 5. Se muestra también una sección del electroferograma obtenido de la secuenciación del fragmento 11-3 del gen *BRCA2* de la muestra de la paciente CM046.

En resumen, para la evaluación de las mutaciones comunes originarias de poblaciones como la española, italiana, africana y latinoamericanas en general, mediante el uso de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, se logró obtener corridas electroforéticas donde se pudo resolver fragmentos que diferían en cuatro (4) pares de bases para fragmentos grandes e incluso de un (1) par de bases para fragmentos pequeños. Sin embargo, los resultados no fueron reproducibles, dado que la gran diferencia entre los tamaños de los fragmentos de un mismo grupo impedía observar todas las bandas del grupo en la misma corrida. Como los objetivos planteados inicialmente incluyen la detección de mutaciones del tipo deleción o inserción de menos de 4 pb en las regiones seleccionadas, mediante una técnica sencilla que permita la evaluación de múltiples fragmentos en una sola tanda de corrida, para la detección confiable de mutaciones, y dado que esto no fue posible, se procedió entonces al uso de la técnica de SSCP, con la finalidad de alcanzar los objetivos planteados respecto a la búsqueda de mutaciones fundadoras de las poblaciones influyentes en Venezuela. La SSCP es capaz de detectar mutaciones puntuales en general, por lo tanto no es específica para mutaciones del tipo deleción o inserción, como la técnica empleada anteriormente, sin embargo tiene un mayor rango de detección de mutaciones. La utilización de esta técnica permitió, además, realizar una comparación entre las dos técnicas empleadas en este trabajo.

4. Detección de mutaciones mediante el Análisis de Polimorfismos de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP)

Para la realización de la SSCP, se procedió a la amplificación cada uno de los exones de interés en los genes *BRCA1/2*, por separado, con los mismos cebadores seleccionados anteriormente. Igualmente, estos productos se analizaron en primer lugar en geles de agarosa

al 1,5% para evaluar la efectiva amplificación de las bandas y posteriormente se procedió al análisis de los fragmentos por SSCP. En la Figura 17 se muestran algunos de los resultados de las PCRs realizadas en esta etapa de la investigación. Se aprecian bandas que indican la obtención de fragmentos de los tamaños esperados, en buena concentración y no contaminadas. Este resultado se repitió en todas las muestras analizadas.

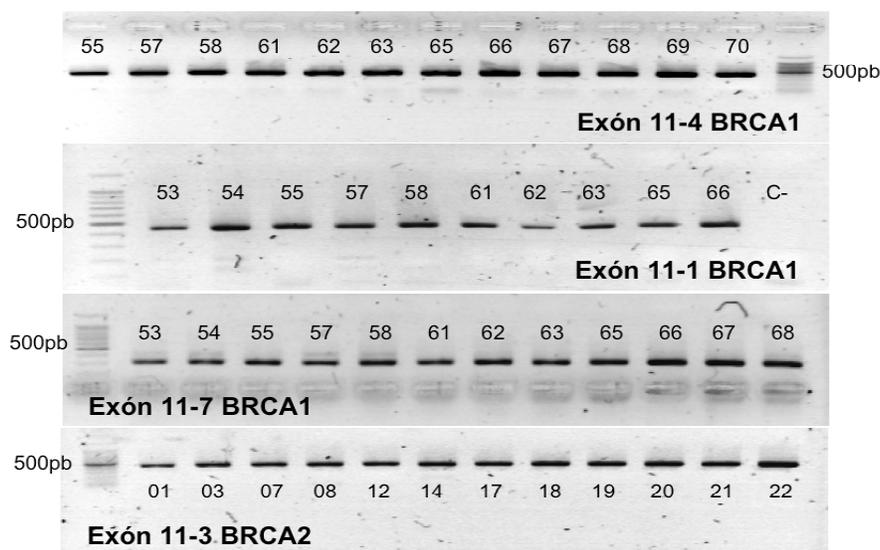


Figura 17.- Registro fotográfico del resultados de algunas PCR efectuadas para posterior análisis mediante SSCP, en electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %. Se muestras 3 de los exones evaluados; 11-4, 11-1 y 11-7 de BRCA1 y 11-3 de BRCA2, con tamaños de 415 pb, 442 pb, 296 pb y 407 pb respectivamente. En el primer carril de cada gel se corrió un marcador de peso molecular de 100 pb, indicando lo que corresponde a la banda de 500 pb. En los carriles se indican los números de los pacientes sin el prefijo CM0__).

Una vez realizadas las PCRs de cada uno de los fragmentos de interés, se llevó a cabo la SSCP mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones renaturalizantes. Estos geles son de menor tamaño, y se corren a temperatura constante y menor voltaje, respecto a la FMPA. Se analizaron seis (6) regiones del exón 11 del gen *BRCA1* y tres regiones del exón 11 y el exón 23 del gen *BRCA2*, en las cuales han sido

identificadas las mutaciones de interés en este trabajo.

En la evaluación de los geles de SSCP, se tomó en cuenta el patrón de corrida general y la presencia de variaciones entre las muestras analizadas. En las Figuras 18 y 19 se observan algunos de los resultados obtenidos para cada una de las regiones evaluadas en cada gen, y se pueden apreciar las diferencias en el patrón de corrida, indicadas con flechas.

Para el caso del exón 11-1 (Figura 18-A) se obtuvo un patrón de corrida general compuesto por 4 bandas; sin embargo, se observó la presencia de 5 bandas en la muestra de la paciente CM055, la cual fue utilizada como control, ya que como se mencionó anteriormente, se conoce que posee una mutación que consiste en la inserción de una adenina en algún lugar entre los nucleótidos 30931 y 30938 (región de 7 repeticiones de adenina) del ADN_g del gen *BRCA1* (MIM113705) en uno de sus alelos, específicamente en el exón 11 (fragmento 11-1) y se denomina c.1128_1136insA en el ARNm (U14680) y genera un codón de parada en el triplete 345 del mensajero maduro. Como puede apreciarse, pudo detectarse el cambio en la movilidad electroforética de la muestra mediante SSCP, mientras que ello no fue posible cuando se evaluó este mismo fragmento en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Por el contrario, el fragmento 11-1 de la muestra CM068 portadora de la mutación c.951_953insA, la cual fue detectada mediante FMPA e identificada en este trabajo, no mostró ningún cambio en la corrida electroforética mediante SSCP.

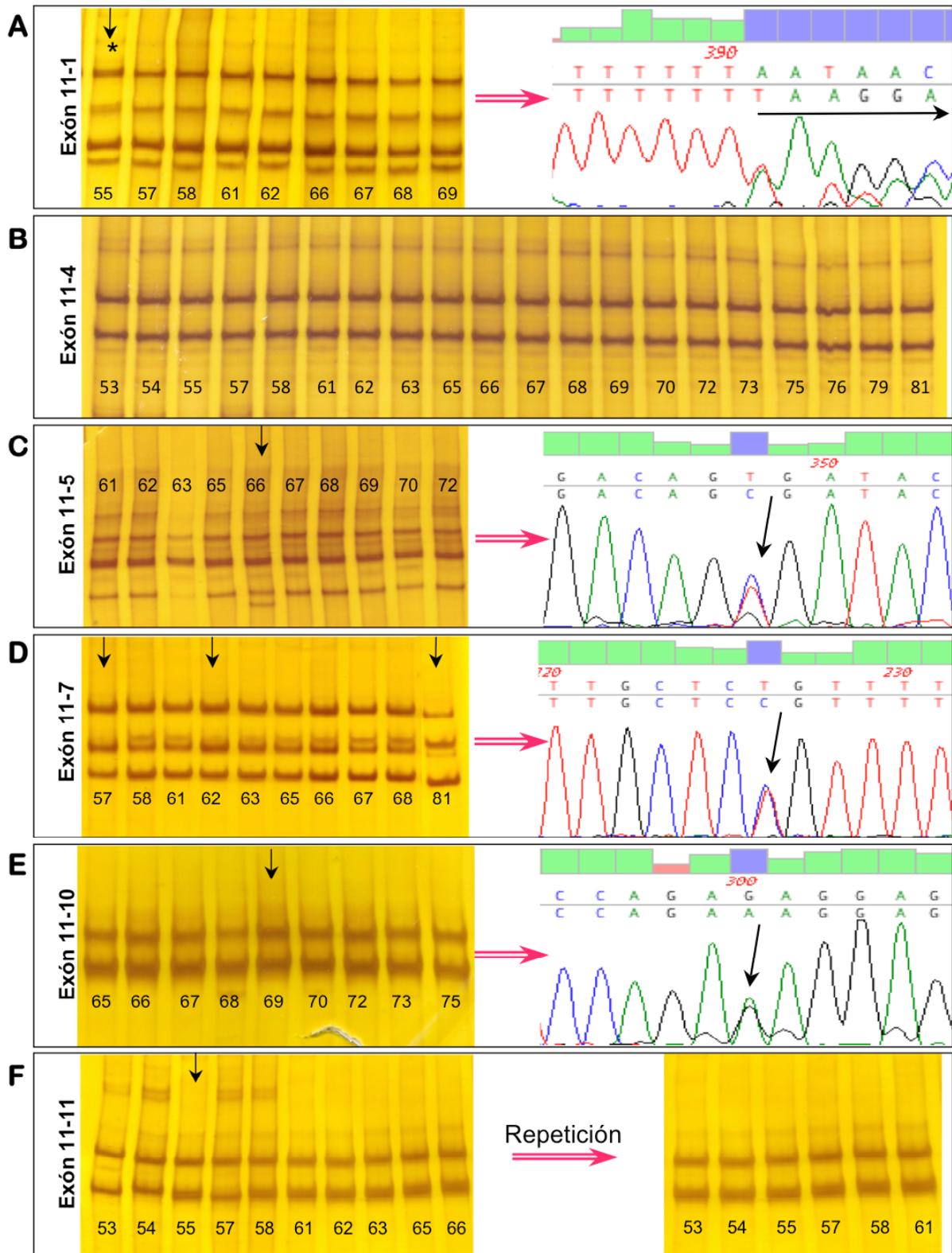


Figura 18- Registros fotográficos de los geles obtenidos mediante la técnica de SSCP para los fragmentos de interés en el gen *BRCA1* y electroferogramas de las variantes. Con una flecha se indican aquellas pacientes en las que se observó diferencia en la movilidad electroforética y así mismo se enviaron posteriormente a secuenciar. Con un asterisco se identifican aquella paciente empleada como control con una mutación conocida (1135insA).

En cuanto al análisis del exón 11-4 (Figura 18-B) del gen *BRCA1*, no se observaron cambios en la corrida electroforética en ninguna de las muestras analizadas. En el exón 11-5 de la muestra de la paciente CM066 (Figura 18-C), se observó la presencia de una banda extra respecto al patrón general observado para el resto de las muestras estudiadas. El resultado del análisis de la secuenciación de esta muestra permitió evidenciar la presencia de una mutación debida al cambio de una citosina por una timina en el nucleótido 32003 del ADN_g de *BRCA1* (MIM113705) y se denomina c.2201C>T en el ARNm (U14680). Esta mutación se observa como un doble pico puntual en la región del electroferograma indicado con una flecha en la Figura 18. Este cambio de base modifica el codón original (AGC), por un codón (AGT) que codifica para el mismo aminoácido y se denomina una mutación sinónima. La misma ha sido reportada en BIC 13 veces por otros autores.

En relación al exón 11-7 de *BRCA1*, en las muestras analizadas, se obtuvieron dos patrones de corrida, uno mostró un patrón constituido por 4 bandas, y dos muestras (CM057 y CM062) mostraron un patrón de 3 bandas; a su vez, la muestra CM081 resultó con un patrón de intensidad de bandas invertido (Figura 18-D). El análisis de las secuencias de estas muestras resultó en la ausencia de mutaciones en la paciente CM081 y en las muestras CM057 y CM062 se encontró la presencia de una misma mutación de pérdida del sentido producto de una transición de una citocina por una timina en el nucleótido 32533 del gen (MIM113705), quedando la alteración en el nucleótido 2731 del ARN mensajero (U14680) y ha sido designada como p.P871L por el BCI, debido al cambio del triplete (CCG) que codifica una prolina, por uno que codifica (CTG) una leucina.

En todas las muestras en las que se analizó el exón 11-10 del gen *BRCA1* se observó un patrón general con dos bandas de gran intensidad y una mucho menos intensa, a

excepción de la muestra CM069. El análisis de la secuencia del fragmento de dicha muestra indicó la presencia de una sustitución de una base en el nucleótido 33469 del gen, que corresponde al nucleótido 3667 del ARNm (U14680) de *BRCA1* que producirá el cambio de una lisina por una arginina en la proteína, por lo que en BIC ha sido denominada p.K1183R. Al igual que en el caso anterior la sustitución se aprecia en la Figura 17-E como un doble pico que indica la presencia de los dos alelos en la muestra. Esta mutación ha sido reportada 33 veces en BIC por otros autores.

Por su parte, la corrida electroforética del exón 11-11 de *BRCA1* en las muestras estudiadas, resultó en la formación de dos patrones de corrida distintos, indicados con flechas en la Figura 18-F, el predominante consta de dos bandas, el segundo por 4 bandas, como se observa en la muestra de la paciente CM055. El mismo patrón de bandas fue observado en otra corrida electroforética de la muestra de la paciente CM072. En este caso, el resultado de la secuenciación no mostró cambios en la secuencia nucleotídica de dichas pacientes. Se repitió la SSCP de estas muestras y en esta ocasión no se apreciaron cambios en la movilidad electroforética. En la Tabla IV, se puede apreciar un resumen de las mutaciones encontradas por paciente.

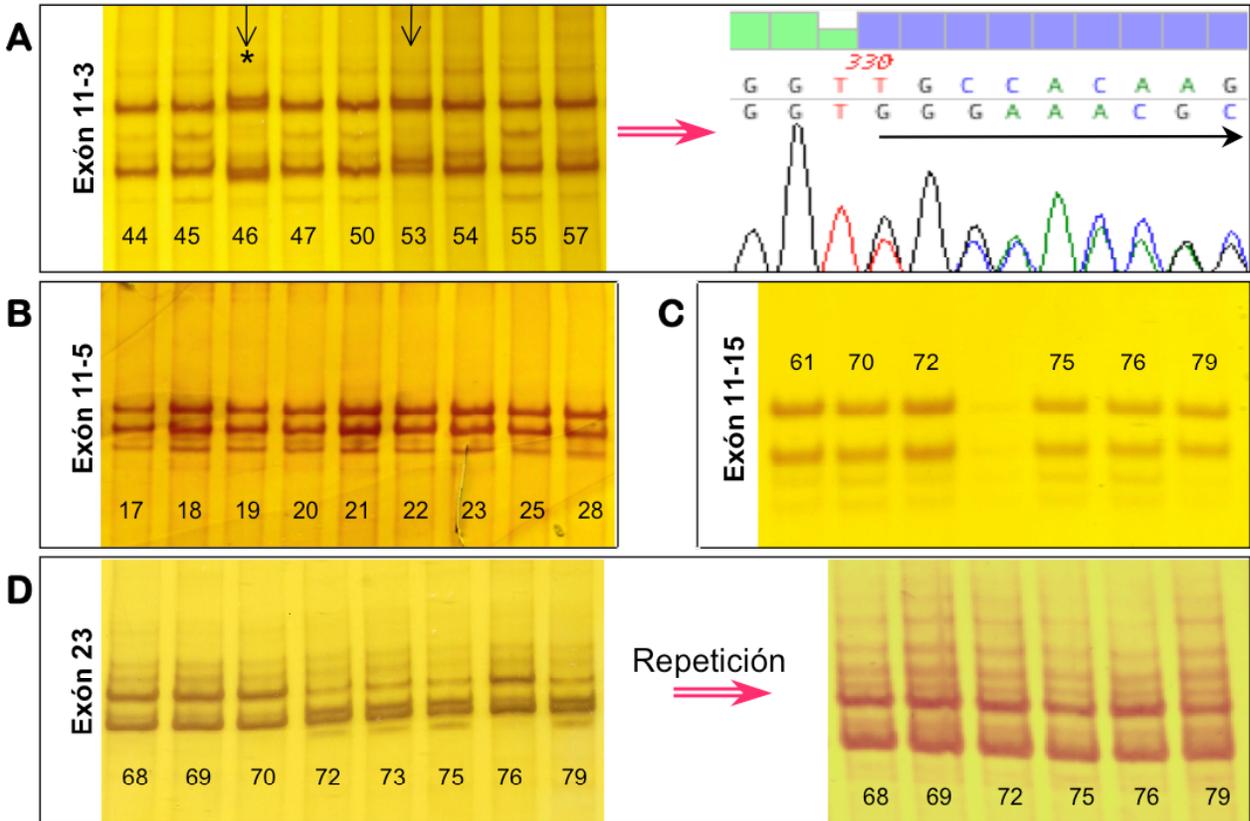


Figura 19.- Registros fotográficos de los geles obtenidos mediante la técnica de SSCP para os fragmentos de interés en el gen *BRCA2* y electroferograma de una variante. Con una flecha se indican aquellas pacientes en las que se observo diferencia en la movilidad electroforética y así mismo se enviaron posteriormente a secuenciar. Con un asterisco se identifica aquella pacientes control con una mutación conocida (c.3036_3039del4). En la figura A se aprecia el electroferograma de la muestra de la paciente CM053 que presentó la mutación c.2732_2734insA. En la Figura D se muestra la repetición de las muestras que presentaban un patrón de corrida distinto.

Con respecto a *BRCA2*, se evaluaron cuatro regiones del gen 3 en el exón 11 (11-3, 11-5 y 11-15) y todo el exón 23, en la Figura 19 se muestran algunos resultados. En el exón 11-3 fue posible identificar tres patrones de corrida diferentes, uno observado para la mayoría de las muestras, y dos distintos indicados en la figura con flechas. En este caso, al igual que para el caso del exón 11-11 de *BRCA1*, se secuenció una muestra por cada patrón de bandas observado. De las muestras en las que se detectó cambio en la movilidad electroforética, se identificaron dos mutaciones diferentes, una en la muestra de la paciente

CM046, usada como control en este trabajo, cuya mutación es c.3036_3039del4 ya mencionada anteriormente (también visualizada mediante FMPA), y otra en la de la paciente CM053. El análisis de la secuencia de esta muestra (electroferograma de la Figura 19-A), mostró una inserción de una adenina en la posición 21380 o 21382 del gen (MIM600185), indicada en el ARNm (U43746.1) como c.2732_2734insA, ya que no puede determinarse la posición exacta de la inserción debido a que la secuencia normal consta de una A en dicha posición. Es importante destacar que esta mutación genera un codón de terminación de la traducción en el triplete 837 del ARNm maduro y que no ha sido reportada por otros autores en BIC (Breast Cancer Information Core).

Las corridas electroforéticas de los fragmentos de los exones 11-5 y 11-15 (Figuras 19 B y C) del gen *BRCA2* no mostraron alteraciones en el patrón de bandas en ninguna de las muestras analizadas. Por último, en el análisis, el exón 23 de este gen, se observaron dos patrones de corrida distintos, identificados con flechas en la Figura 19-D. El análisis de la secuencia de las muestras no indicó cambios, por lo que, se repitió el análisis por SSCP de las muestras que mostraron variación, bajo mas mismas condiciones y todas presentaron el mismo patrón de bandas, lo que explica la ausencia de mutaciones, tal y como se muestra en la figura.

5. Detección de la mutación c.5083del19

Otra de las mutaciones evaluadas en este trabajo fue una deleción de 19 pb en el exón 16 del gen *BRCA1*. La detección de esta mutación se llevó a cabo mediante la realización de una PCR y su posterior corrida electroforética en geles de poliacrilamida al 10 %. En la Figura 20-A se muestran los resultados de la amplificación de dicho fragmento, para el cual se obtuvo bandas de 448 pb tal como se esperaba en ausencia de la deleción. En la Figura

20-B se muestran los resultados obtenidos a partir de los geles de poliacrilamida, en el cual se presenta en el último carril un marcador de bandas que difieren en 20 pb (462 y 442 pb) y en los carriles restantes se corrieron las muestras de cada paciente. El análisis de las 48 pacientes seleccionadas no indicó en ninguno de ellos la presencia de la mutación.

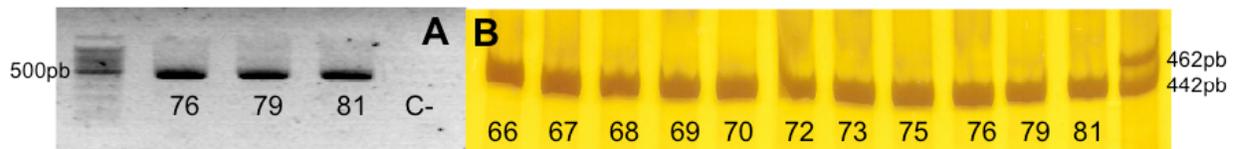


Figura 20.- Productos de PCR del exón 16 de BRCA1 para la detección de la mutación 5083del19. En la Figura A se muestra un resultado de la corrida electroforética en geles de agarosa al 1,5 % de los productos de PCR del exón 16, en el primer carril se tiene el marcador de peso molecular de 100 pb, indicando la banda de 500 pb, en los siguientes carriles se muestra el amplicón obtenido para cada una de las pacientes indicadas y en el último carril el control negativo de la reacción. En la Figura B se muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida de algunas de las pacientes estudiadas, mostrando en los primeros 11 carriles el amplicón de 448 pb de cada una de las pacientes indicadas y en el último carril el marcador de peso molecular con dos bandas de 462 pb y 442 pb (20 pb de diferencia).

En la tabla IV se resumen las mutaciones encontradas en el estudio. De las cuales 4 producen codones de terminación tempranos, dos de ellas han sido previamente reportadas y están calificadas como de importancia clínica, las otras dos se encontraron por primera vez en la población venezolana en este trabajo. De las 4 mutaciones deletéreas, dos están presentes en *BRCA1* y las otras dos en *BRCA2*. Se encontraron también 4 mutaciones que se dan por el cambio de una base pero que sin embargo carecen de importancia clínica, todas ellas previamente reportadas en otros estudios en el BIC.

Tabla IV-. Mutaciones encontradas durante el estudio.

Se indica el código de la paciente utilizado en el laboratorio, la región donde ocurre la mutación tanto en el ADNg (MIM113705 para BRCA1 y para MIM600185 BRCA2) como en el ARNm (U14680 para BRCA1 y U43746.1 para BRCA2), el efecto, nomenclatura utilizada por la base de datos BIC, tipo de mutación, importancia clínica, cantidad de ingresos en la base de datos del BIC, la población donde se ha encontrado y la técnica que permitió su detección.

Código de muestra	Gen	Exón	Nucleótido (ADNg)	Nucleótido (ARNm)	Cambio en el ADN	Codón	Efecto	Nomenclatura según BIC	Tipo	Importancia clínica	# Reportes en BIC	Población	Técnica
CM046	BRCA2	11-3	21684_21687	3036_3039	del 4 (ACAA)	936-937	959-ter	3036del4	Cambio de sentido	Si	105	Caucásica	FMPA / SSCP
CM053	BRCA2	11-3	21380_21382	2732_2734	ins A	835-836	837-ter	-	Cambio de sentido	Si	0	Venezolana?	SSCP
CM055	BRCA1	11-1	30931_30938	1128_1136	ins A	339	345-ter	1135insA	Cambio de sentido	Si	46	Caucásica	SSCP
CM068	BRCA1	11-1	30752_30753	951_952	ins A	278	286-ter	-	Cambio de sentido	Si	0	Venezolana?	FMPA
CM066	BRCA1	11-5	32003	2201	C > T	694	S694S	2201C/T	Sinónima	No	13	Caucásica	SSCP
CM062	BRCA1	11-7	32533	2731	C > T	871	P871L	P871L	Perdida del sentido	No	26	Caucásica	SSCP
CM057	BRCA1	11-7	32533	2731	C > T	871	P871L	P871L	Perdida del sentido	No	26	Caucásica	SSCP
CM069	BRCA1	11-10	33469	3667	A > G	1183	K1183R	K1183R	Perdida del sentido	No	33	Caucásica	SSCP

VI. DISCUSIÓN

En la actualidad, el cáncer es una enfermedad ampliamente distribuida que afecta a un gran número de personas en el mundo. Es por ello, que el estudio de la predisposición genética para esta enfermedad a tomado gran interés a nivel mundial, incluyendo a Venezuela. De los diversos tejidos donde se desarrolla el cáncer, el tejido mamario es uno de los más frecuentemente afectados entre las mujeres. A su vez, esta patología ha sido relacionada en algunos casos con un componente hereditario, donde la mayoría está asociado con alteraciones en los genes *BRCA1/2*. Es por ello que se han incrementado los esfuerzos en la detección de las alteraciones genéticas (mutaciones) en estos genes (base de datos del Breast Cancer Information Core), con el propósito de establecer exámenes diagnóstico-moleculares que permitan determinar la población con un riesgo incrementado de padecer la enfermedad. No se han establecido mutaciones predominantes para la mayoría de las poblaciones con casos de CM del tipo hereditario, salvo en algunos grupos étnicos particulares. En algunas regiones, se han descrito mutaciones recurrentes en *BRCA1* y *BRCA2*, de tal manera que pudieran ser las primeras a ser investigadas con el fin de aumentar la vigilancia médica en las mujeres que presenten historia familiar de CM, para la aplicación oportuna del consejo genético. En la población venezolana no se habían realizado hasta el momento estudios para la identificación de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* de pacientes con una historia familiar para la enfermedad, constituyendo este trabajo el primer estudio al respecto.

Específicamente, en los genes *BRCA1/2* existe cierta inestabilidad genética debida a la presencia de regiones, en ambos genes, que contienen altas densidades de secuencias repetidas (Figura 21). *BRCA1* contiene un 42% de secuencias *Alu* y un 5% de otras

repeticiones. Por el contrario, la composición de *BRCA2* posee un 47% de secuencias repetidas y un 20% de secuencias *Alu*. Genes con tal proporción de secuencias repetidas no son muy comunes en el genoma. Las regiones del ADN con una alta proporción de secuencias *Alu* están asociadas tanto con el intercambio cromosómico homólogo, como no homólogo durante la profase del ciclo celular. Se han descrito numerosos rearrreglos genéticos asociados a la enfermedad mediados por secuencias *Alu* (Welch y col., 2001). La densidad de estas secuencias en *BRCA1/2* podrían promover diversos rearrreglos genéticos, los cuales, se han visto asociados a la enfermedad, entre ellos grandes deleciones, duplicaciones e inserciones (Machado y col., 2007).

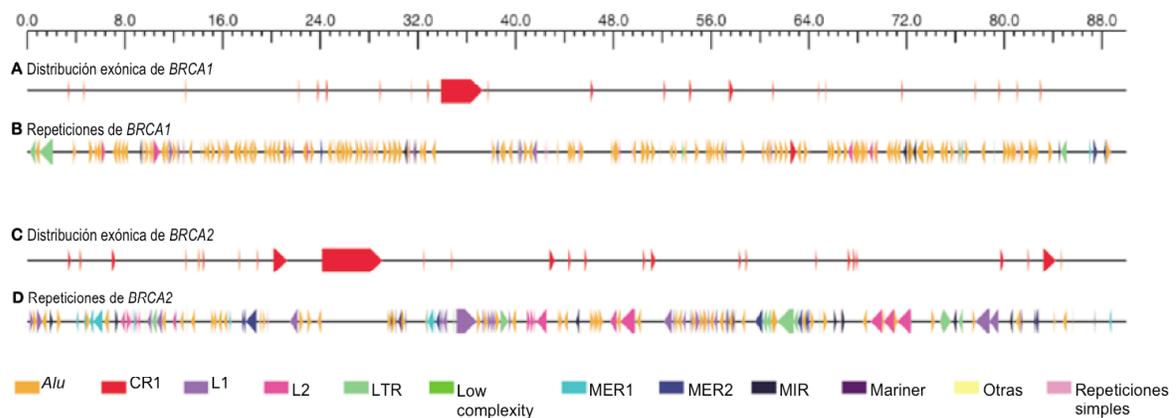


Figura 21.- Elementos repetitivos de ADN en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. (a) Estructura genómica de *BRCA1*. (b) Distribución de los elementos repetitivos en el gen *BRCA1*. Los elementos *Alu* se muestran en amarillo y comprenden el 42% del gen respecto a todas las regiones repetitivas que abarcan el 47%. (c) Estructura genómica de *BRCA2*. (d) Distribución de los elementos repetitivos en el gen *BRCA2*. Los elementos *LINE* y *MER* se muestran en rojo, magenta y azul, y comprenden el 27% del gen, elementos *Alu* (20%). Tomado de Welch y col 2001.

Entre las alteraciones genéticas en los genes *BRCA1/2* que confieren susceptibilidad para el desarrollo del CM se encuentran aquellas que originan proteínas truncadas o no funcionales. Otras mutaciones importantes, son aquellas que interrumpen el marco abierto de lectura del gen y están presentes en la región que codifica para un dominio cuya función es

importante en el proceso de reparación. Por su parte, también se han observado variaciones en estos genes que alteran el empalme (*splicing*) para producir el ARNm maduro, los cuales pueden en consecuencia modificar la función de la proteína y así conferir susceptibilidad (Scully y col., 2002). Hasta la fecha se han reportado más de 800 variantes distintas en cada uno de los genes *BRCA*, observándose un patrón bastante complejo y heterogéneo de mutaciones. En ambos genes, las variantes se distribuyen uniformemente en toda la región codificante e incluso en las regiones intrónicas. Sin embargo, se dificulta la determinación de la importancia patológica de las variantes nucleotídicas que no tengan un cambio significativo en la estructura proteica o que ocurren fuera de los dominios funcionales de la proteína (Cipollini y col., 2004).

Se consideran mutaciones potencialmente patogénicas a las alteraciones detectadas en la secuencia de *BRCA1/2* que causan cambios en el marco de lectura (mutaciones *frameshift*), señales de parada en la síntesis proteica (mutaciones sin sentido o *nonsense*), mutaciones que afectan la unión intrón-exón (mutaciones de tipo *splicing*) y las mutaciones *missense* (pérdida de sentido) que originen un cambio de aminoácido que afecte la funcionalidad de la proteína codificada. Se califican como modificaciones no patogénicas a las variantes sinónimas y no sinónimas en la secuencia que no modifican el aminoácido en la proteína o es cambiado por uno con propiedades similares y por lo tanto no representan un riesgo para la aparición del CM/CO. Basados en el análisis anterior, el comité de la Base de datos BIC establece que una mutación en los genes *BRCA1* o *BRCA2* tendrá importancia clínica si, con los datos disponibles, consideran que el cambio de secuencia encontrado interfiere con la función del gen y da lugar a un aumento del riesgo de cáncer. Por su parte, también con base en los datos disponibles, el comité dictamina que una mutación no es de

importancia clínica, cuando el cambio de secuencia es neutro; o que pudiera tener poca importancia clínica, ya que pudiera estar asociado con un aumento modesto en el riesgo de cáncer; o incluso si se ha determinado que los individuos portadores de ese cambio de secuencia también llevan otra mutación que si es clínicamente significativa. Por otro lado, se catalogan como variantes de efecto desconocido cuando no existen datos suficientes para permitir la evaluación de las implicaciones clínicas y funcionales de este cambio de secuencia.

A pesar de que, la presencia de un alelo portador de una mutación que da origen a un codón de terminación prematura (CTP) codificará una proteína truncada, deben considerarse otros mecanismos que podrían regular la expresión de las mismas, modificando el grado patológico de la mutación. Estudios recientes han determinado la presencia de mecanismos de reconocimiento de estos codones en el ARNm, conllevando a su degradación, tal es el caso del mecanismo denominado decaimiento del ARNm mediado por el antisentido (NMD: Nonsense-mediated mRNA decay).

El NMD es un mecanismo por el cual, transcritos portadores de CTP son detectados y degradados en las células. Por esta razón, los transcritos generados por este tipo de mutaciones, generalmente no conducen a la síntesis de proteínas truncadas que podrían tener un efecto negativo dominante. Cuando se reconoce un codón de terminación en el ARNm, luego de la primera ronda de traducción, se activan señales para la síntesis de factores que forman parte de un complejo de sobrevivencia que interactúa con el ARNm y otros complejos, identificando uniones exón-exón. Estas uniones permiten distinguir un CTP de un codón de terminación normal. Cuando el complejo de sobrevivencia encuentra una unión exón-exón posterior al CTP, se dispara el mecanismo NMD, marcando el ARNm mutado

para la degradación. Relacionado con lo anterior, en un estudio realizado por Perrin y colaboradores (2002), donde analizaron los niveles del transcrito estable de *BRCA1* en 38 individuos con 30 mutaciones diferentes que generan proteínas truncadas, evidenciaron que, en el 80% de los alelos ocurre la reducción de hasta 5 veces de los niveles de ARNm. Dentro del 20% de los alelos cuyo ARNm no es degradado y escapan de la NMD se encuentran los comunes de la población Judía-Ashknazi c.185_186delAG y c.5382insC, que conducen a la síntesis de proteínas truncadas. Al respecto, los autores sugieren en el caso de la mutación c.185_186delAG, que el efecto podría explicarse por la reiniciación de la traducción, proponiendo que cuando se consigue un AUG seguido por un codón de terminación cercano, los ribosomas post –terminación resumen la búsqueda y podrían re-iniciar la traducción en un punto aguas abajo, originándose una proteína truncada en su extremo N-terminal.

Así mismo, se ha observado que el tejido donde se desarrolla el cáncer y el tipo de tumor depende de si las mutaciones germinales ocurren en el gen *BRCA1* o en el gen *BRCA2*. Las mutaciones germinales en *BRCA2* confieren un riesgo mayor para el desarrollo de cáncer de próstata, páncreas, vesícula, estómago o melanoma maligno, así como también se ha visto asociado a un mayor riesgo de CM en hombres. Por su parte, *BRCA1* confiere un mayor riesgo de cáncer de ovario. Además, los tumores asociados a mutaciones en *BRCA1* o a *BRCA2* generalmente muestran diferencias histológicas, los primeros suelen ser mayormente del tipo ductal o medular, encontrándose un mayor número de eventos mitóticos y son calificados como de alto grado, mientras que en los segundos, el tumor es más heterogéneo y es moderadamente de alto grado. Se ha sugerido que esto podría estar asociado a diferencias en los patrones de expresión genética (Hedenfalk y col., 2001). Tal es el caso de la expresión de los receptores de estrógenos (RE) alfa (α) y beta (β), expresándose

mayoritariamente en tumores asociados a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* respectivamente, así se ha observado que *BRCA1* participa en la regulación transcripcional de $RE\alpha$, el cual a su vez se conoce interactúa con p53 (gen supresor de tumor) inactivándolo (Litwiniuk y col., 2008).

Por lo general, fallos en la reparación del ADN conducen a la detención de la proliferación o muerte celular. Como ya se ha mencionado en la introducción, las proteínas *BRCA1* y *BRCA2* participan en una serie de procesos asociados a la reparación de la doble hebra del ADN y se expresan en diversas fases del ciclo celular, promoviendo la apoptosis cuando hay señal de malignidad. En individuos cuyas células presentan mutaciones inactivadoras de la función de *BRCA1* o *BRCA2*, en uno de sus alelos (dado que el desarrollo embrionario de células homocigóticas mutadas para cualquiera de estos genes no es viable) la pérdida del alelo silvestre se espera que conduzca a la detención del ciclo celular o a la apoptosis, por lo que estas células no dejarían descendencia. Así mismo se han descrito variedad de otras mutaciones, como cambios de base, que si bien no generan proteínas truncadas, pueden generar un cambio del aminoácido y esto, cambios en la estructura tridimensional de la proteína, afectando sus condiciones estéricas, sus sitios de reconocimiento y unión con otras proteínas.

Sin embargo, en el tejido mamario y ovárico se observa el desarrollo de tumores en células con deficiencias en los mecanismos reparadores, lo que indica un mecanismo que les permite escapar de la apoptosis, sin embargo, se ha evidenciado; en diversos estudios de familias con historia de CM o CO, pacientes longevas portadoras de mutaciones que no han desarrollado la enfermedad y se piensa que en ellas, las mutaciones inactivadoras de *BRCA* fallan en su resistencia a la apoptosis. En este sentido, los factores asociados a la

producción de estrógenos han sido relacionados con el riesgo de CM. *BRCA1* y *BRCA2* están altamente regulados en las distintas fases del desarrollo del individuo. Durante la pubertad y el embarazo, en respuesta directa a los niveles de estrógenos, las células del epitelio mamario proliferan rápidamente y se ha observado en tejidos con altas tasas proliferativas o en diferenciación, altos niveles de expresión de *BRCA1* y *BRCA2*. Es probable que el incremento dramático en la tasa replicativa de la célula ejerza una presión sobre la capacidad reparadora del ADN, permitiendo además que la célula escape de la muerte y sobreviva, sosteniendo gran variedad de daños en diversos genes, que serán transmitidas a las siguientes generaciones de células. Así mismo, el desarrollo de tumores por mutaciones en *BRCA* está generalmente asociado a alteraciones somáticas en el gen *p53* (Welch y col., 2001).

En cuanto a la distribución de las mutaciones en los genes *BRCA1/2* y su origen, se ha observado, en repetidas oportunidades, que portadoras de mutaciones con un haplotipo común, probablemente son descendientes de un mismo ancestro y estas mutaciones son referidas como fundadoras. Diversas mutaciones fundadoras se han descrito en *BRCA1* en individuos con diferentes antecedentes; tal es el caso de las familias Judías-Ashkenazi (c.185delAG, c.5382insC y c.6174delT), familias francesas-canadienses (p.C4446T, c.2953del3+C), alemanas (c.2804delAA y la deleción del exón 13 al 22 mediada por *Alu*), polacas (c.5382insC, p.C61G y c.4153delA), italianas (c.5083del19), noruegas (c.1128_1136insA y c.1675delA), africanas (c.943ins10), islandesas (c.999del5) y suecas (c.3171ins5), y en *BRCA2* en individuos españoles (c.9254del5), portugueses (c.156insAlu), entre otros (Dorum 1999, Esteban 2007, Rudkin 2006, Nedelcu 2002, Weitzal 2005, Machado 2007, Mefford 1999, Peixoto 2008).

En Venezuela, la mayor afluencia de inmigrantes, después de la época de la colonia, tuvo lugar a principios de la década de los 50's, cuando un gran número de españoles, italianos, portugueses, árabes y colombianos llegaron y se establecieron en el país, lo cual se vio reflejado en el censo de 1981, donde la mayoría de los venezolanos cuyos padres eran extranjeros, eran descendientes de dichas regiones y para 1986 cerca de 17.000 ciudadanos de los Estados Unidos residían en el país (Datos de: The Library of Congress Country Studies; CIA World Factbook).

Por tal motivo, el presente estudio se enfocó principalmente en la búsqueda, en la población venezolana, de mutaciones de tipo delección o inserción de importancia clínica, comunes para poblaciones como la española, la italiana, la africana y la latinoamericana (Baudi y col., 2001; Blesa y col., 2000; Duran y col., 2003; Jara y col., 2002; Martínez y col., 2003; Meford y col., 1999; Nedelcu y col., 2002; Schubert y col., 1997 y Weitzel y col., 2005). Estas mutaciones deben ser investigadas, esperando encontrarlas, dado el origen étnico de la población venezolana.

La búsqueda de mutaciones en los genes *BRCA* es una tarea compleja que depende particularmente de la sensibilidad del método que sea utilizado para la detección de mutaciones, así como de la interpretación de los resultados. En este trabajo, inicialmente se planteó la utilización de la técnica denominada FMPA, para la detección de las mutaciones de interés. Esta técnica consiste en la identificación de mutaciones debida a delecciones o inserciones mediante diferencias de tamaño encontradas en los fragmentos producto de la amplificación por PCR, de una región de ADN específica. En este procedimiento se emplean geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, tal y como los utilizados en la secuenciación, que permiten separar fragmentos con diferencias de una base. La técnica

fue desarrollada inicialmente por Kuperstein y colaboradores en el 2000 y posteriormente fue empleada en tres estudios para de detección de las mutaciones comunes de las población Judía-Ashkenazi y Francesa-Canadiense de los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Risch y col., 2001; Hamel y col., 2003 y Young y col., 2009). Entre las ventajas que presenta esta técnica se tiene, la amplificación de diversos fragmentos de ADN en una sola reacción de PCR múltiple, el tamaño de los fragmentos de amplificación permite la evaluación de diversas mutaciones en una sola corrida electroforética y no requiere de controles positivos, ya que cuando la mutación está presente variará el tamaño del fragmento lo que se transforma en una mayor o menor movilidad electroforética, además, es posible la detección de mutaciones en condición heterocigótica (Kuperstein y col., 2000).

De esta manera, la técnica de FMPA resultó efectiva en este trabajo, para la evaluación de la presencia de las mutaciones de origen Judío-Ashkenazi, en donde se evidenció la ausencia de tales mutaciones. Esta técnica fue empleada, básicamente, bajo las condiciones propuestas por Kuperstein y colaboradores (2000), con algunas modificaciones, entre las que se incluyen la separación de las reacciones de PCR y la variación de los parámetros eléctricos de corrida (80 watts de potencia constantes a temperatura ambiente). Para alcanzar la potencia sugerida fue necesaria la aplicación de 3.000 voltios de corriente, sin embargo, no fue posible realizar la corrida con este voltaje, ya que ello generó una elevación considerable de la temperatura en los vidrios y la consecuente ruptura. Debido a esto, se procedió a la realización de la corrida en un cuarto refrigerado a una temperatura aproximada de 10 °C, aunque no pudo evitarse el llamado efecto sonrisa observado en los resultados. Además, para una mejor resolución de las bandas en el gel, fue necesaria la realización de diluciones 1/8 de los productos de PCR, con agua y buffer de carga con

formamida. Es además, importante resaltar que, para la realización de este ensayo se requirió de productos de PCR frescos (del mismo día), ya que en los productos de PCR puede ocurrir degradación, de algunas bases, lo que podría alterar el patrón de bandas observado en un gel capaz de discriminar diferencias de tamaños.

Así, la FMPA suponía ser una técnica interesante y potencialmente utilizable como método de diagnóstico molecular de individuos en AR, por lo que se realizó un diseño experimental para la detección del resto de las mutaciones específicas de interés en este trabajo, que podrían estar presentes en la población venezolana. Sin embargo y a pesar de los cambios realizados en a metodología, no se pudo evaluar la presencia de las mutaciones de origen español, italiano, africano y latinoamericano, debido a la falta de resolución en la separación de los fragmentos en el gel. Entre los parámetros que se modificaron para mejorar la resolución de los fragmentos en el gel están, la concentración de poliacrilamida en el gel, la temperatura del gel durante la corrida electroforética, la composición del buffer de corrida y del buffer de carga y el tiempo de corrida.

Como se mencionó anteriormente, una de las condiciones que se modificó fue la concentración de poliacrilamida en el gel. Debido al tamaño de los productos de PCR para la evaluación de la presencia de las mutaciones de origen español, italiano y latinoamericano en general, se disminuyó la concentración de la poliacrilamida en el gel al 6% y al 4%, ya que son las concentraciones más comúnmente utilizadas en los geles de secuencia, según lo expresan Lang y Burger (1990) y Slatko y Albright (2001), sin embargo se observaron mejores resultados con geles más concentrados (8%).

En relación a la temperatura del gel durante la corrida electroforética, diversos

autores han reportado que se requiere de la utilización de refrigerantes o placas de aluminio que permitan la regulación y el mantenimiento de una temperatura constante a todo lo largo de la superficie del gel, evitando el calentamiento excesivo de los vidrios, para permitir el desplazamiento uniforme de las muestras en el mismo y evitar el efecto sonrisa, esto permite incrementar el tiempo de corrida y posibilita la obtención de resultados reproducibles (Slatko y Albright, 2001). El uso de una placa de aluminio de 40 x 20 cm en los experimentos permitió el mantenimiento homogéneo de la temperatura, evitando el efecto sonrisa, aunque no permitió aumentar significativamente la resolución de todos los fragmentos en el gel.

La composición del buffer de corrida afecta la fuerza iónica de la corrida y la separación entre las bandas. Según lo propuesto por Lang y Burger (1990), se implementó la utilización de un buffer inferior compuesto por TBE 1X y adicionándole Fosfato de sodio (100 mM), que forma un gradiente salino que va incrementando lentamente durante la electroforesis, por la migración de los iones a través del gel, provocando el apilamiento de la bandas. Por su parte, la composición del buffer de carga afecta el grado de desnaturalización de las muestras. El tiempo de corrida afecta el desplazamiento de las bandas en el gel y de forma indirecta la movilidad de las bandas, sin embargo, tiempos muy prolongados de corrida afectan la capacidad amortiguadora de la solución, permitiendo la difusión de las bandas en el gel, observándose estas poco definidas.

Finalmente, el tamaño del fragmento a evaluar juega también un papel importante (Rocheleau y col., 1992). Como pudo apreciarse en los resultados, los fragmentos más pequeños tuvieron un mayor desplazamiento en el gel, lo que en consecuencia provocó una mayor separación entre bandas de un mismo fragmento, pero a su vez, se separaron mucho

de los fragmentos más grandes del mismo grupo, quedando estos últimos muy arriba y con menor resolución.

Como se pudo apreciar en la sección de resultados, luego de probar la técnica (FMFA) bajo diversas condiciones para la evaluación de mutaciones tipo del/ins específicas que podrían estar presentes en nuestra población, no fue posible obtener resultados reproducibles, así como tampoco la detección simultánea de alteraciones en varios fragmentos de los genes en estudio. Para los fragmentos de gran tamaño (450-300 pb) no se logró obtener una resolución de 1 pb, pero sí de 4 pb. Para fragmentos pequeños (121 - 270 pb) fue posible obtener diferencias de 1 pb. Sin embargo, en las muestras de 15 pacientes evaluadas para los exones 11-15 y 23 de *BRCA2* respectivamente, no se observaron alteraciones en el patrón de corrida. A pesar de los inconvenientes, en una de las muestras problema (CM068), específicamente en el análisis del exón 11-1 de *BRCA1*, se observó una variación del tamaño, que al secuenciarla permitió determinar la presencia de la mutación (c.952_953insA); sin embargo, para el mismo fragmento de esta muestra, no se logró detectar el cambio cuando se modificaron las condiciones en el gel. En lo que respecta a la muestra de la paciente CM055, utilizada como control, no pudo definirse claramente la presencia de la mutación. En conclusión, probablemente la falta de resolución de las bandas en el gel se deba al tamaño de los fragmentos producto de la PCR múltiple que conformaban los distintos grupos y la diferencia de tamaños entre los fragmentos a evaluar en un mismo grupo. Por lo anteriormente expuesto, no debe descartarse el uso de esta técnica para la detección de mutaciones del tipo inserción o deleción, sino que deben diseñarse nuevos cebadores que permitan la obtención de fragmentos más pequeños y que no difieran significativamente en tamaño dentro de un mismo grupo.

Debido a las dificultades que se presentaron con la técnica FMPA, y con el fin de cumplir con los objetivos propuestos, se procedió al uso de otra técnica diseñada para la detección de mutaciones, como lo es la SSCP. Esta técnica permite detectar debido a los cambios producidos en la conformación de un fragmento de ADN la presencia de una mutación en la muestra (inserciones, deleciones y sustituciones). Fue desarrollada inicialmente por Orita y colaboradores en 1989, se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes y ha sido empleada ampliamente por diversos autores para la detección y búsqueda de mutaciones en los genes *BRCA1/2* a nivel mundial (Schubert y col., 1997; Markoff y col., 1998; Panguli y col., 1999; Osorio y col., 2002; Martinez y col., 2003 y Mucha y col., 2005).

Diversos estudios se han enfocado en la determinación de la eficacia del método y establecen que en fragmentos entre 150 y 400 pb es posible detectar hasta el 80% de las mutaciones presentes, sin embargo esto puede estar afectado por diversos parámetros como el contenido de GC del fragmento de ADN, la temperatura del gel, la composición del buffer y sus aditivos, la composición de la matriz del gel y su concentración, así como la concentración de los cebadores (Zhu y col., 2006). También la posición de la base que se sustituye en el fragmento es importante, ya que si la mutación está presente en cualquiera de los extremos de la secuencia, ello no contribuiría de manera significativa en los cambios de la conformación, por lo que no sería detectada. La naturaleza de la sustitución ha sido comentada por algunos autores, sin embargo otros manifiestan haber observado igual capacidad de detección de mutaciones tanto de tipo transición como transversión (Sheffield y col., 1993). Por su parte, la composición de bases (% de GC o % de AT) del fragmento de ADN también es importante, ya que en ocasiones la alteración no es capaz de producir un

cambio conformacional detectable por la técnica, ya que una secuencia con una mayor concentración de purinas migrará más rápido por lo que se mostrará mayor diferencia entre la movilidad de las bandas facilitando la detección de las alteraciones (Markoff y col., 1998). La concentración de cebadores remanentes al final de la PCR pueden afectar la sensibilidad de la SSCP, en este sentido, Zhu y colaboradores (2006) determinaron que una relación 200:1 producto:cebador podría resultar beneficiosa, reduciendo la cantidad de ADN doble cadena que pudiera renaturalizar y evitar la presencia de otras bandas como consecuencia de la presencia de productos incompletos.

Ocasionalmente, una de las hebras es visualizada en dos o más bandas en el gel de SSCP, aunque la secuencia sea la misma, lo que sugiere que hebras con la misma secuencia pueden tener diferentes conformaciones estables (Kenshi, 1991). Usualmente la intensidad de estas bandas puede variar pero el patrón de bandas para un mismo fragmento siempre será constante entre distintas muestras, a menos que haya un cambio en la secuencia. En otras ocasiones es posible observar una de las hebras como manchones (*smears*) en el gel, más que como bandas definidas y esto está asociado con la presencia de fragmentos en un estado de transición entre dos conformaciones, bajo dada condición electroforética (Hayashi, 1991). Además, sutiles cambios en el gel, como la temperatura, las regiones cercanas a los vidrios; son suficientes para permitir diversas conformaciones. Una de las desventajas de este método es que no permite distinguir entre dos sustituciones distintas que ocurren en la misma posición nucleotídica (Sheffield y col., 1993).

En este trabajo la SSCP se implementó con la finalidad de buscar en la población seleccionada las mutaciones de tipo del/ins fundadoras para las poblaciones española, italiana, africana y latinoamericana. Con este método se logró detectar cambios en las

muestras utilizadas como control, confirmándose no sólo la presencia de las mutaciones en los exones 11-1 de *BRCA1* y 11-3 de *BRCA2*, sino que además fue posible detectar 4 mutaciones más, de las cuales 3 son debidas a la sustitución de una base y una a la inserción de un nucleótido, en un total de 6 pacientes. Si bien las mutaciones encontradas no están incluidas dentro del grupo de las mutaciones que se estaban evaluando en este trabajo, las encontradas constituyen un aporte, ya que proporcionan información sobre la composición genética de zonas específicas de los genes *BRCA1* y 2 en la población venezolana.

Sin embargo, se debe mencionar que la mutación presente en el exón 11-1 de *BRCA1* en la paciente CM068 detectada mediante FMPA, no fue detectada por SSCP. La detección de mutaciones depende de los cambios conformacionales de la molécula simple cadena, inducidos por la mutación, sólo limitados cambios en la secuencia del ADN pueden causar cambios estructurales de la molécula que sean detectables, por tanto, los cambios conformacionales son sensibles al ambiente físico; por ejemplo en el gel: temperatura, concentración de iones y solventes, entre otros (Kenshi, 1991). Tal puede ser el caso del exón 11-11 de *BRCA1* y el exón 23 de *BRCA2*. Otra posibilidad es que el cambio conformacional del alelo mutado migre en el gel de igual manera que el alelo normal, por lo que no se detectaría la presencia de la alteración, siendo ésta una desventaja que presenta ese método.

En el presente estudio, de un total de 48 pacientes analizados, diagnosticados con CM y seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión, ya mencionados para el cáncer de mama del tipo hereditario, se detectaron, con los métodos moleculares empleados (FMPA y SSCP), siete (7) mutaciones diferentes, distribuidas en 8 pacientes, cinco en *BRCA1* y dos

en *BRCA2*, de las cuales cuatro (8,3%) son mutaciones de cambio de sentido, dos de pérdida de sentido y una sinónima (Tabla IV).

Una de las mutaciones encontradas en *BRCA1*, es una mutación que cambia el sentido del marco de lectura del ARNm, debida a la inserción de una adenina entre los nucleótidos 30931 y 30937 del gen (MIM113705). El cambio se encuentra en el codón 339 del ARNm maduro y produce una señal de parada en el triplete 345 del mismo, dando origen a una proteína truncada. Esta mutación; denominada c.1128_1136insA (por la posición en el ARNm) y ubicada en el exón 11 del gen, ha sido previamente reportada (46 veces) en la base de datos del BIC por Myriad en 2002, encontrándola en la pacientes provenientes del este de Europa (España, Noruega, Italia, Austria) y América, y calificándola como una mutación de importancia clínica. En esta misma base de datos, la mutación c.1128_1136insA es la 15^{va} mutación de cambio del marco de lectura más común en *BRCA1*. La paciente portadora de esta mutación en el presente estudio desarrolló CM a la edad de 48 años y presenta una pariente de primer grado con la enfermedad.

La mutación c.1128_1136insA ha sido anteriormente identificada como una mutación fundadora para la población Noruega, sin embargo, aunque no se ha determinado el momento cronológico de su aparición, se presume que puede haber sido hace 20-30 generaciones (Moller y col., 2001). Además, aunque sin efecto fundador, ha sido igualmente detectada en la población italiana (Nedelcu y col., 2002), así como también en la población hispana de los Estados Unidos, en una familia de ascendencia cubana (Weitzel y col., 2005). En el estudio de Moller y colaboradores (2001), el 1% de la población noruega menor de 70 años con cáncer de ovario, presentó esta mutación.

Rudkin y colaboradores (2006) se plantearon determinar si los portadores de la mutación c.1128_1136insA de *BRCA1* presentaban un origen común o si la misma se había originado recurrentemente en diversos momentos de la historia humana. Estos autores determinaron que ésta es una mutación antigua que existe con haplotipos distintos y se pudo haber originado por eventos independientes en el genoma humano. Ésto se sustenta además por el hecho de que la inserción ocurre en una secuencia con un entorno de 7 repeticiones de adeninas (rica en A), región que podría estar creando un punto caliente (*hot-spot*) para errores en la replicación, lo cual pudiera favorecer conversiones o recombinación génica. Así mismo, estos autores sugieren la inclusión de esta mutación entre los grupos de mutaciones a evaluar en las distintas poblaciones de diversos orígenes étnicos.

Otra mutación detectada en *BRCA1*, es una que también provoca un cambio del sentido del marco de lectura, debido, al igual que en el primer caso, a la inserción de una adenina, ésta vez entre los nucleótido 30752_30753 del gen *BRCA1* (MIM113705). La mutación genera un cambio en el codón 278 del ARNm maduro y produce un codón de terminación de la transcripción en el triplete 286 del mismo, dando origen a una proteína truncada. Esta mutación; denominada c.951_952insA (en la secuencia del ARNm U14680) está ubicada en el exón 11 del gen, no ha sido reportada previamente en la base de datos del BIC, por lo que no se tiene información sobre su importancia clínica. Sin embargo, la mutación c.951_952insA se puede catalogar como una mutación *frameshift* patogénica, ya que luego de la inserción de la base cambia totalmente el marco de lectura del gen produciéndose la terminación temprana de la proteína. La paciente, perteneciente a este estudio, portadora de dicha mutación, desarrolló CM a la edad de 54 años y presenta historia familiar de cáncer de mama (más de 3 casos) y ovario.

A pesar de que en el presente trabajo, las pacientes portadoras de las mutaciones de cambio del marco de lectura (*frameshift*) no reportaron historia familiar de CO, diversos estudios han sugerido, que cuando una mutación de este tipo ocurre en las dos terceras partes iniciales del gen *BRCA1* (Figura 22), el riesgo de padecer CO en una familia con historia de CM es significativamente mayor que cuando la mutación ocurre en la tercera parte final del gen (Konstantopoulou y col., 2000).

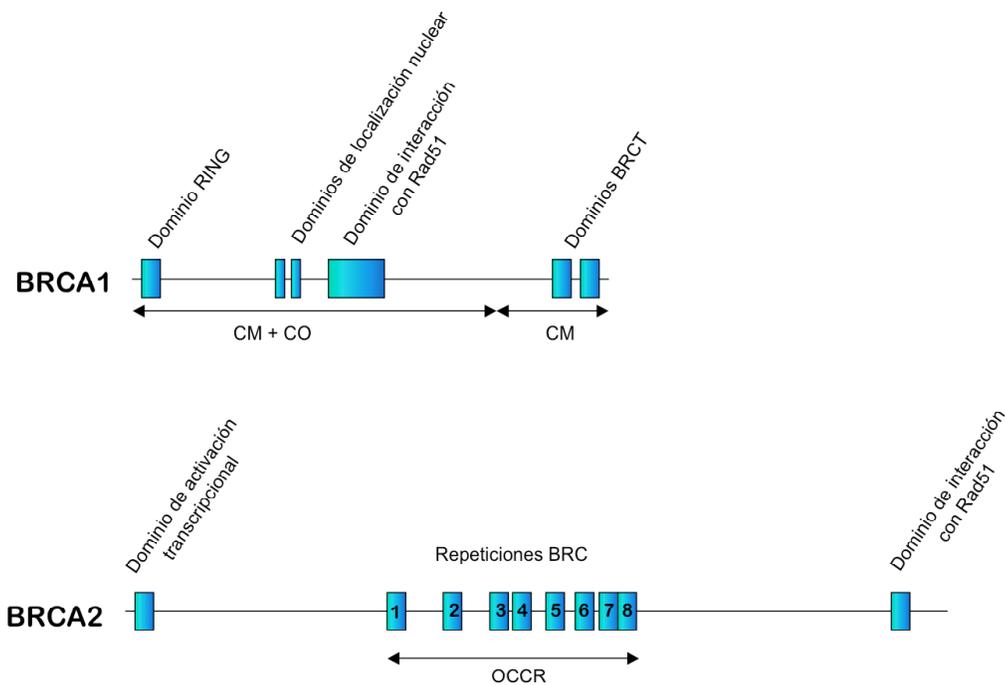


Figura 22.- Dominios funcionales de las proteínas *BRCA1* y *BRCA2*. Tomado y modificado de Bertwistle y Ashworth, 1998.

La siguiente mutación encontrada en *BRCA1*, es una mutación de pérdida del sentido, debida a un cambio de base (C por T), en el nucleótido 32533 del gen *BRCA1* (MIM113705), que se traduce en un cambio de un aminoácido en la proteína. El cambio se encuentra en el codón 871 del ARNm maduro, provocando el cambio del triplete CCG al

triplete CTG, lo que produce la sustitución de una prolina por una leucina. Esta mutación, denominada p.P871L y ubicada en el exón 11 del gen, ha sido previamente reportada (26 veces) en la base de datos del BIC, encontrándola en pacientes de procedencias diversas; como caucásica, india, china, griega, italiana, turca, afroamericana y latinoamericana (Konstantopoulou y col., 2000; Tommasi y col., 2005; Deng y col., 2003). Este cambio ha sido catalogado como un polimorfismo benigno muy conocido en *BRCA1*, dado que se ha encontrado presente en la mayoría de las poblaciones estudiadas hasta el momento a nivel mundial (Judkins y col., 2005 y Konstantopoulou y col., 2000). Esta mutación se observó en dos pacientes en este trabajo: CM057 y CM062. Las pacientes portadoras de esta mutación desarrollaron CM entre los 44-46 años de edad y ambas presentan una pariente de primer grado con la enfermedad, sin embargo, una resultó ser homocigótica (T/T) y la otra heterocigótica (C/T) para la mutación, por lo que obviamente esta alteración no es la causante de la patología. Así, p.P871L no tiene importancia clínica, es decir, que la presencia de este alelo en el individuo no incrementa el riesgo de padecer CM, debido a que el efecto de la mutación es neutro. Aquellos individuos que hayan desarrollado la patología deben presentar otra alteración genética de importancia clínica. En este sentido, resulta interesante mencionar el estudio realizado por Deng y colaboradores (2003) en la población china; donde encontraron que el alelo T de este polimorfismo está ligado con dos variaciones intrónicas; IVS18+65G>A y IVS8-57delT, hallándola en el 88,9% de los pacientes afectados, tanto en condición heterocigota como homocigota. Por lo mencionado anteriormente, en estudios posteriores, podría evaluarse la asociación del alelo mutado del polimorfismo, con otras variaciones en la población venezolana.

El efecto neutro de la mutación p.P871L podría ser explicado por las características

de los aminoácidos implicados en el cambio. La leucina, aminoácido que pertenece al grupo de los alifáticos, es del tipo hidrófobo, por ser uno de los que presenta la cadena lateral más extensa. Este tipo de aminoácido por lo general se presenta en el interior de la molécula proteica. Por su parte, la prolina es un aminoácido cíclico pero su cadena lateral tiene un comportamiento alifático, aunque la rigidez del anillo suele dificultar el plegado de los residuos de prolina (Mathews y col., 2002). Así, el cambio de aminoácido tendrá un efecto menor sobre la proteína.

Otra de las mutaciones encontradas en *BRCA1* es también de pérdida del sentido, debida a un cambio de base, una transición de una adenina por una guanina, en el nucleótido 33469 del gen (MIM113705). La mutación genera un cambio en el codón 1183 del ARNm maduro y se traduce en el cambio de una lisina a una arginina. Esta mutación designada p.K1183R y ubicada en el exón 11 del gen *BRCA1*, ha sido previamente reportada (33 veces) en la base de datos del BIC, encontrándola principalmente en pacientes de poblaciones caucásicas (Konstantopoulou y col.; 2000 y Tommasi y col., 2005), aunque también en la población afroamericana (Panguluri y col., 1999), china e india. Se ha afirmado que esta mutación carece de importancia clínica. La paciente portadora de esta mutación en el presente estudio desarrolló CM bilateral a la edad de 47 años y presenta una pariente de primer grado con la enfermedad, así que debe ser otra mutación la que causa la patología.

La ausencia de importancia clínica de la mutación p.K1183R podría estar asociada a que el cambio ocurre entre dos aminoácidos del mismo grupo (lisina y arginina), los básicos, dentro del cual ambos son de los más básicos. Sus cadenas laterales siempre están cargadas positivamente a pH fisiológico, son muy polares y por lo general se encuentran en las

superficies exteriores de la proteína.

La mutación c.2201C>T (U14680), también encontrada en el exón 11 del gen *BRCA1* (MIM113705), en el nucleótido 32003 es, a diferencia de las demás mutaciones encontradas, una mutación sinónima o silente. En este tipo de mutación la sustitución de un nucleótido por otro, genera un codón distinto, pero éste no se traduce en un cambio de aminoácido en la proteína. El cambio altera el codón 694 del ARNm maduro, donde, cambia el triplete AGC por AGT, codificando ambos para una serina en la proteína (p.S694S), por lo que obviamente esta mutación carece también de importancia clínica. Se ha reportado 13 veces en la base de datos del BIC, encontrándola en poblaciones caucásicas, principalmente española (Osorio y col., 2002; Velasco y col., 2002 y Esteban y col., 2007) y también en poblaciones asiáticas, representando la quinta mutación más común dentro de las sinónimas (Martinez y col., 2003). La paciente portadora de esta mutación en este estudio desarrolló CM a la edad de 34 años y no reporta historia familiar de CM, por lo que al igual que las mutaciones anteriores, otra alteración genética es la que debe estar causando la patología en esta paciente.

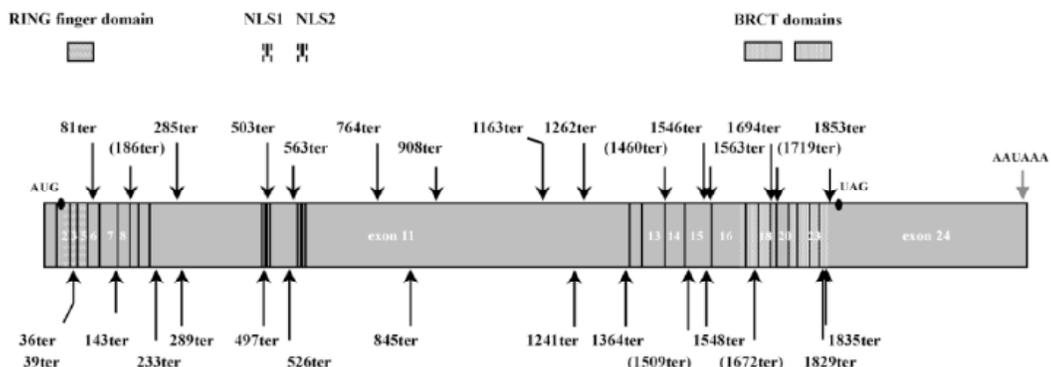


Figura 23.- Representación esquemática de los codones de terminación prematura de la transcripción en el ARNm de *BRCA1*. Tomada Perrin-Vidoz, 2002.

Las mutaciones patogénicas encontradas en este trabajo en el gen *BRCA1* se localizan en el exón 11 y conducen a la terminación prematura de la proteína. En función de esto es importante señalar, que dada la gran longitud que posee este exón (3426 pb) aumenta la probabilidad de aparición de diversas mutaciones. Cuando mutaciones de tipo del/ins ocurren en este exón, el producto truncado de la proteína traducida corresponde a un péptido carente de los dominio BRCT de la proteína (Liu y col., 2002). Dado que los codones de terminación en las mutaciones encontradas son 286-ter y 345-ter, tal como se puede apreciar en la Figura 23, los dominios de localización nuclear también estarán ausentes en la nueva proteína. El dominio BRCT es un motivo de interacción con proteínas específicamente relacionadas con el proceso de reparación del ADN y la regulación del ciclo celular, tal y como se mencionó en la introducción (Venkitaraman y col., 2001).

Con relación al gen *BRCA2*, se encontraron dos mutaciones. La primera mutación cambia el sentido del marco de lectura, debida a la delección de cuatro nucleótidos que pueden ser 21682_21685 (AAAC) o 21684_21687 (ACAA) del gen (MIM600185), ya que por la secuencia nucleotídica es difícil determinar con exactitud cuáles fueron los nucleótidos delecionados. El cambio altera el codón 936 del ARNm maduro y produce un codón de terminación de la transcripción en el triplete 959 del mismo, dando origen a una proteína truncada. Esta mutación; denominada c.3034_3037delA o c.3036_3039del4 (según BIC, en el ARNm U43746.1) y ubicada en el exón 11 del gen, ha sido reportada muchas veces (141 veces en total) en la base de datos del BIC, por Myriad, Salazar, Blanco, Narod y Llorca entre 1997-2004, encontrándola en la pacientes principalmente caucásicos, provenientes del este de Europa, esencialmente españoles (Esteban y col., 2007; de la

Hoya y col., 2003; Duran y col., 2003; Velasco y col.; 2002; Llorca y col., 2002 y Campos y col., 2002), también en irlandeses (Schubert y col., 1997), en portugueses (Machado y col., 2007), en alemanes (Spitzer y col., 2000) y en griegos (Konstantopoulou y col., 2004), así como también asiáticos y africanos; representando la segunda mutación de cambio del marco más común en el gen *BRCA2*, clasificada como una mutación de importancia clínica. La paciente portadora de esta mutación desarrolló CM a la edad de 35 años y presentó un pariente de primer grado y del sexo masculino con la enfermedad.

Actualmente, la mutación c.3036_3039del4 es considerada recurrente en el gen *BRCA2* en familias españolas con historia familiar de CM, sin embargo los estudios realizados no confirman el efecto fundador en personas de esta región (Duran y col., 2003). Específicamente, se ha visto asociada a una alta incidencia de CO familiar y en ciertos casos a la incidencia en familiares del sexo masculino (Schubert y col., 1997). Familias de AR con historia familiar de CO asociado a *BRCA2*, probablemente presentan mutaciones en la región de agrupación de cáncer de ovario (OCCR del inglés: **O**varian **C**ancer **C**luster **R**egion) (Figura 22), acotada por los nucleótidos 3035-6629 del gen (Gayther y col., 1997). La mutación c.3036_3039del4 comienza a un nucleótido del extremo 5' de esta región, sin embargo, la paciente a la que se le encontró la mutación no reportó historia familiar de CO. Resultaría interesante buscar esta mutación en muestras de pacientes con CO del tipo hereditario.

La siguiente mutación encontrada en el gen *BRCA2*, es una mutación que también cambia el sentido del marco de lectura (*frameshift*), debido a la inserción de una adenina entre los nucleótidos 21380 y 21382 del gen (MIM600185), dado que en la posición 21381 de la secuencia normal ya existe una adenina, por lo que no es posible determinar si la

inserción ocurre antes o después de ésta. El cambio altera el codón 835 del ARNm maduro y genera un codón de parada en el triplete 837, dando origen a una proteína truncada. Esta mutación, denominada c.2732_2734insA en el ARNm (U43746.1) y ubicada en el exón 11 del gen, no ha sido previamente reportada en la base de datos del BIC, ni publicada en otras investigaciones, por lo que no se ha determinado su importancia clínica, sin embargo, debido a que genera un codón de terminación temprana, podría ser vista como una mutación patológica. La paciente portadora de esta mutación en el presente estudio desarrolló CM a la edad de 48 años y presenta una pariente de primer grado con la enfermedad.

Se ha reportado que células portadoras de mutaciones deletéreas en *BRCA2*, acumularan progresivamente aberraciones cromosómicas. Deficiencias en este gen, dificultan la unión con RAD51 impidiendo que tenga lugar la recombinación reparadora en respuesta al daño. Los dominios BRC están mayormente codificados en el exón 11 del gen (Liu y col., 2002). Por su parte *BRCA1* y *BRCA2* se asocian entre si, a través de una región (nucleótidos 1314-1862), para formar el complejo BRCA1-RAD51-BRCA2, que participa en la respuesta celular al daño en el ADN. En consecuencia, células deficientes en *BRCA1/2* han mostrado una sensibilidad elevada a los agentes genotóxicos (Venkitaraman y col., 2001).

La frecuencia de mutaciones deletéreas que fueron encontradas en este trabajo es baja con respecto a la reportada en otras poblaciones (Tabla V), en los cuales se ha llevado a cabo el estudio molecular de la enfermedad. La baja frecuencia de mutaciones deletéreas encontradas en la muestra de 48 individuos de nuestra población podría estar asociada al bajo número de pacientes evaluados, y a que sólo se buscaron mutaciones en determinados exones del gen, no realizándose un análisis completo de la secuencia codificante. Así

mismo, la baja proporción de mutaciones patogénicas encontradas, podría estar también asociada a la sensibilidad del método, a la complejidad del espectro mutacional, a la severidad en los criterios de inclusión o a que en nuestra población se encuentran otras mutaciones (Konstantopoulou y col., 2000). Además de lo expuesto anteriormente, la baja frecuencia de mutaciones patogénicas encontrada podría ser un indicativo de que el establecimiento temprano no es el único factor determinante de la presencia de mutaciones en *BRCA*. Para aumentar la confiabilidad y precisión, es necesario incluir en el estudio un mayor número de pacientes y establecer criterios de inclusión más estrictos, así como la evaluación por otros métodos de detección de mutaciones.

Algunos autores optan por catalogar la carga familiar de incidencia de CM o CO en diferentes tipos, según la aplicación de modelos genéticos empíricos predictivos del riesgo, como Myriad II y BRCApro. Ambos modelos consisten en el cálculo, a través de un programa de computación, de la probabilidad que tiene un individuo particular de portar una mutación germinal en los genes *BRCA1* o *BRCA2*, dada la historia personal y familiar (con parentesco de primer y segundo orden) de CM y CO, tomando en cuenta la frecuencia mutacional de la población normal y la de los Judíos-Ashkenazi. En el programa se pueden incluir pacientes tanto hombres como mujeres, tomando en cuenta el diagnóstico (si tiene cáncer y de qué tipo), la edad de diagnóstico o la actual; clasificando a los pacientes en grupos o tipos según el número de familiares afectados, la bilateralidad, la presencia en individuos del sexo masculino y el inicio temprano. El uso de estos programas permite seleccionar con mayor confiabilidad pacientes portadores, discriminando los no portadores. Así mismo, en un estudio realizado por Esteban y colaboradores (2007) en individuos españoles, en el cual aplicaron dichos modelos para la clasificación de los pacientes,

encontraron que el 84 % de las mutaciones patogénicas encontradas se presentaban en dos tipos de grupos particulares. Uno de ellos caracterizado por pacientes con historia familiar tanto de CM como de CO o la presencia de ambos en la misma paciente y el otro grupo por pacientes con más de tres casos de CM en la familia.

Tabla V.- Frecuencia de mutaciones deletéreas observadas, en *BRCA1/2*, por diversos autores en diversas regiones del mundo.

Autor	Población	Frecuencia
Konstantopoulou y col., 2000	Grecia	20%
Tommasi y col., 2005	Italia	7%
Deng y col., 2003	China	11%
Osorio y col., 2002	España	35%
Laplace y col., 1999	Francia	24%

En relación a las técnicas para la detección de mutaciones, además de las utilizadas en este trabajo, han sido empleadas a nivel mundial, otras metodologías en la búsqueda de alteraciones en los genes *BRCA1/2*. La CSGE es junto con la SSCP, una de las más usadas (Spitzer y col., 2000; Osorio y col., 2002; Blesa y col., 2000; Duran y col., 2003 y Machado y col., 2007) y en ocasiones, la CSGE, ha mostrado un 100% de sensibilidad con respecto a la SSCP, sin embargo, la detección dependerá igualmente de los factores mencionados anteriormente en la FMPA y SSCP, debido a que también se implementa la electroforesis en geles de poliacrilamida. Así, en la detección de mutaciones en los genes *BRCA1/2*, se han implementado también técnicas que no requieren de la utilización de estos geles, tales como la DHPLC (Han y col., 2006 y Song y col., 2006), que dependerá al igual que en el caso de la CSGE de las conformaciones de la molécula de ADNdc, y la PTT (Blesa y col., 2000 y Duran y col., 2003), con la cual solo es posible detectar mutaciones que conducen a la

síntesis de proteínas truncadas.

A través de las distintas investigaciones se ha observado la preferencia de los autores por la aplicación de más de un método de búsqueda de alteraciones garantizando la detección de un mayor número de variantes, evitando la observación de falsos positivos o falsos negativos. El paso final común en todas las investigaciones es la secuenciación de aquellas muestras que presenten un patrón diferente al normal, estableciendo de forma certera el tipo de alteración presente. La característica común entre las metodologías propuestas es el laborioso procesamiento post-PCR necesario. Más recientemente, en 2002, se desarrollo una técnica rápida, sencilla y que requiere mucho menos procesamiento post-PCR, la HRM (Wittwer y col., 2003). Como se mencionó en la introducción, esta técnica se basa en la detección de cambios en la temperatura de *fusión* de un fragmento (producto de la amplificación por PCR) con respecto a una secuencia normal, por la presencia de una alteración genética y se lleva a cabo en un equipo de PCR en tiempo real con la adaptación de un *software* específico. Ha sido utilizada para el análisis de mutaciones en los genes *BRCA1/2* por De Leener y colaboradores (2008) y por Juan y colaboradores (2009). En el último estudio, se detectaron el 100% de las variables previamente encontradas mediante otras técnicas, además la HRM les permitió la detección de otras alteraciones no detectadas por los métodos anteriores e incluso fue posible evidenciar la presencia de más de una variante por fragmento, resultados que fueron corroborados finalmente mediante secuenciación. Los autores sugieren que es posible asegurar con bastante certeza, que las muestras que no muestren variación en la curva de fusión son portadores de la secuencia normal sin necesidad de secuenciarlos

Con este trabajo, el primero realizado en nuestro país, se pretendió dar inicio al diagnóstico molecular del riesgo de padecer CM, para conocer la frecuencia de las diferentes alteraciones de los genes *BRCA1* y *BRCA2* y relacionarlas con la patología, de tal manera que se puedan mejorar las medidas terapéuticas y profilácticas de la enfermedad. Este trabajo forma parte de un proyecto más grande que se lleva a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular Humana B (USB), en donde se están evaluando otras regiones de ambos genes en mujeres con CM del tipo hereditario.

La presencia de diferentes las mutaciones observadas en este estudio, podrían ser un indicativo de la gran heterogeneidad del espectro mutacional de los genes *BRCA1/2* en Venezuela, lo cual podría estar asociado a la gran diversidad de orígenes étnicos, gracias a la migración de variedad de poblaciones de regiones distintas del mundo a través de la historia de nuestro país, mezclándose con la población amerindia, e incluso con la ya mestiza. Así mismo, las propias características estructurales de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, favorecen la ocurrencia de mutaciones patológicas en casi cualquier región de cualquiera de los dos genes, sin que se pueda establecer entonces un patrón particular y en consecuencia se debe estudiar cada uno de los genes en las pacientes con CM del tipo hereditario que se quiera evaluar.

VII. CONCLUSIONES

- La técnica de FMPA fue efectiva en la evaluación de las mutaciones originarias de la población Judía-Ashkenazi, alteraciones que no estuvieron presentes en la población de AR para el CM evaluada en este trabajo. Sin embargo, con las condiciones ensayadas, no fue posible estandarizar esta técnica para la detección del resto de las mutaciones propuestas, pudiéndose detectar la mutación de uno de los controles y otra mutación en una muestra problema.
- La SSCP, técnica empleada como método alternativo para la detección de mutaciones, permitió la detección de cuatro mutaciones, de las cuales 3 fueron debidas a la sustitución de una base y una a la inserción de un nucleótido, en un total de 6 muestras de pacientes con CM de AR.
- De un total de 48 muestras de pacientes analizados con CM de AR, se detectaron, con los métodos moleculares empleados (FMPA y SSCP), 7 mutaciones diferentes, distribuidas en 8 pacientes, cinco en *BRCA1* y dos en *BRCA2*, de las cuales cuatro (8,3%) son mutaciones de cambio de sentido, dos de pérdida de sentido y una sinónima.
- Las mutaciones encontradas en el exón 11 de *BRCA1* (c.1128_1136insA, c.2201C>T, p.P871L y p.K1183R) y en el exón 11 de *BRCA2* (c.3036_3039del4) sugieren la influencia de la población caucásica, especialmente española, sobre la población venezolana, debido a que las alteraciones encontradas son recurrentes en dicha población.
- Finalmente, se logró la detección de dos mutaciones no reportadas previamente, una mediante FMPA (c.951_952insA en el exón 11 del gen *BRCA1*) y la otra por SSPC (c.2732_2734insA en el exón 11 del gen *BRCA2*), que podrían tener importancia clínica, sin embargo esto queda por ser determinado.

VIII. RECOMENDACIONES

De acuerdo a la evaluación de los resultados obtenidos durante la estandarización de la técnica de FMPA, se recomienda el diseño de nuevos cebadores para la amplificación de fragmentos más pequeños que incluyan las regiones donde se han detectado las mutaciones de interés planteadas en este trabajo, y que además, difieran poco en tamaño entre ellos, a fin de establecer grupos idóneos para el análisis múltiple en los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con la resolución esperada en todos los fragmentos (separación de fragmentos que difieran en 1 pb).

Se recomienda continuar el estudio molecular de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, para aumentar el número de datos, lo que permitirá establecer con mayor precisión el espectro mutacional de estos genes en la población venezolana y su implicación con el desarrollo de la enfermedad. Así mismo, tratar de seleccionar pacientes con al menos tres generaciones de CM/CO nacidos en Venezuela, lo que permitirá caracterizar adecuadamente nuestra población, para lo cual sería apropiado incluir en la planilla de recolección de datos, información sobre el origen étnico de la paciente. En la medida de lo posible.

IX. FINANCIAMIENTO

Este trabajo estuvo financiado por fondos del Laboratorio de Genética Molecular Humana B de la Universidad Simón Bolívar (Sartenejas), y el proyecto LOCTI N° 5662-08.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. BAUDI, F.; QUARESIMA, B.; GRANDINETTI, C.; CUDA, G.; FANIELLO, C.; TASSONE, P.; ZARBIERI, V. y colaboradores. 2001 Evidence of a founder mutation of *BRCA1* in a highly homogeneous population from southern Italy with breast/ovarian cancer. *Hum. Mutat.*: **18**:163-164
2. BETWISTLE, D.; ASHWORTH, A. 1998. Functions of the *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Curr opin Genet Dev.* **8**: 14-20
3. BLESA, J.; GARCIA, J.; OCHOA, E. 2000. Frequency of Germ-line *BRCA1* Mutations among Spanish Families from a Mediterranean Area. *Hum. Mutat.* **15**(4):381-382
4. BOWEN, D.; KEENEY, 2003. S. Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. *Thromb Haemost*; **2-89**:201.
5. BULLER, R.; SOOD, A.; LALLAS, T.; COLABORADORES. 1999. Association Between nonrandom X-chromosome inactivation and *BRCA1* mutation in germline DNA patients with ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**:339-346.
6. CIPOLLINI, G.; TOMMASI, S.; PARADISO, A.; ARETINI, P.; BONATTI, F.; BRUNETTI, I.; BRUNO, M. y colaboradores. 2004. Genetic alterations in hereditary breast cancer. *Annals of Oncology* **15**(1): i7-i13.
7. COOPER, T. 1997. The tools of Biochemistry. New Cork: John Wiley and Sons.
8. DALY, P. A. 2003. Cancer genetics or cancer genomics in the era of genomic medicine?. *Ann. Oncol.* **14**(3):19-25.
9. de la HOYA, M.; FERNÁNDEZ, J.; TOSAR, A.; GODINO, J.; SÁNCHEZ, A.; VIDART, J.; PEREZ, P.; DÍAZ, E.; CALDÉS, T. 2003. Association Between *BRCA1* Mutations and Ratio of Female to Male Births in Offspring of Females with Breast Cancer, Ovarian Cancer, or Both. *JAMA* **209**(7): 929-931.
10. DE LEENER, K.; COENE, I.; POPPE, B.; PAEPE, A.; CLAES, K. 2008. Rapid and Sensitive detection of *BRCA1/2* Mutations in a Diagnostic Setting: Comparison of Two High-Resolution Sequencing Platforms. *Clin Chem* **54**(6):982-989
11. DENG, S.; WANG, Y.; KE, Y.; XU, G. 2003. Analysis of the mutations of *BRCA1* in 9 familial breast cancer patients. *Beijing Da Xue Xue Bao.* **35**(4):373-6.
12. DOBROVIC, A.; SIMPFENDORFER D. 1997. Methylation of the *BRCA1* Gene in Sporadic Breast Cancer. *Cancer Res* **57**:3347-3350.
13. DURAN, M.; ESTEBAN, E.; VELASCO, E.; INFANTE, M.; MINER, C. 2003. Mutational Analysis of *BRCA2* in Spanish Breast Cancer Patients from Castilla-Leon: Identification of Four Novel Truncating Mutations. Valladolid, España. *Hum. Mutat.*

21(4):448.

14. ESTEBAN, E.; BOLUFER, P.; PALANCA, S.; BARRAGÁN, E.; OLTRA, S.; CHIRIVELLA, I.; SEGURA, A.; GUILLÉN, C.; MARTÍNEZ, E.; CUEVAS, D.; SALAS, D.; en representación del Grupo de Asesoramiento en Cáncer Hereditario de la Comunidad Valenciana. 2008. Mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* en familias estudiadas en el Programa de Consejo Genético en el Cáncer de la Comunidad Valenciana. *Med Clin (Barc)*. **130**(4):121-6
15. ESTRADA, A.; SANDOVAL, J.; GUEVARA, M.; FUJITA, R. 2005. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano *Rev. peru. biol.* **12**(3): 349- 358
16. FACKENTHAL, J.; OLOPADE, O. 2007. Breast cancer risk associated with *BRCA1* and *BRCA2* in diverse populations. *Nat Rev Cancer*, **7**:937-948.
17. FISCHER, S.; LERMAN, L. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory (screening for mutation/gel electrophoresis/helix-coil transition/A phage/restriction fragment). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:1579-1583
18. FRIEDMAN, Lori S.; OSTERMEYER, E.; SZABO, C.; DOWD, P.; LYNCH, E.; ROWELL, S.; KING, M. 1994. Confirmation of *BRCA1* by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian Cáncer in ten families. *Nat. Genet.* **8**:399-404.
19. GANGULY, A.; ROCK, M.; PROCKOP, D. 1993. 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. USA* **90**:10325-10329
20. GARCÍA, H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Diag.*; **1**(2):31-41.
21. GASSER, R.; HU, M.; CHILTON, N.; CAMPBELL, B.; JEX, A.; OTRANTO, D.; CAFARCHIA, C.; BEVERIDGE, I.; ZHU, X. 2007. Single-Strand conformation polimorfism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nat Protoc.* **1**:3121-3128.
22. GAYTHER, SA.; MANGION, J.; RUSSELL, P. y colaboradores. 1997. Variation of risk of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the *BRCA2* gene. *Nat Genet*; **15**: 103-5.
23. HALL, J.M.; LEE, M.; NEWMAN, B.; MORROW, J.; ANDERSON, L.; HUEY, B.; KING, M. 1990. Linkage of early-onset familial breast Cáncer to chromosome 17q21. *Science.* **250**: 1684–1689.
24. HAN, SH.; LEE, K.; LEE G.; KIM, B.; LEE, K.; CHUNG, W. Mutation analysis of *BRCA1* and *BRCA2* from 793 Korean patients with sporadic breast cancer. *Clin Genet.* **70**(6):496-501.
25. HAYASHI, H. 1991. PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of

Mutations in the Genomic DNA. *PCR Meth Appl* **1**:34-38

26. HEDENFALK, I.; UGGAN, D.; CHEN, Y.; ADMACHER, M.; ITTNER, M.; SIMON, R.; MELTZER, P.; y colaboradores. 2001. Gene-Expression Profiles In Hereditary Breast Cancer. *N Engl J Med* **344**:8
27. JARA, Lilian S.; AMPUERO, S.; SECCIA, L.; BUSTAMANTE, M.; BLANCO, R.; SANTIBAÑEZ, E.; REYES, J.; OJEDA, J. 2002. Frecuencia de la mutación 185delAG en el gen *BRCA1* en mujeres chilenas sanas con antecedentes familiares de Cáncer de Mama. *Rev. Méd. Chile*. **130**(10):1113-1123.
28. JUAN, I.; ESTEBAN, E.; PALANCA, S.; BARRAGAN, E.; BOLUFER, P. 2009. Advantages of the high resolution meeting in the detection of *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers. *Clin Biochem* **42**: 1572-1576
29. KENSHI H. 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR meth appl* **1**:34-38
30. KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R J. 2001. Breast Cancer mortality among Ashkenazi Jewish women in Sao Paulo and Porto Alegre, Brazil. *Breast Cancer Res*. **3**:270-275.
31. KONSTANTOPOULOU, I.; KROUPIS, C.; LADOPOULOU, A.; PANTAZIDIS, A.; BOUMBA, A.; LIANIDOU, S. y colaboradores. 2000. *BRCA1* Mutation Analysis in Breast/Ovarian Cancer Families from Greece. *Hum Mutat*. **16**(3): 272-273.
32. KORKKO, J.; ANNUMEN, S.; PIHLAJAMAA, T.; PROCKOP, D.; ALA-KOKKO, L. 1998. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: Comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proc. Acad. Sci. USA* **95**: 1681-1685.
33. KUPERSTEIN, G.; FOULKES, W. D.; GHADIRIAN, P.; HAKIMI, J.; NAROD, S. A. 2000. A rapid fluorescent multiplexed PCR analysis (FMPA) for founder mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Clin. Genet*: **57**:213-220.
34. LANG, B.; BURGER, G. 1990. A rapid high resolution DNA sequencing gel system. *Anal. Biochem*. **188**(1):176-180.
35. LEENER, K.; COENE, I.; POPPE, B.; DE PAEPE, A.; CLAES, K. 2008. Rapid and sensitive detection of *BRCA1/2* mutations in a diagnostic setting: Comparison of two high-resolution melting platforms. *Clin. Chem*. **54**(6): 982-989.
36. LITWINIUK, M.; ROZ, K.; FILAS, V.; GODLEWSKI, D.; STAWICKA, M.; KALETA, R.; BRE, J. 2008. Expression of estrogen receptor beta in the breast carcinoma of *BRCA1* mutation carriers. *BMC Cancer* **8**:100
37. LIU, Y.; WEST, S. 2002. Distinct functions of *BRCA1* and *BRCA2* in double-strand break repair. *Breast Cancer Res* **4**: 9-13
38. LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L. y MATSUDAIRA, P. 2000. *Molecular Cell Biology*. Baltimor, New York. Editorial Médica Panamericana. 4th. Edición.

39. LOZANO, J.; GALINDO, J.; GARCIA-BARRON, J; MARTINEZ-LIARTE, J.; PEÑAFIEL, R.; SOLANO, F. 2000. *Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud*. McGrawGill Interamericana. Segunda edición. Madrid, España.
40. LUQUE, J. y HERRÁEZ, A. 2001. *Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. Elsevier Science. Madrid, España.
41. MACHADO, P.; BRADAO, R.; CAVACO, B.; EUGENIO, J.; BENTO, S.; NAVE, M.; RODRIGUES, P.; FERNANDES, A.; VAZ, F. 2007. Screening for a *BRCA2* Rearrangement in High-Risk Breast/Ovarian Cancer Familias: Evidence for a founder Effect and análisis of the Associated Phenotypes. *J Clin Oncol* **25**: 2027-2034.
42. MARTINEZ, F.; VEGA, A.; CHIRIVELLA, I.; MARÍN, P. INSA, A.; LLUCH, A.; CARRACEDO, A.; CHAVES, F.; GARCIA, J. CERVANTES, A.; ARMENGOD M. 2003. Mutational Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* in Mediterranean Spanish Women with Early Oncet Breast cancer: Identification of Three Novel Pathogenic Mutations. *Hum. Mutat.* **22**(5):417-418.
43. MARKOFF, A.,; SORMBROEN, H.; BOGDANOVA, N.; PREISLER, S.; GANEV, V.; DWORNICZAL, B.; HORST, J. 1998. Comparison of conformation-sensitive gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism análisis for detection of mutations in the *BRCA1* gene using optimized conformation análisis protocols. *Eur J Hum Genet.* **6**:145-150.
44. MATHEWS, C. K.; VAN HOLD, K. E.; AHERN, K. G. 2002. *Bioquímica*. Pearson Educación, S. A., Madrid, España.
45. MAXAM, A.; GILBERT, W. 1977. A new method for sequencing DNA (DNA chemistry/dimethyl sulfate cleavage/hydrazine/piperidine). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**(2):560-564
46. MEFORD, H.; BAUMBACH, L.; PANGULURI, R.; WHITFIELD, C.; SZABO, C.; SMITH, S.; KING, M.; DUNSTON, G.; STOPPA, D.; ARENA, F. 1999. Evidence for a *BRCA1* Founder Mutation in Families of West African Ancestry. *Am. J. Hum. Genet.* **65**:575-578.
47. MIKI, Y. SWENSEN, J.; SHATTUCK, P.; FUTREAL, A.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S.; LIU, Q.; y colaboradores. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian Cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science.* **266**: 66-71.
48. MOLLER, P.; Borg, A.; HEIMDAL, K.; APOLD, J.; VALLON-CHRISTERSSON, J.; HOVIG, E.; MAEHLE, L.; Norwegian Inherited Breast Cancer Group y Norwegian Inherited Ovarian Cancer Group. 2001. The *BRCA1* syndrome and other inherited breast or breast-ovarian cancers in a Norwegian prospective series. *Eur. J. Cancer.* **37**(8):1027-32.
49. MUCHA, R.; CARVALHO, S.; HEINRICH, J.; YORIKO, J.; CABELLO, C.; ZEFERINO, L.; SCHMITT, F. 2005. Análisis of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in

- Brazilian besar cancer patients with positive family history. *Sao Paulo Med. J.* **123**(4) 192-197.
50. NATHANSON, L.; WOOSTER, R.; WEBER, B. 2001. Breast cancer genetics: What we know and what we need. *Nat med* **7**(5):552-556.
 51. NEDELCO, R.; LIEDE, A.; AUBÉ, J.; FINCH, A.; KWAN, E.; JACK, E.; NAROD, S.; RANDALL, S.; HUGEL, L.; CLARK, K. 2002. *BRCA* mutations in Italian breast/ovarian cancer families. *Eur J Hum. Genet.* **10**:150-152.
 52. ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKLYA, T.; HAYASHI, K. 1989. A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* **5**: 874-879.
 53. OSORIO, A.; DE LA HOYA, M.; RODRIGUEZ, R.; MARTINEZ, A.; CAZORLA, A.; GRANIZO, J.; ESTELLER, M.; RIVAS, C.; CALDÉS, T.; BENÍTES, J. 2002. Loss of heterozygosity analysis at the *BRCA* loci in tumor samples from patients with familial breast cancer. *Int. J. Cancer* **99**:305-309.
 54. PANGULURI, R.; BRODY-RAMA, L.; UTLEY, K.; ADAMS-CAMPBELL, L.; DAY, A.; WHITFIELD-BROOME, C.; DUNSTON, G. 1999. *BRCA1* mutations in African Americans. *Hum Genet* **105**:28-31
 55. PONZ, M. 1994. Familial and Hereditary Tumors. Recent Results in Cancer Research. Springer-Verlag.
 56. REED, G.; KENT, J.; WITWER, C. 2007. High Resolution DNA Melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* **8**(6): 597-608.
 57. RISCH, H.; MCLAUGHLIN, J.; COLE, D.; ROSEN, B.; BRADLEY, L.; KWAN, E.; JACK, E. y colaboradores. 2001. Prevalence and Penetrance of Germline *BRCA1* and *BRCA2* Mutations in a Population Series of 649 Women with Ovarian Cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **68**:700-710, 2001
 58. ROCHELEAU, MJ.; GREY, RJ.; CHEN, Y.; HARKE, HR.; DOVICH NJ. 1992. Formamide modified polyacrilamide gels for DNA sequencing by capillary gel electrophoresis. *Electrophoresis.* **13** (8):484-486.
 59. RODRIGUEZ, A.; CASTRO, D.; GONZALES, M.; MORALES, J. 2001. Frecuencia génica y porcentaje de mezcla en diferentes áreas geográficas de Venezuela, de acuerdo a los grupos RH y ABO. *Interciencia* **26**(1): 8-12.
 60. ROEST, P.; ROBERTS, R.; SUGINO, S.; VAN OMEN, G.; DEN DUNEN, J. 1993. Protein Truncation Test (PTT) for rapid detection of translation-termination mutations. *Hum Mol Genet* **2**: 1719-1721
 61. ROSENBAUM, V.; RIESNER, D. 1987. Temperature gradient gel electrophoresis; thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and cellular extracts. *Biophys. Chem.* **26**: 235-246.
 62. RUDKIN, T.; HAMEL, N.; GALVEZ, M.; HOGERVORST, F.; GILLE, J.; MØLLER,

- P.; APOLO, J.; Y FOULKES, W.; 2006. The frequent BRCA1 mutation 1135insA has multiple origins: a haplotype study in different populations. *BMC Medical Genetics* **7**:15
63. SAMBROOK, J.; FRITSCH E.; MANIATIS T. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Segunda edición. Estados Unidos.
64. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA Polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* **74**(12):5463-5467
65. SCHUBERT, E. LEE, M.; MEFFORD, H.; ARGONZA, R.; MORRW, J.; HULL, J.; DANN, J. y colaboradores .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**: 1031-1040.
66. SCULLY, R. 2000. Role of *BRCA* gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast Cancer Res* **2**: 324-330.
67. SCULLY, R.; PUGET, N. 2002. *BRCA1* and *BRCA2* in hereditary breast cancer. *Biochimie* **84**: 95-105.
68. SHEFFIELD, V.; BECK, J.; KWITEL, A.; SANDSTROM, D.; STONE, E. 1993. The Sensitivity of Single-Strand Coformation Polymorfism Análisis for the detection of singles Baese Substitutions. *Genomics* **16**: 325-332
69. SLATKO, BE.; ALBRIGHT, LM. 2001. Denaturing gel electrophoresis for sequencing. *Curr. Protoc. Mol. Biol.:* Capitulo 7, Unidad 7.6
70. SONG, C.;HU, Z.;YUAN, W.;DI, G.;SHEN, Z.;HUANG, W.;SHAO, Z. *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations of familial breast cancer from Shanghai in China. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **23**(1):27-31.
71. SPITZER, E.; ABBASZADEGAN, M.; SCHMIDT, F.; HAUSER, A.; BUWITT, U.; LAUTER, F.; TSCHICK, K.; KROCKER, J.; ELLING, D.; GROSSE, R. 2000. Detection of *BRCA1* And *BRCA2* Mutations in Breast Cancer Families by a Comprehensive Two-Stage Screening Procedure. *Int. J. Cancer:* **85**, 474 – 481
72. STOPPA-LYONNETL, D.; LAURENT-PUI, P.; ESSIUX, L.; PAGES, S.; ITHIER, G.; LIGOT, L.; FOURQUET, A.; SALMON, R.; CLOUGH, K.; POUILLART, P.; y the Institut Curie Breast Cancer Group. 1997. *BRCA1* Sequence Variations in 160 Individuals Referred to a Breast/ Ovarian Family Cancer Clinic. *Am. J. Hum. Genet.* **60**:1021-1030
73. TANNOCK, I.; HILL, R. 1998. The Basic Science of Oncology. Tercera Edición. McGrawHill Health Professions Division. Singapur.
74. TOMMASI, S.; CRAPOLICCHIO, A.; LACALAMITA, R.; BRUNO, M.; MONACO, A.; PETRONI, S.; SCHITTULLI, F.; LONGO, S.; DIGENNARO, M.; CALISTRU, D.; MANGIA, A.; PARADISO, A. 2005. BRCA1 mutations and

- polymorphisms in a hospital-based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italy. *Mutat Res.* **15**(1-2):395-405.
75. VELASCO, E.; ESTEBAN, E.; INFANTE, M.; DURÁN, M.; LASTRA, E.; GARCÍA, C.; MINER, C. 2002. 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)*; **119**(12): 441-5
76. VENKITARAMAN, A. 2001. Functions of *BRCA1* and *BRCA2* in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci.* **114**: 3591-3598.
77. WEINBERG, R. 1996. How Cancer Arises. *Sci. Am.* **275**(3): 32-40.
78. WEITZEL, J.; LAGOS, V.; BLAZER, K.; NELSON, R.; RICKER, C.; HERZOG, J.; MCGUIRE, C.; NEUHAUSEN, S. 2005. Prevalence of *BRCA* Mutations and Founder Effect in High-Risk Hispanic Families. *Cancer Epidem. Biomar.* **14**(7):1666-1671
79. WELCSH, L.; OWENS, N.; KING, MC. 2000. Insights into the functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *TIG.* **16**(2): 69-74.
80. WITWER, C.; REED, G.; GUNDRY, C.; VANDERSTEEN, J.; PRIOR, R. 2008. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clin. Chem.*, **49**: 853 - 860.
81. WOOSTER, R.; NEUHAUSEN, S.; MANGION, J.; QUIRK, Y.; FORD, D.; COLLINS, N. NGUYEN, K.; y colaboradores. 1994. Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene, *BRCA2*, to Chromosome 13q12-13. *Science.* **265**: 2088-2090.
82. WOOSTER, R. BIGNELL, G.; LANCASTER, J.; SWIFT, S.; SEAL, S.; MANGION, J.; COLLINS, N.; y colaboradores. 1995. Identification of the breast Cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature*: **378**: 789-792.
83. YOUNG, S.; PILARSKI, R.; DONENBERG, T.; SHAPIRO, C.; HAMMOND, L.; MILLAR, J. y colaboradores. 2009. The prevalence of *BRCA1* mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* **9**:86 doi:10.1186/1471-2407-9-86 (www.biomedcentral.com)
84. ZHU, X.; NIU, N.; LIU, Y.; DU, T.; CHEN, D.; WANG, X.; GU, H.; LIU, Y. 2006. Improvement of the sensitivity and resolution of PCR-SSCP análisis with optimizad primer concentrations in PCR products. *J Genet* **85**(3): 233-235

Consultas en línea:

85. Breastcancer.org. Pictures of Breast Anatomy. <http://www.breastcancer.org>. . [Consulta: 18 Diciembre 2009]
86. Brody, L. Breast Cáncer Information Core (BIC database). National Human Genome

- Research Institute. <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>. [Consulta: 10 Abril 2009]
87. Cancer Research UK: <http://info.cancerresearchuk.org>. [Consulta: 16 Marzo 2010]
88. Genetics Home Reference. BRCA1. U.S. National Library of Medicine®. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=brca1>. [Consulta: 18 Julio 2008]
89. Genetics Home Reference. BRCA2. U.S. National Library of Medicine®. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=brca2>. [Consulta: 18 Julio 2010]
90. National Center of Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Consulta: 15 Enero 2010]
91. Sociedad Americana del Cáncer. Datos y estadísticas del Cáncer en los hispanos/latinos 2003-2005. <http://www.cancer.org> [Consulta: 22 Abril 2009].
92. The Library of Congress Country Studies and the CIA World Factbook. Data as of December 1990. www.photius.com. [Consulta: 15 Abril 2010]

XI. ANEXOS

1. Consentimiento Informado
2. Planilla de Recolección de Datos de las pacientes
3. Diagrama explicativo de los grados de parentesco

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

(Hoja 1 de 3)

Título del Estudio: ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2* EN PACIENTES VENEZOLANAS CON CÁNCER DE MAMA

Objetivos de la investigación:

Usted está invitado a participar, donando una muestra de su sangre, en un estudio donde mediante análisis genéticos se detectará la presencia de alteraciones que pudieran estar determinando un aumento en la predisposición a sufrir de cáncer de mama.

Procedimientos:

El estudio tendrá una duración de tres años. Si usted acepta participar necesitaremos:

1. De una muestra de sangre (20 cc).
2. Que le suministre al médico tratante la información requerida para rellenar la historia médica.
3. Que podamos contactarlo en caso de requerir una segunda muestra o datos adicionales que complementen dicho estudio.

Con su muestra de sangre se procederá única y exclusivamente al análisis genético que permita determinar si usted posee algunas de las alteraciones genéticas conocidas que predisponen a la enfermedad antes mencionada. Los análisis genéticos serán realizados mediante técnicas de biología molecular que permitan identificar las alteraciones en aquellos genes relacionados con el cáncer de mama.

Su muestra será almacenada en Laboratorio de Genética Molecular Humana "B" bajo la responsabilidad de la Dra. Antonietta Porco. Parte de dicha muestra será empleada en la investigación y el resto será conservada hasta finalizar los estudios y posteriormente desechada.

Importancia y beneficios de su participación:

Mediante este estudio, que podrá realizarse gracias a su valiosa colaboración con sólo proporcionar una muestra de su sangre, se podrá avanzar en el entendimiento de las causas del cáncer de mama lo cual permitirá la aplicación, por parte del médico responsable, de tratamientos más efectivos para su mejoría. Los resultados obtenidos con su muestra, a su vez permitirán obtener datos que serán utilizados para establecer una estadística de las causas del cáncer de mama en nuestro país.

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN (continuación)
(Hoja 2 de 3)

Los resultados obtenidos una vez finalizado este estudio serán publicados en revistas científicas especializadas.

Riesgos:

Su participación no implica riesgo ni inconveniente para su salud ni la de sus familiares.

Confidencialidad:

Todos los datos obtenidos de la investigación serán mantenidos en absoluto secreto y toda la información sobre su persona será solo accesible a los investigadores y médicos involucrados en el estudio. Su identidad no será hecha pública en ninguno de los manuscritos científicos o en las presentaciones que se realicen en eventos científicos.

Derecho a negarse a participar:

La participación en este estudio es voluntaria. Usted puede negarse a participar en el estudio o interrumpir su participación en cualquier momento. Si usted se niega a participar en el estudio, esto no afectará el tipo de atención que recibirá por parte de su médico.

Preguntas:

Debido a que se utilizaron algunos términos técnicos en este formulario de consentimiento, si existe algo que usted no entienda, por favor pregunte sobre esto sin dudar.

Por favor tome su decisión de participar en este estudio sólo después de haber examinado detenidamente el contenido de este formulario.

En caso de emergencia o que tenga cualquier pregunta, en cualquier momento sobre el estudio por favor contacte al investigador principal o al médico responsable:

Investigador Principal:
Dra. Antonietta Porco G.

Telf: 0412-9525180
Correo Elect: aporco@usb.ve

Centro de Investigación:
Laboratorio de Genética
Molecular Humana "B"
Universidad Simón Bolívar
Telf: 0212-9064217

Médico Responsable:
Dr. Jorge Pérez Fuentes

**Centro Clínico de
Estereotaxia (CECLINES)**
Avenida Libertador. Edif.
Ciclar - Caracas

Telf: 0414-3190999

Telf: 0212-7621771

Correo Elect: peregon@cantv.net

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN (continuación)

(Hoja 3 de 3)

Consentimiento:

Yo, _____ portador(a) de la cédula de identidad _____ he sido informado(a) de manera amplia, clara y sencilla y mis preguntas han sido contestadas en relación al estudio sobre el "ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES BRCA1 Y BRCA2 EN PACIENTES VENEZOLANAS CON CÁNCER DE MAMA", que se llevará a cabo en forma conjunta entre el Laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad Simón Bolívar (USB) y el Centro Clínico de Estereotaxia (CECLINES), coordinado por la Dra. Antonietta Porco y por lo tanto manifiesto estar de acuerdo en participar en él, por lo que autorizo me sean tomadas las muestras sanguíneas necesarias para tal fin. He recibido una copia de este consentimiento.

Nombre y apellido: _____

Firma: _____

Fecha: / /

Firma del investigador
principal

Testigos:

Nombre y apellido

C.I.

Firma

1.

2.



UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR
 División de Ciencias Biológicas
 Departamento de Biología Celular
 Laboratorio Genética Molecular Humana "B"

Código Paciente: _____

**ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LOS GENES BRCA1 Y BRCA2 EN PACIENTES VENEZOLANAS
 CON CÁNCER DE MAMA**

I. Datos de identificación del paciente

Apellidos: _____,
 Nombres: _____,
 Edad: _____, Sexo: F _____ M _____, Referido por: CECLINES _____ SA _____ Otro _____,
 Lugar de Nacimiento _____,
 Teléfono _____ / _____,
 Dirección _____,
 N° Historia Centro Médico _____
 Edad de la primera menstruación _____ Fecha de la última menstruación _____,
 Menopausia: Si _____ No _____ Natural _____ Quirúrgica _____
 Embarazos a término: Si _____ No _____ Cuántos _____, Lactancia materna: Si _____ No _____

II. Historia Clínica

Historia Personal de Cáncer de Mama: Si _____ No _____ (MD _____ MI _____)

(MD: Mama Derecha; MI: Mama Izquierda)

Edad del diagnóstico: _____

Historia Personal de otros tipo de cáncer: Si _____ No _____ (O _____ E _____ CU _____ C _____ Otro _____)

(O: Ovario; E: Endometrio; CU: Cuello Uterino; C: Colon)

Tratamiento: MP _____ MT _____ VA _____ GC _____ R _____ Q _____

(MP: Mastectomía parcial; MT: Mastectomía total; VA: Vaciamiento axilar; GC: Ganglio centinela;

R: Radioterapia; Q: Quimioterapia)

Historia Familiar de Cáncer Mάma: Si _____ No _____ (Madre _____ Hermana _____ Abuela _____ Hija _____
 Otro _____).

Historia Familiar de otros tipo de cáncer: Si _____ No _____ (O _____ E _____ CU _____ C _____ Otro _____)

(O: Ovario; E: Endometrio; CU: Cuello Uterino; C: Colon)

Medicamento(s) consumido(s)

actualmente: _____,

Anticonceptivos Orales: Si _____ No _____ ¿Cuál(es)? _____ ¿Por cuánto tiempo? _____,

Hormonas: Si _____ No _____ ¿Cuál(es)? _____ ¿Por cuánto tiempo? _____,

Biopsias anteriores: Si _____ No _____ Mama derecha _____ Mama Izquierda _____ Resultado _____,

III. Características Histopatológicas

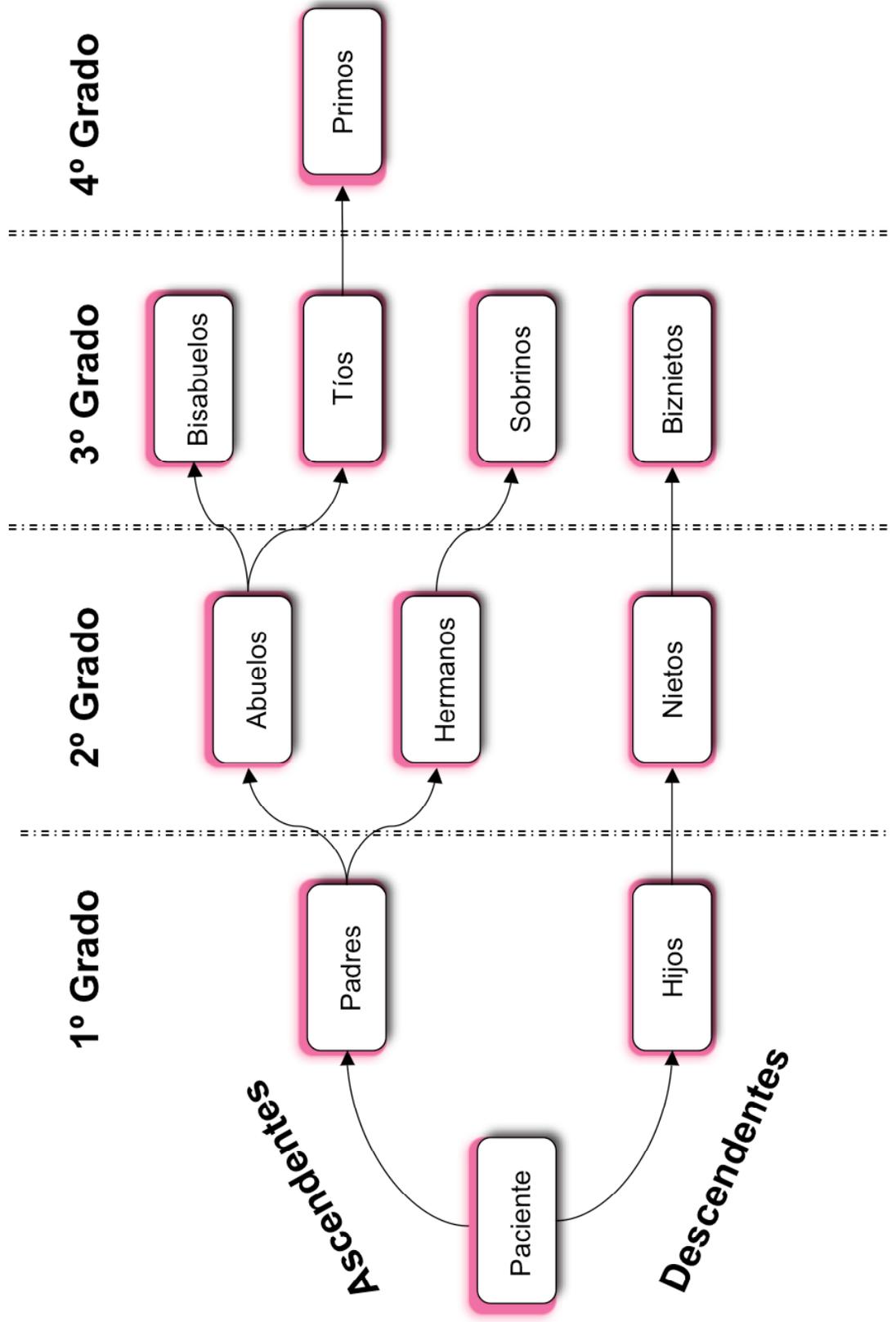
Receptores de Estrógeno: Positivo _____ Negativo _____

Receptores de Progesterona: Positivo _____ Negativo _____

Otros: _____

IV. Observaciones: _____

Anexo 3. Diagrama explicativo de los grados de parentesco.
Tomado y modificado de: www.fsie-cl.org/noticiasjuridicas/gradosparentesco.pdf



INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	8
1. El Cáncer.....	8
1.1. Aspectos Genéticos del Cáncer.....	10
1.1.1. Oncogenes	11
1.1.2. Genes oncosupresores.....	12
2. Cáncer de Mama.....	13
2.1. Cáncer de Mama de Tipo Esporádico	15
2.2. Cáncer de Mama de Tipo Hereditario.....	16
2.2.1. Genes <i>BRCA</i> de Susceptibilidad para el Cáncer de Mama	17
2.2.2. Pérdida de Heterocigosidad.....	22
2.2.3. Mutaciones en los Genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	23
2.2.3.1. Métodos para la detección de mutaciones.....	30
III. OBJETIVOS.....	39
Objetivo General.....	39
Objetivos Específicos.....	39
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1. Obtención de las muestras y selección de los pacientes	41
2. Aislamiento del ADN genómico.....	42
3. Electroforesis en geles de agarosa.....	45
4. Amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	45
4.1. Condiciones de la PCR.....	46
4.2. Ciclos de Amplificación.....	49
5. Electroforesis en geles de poliacrilamida	50
6. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, para el análisis por tamaño (FMPA).....	51
7. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones renaturalizantes, para el análisis por conformación (SSCP)	52
8. Revelado de los geles de poliacrilamida.....	54

9. Secuenciación.....	55
V. RESULTADOS.....	56
1. Obtención de muestras y selección de pacientes.....	57
2. Aislamiento del ADN genómico.....	58
3. Detección de mutaciones en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	59
• Detección de mutaciones comunes de origen Judío-Ashkenazi.....	59
• Detección de mutaciones de origen europeo, italiano, africano y latino-americano	62
4. Detección de mutaciones mediante el Análisis de Polimorfismos de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP).....	69
5. Detección de la mutación c.5083del19.....	76
VI. DISCUSIÓN.....	79
VII. CONCLUSIONES.....	107
VIII. RECOMENDACIONES.....	108
IX. FINANCIAMIENTO.....	108
X. BIBLIOGRAFÍA.....	109
Consultas en línea:.....	115
XI. ANEXOS.....	117
INDICE GENERAL.....	118

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1-.** Casos de cáncer mas comúnmente diagnosticados (izquierda), y número de muertes (derecha) estimadas en ambos sexos a nivel mundial para el 2002 por el centro de investigación del cáncer del Reino Unido (<http://www.cancerresearchuk.org>).....6
- Figura 2-.** Número de nuevos casos de cáncer diagnosticados anualmente en ambos sexos, estimados a nivel mundial, por el centro de investigación del cáncer del Reino Unido (<http://www.cancerresearchuk.org>). ...8
- Figura 3-.** Corte longitudinal de la mama de una mujer adulta, indicando las partes que la componen (Tomado y modificado de www.breastcancer.org).....14
- Figura 4-.** Ubicación de los genes BRCA y BRCA2: A la izquierda, esquema del cromosoma 17, donde a través de una flecha se indica la ubicación del gen BRCA1 (Extraído de: <http://promega.files.wordpress.com/2009/03/brca1.jpeg>). A la derecha el esquema del cromosoma 13, indicando la ubicación del gen BRCA2 a través de una flecha (Extraído de: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=brca1> y de: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=palb2>).17
- Figura 5-.** Estructura de los genes BRCA1 y BRCA2: En la parte superior, BRCA1 con sus 24 exones y BRCA2 en la parte inferior con sus 27 exones. (Tomado de Fackenthal y col., 2007)18
- Figura 6-.** Interacciones de BRCA1 y BRCA2: Representación esquemática de las interacciones de BRCA1 y BRCA2 con otras proteínas o complejos proteico. Tomado de: Liu y West, 2002.21
- Figura 7-.** Pérdida de Heterocigosidad (LOH). Se esquematizan los dos mecanismos por los cuales puede ocurrir: segregación anormal o recombinación mitótica. (Tomado de Lodish y col., 2000).23
- Figura 8-.** Representación esquemática comparativa de distintas técnicas para la detección de mutaciones basadas en la utilización de electroforesis en geles de poliacrilamida. En la Figura (A) se muestra el esquema de una CSGE, en la (B) una SSCP y en la (C) una DGGE. (Tomado y modificado de: Gasser y col. 2007).33
- Figura 9-.** Gel de FMPA obtenido por Kuperstein y colaboradores: Se muestran dos resultados obtenidos por Kuperstein y colaboradores luego del análisis de los productos de PCR en los geles desnaturalizantes de poliacrilamida, para cada una de las poblaciones. A la izquierda el resultado obtenido para las tres mutaciones evaluadas en la población Judía-Ashkenazi y a la derecha el resultado de las 5 mutaciones evaluadas en la población francesa canadiense. En cada caso se enumeraron los carriles y se indica mediante un signo positivo aquellos individuos portadores de las mutaciones y con un signo negativo los individuos normales donde esta ausente la mutación. En cada caso se indica además el fragmento correspondiente a cada banda. Por ejemplo, a la izquierda, la mutación c.185_186delAG para la población Judía-Ashkenazi, se muestra en el primer carril un paciente no portador de la mutación, en el segundo carril se tiene un paciente portador de la mutación y se observa un cambio en la movilidad electroforética, debido a que la delección de 2pb origina un producto de PCR 2 nucleótidos mas pequeño que el correspondiente al alelo normal por lo cual tiene una mayor movilidad (Kuperstein y col. 2000). 35
- Figura 10-.** Plan de trabajo y orden de actividades realizadas para la obtención de los resultados y análisis final de los mismos.44
- Figura 11-.** Registro fotográfico de una corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8% del ADN_g aislado a partir de algunas de las pacientes seleccionadas, con cáncer de mama del tipo hereditario.59
- Figura 12-.** Registro fotográfico del resultado de dos electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, de productos de la PCR del grupo 1: con los tres (3) fragmentos contentivos de las mutaciones de origen Judío-Ashkenazi para algunos de los pacientes evaluados. (A)PCR-Múltiple (185delA, 5382insC y 6174delT): En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb, en los carriles 2 al 7 e observan las muestras de los pacientes evaluados y en el último carril se encuentra el control negativo de la reacción de PCR. (B) Mezcla de PCR Múltiple (185delAG y 5382insC) y PCR convencional (6174delT): En el primer carril se observa el marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb, en los carriles 2 al 8 se observan las muestras de los pacientes evaluados y en el último carril se encuentra el control negativo de la reacción de PCR.60
- Figura 13-.** Registro fotográfico del resultado de una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, de los fragmentos de ADN, donde se han localizado las mutaciones comunes fundadoras para la población Judía-Ashkenazi, de algunos de los pacientes en estudio.62
- Figura 14-.** Registro fotográfico de algunas electroforesis en geles de agarosa al 2,5 %, donde se evaluó el resultado de cuatro PCRs múltiples durante el proceso de estandarización, a diversas condiciones. Se muestra el marcador de peso molecular en el primero o el último carril de cada según se indica. En los carriles siguientes se muestran los productos de PCR de las muestras de algunas pacientes y el₁₂₅

respectivo control negativo de cada reacción. En la imagen se indica a que grupo de PCR corresponde cada gel y las condiciones de concentración de magnesio y temperatura de alineamiento evaluadas.....64

Figura 15.- Registro fotográfico del resultado de tres electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, para los fragmentos contentivos de las mutaciones seleccionadas en el grupo 2 de PCR y electroferograma de una variante. En la Figura A se observa un gel al 4%, en la B un gel al 6% y en la Figura C un gel al 8% de concentración de poliacrilamida. Las bandas de mayor tamaño (442pb), en cada uno de los geles, corresponden al fragmento del exón 11-1 del gen BRCA1, la segunda banda de 270pb, corresponde al exón 23 del gen BRCA2 y la banda más pequeña de 121pb, corresponde a la región 11-15 del exón 11 del gen BRCA2. Cada carril se identifica con el número de la paciente analizada (CM0__). En la figura C se muestra además una sección del electroferograma obtenido del exón 11-1 de la muestra CM068 en donde se encontró la mutación c.951_952insA.66

Figura 16.- Registro fotográfico de dos electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes para la detección de mutaciones de tipo delección e inserción y electroferograma de una variante. En la Figura A se muestra un gel realizado bajo las condiciones iniciales propuestas por Kuperstein y colaboradores (2000), donde se muestran los fragmentos de interés de algunas de las pacientes de alto riesgo, para los grupos de PCR múltiple 2, 3 y 5. En la Figura B se aprecia un gel realizado bajo las modificaciones propuestas por Lang y Burger (1990), donde se muestran los fragmentos contentivos de mutaciones de algunas de las pacientes de alto riesgo, para los grupos de PCR múltiples 2 y 5. Se muestra también una sección del electroferograma obtenido de la secuenciación del fragmento 11-3 del gen BRCA2 de la muestra de la paciente CM046.68

Figura 17.- Registro fotográfico del resultados de algunas PCR efectuadas para posterior análisis mediante SSCP, en electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %. Se muestran 3 de los exones evaluados; 11-4, 11-1 y 11-7 de BRCA1 y 11-3 de BRCA2, con tamaños de 415 pb, 442 pb, 296 pb y 407 pb respectivamente. En el primer carril de cada gel se corrió un marcador de peso molecular de 100 pb, indicando lo que corresponde a la banda de 500 pb. En los carriles se indican los números de los pacientes sin el prefijo CM0__).70

Figura 18.- Registros fotográficos de los geles obtenidos mediante la técnica de SSCP para los fragmentos de interés en el gen BRCA1 y electroferogramas de las variantes. Con una flecha se indican aquellas pacientes en las que se observó diferencia en la movilidad electroforética y así mismo se enviaron posteriormente a secuenciar. Con un asterisco se identifican aquella paciente empleada como control con una mutación conocida (1135insA).72

Figura 19.- Registros fotográficos de los geles obtenidos mediante la técnica de SSCP para os fragmentos de interés en el gen BRCA2 y electroferograma de una variante. Con una flecha se indican aquellas pacientes en las que se observo diferencia en la movilidad electroforética y así mismo se enviaron posteriormente a secuenciar. Con un asterisco se identifica aquellas pacientes control con una mutación conocida (c.3036_3039del4). En la figura A se aprecia el electroferograma de la muestra de la paciente CM053 que presentó la mutación c.2732_2734insA. En la Figura D se muestra la repetición de las muestras que presentaban un patrón de corrida distinto.75

Figura 20.- Productos de PCR del exón 16 de BRCA1 para la detección de la mutación 5083del19. En la Figura A se muestra un resultado de la corrida electroforética en geles de agarosa al 1,5 % de los productos de PCR del exón 16, en el primer carril se tiene el marcador de peso molecular de 100 pb, indicando la banda de 500 pb, en los siguientes carriles se muestra el amplicón obtenido para cada una de las pacientes indicadas y en el último carril el control negativo de la reacción. En la Figura B se muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida de algunas de las pacientes estudiadas, mostrando en los primeros 11 carriles el amplicón de 448 pb de cada una de las pacientes indicadas y en el último carril el marcador de peso molecular con dos bandas de 462 pb y 442 pb (20 pb de diferencia).77

Figura 21.- Elementos repetitivos de ADN en los genes BRCA1 y BRCA2. (a) Estructura genómica de BRCA1. (b) Distribución de los elementos repetitivos en el gen BRCA1. Los elementos Alu se muestran en amarillo y comprenden el 42% del gen respecto a todas las regiones repetitivas que abarcan el 47%. (c) Estructura genómica de BRCA2. (d) Distribución de los elementos repetitivos en el gen BRCA2. Los elementos LINE y MER se muestran en rojo, magenta y azul, y comprenden el 27% del gen, elementos Alu (20%). Tomado de Welch y col 2001.80

Figura 22.- Dominios funcionales de las proteínas BRCA1 y BRCA2. Tomado y modificado de Bertwistle y Ashworth, 1998.96

Figura 23.- Representación esquemática de los codones de terminación prematura de la transcripción en el ARNm de BRCA1. Tomada Perrin-Vidoz, 2002.99

