

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA E IDENTIFICACIÓN DE
MUTACIONES ASOCIADAS A LOS GENES DE
SUSCEPTIBILIDAD HEREDITARIA AL CÁNCER DE MAMA
EN LA POBLACIÓN COSTARRICENSE

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Biología para optar
por el grado de Magister Scientiae en Biología con énfasis en
Genética y Biología Molecular

ADRIANA PATRICIA RAMÍREZ MONGE

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2008

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mis padres y a mi hermana que me han apoyado siempre y sin los cuales el alcance de esta meta no hubiera sido posible.

Así mismo, ellos son los principales dueños de mi agradecimiento sin embargo no puedo dejar de pensar en este momento en todas aquellas personas que de una u otra forma han estado a mi lado todos estos años acompañándome en los buenos y sobre todo en los malos momentos. Sin ellos a mi lado estaría todavía muy lejos de terminar de recorrer el camino.

Gracias a todos, que sin necesidad de mencionarlos me atrevo a decir, saben quienes son con gran certeza.

Gracias de nuevo, desde lo más profundo de mi corazón.

“Esta tesis fue aceptada por la comisión del Programa de Estudios de Postgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica como requisito parcial para optar por el grado de Magister Scientiae en Biología con énfasis en Genética Humana y Biología Molecular.”



Dr. Ramiro Barrantes Mesén
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado



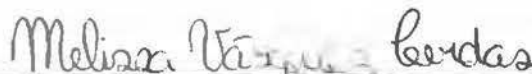
Ph.D. Gustavo Gutiérrez Espeleta
Director de Tesis



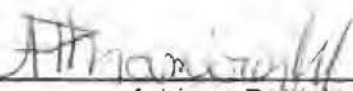
M.Sc. Henriette Raventós Vorst
Asesora



Dr. Alejandro Leal Esquivel
Asesor



M.Sc. Melissa Vásquez Cerdas
Representante
Director Programa de Posgrado en Biología



Adriana Patricia Ramírez Monge
Candidata

Índice

Dedicatoria.....	ii
Índice.....	iv
Prólogo.....	v
Descriptores:.....	v
Estado actual del conocimiento:.....	v
Cáncer de mama.....	vi
Descripción del cáncer de mama.....	vii
Métodos de diagnóstico.....	xiii
Referencias.....	xix
<i>BRCA1 and BRCA2 mutational analysis in Costa Rican Breast Cancer Families</i>	23
Abstract.....	23
Material and Methods.....	25
Studied population:.....	25
Laboratory methods.....	26
Results.....	27
Discussion.....	27
Referentes.....	31
Anexos.....	34
Genealogías de las familias estudiadas.....	34
Significado de la simbología.....	92
Cuadro 1 Características de las familias seleccionadas para el estudio.....	93
Cuadro 2. Resultados de los análisis de mutaciones obtenidos para las familias estudiadas.....	95

Prólogo

Descriptores:

Cáncer de mama, herencia, genes de susceptibilidad, BRCA1, BRCA2, mutaciones, factores de riesgo.

Estado actual del conocimiento:

El cáncer es un conjunto de múltiples enfermedades que afectan muchos tipos de células y tejidos. Una característica de todos los tipos de cáncer es la presencia de mutaciones que afectan el genoma y la expresión de los genes. En algunos casos estas mutaciones pueden presentarse en la línea germinal y pasar a la generación siguiente, pero es más común que se presenten en células de tejido somático y por tal razón no sean heredables (Hartl y Jones 2000).

Las mutaciones que se presentan en el genoma pueden ser a gran o pequeña escala, es decir abarca desde mutaciones puntuales hasta reordenaciones cromosómicas, aneuploidías e incluso la integración de genomas virales en el cromosoma. En los seres humanos los cambios genómicos a gran escala son lo que se presenta mayormente en los tumores (Hartl y Jones 2000, Ponder 2001).

El cáncer se desarrolla porque los mecanismos que controlan el ciclo celular funcionan de forma inadecuada o dejan de funcionar del todo. Estas anomalías hacen que las células tengan un número mayor de divisiones del que deberían tener antes de morir, produciendo el desarrollo de una masa celular anormal, que es lo que se conoce como tumor. Esto ocurre porque las células ignoran los controles normales de proliferación y siguen sus propias instrucciones internas de reproducción (Weinberg 1996, Hartl y Jones 2000). Cabe destacar que varios investigadores han identificado cinco características relacionadas con las células cancerosas que son: no hacer caso de las señales que detienen la proliferación, la capacidad de mantener la proliferación, evasión de la apoptosis o muerte celular programada, invasión de otros tejidos o metástasis y la capacidad de desarrollar nuevos vasos sanguíneos proceso llamado angiogénesis o neovascularización (Ruoslahti 1996, Weinberg 1996, Ponder 2001).

Varias de estas características de las células tumorales o cancerosas son producto de dos tipos de genes que juegan papeles fundamentales en el desarrollo del cáncer, los protooncogenes y los genes supresores de tumores. Ambos están relacionados de forma directa con el inicio del cáncer y en sus versiones normales controlan en ciclo celular. Los protooncogenes activan el ciclo celular, mientras que los genes supresores de tumores lo inhiben (Weinberg 1996, Hartl y Jones 2000, Ponder 2001).

Los genes mutados de los protooncogenes reciben el nombre de oncogenes y están relacionados con eventos genéticos de ganancia de función, porque ellos aumentan de forma inadecuada la expresión de genes que promueven la proliferación celular o inhiben la apoptosis. Estos genes incluyen ciclinas, receptores de factores de crecimiento, CDKs (calcinas dependientes de quinasas –cycline dependant kinasas-) y otros. Al contrario los genes supresores de tumores son genes involucrados con mutaciones de pérdida de función; su función normal es dar control negativo a los controles de división celular o activar apoptosis. Al estar mutados pierden su función normal y contribuyen de esta forma al progreso del cáncer (Weinberg 1996, Hartl y Jones 2000, Ponder 2001).

Cáncer de mama

El cáncer de mama posee una de las mayores tasas de incidencia y mortalidad en la población femenina mundial, siendo en algunos países la principal causa de muerte para dicho sexo. Actualmente se diagnostican al menos un millón de nuevos casos por año a nivel mundial (Ruiz *et al.* 2002) Por ejemplo es el cáncer de mayor prevalencia para las mujeres de occidente siendo en los Estados Unidos la principal causa de muerte para mujeres mayores de 50 años (Gryzoowska *et al.* 2002). Así mismo se espera que para este año se diagnostiquen un total de 250 230 casos nuevos de cáncer de mama solamente en esta población (Anónimo 2008).

En Argentina se estima que 1 de cada 8/9 mujeres padecerán de cáncer de mama en algún momento de su vida (Kowalyszyn 2002). Además en los países de oriente se repite la situación. Tal es el caso de la India, país en el que el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común entre las mujeres (Kumar *et al.* 2002).

Costa Rica no es la excepción. Al igual que en otros países del mundo, el cáncer de mama posee el primer lugar en incidencia y mortalidad entre los tumores que afectan a las mujeres de nuestro país. Su incidencia se manifiesta en forma importante a partir de los 25 años de edad, pero no es sino a partir de los cuarenta años de edad donde se comienza a presentar más frecuentemente y aumenta en forma proporcional (Registro Nacional de Tumores, datos no publicados)

Descripción del cáncer de mama

El cáncer de mama al igual que todos los tipos de cáncer es resultado de la presencia de mutaciones en una única célula la cual comienza a dividirse de forma descontrolada formando una neoplasia en el tejido mamario y al igual que otros cánceres se caracteriza por tener clonalidad de células, autonomía, anaplasia y metástasis a otros tejidos (Friedewald *et al.* 1997).

El cáncer de mama se origina en el seno, el cual está compuesto de diferentes estructuras y tejidos. En el centro de cada seno se halla el pezón y la areola es el tejido de color oscuro que lo rodea; debajo de la piel, el seno está compuesto por varios tipos de tejido, siendo su mayoría de tipo adiposo. Dentro del tejido adiposo están las glándulas productoras de leche, llamadas lóbulos, los cuales desembocan en los ductos, que son tubos delgados que llevan la leche al pezón. También hay nervios, vasos sanguíneos y tejido conectivo. Además dentro del seno corre la red de vasos linfáticos, que se conectan con los tres grupos de nódulos linfáticos: los axilares, los supra claviculares y los paraesternales (Basett & Gold 1987, Friedewald *et al.* 1997).

La célula que genera el cáncer generalmente está dentro de los lóbulos (en un 10 % de los casos) y en los ductos (en un 80% de los casos), porque estas células están sometidas a estímulos de crecimiento dados por los estrógenos y la progesterona en ciertos períodos del ciclo menstrual. El cáncer que se desarrolla en estos tejidos puede permanecer en estado latente o en un estado donde sea imperceptible, ya que los tumores cuando alcanzan cierto número de células llegan al equilibrio. Este equilibrio se describe como el momento en el que el número de células que muere es igual al número de células que se producen. Finalmente, luego de que

se den varios procesos como la angiogénesis, el tumor crece al tener acceso a oxígeno y nutrientes, se da un aumento en el número de células y la masa se vuelve perceptible (Folkman 1996, Friedewald *et al.* 1997).

Los carcinomas se presentan con más frecuencia en unas zonas del seno que en otras; 25% de los tumores se presenta bajo el pezón, en los cuadrantes superiores se desarrollan la mayoría de los carcinomas. Un 45% en el cuadrante superior externo y un 15 % en el cuadrante superior interno. Los cuadrantes inferiores son los que menor porcentaje presentan un 10% se presentan en el cuadrante externo y un 5% en el interno (Basett & Gold 1987).

Los tumores que se presentan pueden ser localizados o infiltrantes. Esta clasificación depende de que el tumor se encuentre confinado a una zona específica del seno o de que atravesase el tejido donde se origina y afecte tejidos vecinos. El carcinoma ductual infiltrante es el más común y se presenta en un 80 % de los casos (Pérez 1983, Friedewald *et al.* 1997, Chen 2002). También se presentan varios estadios que valoran al tumor según el tamaño de la masa tumoral y por presencia/ausencia de metástasis; cinco estadios que van desde el 0 hasta el IV, siendo el primero el más temprano y fácil de erradicar y el último el que presenta metástasis a otros órganos (Aguilar 1995, Friedewald *et al.* 1997).

Dentro de dicha patología se encuentran dos tipos de casos: los esporádicos y los que son producto de afecciones genéticas hereditarias. De la totalidad de los casos que se presentan en la población, de un 5-10% de los casos de cáncer de mama, presentan un factor de tipo hereditario (Márquez y Trujillo 1999, Peterson *et al.* 2002). El cáncer de mama hereditario posee ciertas características cuando se compara con el no heredado o esporádico: la edad de aparición es notablemente más temprana, se puede encontrar en mujeres de edad inferior a los 20 años, la prevalencia de cáncer bilateral (ambos senos) es más alta y en algunas personas aparecen otros tipos de tumores asociados (Márquez y Trujillo 1999).

El cáncer de mama, tanto los esporádicos como los heredados se ha relacionado con ciertos factores que tienen que ver con la etiología de la enfermedad y con un aumento de su riesgo. Algunos de estos factores son:

➤ **La edad:** El riesgo de padecer cáncer de mama aumenta con la edad. Esto se ve como un aumento en la incidencia de casos según aumenta la edad. Más de $\frac{3}{4}$ partes de los cánceres de mama aparecen a los 50 años y más de la mitad en mujeres de 65 años o más. La edad se relaciona como con cualquier tipo de cáncer por el hecho que le permite a las células acumular el número necesario de mutaciones para que se de el descontrol del ciclo celular (Pérez 1983, McPherson *et al.* 2000)

➤ **Edad de la menarquia y la menopausia:** Estos factores se relacionan con las hormonas sexuales de la mujer. Los estrógenos y la progesterona son agentes mitóticos que provocan la división celular de los diferentes tejidos del seno (Friedewald *et al.* 1997 Chen 2002). Cuanto más temprano se de la primer menstruación las células pasarán por más ciclos de división lo que hace que aumenten las posibilidades de que se de un error en la replicación o reparación del ADN. Lo mismo ocurre si la edad a la que se da la menopausia es tardía. El riesgo es dos veces más alto para mujeres que tuvieron la menopausia a los 55 años con respecto a las que la tuvieron antes de los 45 años. Las mujeres que se han sometido a ooforectomías antes de los 35 años poseen únicamente un 40% del riesgo de desarrollar cáncer de mama de mujeres que han tenido una menopausia natural (Friedewald *et al.* 1997, McPherson *et al.* 2000).

➤ **Edad del primer embarazo:** El riesgo de mujeres que han tenido su primer hijo después de los treinta años es aproximadamente del doble del de una mujer que haya tenido su primer hijo antes de los 20 años. Se cree que los cambios hormonales que se producen durante el embarazo producen algún tipo de protección en las células del seno para que no desarrollen el cáncer (Friedewald *et al.* 1997, McPherson *et al.* 2000).

➤ **Dieta:** Existe una relación estrecha entre la incidencia y la cantidad de grasa, proteína y azúcares ingeridos en la dieta. Las dietas ricas en grasa aumentan el colesterol y favorece la presencia de *Clostrydium* en el intestino, que son bacterias capaces de sintetizar estrona y etradiol a partir del colesterol. Las dietas ricas en azúcares y proteínas aumentan los depósitos de grasa y en ellos se produce la conversión de androstediona en estrona. Ésta es un tipo de estrógeno por lo que se aumenta el estímulo de división que reciben las células del seno. (Pérez 1983).

➤ **Mastopatías y tumores previos:** Mujeres con un carcinoma de mama previo poseen siete veces más la posibilidad de desarrollar un segundo tumor. Otro tipo de enfermedades del seno, no relacionadas con el cáncer implican un aumento en el riesgo, como por ejemplo las hiperplasias epiteliales anormales severas, que dan una mayor predisposición para la enfermedad, la papilomatosis y la enfermedad fibroquística mayor (Pérez 1983, Friedewald et al. 1997, McPherson et al. 2000).

➤ **Genes de susceptibilidad:** Se ha observado que poseer mutaciones en genes relacionados al cáncer de mama producen un incremento en el riesgo de desarrollar la enfermedad. Dichas mutaciones pueden ser tanto somáticas como de la línea germinal.

Se han descubierto dos genes principales de susceptibilidad involucrados en el cáncer de mama hereditario: *BRCA1* y *BRCA2* (Loman et al. 2001) los cuales presentan varios tipos de mutaciones que generalmente dan como resultado una proteína truncada, la cual ve afectada su función normal y por consiguiente se produce la enfermedad (Márquez y Trujillo 1999). Estos genes se han relacionado con los mecanismos que controlan el ciclo celular. Son genes supresores de tumores, esto significa que sus productos proteicos regulan el crecimiento normal de las células y su inhibición hace que se de un crecimiento descontrolado (Kachhap y Ghosh 2001).

En 1990, el gen *BRCA1* fue localizado en el cromosoma 17q12-21 y más de 130 mutaciones en la región codificante se han informado desde entonces (Breast Cancer Information Core Data Base 1996, Klug y Cummings 1999). Este gen contiene 24 exones, 5592 nucleótidos los cuales codifican para una proteína de 1,863 aminoácidos. Un gran porcentaje de estas mutaciones conducen a cambios en el marco de lectura resultando en la pérdida de la proteína o en proteínas no funcionales (Marquéz y Trujillo 1999). Este gen parece ser responsable de la enfermedad solamente en el 45% de las familias con casos múltiples de cáncer de mama, pero más del 90% de las familias con cáncer de mama y de ovario presentan mutaciones en este gen (Easton et al. 1993). Diferentes mutaciones en este gen están relacionadas con diferentes riesgos para cáncer ovárico (Shattuck-Eidens et al. 1995, Easton et al. 1995, Gayther et al. 1995).

Se ha observado que en casos de cáncer de mama hereditarios como en ciertos esporádicos hay una disminución detectable de la expresión del gen *BRCA1*. Aproximadamente la mitad de los tumores de mama de las portadoras de mutaciones, presentan la pérdida de la copia normal del gen *BRCA1* quedando solamente la copia mutada que fue heredada (Márquez y Trujillo 1999).

El gen *BRCA2* se localizó en el cromosoma 13q12-13, en el año 1994. Es un gen grande con 27 exones que codifican para una proteína de 3,418 amino ácidos. La mayoría de las mutaciones de *BRCA2* consisten en deleciones, inserciones o mutaciones sin sentido que cambian el marco de lectura que conducen a una finalización prematura de la traducción de la proteína (Myriad Genetics 2002).

Mutaciones en este gen son responsables de aproximadamente un 35% de los casos que se presentan en familias con cáncer de mama múltiples. También están asociadas con cáncer de mama en hombres y otros tipos de cáncer como el de ovario, próstata y páncreas (Wooster *et al.* 1994). Familias con hombres afectados con cáncer de mama son a menudo ligados al *BRCA2* y muy raramente ligados al *BRCA1* (Stratton *et al.* 1994, Wooster *et al.* 1994).

➤ **Historia familiar:** Se relaciona de forma directa con la presencia de mutaciones en la línea germinal de los genes anteriormente mencionados. Estudios han mostrado que aquellas mujeres que tienen a su madre o hermana con el padecimiento, poseen un riesgo dos o tres veces mayor al del resto de la población de desarrollar cáncer de mama. En casos en que ambas estén enfermas, el riesgo aumenta hasta 6.5 veces respecto a la población sin antecedentes familiares de primer grado (Márquez y Trujillo 1999). La edad a la cual las parientes de primer grado desarrollan la enfermedad también está asociado con el aumento del riesgo, por ejemplo una mujer cuya hermana desarrolló el cáncer antes de los 50 años posee un riesgo de presentar la enfermedad a los 65 años del 10%, mientras que si lo hubiera desarrollado a los 50-54 años el riesgo sería únicamente del 5% (McPhearson 2000).

Las mujeres de familias afectadas con una mutación en los genes de susceptibilidad para la enfermedad poseen un riesgo aumentado de padecer el cáncer en algún momento de su vida, comparadas con la población general (Schrag *et al.*

2000. Lerman *et al.* 2001, Kowalyszyn 2001). Así mismo, se ha observado que un **85% de las mujeres** portadoras de una mutación desarrollan la enfermedad en algún momento de su vida (Klug y Cummings 1999).

➤ **Terapia de reemplazo hormonal:** El riesgo aumenta en un factor de 1.023 por cada año de uso de la terapia (McPherson 2000). Según Chen y colaboradores(2002) la incidencia de cáncer de mama aumenta de un 65% a un 80% en mujeres que han dejado de utilizar la terapia recientemente de estrógenos y estrógenos más progesterona respectivamente. Además se mostró que el uso prolongado de estrógenos está asociado con un aumento del riesgo del 50% de aparición de cáncer no lobular.

➤ **Enfermedades asociadas:** Hay ciertos síndromes asociados con aumento en la incidencia de cáncer de mama hereditario. Éstos presentan una herencia de tipo autosómica dominante y son el síndrome de Li-Fraumeni, que se relaciona con mutaciones en el gen *p53*, la enfermedad de Cowden que se debe a mutaciones en el gen *PTEN* y el Síndrome de Lych o síndrome mama-ovario. Todos estos síndromes representan un aumento del riesgo de llegar a desarrollar cáncer de mama y se relacionan con edades de aparición tempranas(Hoskins *et al.* 1995, Márquez y Trujillo 1999). Además otro tipo de enfermedades como la Anemia de Fanconi y la ataxia telangiectasia están asociados con un aumento del riesgo en el desarrollo del cáncer de mama. Se ha observado que para portadores de mutaciones germinales en los genes *Fa*, los cuales son los responsables de la aparición de la Anemia de Fanconi y a su vez están relacionados con los genes *BRCA1* y *BRCA2*, hacen que estos puedan tener un riesgo para el cáncer similar al observado en portadores de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* (Howlett *et al.* 2002). El gen *ATM*, es responsable del orden autosómico recesivo llamado ataxia telangiectasia y se ha visto que portadores de mutaciones heterocigotas en este gen poseen un riesgo de casi nueve veces más con respecto a la población de desarrollar cáncer de mama. Las mutaciones en este gen se relacionan con la aparición de casos esporádicos y no para casos familiares (Broeks *et al.* 2000).

Métodos de diagnóstico

Los métodos de diagnóstico se clasifican en dos categorías: los no invasivos y los invasivos. Dentro de los no invasivos se encuentran el autoexamen, la mamografía, el ultrasonido, la resonancia magnética, la tomografía de emisión de positrón y la exploración. Los invasivos incluyen todos los tipos de biopsia que a su vez se clasifican en dos tipos principales: con aguja y quirúrgica (Pérez 1983, Friedewald *et al.* 1997).

Países como Estados Unidos y Canadá cuentan con varios tipos de diagnósticos presintomáticos genéticos y moleculares para el cáncer de mama. En estos países se realizan pruebas de tamizaje para poder diagnosticar la presencia de mutaciones en los genes de susceptibilidad hereditaria *BRCA1* y *BRCA2* antes de que se manifieste la enfermedad; en pacientes que tengan historial familiar de la enfermedad. Estas técnicas se han podido establecer por los esfuerzos realizados para la caracterización de ciertos grupos poblacionales y por la necesidad de crear protocolos efectivos y poco costosos para la determinación de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*. Que como se explicó anteriormente son los principales genes asociados al cáncer de mama.

Estas técnicas incluyen desde secuenciación de ambos genes hasta PTT (Protein Truncation Test). Una de las poblaciones mejor caracterizadas, en las que se ha encontrado efecto fundador para tres mutaciones es la de los Judíos Askenazi (Kupperstain *et al.* 2000) donde se ha encontrado que estas mutaciones (185delAG y 5382incC para *BRCA1* y 6174delT para *BRCA2*) tienen una alta frecuencia por origen ancestral y no por la existencia de puntos calientes en el gen (Kupperstein *et al.* 2000).

Esto ha permitido que para esta población, cuando se requiere un diagnóstico, se inicie por la búsqueda de estas tres mutaciones ya que se ha logrado determinar que aproximadamente 2-2.5% de las mujeres judías Askenazi portan una de estas tres mutaciones (Warmer *et al.* 1999).

Además, al ser una de las poblaciones mejor caracterizadas y descritas en la literatura permite que el uso del protocolo para el análisis de las 3 mutaciones

anteriormente mencionadas sea utilizado como primer acercamiento en poblaciones en las que no existe conocimiento previo.

Otro protocolo que se ha establecido como análisis de rutina es el monitoreo del gen *BRCA1*, específicamente la búsqueda de la duplicación del exón 13. Esto porque la duplicación del exón 13, que consiste en una inserción de 6 kb, fue la primera alteración grande que se identificó para dicho gen (Puget *et al.* 1999). Además se ha determinado que del 2-3% de los pacientes diagnosticados con una mutación en *BRCA1* portan esta mutación (Hedge *et al.* 2000).

También se ha determinado que es una mutación que tiene un efecto fundador en poblaciones geográficamente muy distintas (The *BRCA1* Exon 13 dup 13 Screening group). Estas características hacen que sea importante la búsqueda de esta mutación de forma rutinaria.

Otra técnica que se utiliza actualmente para la búsqueda mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* es el PTT. Esta técnica se desarrollo porque se ha identificado un número creciente de genes asociados con enfermedades que tienen mutaciones que producen cambios en el encuadre de lectura que dan como resultado una terminación prematura de la traducción (Hogevorst 1997). Estos cambios producen proteínas anormales que funcionan inadecuadamente y provocan una enfermedad. Algunas enfermedades producidas por proteínas truncadas son la Distrofia Muscular de Duchen, la Fibrosis Quística y algunos tipos de cáncer (Kephart 1999).

La ventaja del PTT sobre técnicas tradicionales que se utilizan actualmente como el DGGE, SSCP y el análisis de heteroduplex es que todas estas técnicas identifican mutaciones que no necesariamente están asociadas a la enfermedad como es el caso de los polimorfismos. En el caso del PTT se pueden monitorear secciones grandes de ADN a nivel de proteína y las mutaciones que se identifican siempre son truncadas y deletéreas lo que simplifica grandemente el análisis de dichos genes (Hogevorst 1997, Kephart 1999).

El desarrollo de estas técnicas como protocolos de rutina, es sumamente importante porque permite que los estudios en las poblaciones se hagan de una forma más dirigida. Además permite que se amplíe el conocimiento referente al cáncer de mama y que se enfoquen más los esfuerzos a la prevención.

Claro está que la implementación de estas técnicas es costosa e incluyen consejo genético para quienes deciden realizarse este tipo de diagnóstico (Lawrence *et al.* 2001).

Justificación

El hecho de que la aparición del cáncer de mama en mujeres con historial familiar sea a edades premenopáusicas, que no es lo más común si se compara con los esporádicos, es un aspecto muy importante que hay que tomar en cuenta cuando se piensa en los métodos de diagnóstico tradicionales, los cuales para este tipo de mujeres no son muy efectivos por las siguientes razones:

1. La mujer joven premenopáusica posee mayor tejido mamario que una mujer postmenopáusica.
2. Los senos experimentan cambios a lo largo del mes debido a la variación de los niveles hormonales durante el ciclo menstrual.
3. Las mujeres jóvenes premenopáusicas presentan comúnmente pequeñas protuberancias en los senos debido a la gran cantidad de glándulas que contienen.
4. Por la alta densidad mamaria se da un número mayor de falsos negativos (Friedewald *et al.* 1997) (Kowalyszyn 2002).

Todos estos factores dificultan la identificación de anomalías por los métodos de detección más utilizados (mamografía y autoexamen). Además, en la mayoría de los casos el diagnóstico se realiza cuando la enfermedad ya está en etapas avanzadas por lo que el tratamiento y supervivencia son de pronóstico reservado en la mayoría de los casos.

Las mujeres de familias afectadas con una mutación en los genes de susceptibilidad para la enfermedad poseen un riesgo aumentado de padecer la enfermedad en algún momento de su vida, comparadas con la población general (Lerman *et al.* 2001) (Kowalyszyn 2002). El 85% de ellas llegarán a desarrollar la enfermedad en algún momento de su vida (Klug y Cummings 1999).

La posibilidad de tener un diagnóstico presintomático, tanto para las mujeres como sus parientes con un historial familiar de cáncer de mama, es decir con un componente genético heredable, sumado a los métodos tradicionales, podría disminuir de forma significativa la probabilidad de desarrollar dicha patología.

Además en el país no se cuenta actualmente con algún tipo de diagnóstico o medio por el cual se pueda identificar la enfermedad antes de que se manifieste. Dicho diagnóstico facilitaría la toma de decisiones antes de que se desarrolle el padecimiento y permitiría un control más estricto con asesoramiento adecuado, para detectar cualquier tipo de anormalidad que se presente y brindar un tratamiento temprano con altas tasas de sobrevida.

Al sumarse ambos tipos de diagnóstico, - los postsintomáticos y presintomáticos -, mejoraría el tratamiento de los pacientes mejorando su expectativa y calidad de vida, lo cual implica una mejora en la salud pública.

El poder identificar mutaciones y a los portadores de las mismas permitirá tener un instrumento más de lucha contra el cáncer de mama, y una potencial reducción de la morbilidad y la mortalidad, producto de una mejor vigilancia de los portadores de tales mutaciones y de la preparación del sistema nacional de salud con base en el conocimiento de la prevalencia de esos alelos en la población del país, en el caso de que esta sea alta.

También implica una mejora en la salud pública al desarrollar en el proyecto campañas de difusión informativa, con el fin de aumentar el conocimiento de las personas en aspectos generales, genéticos y hereditarios, relacionados con el cáncer de mama, educando a la población en la prevención de la enfermedad, punto débil de nuestro sistema de salud.

Estudios realizados en Estados Unidos, demuestran que un gran porcentaje de mujeres con historial familiar de cáncer de mama y sin éste, no acuden a consulta por falta de información y las que tienen acceso a las pruebas genéticas no las utilizan por la misma razón (Peterson *et al.* 2002).

Esto daría la ventaja de que las mujeres no recurran al médico cuando ya la enfermedad se encuentra en sus estadios más avanzados y cuando muy probablemente ya haya ocurrido metástasis, provocando una reducción en la mortalidad ya que se podrían dar diagnósticos más tempranos y cuando las posibilidades de altas tasas de curación de la enfermedad son muy elevadas.

En Costa Rica la información sobre el tema es muy escasa y el conocimiento derivado de esta investigación, permitirá realizar una planificación a mediano y largo

plazo de políticas de salud que permitan mejorar el manejo de la enfermedad en el país.

Referencias

- Anónimo. 2008. Cancer Facts and Figures 2008. American Cancer Society. 51 p. (Also available online: <http://www.cancer.gov>.)
- Basset, L. & R. Gold. 1987. Breast Cancer Detection Mamography and other Methods in breast Imagine 2nd. Ed. Gruney Stratton Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. 264p.
- Bottorff, J., Ratner, P., Balneaves, L., Richardson, C., McCullum, M., Hack, T., Chalmers & K. Buxton. 2002. Women's Interest in genetic testing for breast cancer risk: the influence of sociodemographics and knowledge. CEBP. 11: 89-95.
- Broeks, A., Urbanus, J., Floore, A., Dahler, E., Klijn, J., Rutgers, E., Devilee, P., Russell, N., van Leeuwen, F. & L. van't Veer. 2000. ATM- Heterozygous germline mutations contribute to breast cancer susceptibility. Am. J. Hum. Genet. 66:494-500.
- Chen, C., Weiss, N., Newcomb, P., Barlow, W. & E. White. 2002. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. JAMA 287:734-741.
- Easton, DF, Bishop DT. & Ford, D. 1993. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer. Results from 214 families. Am. J. Hum. Genet. 52:678-701.
- Easton, DF, Ford, D., Bishop T. & Breast Cancer Linkage Consortium. 1995. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutations carriers. Am. J. Hum. Genet. 56:256-271.
- Friedwald, V., Buzdar, A. & M. BoKulich. 1997. Cáncer de seno todo lo que usted debe saber. Grupo editorial Norma 158p.
- Folkman, J. 1996. Cáncer y suministro sanguíneo. Investigación y Ciencia 242:101-104.
- Gayther, SA., Warren W. & S. Mazoyer. 1995 Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian high-risk families provide evidence for genotype-phenotype correlation. Nature Genet. 11: 428-433.
- Grzybowska, E., Seiminska, M., Zientek, H., Kalinowska, E., Michalska J., Utracka-Hutka, B., Rogozinska-Szczepka, J. & Kazmierczak-Maciejewika, M. 2002. Germline mutations in the BRCA1 gene predisposing to breast ovarian cancer in Upper Silesia population. Acta Biochimica Polonica. 49(2):351-356.

- Hartl, D. & E. Jones. 2001. Genetics analysis of genes and genomes 5th ed. Jones and Bartlett Publishers 858p.
- Hedge, M., Chong, B., Fawkner, M., Leary, J., Shelling, A., Culling, B., Winship, I., & Love, D. 2000. Hierarchical Mutation Screening Protocol for the BRCA1 gene. *Hum. Mut.* 16:422-430
- Herrera, M. 1999. Manejo de los estadios I y II del cáncer de mama entre los años 1990 y 1998 en el servicio de oncología del hospital San Juan de Dios Tesis Universidad de Costa Rica, San Pedro Montes de Oca.
- Hogervorst, F., 1997. The protein truncation test (PTT). *Promega Notes Magazine*.62:7-11
- Hoskins, K., Stopfer, J. & K. Calzone. 1995. Assesment and counseling for women with family history of breast cancer. *JAMA* 273:577-585.
- Howlett, N., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., Ikeda, H., Fox, W. & A. D'Andrea. 2002. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia. *Science* 297:534-606.
- Kachhap, S. & S. Ghosh. 2001. Implication of BRCA1 gene in breast cancer. *Indian J Exp. Biol.* 39(5):391-400
- Kowalszyn, R. 2002. Evaluación del riesgo de padecer Cáncer de mama. Servicio de Oncología Clínica, Clínica Viedma SA, y Grupo de Estudio Tratamiento e Investigación del Cáncer del Sur, Getics, Viedma Río Negro, Patagonia Argentina, Argentina (Consultado: 22 de enero 2002. <http://www.ce.in.or.ar/evcamama.htm>)
- Kephart, D., Rhodes, R. & Kobs, G. 1999. Options for the protein truncation test protocol: A molecular Diagnostics Application. *Promega Notes* 70:18-23
- Kumar, B., Lakhoita, S., Ankathil, R., Madhavan, J., Jayprakash, P., Krishnaan, M., & Somasundaram, K. 2002. Germline BRCA1 mutations Analysis in Indian Breast/Ovarian Cancer Families. *Cancer Biology and Therapy*. 1:18-21
- Kupperstain G., Foulkes WP., Ghandirian P., Hakimi J., & Narod SA. 2000. a rapid fluorescent multiplex PCR analysis (FMPA) for founder mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Clin. Genet.* 57:213-220
- Langston, A., Malone, K. & J. Thompson. 1996. BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med.* 334:137-142
- Lawrence, W., Peshkin, B., Liang, W., Isaacs, C., Lerman, C. & J. Mandelblatt. 2001. Cost of genetic counseling and testing for BRCA1 and BRCA2 Breast Cancer Susceptibility mutations. *CEBP* 10:457-481

Lerman, C. Huges, C. & R. Robert. 2000. Prophylactic surgery decisions and surveillance practices one year following BRCA1/2 testing. *Preventive medicine* 31:75-80.

Loman, N., Johannsson, O., Kristofferson, U., Olsson, H. & A. Borg. 2001. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 93(16):1215-1223.

Malone, K., Dalin, J. & J. Tompkins. 1998. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: Analysis in women before age 35 years and in women before age 45 years with first degree family history. *JAMA* 279:922-929.

Márquez A. & R. Trujillo. 1999. Cáncer de mama hereditario (I). MEDSPAIN. La nueva revista de Medicina y Salud en Internet (Consultado: 22 de enero de 2002). http://www.medspain.com/n6_nov99/cancer_mama1.htm.

Márquez A. & R. Trujillo. 1999. Cáncer de mama hereditario (II). MEDSPAIN. La nueva revista de Medicina y Salud en Internet (Consultado: 22 de enero de 2002). http://www.medspain.com/n7_nov99/cancer_mama2.htm

McPhearson, K., Steel, C. & J. Dixon. 2002. Breast cancer- epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ*. 321:624-628.

Morrow, M. & W. Gradishar. 2002. Breast Cancer. *BMJ*. 324:410-414.

Narod, S., Brunet, J., Gadirian P., Robson M., Heimdal, K., Neuhausen, S., Stoppa-Lyonnet, D., Lerman, C., Pasini, B., de los Ríos P., Weber, B. & H. Lynch. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. 2000. Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutations carriers: a case-control study. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. *Lancet* 356:1876-1881.

O'Brien, K., Cokkinides, V. & Thun, M. 2000. Datos y Estadísticas de los Hispanos/Latinos 2000-2001. American Cancer Society pp9-11.

Peterson, E., Milliron, K., Lewis, K., Gould, S., & Merajver, S. 2002. Health insurance and discrimination concerns and BRCA1/2 in a clinic population. *CEBP* 11: 79-87.

Ponder, B. 2001. Cancer genetics. *Nature* 411:336-341.

Pouget, N., Sinilnikova, O., Stoppa-Lyonnet, D., Audouyoud, C., Pages, S., Lynch, H., Goldgar, D., Lenoir, G., & Mazoyer, S. 1999. An Alu-Mediated 6-kb duplication in the BRCA1 gene: a new founder mutation? *Am. J. Hum. Genet.* 64:300-302

Ruíz, P., Sinilkova, O., Badzioch, M., Calderón, A., Sandrine, C., Fabrice, O., Gónzales, J., Szabo, C., Lenoir, G., Goldgar, D., & Barrera-Saldaña. 2002. BRCA1 and BRCA2 Mutation analysis of early-onset and familia breast cancer cases in Mexico. *Hum. Mut.* 20(6):474-479

Ruoslahti, E. 1996. Así se propaga el cáncer. *Investigación y Ciencia.* 242:20-26

The BRCA1 Exon 13 duplication screening group. 2000. The Exon 13 duplication mutation present in geographically diverse populations. *Am. J. Hum. Gen.* 67:207-212

Scharg, D., Kuntz K. & J. Garber. 2000 Life expentancy gains from cancer prevention strategies for women with breast cancer and BRCA1 or BRCA2 mutations. *JAMA* 283:617-624.

Shattuck-Eidens D., McClure M. & J. Simard. 1995. A collaborative survery of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibilty gene. *JAMA* 273:535-534.

Stratton, M., Ford, D. & S. Nehausen. 1994. Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome17q. *Nat Genet.* 7:103-107

Warner E., Fouikes W., Goodwin P., & Meschino W., 1999. Prevalence and penetrance of BRCA1 genes mutations in unselected Askenazi Jewish women with breast cancer. *Jour. of the Natl. Can. Inst.* 91(14):1241-1247

Weinberg, R. 1996. Base molecular del cáncer. *Investigación y ciencia* 242:48-59.

Wooster R., Neuhausen S. & J. Mangion 1994. Localization of breast cancer susceptibilty gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 256:2088-2092

BRCA1 and BRCA2 mutational analysis in Costa Rican Breast Cancer Families 23

Adriana Ramirez Monge¹, Gustavo Gutierrez Espeleta¹ & Steven A. Narod².

¹Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

²University of Toronto, Sunnybrook & Women's College Health Science Centre, Toronto.

Abstract

Breast cancer (BC) is the second leading cause of cancer deaths in women today and the most common cancer among women. In Costa Rica, breast cancer is the most common malignant condition in incidence and mortality. Costa Rica presented 818 new diagnoses of breast cancer in 2007, as well in that year 284 women died of breast cancer. We studied fifty-eight unrelated Costa Rican families based on a family history of breast and ovarian cancer. We screened for duplication 13 for *BRCA1* and the three Jewish mutations, as well as other mutations presented in both genes by the Protein Truncation Test (PTT). We found 6174delT C5507G, 5531delT mutations in *BRCA2* and C3522T in *BRCA1*. We did not find any founder mutation because of the characteristics of the study.

Breast cancer (BC) is the second leading cause of cancer deaths in women today (after lung cancer) and is the most common cancer among women, excluding non-melanoma skin cancers world wide (Anonymous 2004).

In Costa Rica, breast cancer is the most common malignant condition both for incidence and mortality among women, representing about 800 new diagnoses of breast cancer each year. For 2007, 284 women died because of breast cancer (Registro Nacional de Tumores, unpublished data)

Breast cancer can be classified in sporadic cases, which are the result of *de novo* mutations, and those which are a product of inherited alterations in known cancer susceptibility genes (Lawrence 2001, Narod 2002).

Mutations in two autosomal genes *BRCA1* (MIM # 113705) and *BRCA2* (MIM # 600185) have been linked to inherited (familial) breast cancer (Kumar et al. 2002).

Linkage studies suggest that germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* account for ²⁴ more than 90% of families with both breast cancer (BC) and ovarian cancer (OVC) (Eaton *et al.* 1993, Narod *et al.* 1995, Palmieri *et al.* 2002).

However, the frequency of mutations detected in BC/OVC families is variable based on the characteristics of the population of study like ethnic group and geographical differences (Muller *et al.* 2004), migration patterns and population growth (Kupperstain *et al.* 2000).

The Ashkenazi Jews for example, have three well-described mutations. There are two on *BRCA1* and one on *BRCA2* that account for the great majority of BRCA mutations in this population group (Kupperstain *et al.* 2000, Narod 2005). As well, other population groups have shown founder effects for mutations on both genes: Poland, Iceland, French Canadians, Russians and Cyprus (Tonin *et al.* 1998, Kupperstain *et al.* 2000, Sei Hyun Ahn *et al.* 2004, Narod 2005, Loizidou *et al.* 2007 Sokolemko *et al.* 2007.)

A 200 family study performed by The Breast Cancer Linkage Consortium (1998) have shown that 81% of the families with at least four affected members of BC and several cases of OVC present mutations on *BRCA1* while 14% of families present mutations on *BRCA2*. Also, 76% of the families selected for the study which present male breast cancer showed mutations associated with *BRCA2*. The probability of finding mutations on these genes increases with the number of related cases of early onset BC or OVC in the family (The Collaborative group on hormonal Factors in Breast Cancer, 2001; Narod 2005).

Other studies show that the possibility of developing BC increases with high numbers of affected first-degree relatives. The cumulative life risk (to age 70) of developing breast cancer in mutation carriers, from families with several cases has been estimated to be 80% (The Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001, Palmieri *et al.* 2002; Narod, 2005). Other risk factors associated with the development of breast cancer, besides family history are: age, high breast tissue density, biopsy confirmed hyperplasia, long

menstrual history (early onset of menstruation or late menopause), obesity after menopause, 25
recent use of oral contraceptives, postmenopausal hormone therapy (especially combined
estrogen and progestin therapy), never having children or having a first child after age of 30, or
consumption of one or more alcoholic beverage per day (Anonymous 2007).

Since breast cancer is a major health problem in Costa Rica, this study was conducted
to determine which mutations on *BRCA1* and *BRCA2* genes are found in Costa Rican families
with a history of breast cancer.

Material and Methods

Studied population:

We studied fifty- eight Costa Rican families based on a family history of breast and
ovarian cancer. All the families had several members affected with both breast and ovarian
cancer, one side (paternal or maternal) of the family. The following criteria were established to
select a family: three cases of breast or ovarian cancer on the first or second degree relatives
of one side of the family, or families with two cases of breast or ovarian cancer on first degree
relatives both diagnosed before the age of 50.

Sixty-nine individuals with a confirmed diagnosis of breast or ovarian cancer were
selected. 58.3% of all patients diagnosed with breast cancer were younger than 50 years old.
All of them had a family history of breast and ovarian cancer. 95.3% of these patients had
unilateral breast cancer.

The patients were identified through the Fundación Nacional de Solidaridad contra el
Cancer de Mama (National Foundation of Solidarity Against Breast Cancer-FUNDESO), and
by reference of two gynecologists. The study was approved by the Institutional Review Board
of the Universidad de Ciencias Médicas following the principles of research involving human
subjects.

The aim of the project and the genetic tests were explained to all the participants, which after asking questions and getting their responses, signed an informed consent. All patients were interviewed to obtain information about their family history of cancer, recurrence of cancer in the family, age of diagnosis, ages of death, weight, reproductive history, use of oral contraceptives, exercise, smoking history and alcohol consumption. After the interview, blood samples were obtained for genetic analysis. Based on the information obtained from the interviews, pedigrees were constructed for each family.

Laboratory methods

DNA was prepared from whole blood by standard procedures, using Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) in accordance with the manufacturer's protocols. All samples were screened for four common alterations. These were the *BRCA1* 185delAG, 5382insC and *BRCA2* 6174delT mutations common to Ashkenazi Jews and others eastern European ancestry. These founder mutations were assayed using rapid multiplex method (Kupperstain 2000). We tested separately for the presence of the *BRCA1* exon -13 6-kb duplication (The *BRCA1* duplication screening group 2000). We studied these four mutations because they are very well described in the literature and they are present in many populations around the world. It is a good start line because there is no information about mutations in these genes for the Costa Rican population. Exon 11 of *BRCA1* and exons 10 and 11 of *BRCA2* were then screened by protein truncation test (PTT). Primer sequences used to amplify overlapping fragments were obtained from the Breast Cancer Information Core (BIC). PTT was performed using the TNT™ rabbit reticulocyte lysate system (Promega), involving [³⁵S] methionine/cysteine (New England Nuclear) for protein detection. All variants identified by PTT were confirmed by direct DNA sequencing. All the observed alterations determined by these methods are considered deleterious.

Results

All 69 patients were tested for four of the most commonly reported mutations and tested for protein truncation mutations within exons 11 of *BRCA1* and exons 10 and 11 of *BRCA2* using the PTT test.

Overall, there were 4 mutations identified, 1 at *BRCA1* and 3 at *BRCA2*. (Table 1) the mutation 6174delT was identified by standard procedures and the other 4 mutations were identified by PTT and confirm by direct sequencing.

Table 1 *BRCA1* and *BRCA2* Mutations identified in Costa Rican Breast Cancer families

Patient	Gene	Exon	Mutation	Age of diagnosis	Cases presented in the family
CM 2-1	BRCA2	11	C5507G	51	4
CM10-2	BRCA2	11	5531delT	41	5
CM10-3	BRCA2	11	5531delT	40	5
CM20-1	BRCA2	11	6174delT	42/55bi	3
CM20-2	BRCA2	11	6174delT	30	3
CM-24	BRCA1	11	C3522T	49	2

Discussion

We did not find any carriers for the duplication of exon 13 which could be explained because of the population characteristics and family history. Studies have shown that approximately 2-3% of *BRCA1* patients carry this type of mutation (Hedge *et al.* 2000), and it is most likely a founder mutation distributed mainly in English-speaking countries or in countries with historical links with Britain (The *BRCA1* Exon 13 duplication Screening Group 2000). This

could explain our negative results. Costa Rica population has European backgrounds but mainly from Spain, and this population has not shown any founder mutations (Llort *et al.* 2002).²⁸

The families selected for the study also showed characteristics that increase the possibility of finding mutations on *BRCA2*. There are some cases of pancreatic, stomach and prostate cancer, and a study performed by the Breast Cancer Linkage Consortium (1999) showed that carriers of mutations on *BRCA2* have an increased risk of developing other cancer types such as stomach, pancreas, prostate, malignant melanoma, etc.

Mutations on *BRCA1* are related with a high risk of OV cancer. In our study, just eight families showed this type of cancer, and most of them do not have a reliable documented age of diagnosis, which reduces the probabilities of finding a mutation on *BRCA1*. If the onset of the cancer is at old ages, probably this illness is the result of causes related to somatic mutations added by longevity and not a result from an inherited mutations but we would need the age of diagnosis to confirm this, because the information obtained is from the individual tested and not directly from the affected member of the family.

For Jewish mutation analysis we found one family (family 17), which had the 6174delT mutation on *BRCA2*. According to the questionnaire this family has a German-Jewish background. It is well known that the Jewish population is more at risk of developing BC than the non-Jewish population, and one explanation for this is the high frequency of mutations in breast cancer susceptibility genes (Warner *et al.* 1999). There are three well described mutations on both *BRCA* genes (one of those is 6174delT) that account for the great majority of mutations found on this population (Ashkenazi-Jewish)(Kupperstain *et al.* 2000, Narod 2005).

Also, members of the family 17 have shown characteristics that increase the probability of finding mutations in the *BRCA* genes. Both members are first-degree relatives, mother and daughter with early onset of the BC, 40 and 30 years respectively (Narod 2002, Narod 2005).

Furthermore, the mother had bilateral disease. Some studies have shown that BRCA₂₉ mutation carriers have a significantly higher risk of developing bilateral BC in contrast to the general population (Rogozińska- Szczepka 2004).

In addition, this family has several members affected with other cancer types such as prostate and gastric cancer. Mutations on *BRCA2* have been related with a high risk of developing other cancer types (Breast Cancer Linkage Consortium 1999), as we explained earlier, and since a mutation was found in *BRCA2*, this family appears to support the claim.

Screening using PTT showed three different types of mutations in three different families: C5507G, 5531delT and C3522T. For family CM2 three members were tested. One of them had a positive result. A reason for this could be that inherited breast cancer is associated with germline mutations in ten different genes in pathways critical to genomic integrity (Baynes *et al.* 2007, Walsh and King 2007). Based on this we could say that these patients could have a mutation in some other gene or genes, and not necessarily in *BRCA1* and *BRCA2*. Other explanation for these results is that PTT was made just for exon 11 of *BRCA1* and exons 10 and 11 of *BRCA2*, because they are the largest exons for both genes respectively. This testing comprises approximately 60% of the coding region of both genes (Liede *et al.* 2002), but the other 40% was not tested and it could be that these patients have a mutation on other parts of the gene. Same explanations could be used for family CM10. Three members of this family were tested and only two of them were positive for a mutation. We are not surprised with this result because the family had characteristics that increase the odds of finding mutations in BRCA genes: all affected members were first degree relatives, several of them were diagnosed before the age of fifty and the family present other cancer types as prostate and brain cancer. As we explain earlier these facts increase the chances of finding mutations, mainly in *BRCA2*.

Another explanation for these results is the fact that cancer is a complex disease in which the environmental factors play an important role. The individuals tested that belong to

these two families, are close relatives, so they could be exposed to similar environmental conditions and can have similar life styles. 30

In addition epidemiological investigations revealed that three to seven mutations are required for full development of cancer. Based on that for these families the screening of just two genes was not enough to find the mutations related with the disease (Kinzler & Vogelstein 2002).

It is important to conduct a more extensive study including these and other genes to determine if Costa Rican population with breast and ovarian cancer has other mutations.

- Anonymous. 2007. Cancer Facts and Figures 2007. American Cancer Society. 51 p. (Also available online: <http://www.cancer.gov>.)
- Baynes, C., Healey, C., Pooley, K., Scollen, S., Luben, R., Thompson, D., Pharoah, P., Easton, D., Ponder, B., & Dunning, A. 2007. Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2; CHECK2 & TP53 cancer genes are unlikely to increase breast cancer risk. *Breast Cancer Research*.9(2)1-14
- Collaborative group of Hormonal factors in Breast Cancer. 2001. Familial breast cancer. Collaborative reanalysis of individual data from epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *The Lancet* 358:1389-1399
- Hedge, M., Chong, B., Fawkner, M., Leary, J., Shelling, A., Culling, B., Winship, I. & D. Love. 2000. Hierarchical Mutation Screening Protocol for the BRCA1 gene. *Hum. Mut.* 16:422-430
- Herber, D. & E. Fearon. 1998. The promise of cancer genetics. *Lancet* 351:1-8
- Hogervorst, F., 1997. The protein truncation test (PTT). *Promega Notes Magazine*.62:7-11
- Hopper, J., Southey, M., Dite, G., Jolley, D., Giles, G., McCredie, M., Easton, F., Venter, D. & the Australian Breast Cancer Family Study. 1999. Population-Based Estimate of the average Age -specific Cumulative Risk of Breast Cancer for a Defines Set of Protein -truncating mutations in BRCA1 and BRCA2. *Canc. Epidemiol. Biomarks. & Prev.* 8:741-747
- Hyun, S., Kang, U., Seok, B., Sung, H., Kyung, B., jun, H., su, J, Kyun, B., Dae, C., sik, K., cho, D., Suk, J. & B. Ho. 2004. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Korean Breast Cancer Patients. *J Korean Med Sci* 19:269-274
- Kinzle, K. & B. Vogelstein. 2002. The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill Companies.3-821p.
- Kumar, B. Lakhoita, S., Ankathil, R., Madhavan, J., Jayprakash, P., Krishnaan, M. & K. Somasundaram. 2002. Germline BRCA1 mutations Analysis in Indian Breast/Ovarian Cancer Families. *Cancer Biology and Therapy.* 1:18-21
- Kupperstain G., Foulkes WP., Ghandirian P., Hakimi J. & SA. Narod. 2000. A rapid fluorescent multiplex PCR analysis (FMFA) for founder mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Clin. Genet.* 57:213-220

- Lawrence, W., Peshkin, B., Liang, W., Isaacs, C., Lerman, C. & J. Mandelblatt. 2001. Cost of genetic counseling and testing for BRCA1 and BRCA2 Breast Cancer Susceptibility mutations. *CEBP* 10:457-481
- Liede, A., Jack, E., Hegele, R. & SA. Narod. 2002. A BRCA1 Mutation In Native North American Families. *Hum Mut.* 19(4):460-466
- Llort, G., Yagüe, C., Peris M., Blanco, I., Germá, J., Bale, A. & M. Alvarez. 2002. Low Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain. *Hum. Mut.* 19(3):307-313.
- Loizidou, M., Marcou, Y., Anastasiadou, V., Newbold, R., Hadjisavvas, A. & K. Kyriacou. 2007. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germline mutations to the incidence of early onset breast cancer in Cyprus. *Clin. Genet.* 71(2):165-170.
- Muller, D., Bonaiti-Pellie, C., Abecassis, J., Stoppa-Lyonnet, D. & J. Fricker. 2004. BRCA1 testing in breast ovarian cancer families from northeastern France identifies two common mutations with founder effect. *Fam. Can.* 3:15-20
- Narod, SA. 2002. Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer. *Nat. Reviews.* 2:113-123.
- Narod, SA. 2005. BRCA1 and BRCA2 in 2005. *Disc. Med.* 5(25):50-54
- Palmeri, G., Palomba, G., Cossu, A., Pisano, M., Redola, M., Sarobba, M., Farris, A., Olmeo, N., Contu, A., Pasca, A., Satta, M., Persico, I., Carboni, A., Cossu-Rocca, P., Contini, M., Mangion, J., Stratton, M. & F. Tanda. 2002. BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Sardinian breast cancer families and their implications for genetic counseling. *Ann. Onc.* 13:1899-1907
- Pouget, N., Sinilnikova, O., Stoppa-Lyonnet, D., Audouy, C., Pages, S., Lynch, H., Goldgar, D., Lenoir, G. & S. Mazoyer. 1999. An Alu-Mediated 6-kb duplication in the BRCA1 gene: a new founder mutation? *Am. J. Hum. Genet.* 64:300-302
- Rogozinka-Szczepka, J., Utracka-Hutka, B., Gryzbowska, E., Mak, B., Nowicka, E., Smok-Ragankiewicz, A., Zientek, H., Steffen, J. & A. Wojciechowska-Lacka. 2004. BRCA1 and BRCA2 mutations as prognostic factors in bilateral breast cancer. *Anna. Onc.* 15:1373-1376.
- Roest P.A, Roberts, R.G., Sugino, S., van Ommen, G.J. & J.T. Dunnen. 1993. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum. Mol. Genet.* 2:1719-1721
- Ruiz, P. Sinilkova, O., Badzioch, M., Calderón, A., Sandrine, C., Fabrice, O., Gónzales, J., Szabo, C., Lenoir, G., Goldgar, D. & Barrera-Saldaña. 2002. BRCA1 and BRCA2 Mutation analysis of early-onset and familial breast cancer cases in Mexico. *Hum. Mut.* 20(6):474-479
- Sokolenko, A., Rozanov, M., Mitiushkina, N., Sherina, N., Iyevleva, A., Chekmariova, E., Buslov, K., Shilov, E., Togo, A., Bit-Sava, E., Voskresenskiy, D., Chagunava, O., Devilee,

P., Cornelisse, C., Semiglazov, V. & E. Imyanitov. 2007. Founder mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia. *Familial Cancer*. 1389-1396³³

The BRCA1 Exon 13 duplication screening group. 2000. The Exon 13 duplication mutation present in geographically diverse populations. *Am. J. Hum. Gen.* 67:207-212

The breast cancer linkage consortium. 1999. Cancer risk in BRCA2 mutation carriers. *Jour. Nat. Canc. Inst.* 91(15):1310-1316.

Tonin, P., Mes-Masson, A., Futreal, A., Morgan, K., Mahon, M., Foulkes, W., Cole, D., Provencher, D., Ghadirian, P. & SA. Narod. 1998. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian breast and Ovarian Cancer Families. *Am. J. Hum. Gen.* 63:1341-1351.

Walsh, T. & MC. King. 2007. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell.* 11(2):103-105

Warner E., Foulkes W. Goodwin P. & W. Meschino. 1999. Prevalence and penetrance of BRCA1 genes mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *Jour. of the Natl. Can. Inst.* 91(14):1241-1247

Internet References

Anonymous. 2003. Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020. World Health Organization 7p. (Downloaded: February 04, 2004. <http://www.who.com>)

Anexos
Genealogías de las familias estudiadas

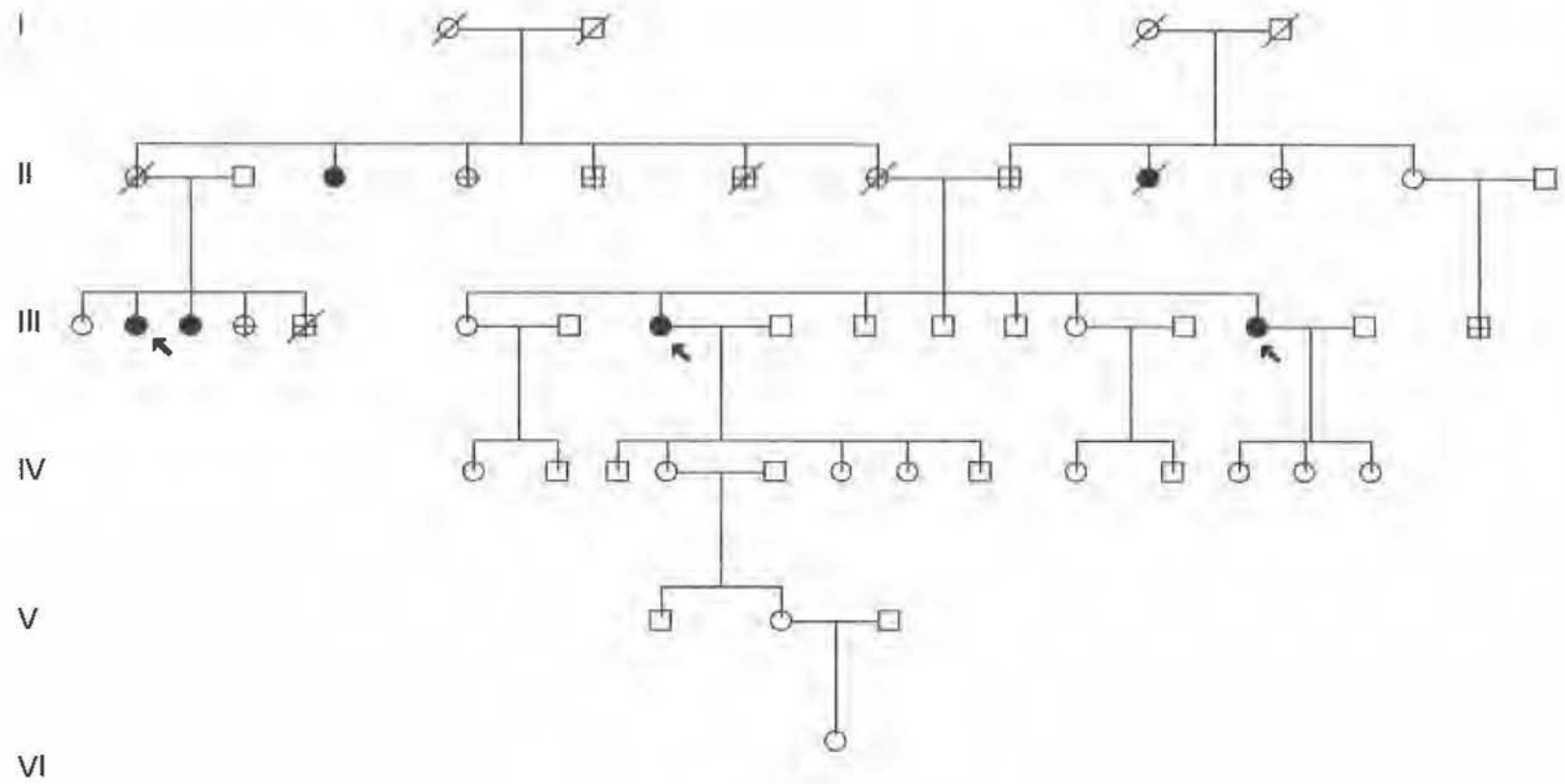


Figura 1. Genealogía de la familia código CM02

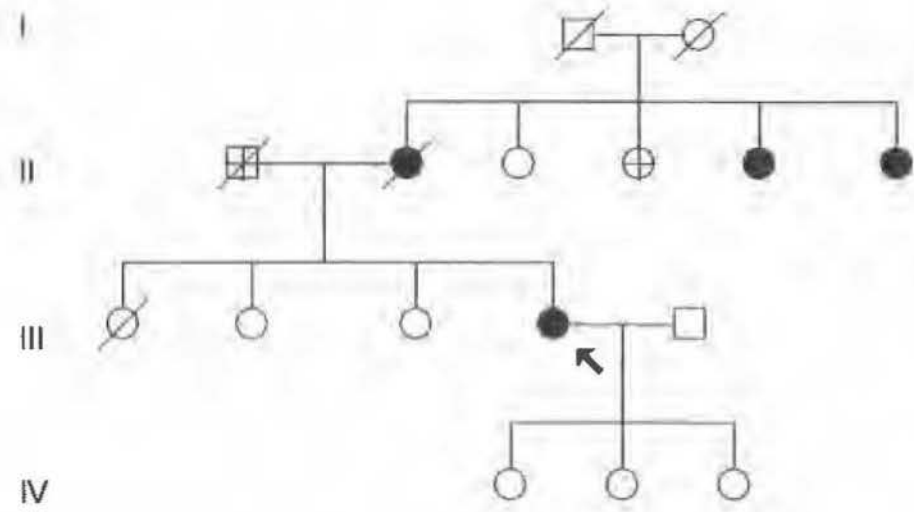


Figura 2. Genealogía de la familia código CM03

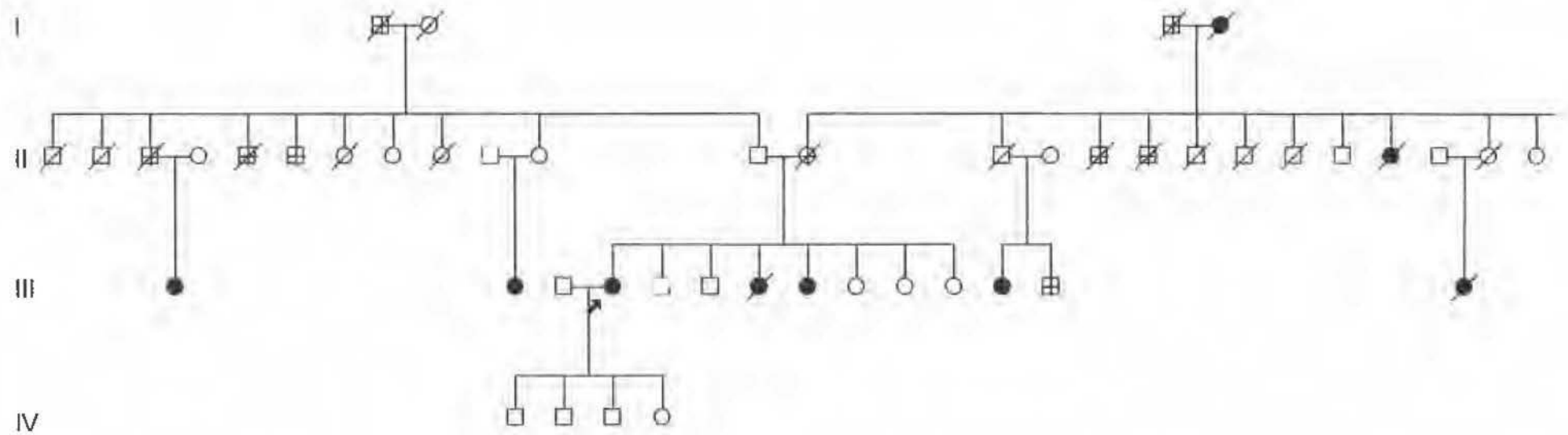


Figura 3. Genealogía de la familia código CM04

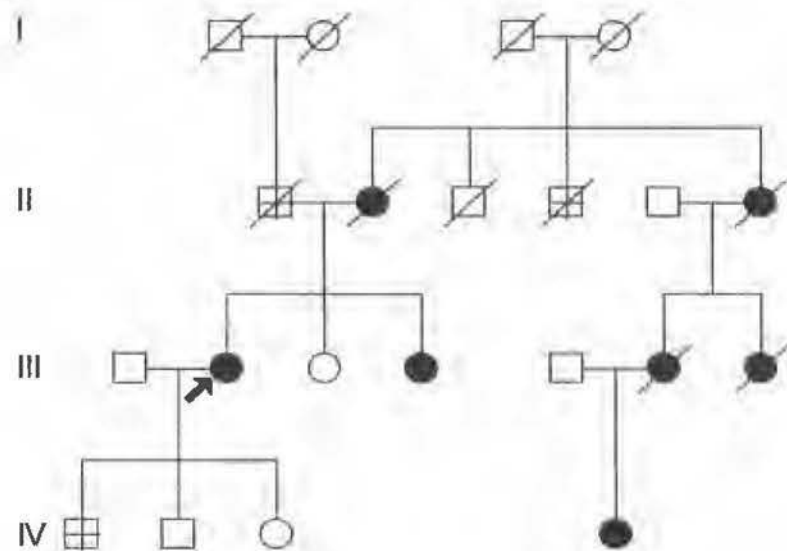


Figura 4. Genealogía de la familia código CM05

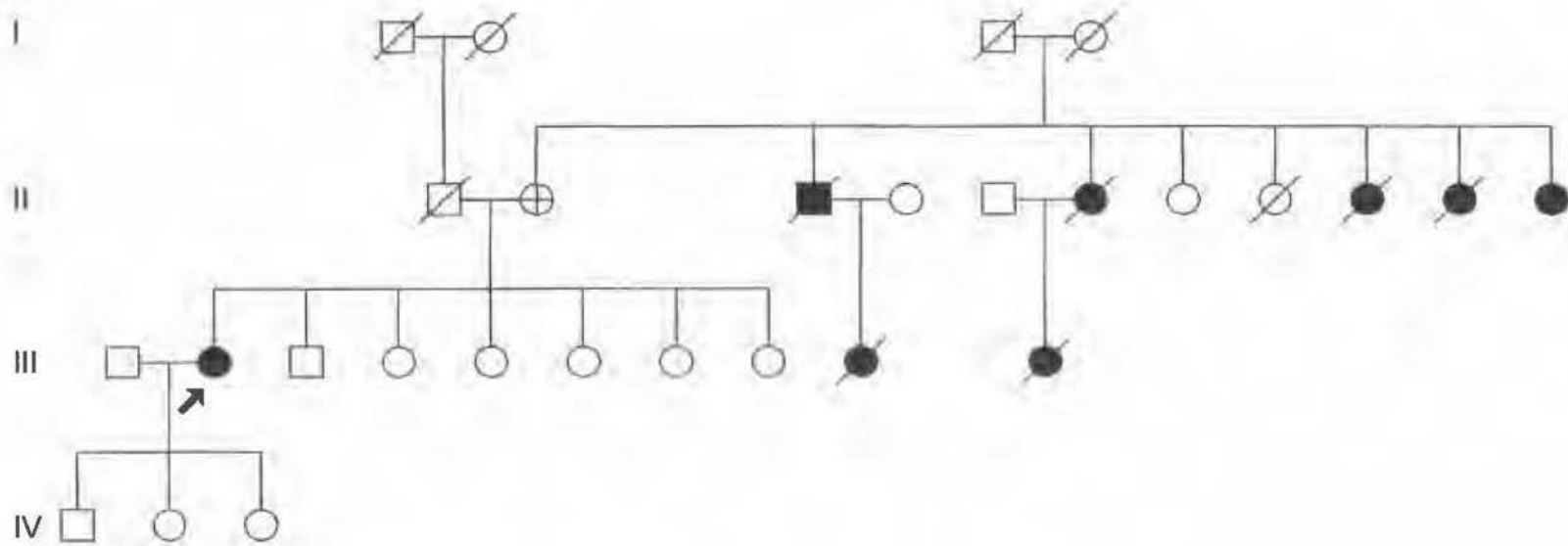


Figura 5. Genealogía de la familia código CM06

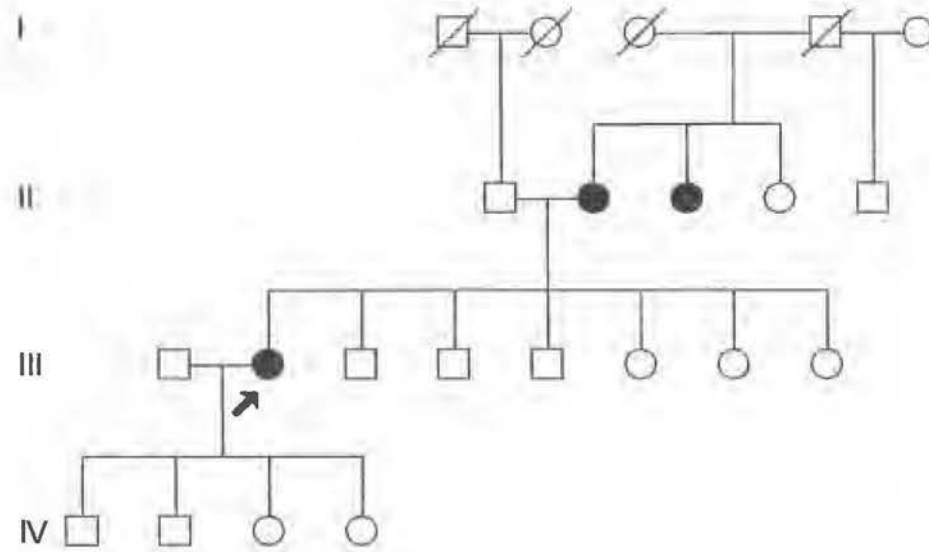


Figura 6. Genealogía de la familia código CM07

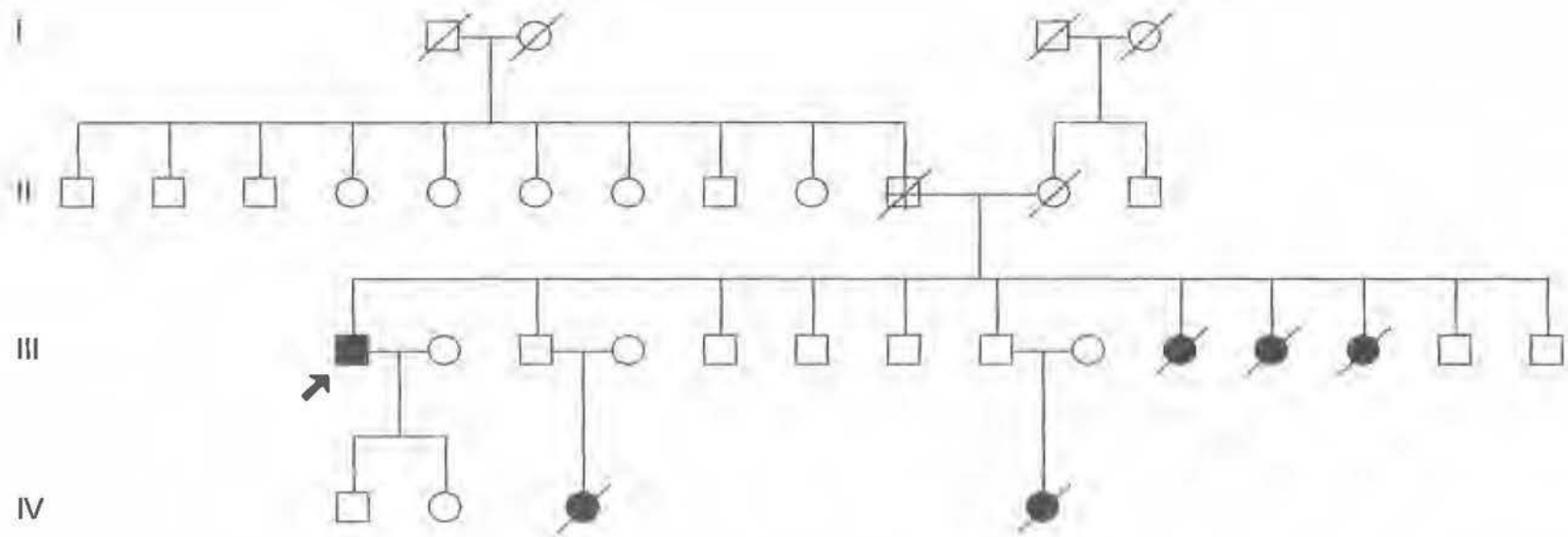


Figura 7. Genealogía de la familia código CM08

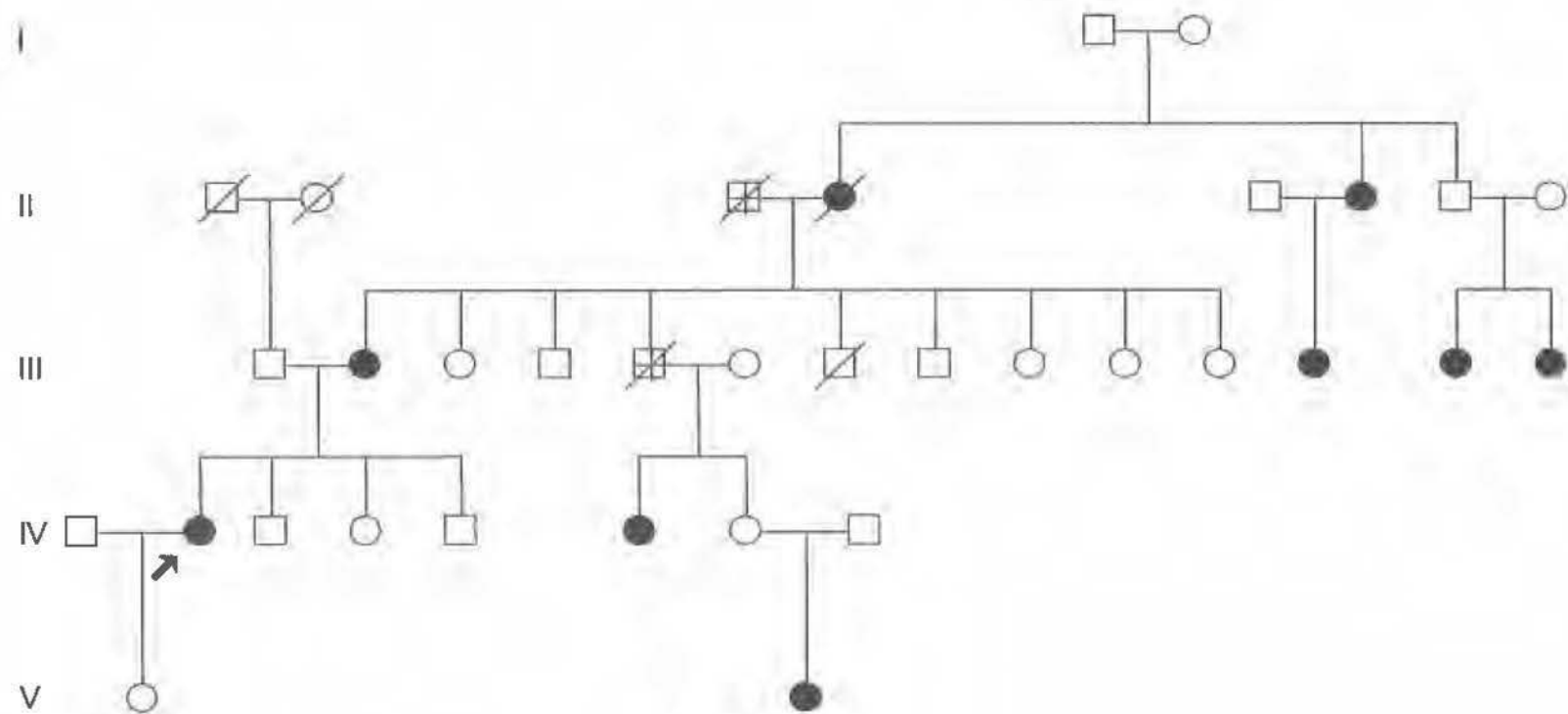


Figura 8. Genealogía de la familia código CM09

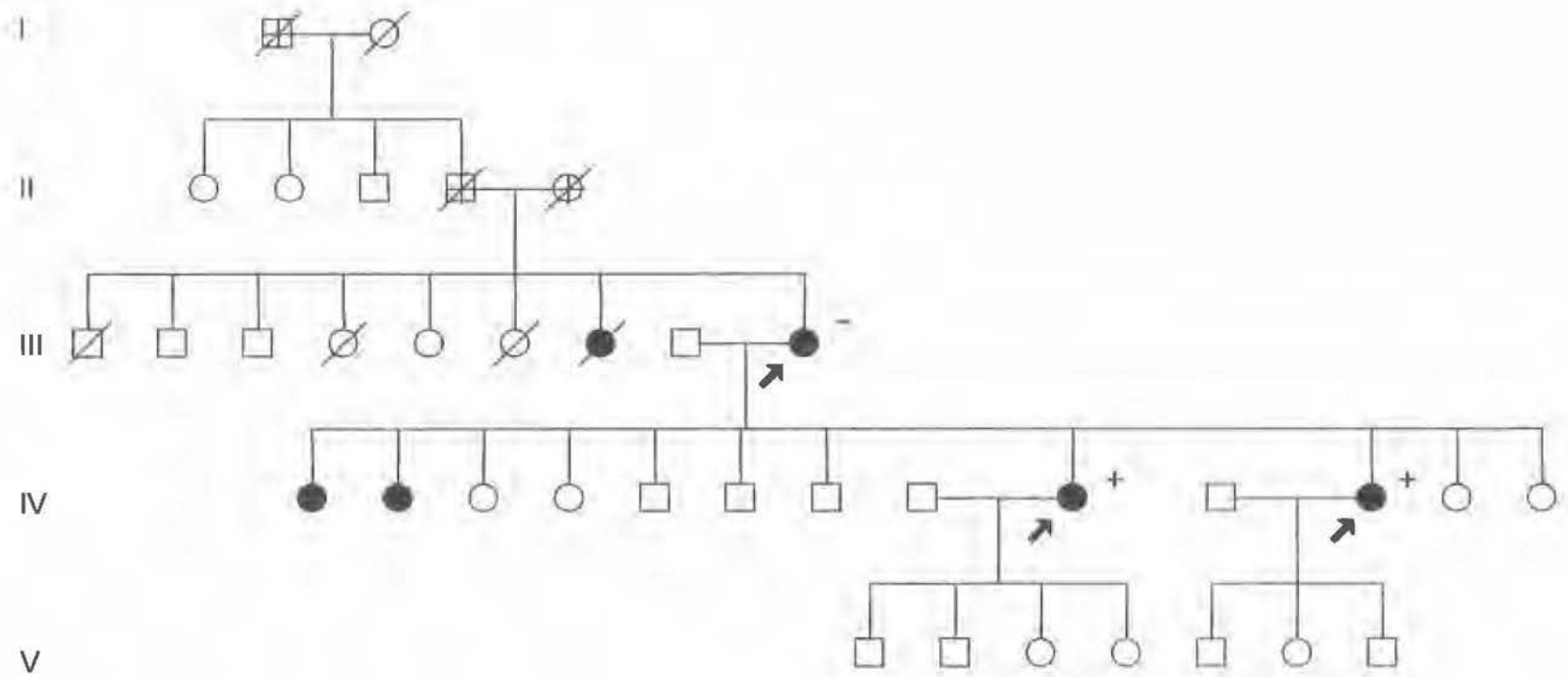


Figura 9. Genealogía de la familia código CM10

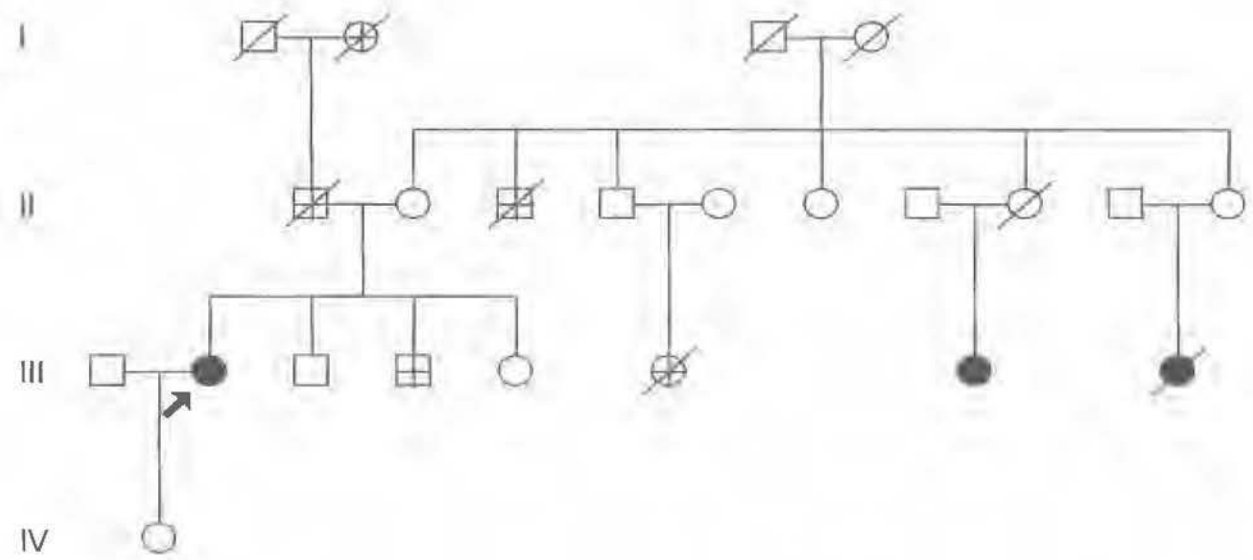


Figura 10 Genealogía de la familia código CM11

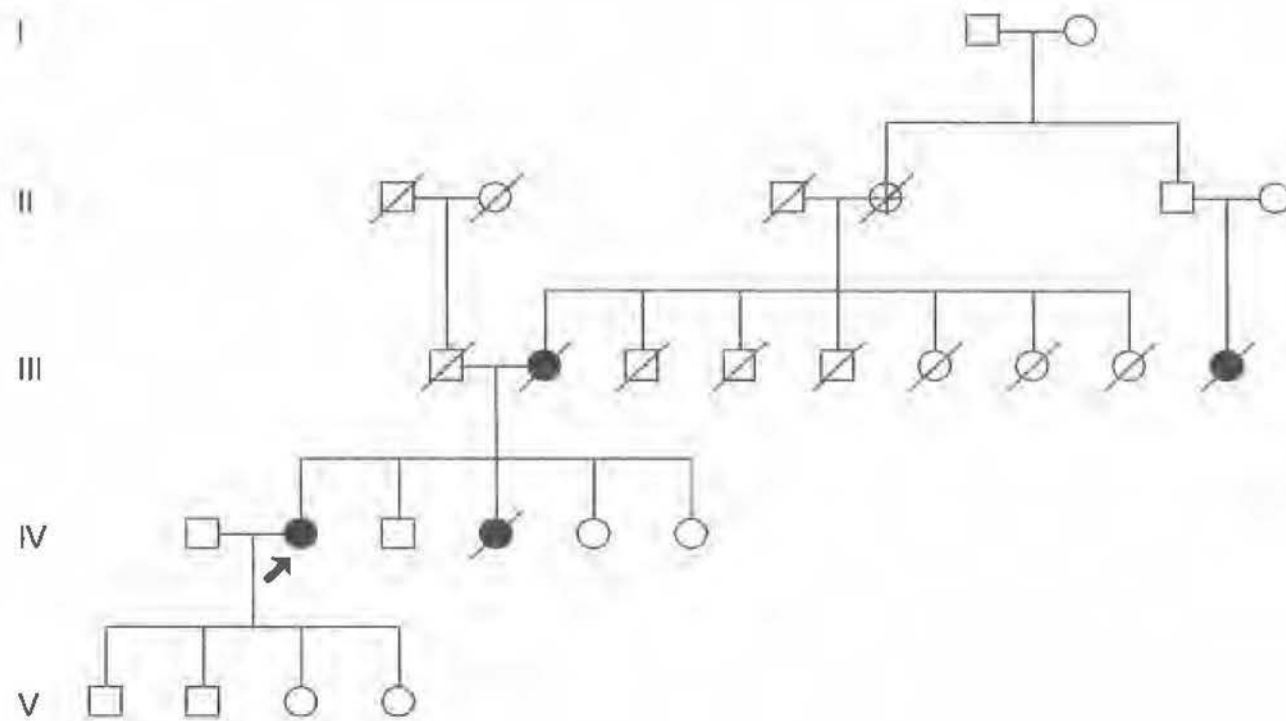


Figura 11. Genealogía de la familia código CM12

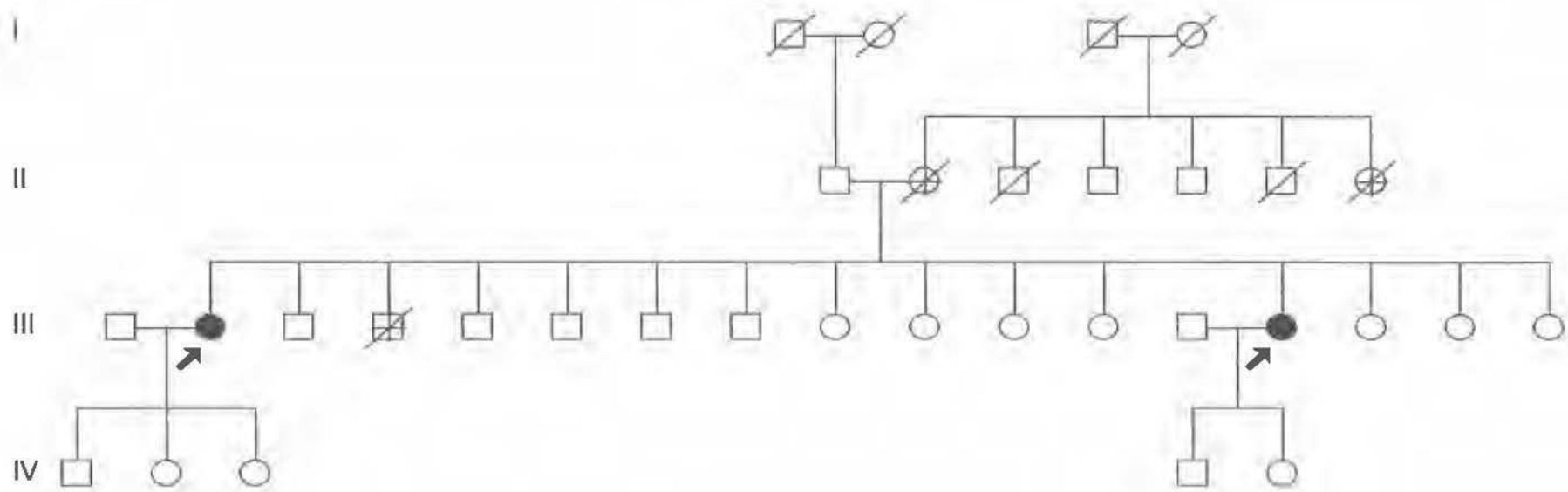


Figura 12. Genealogía de la familia código CM13

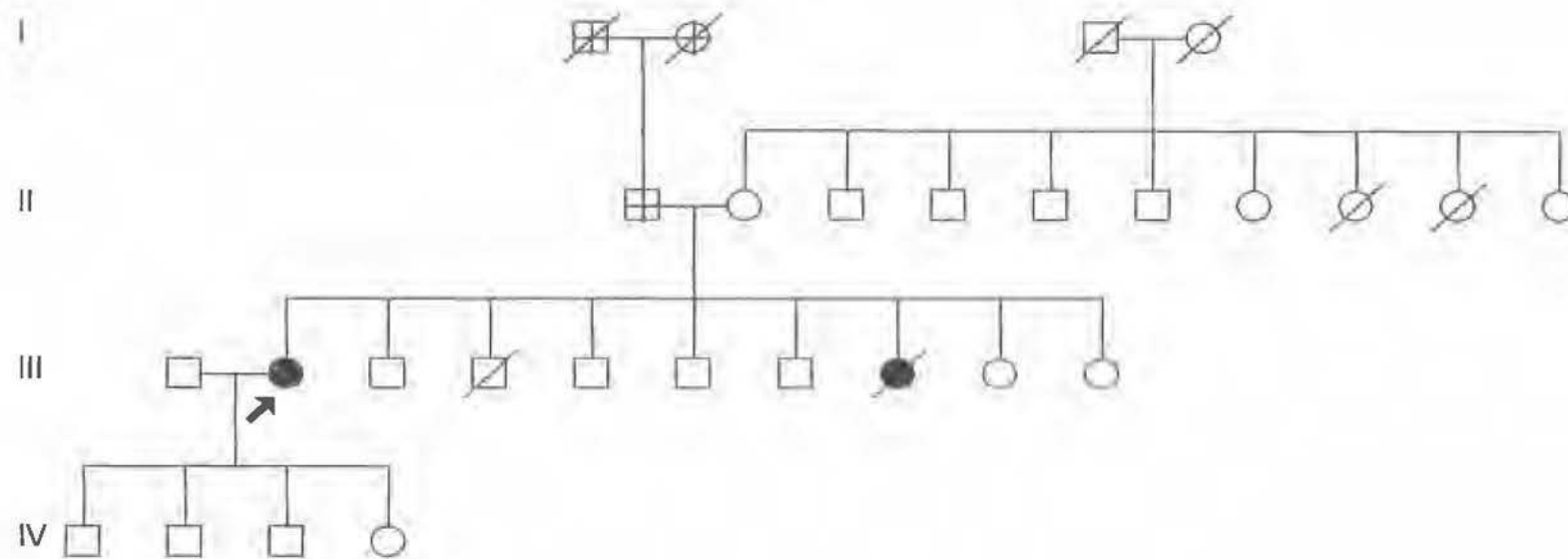


Figura 13. Genealogía de la familia código CM14

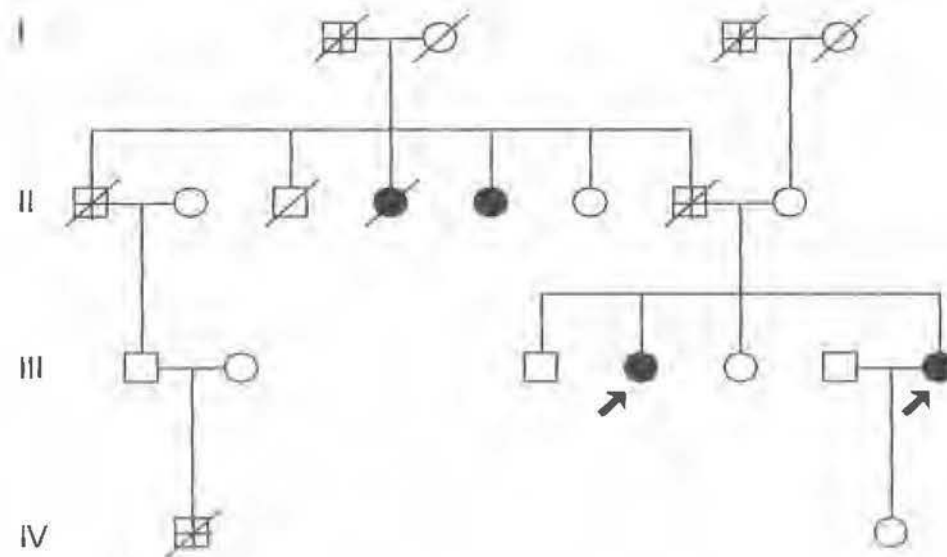


Figura 14. Genealogía de la familia código CM15

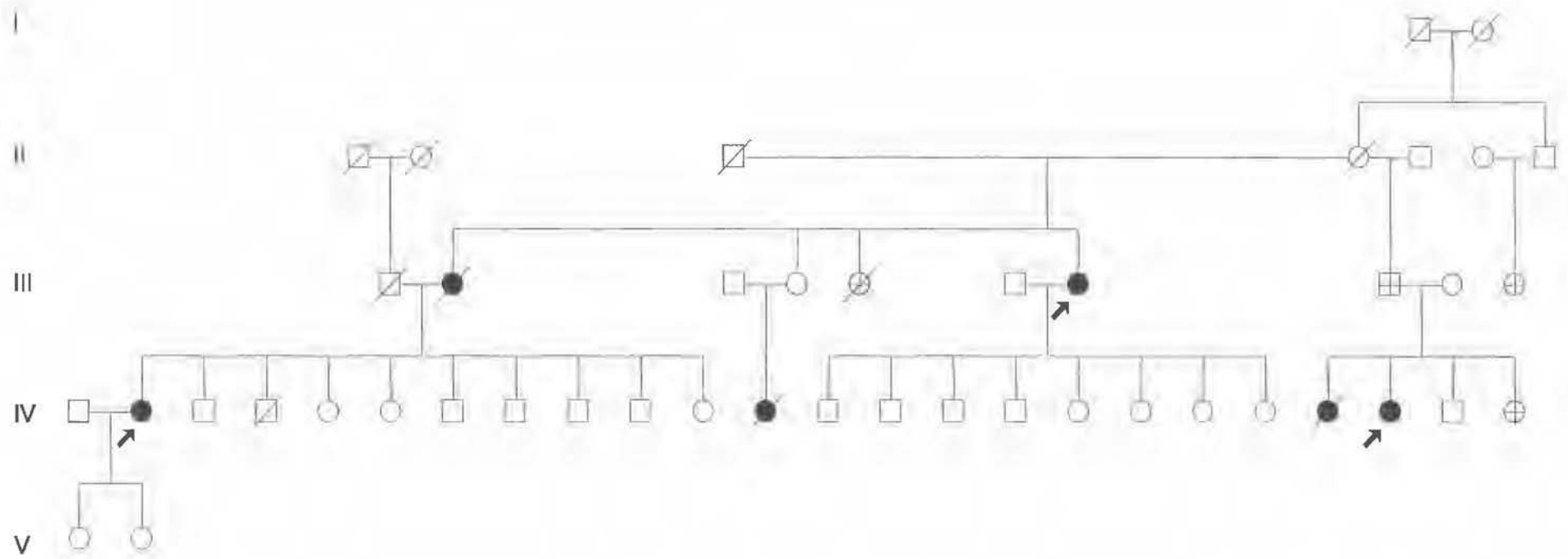


Figura 15. Genealogía de la familia código CM16

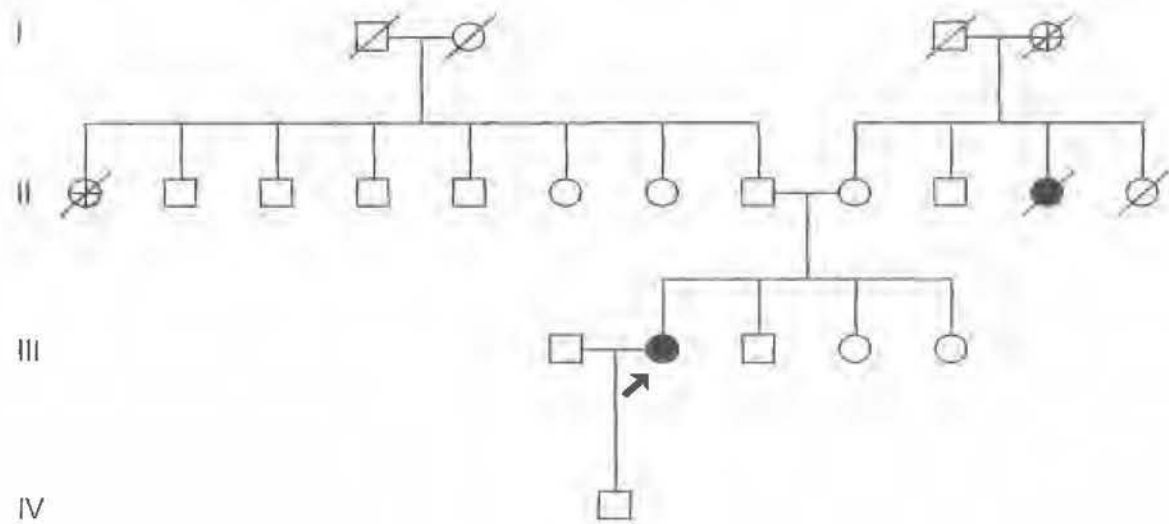


Figura 16. Genealogía de la familia código CM17

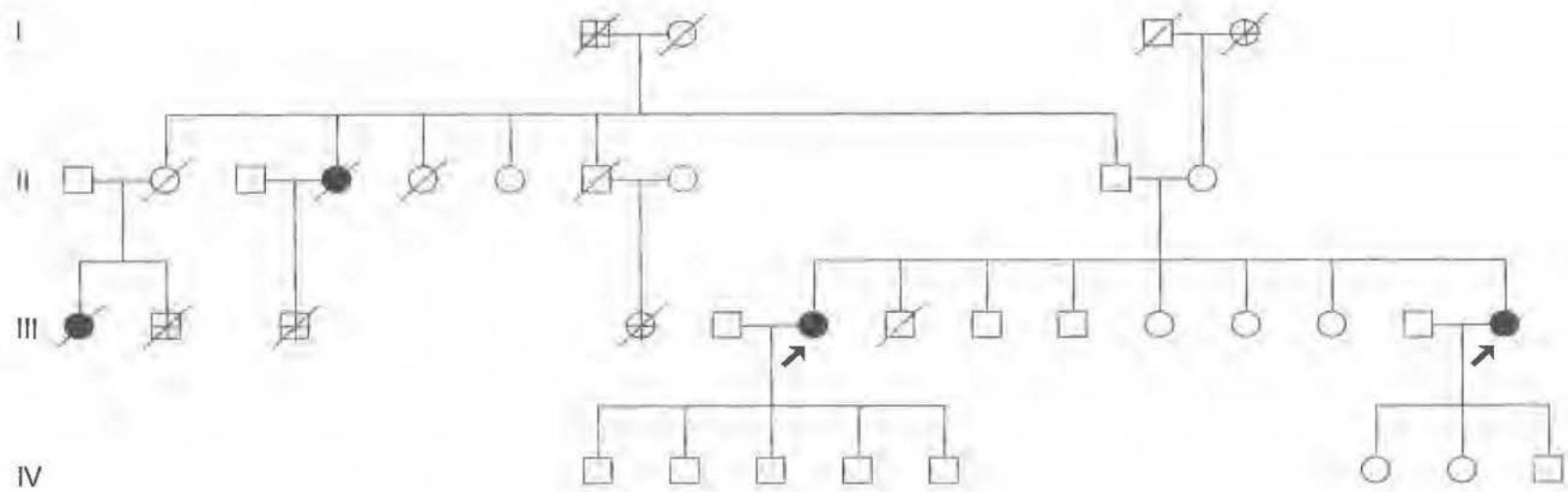


Figura 17. Genealogía de la familia código CM18

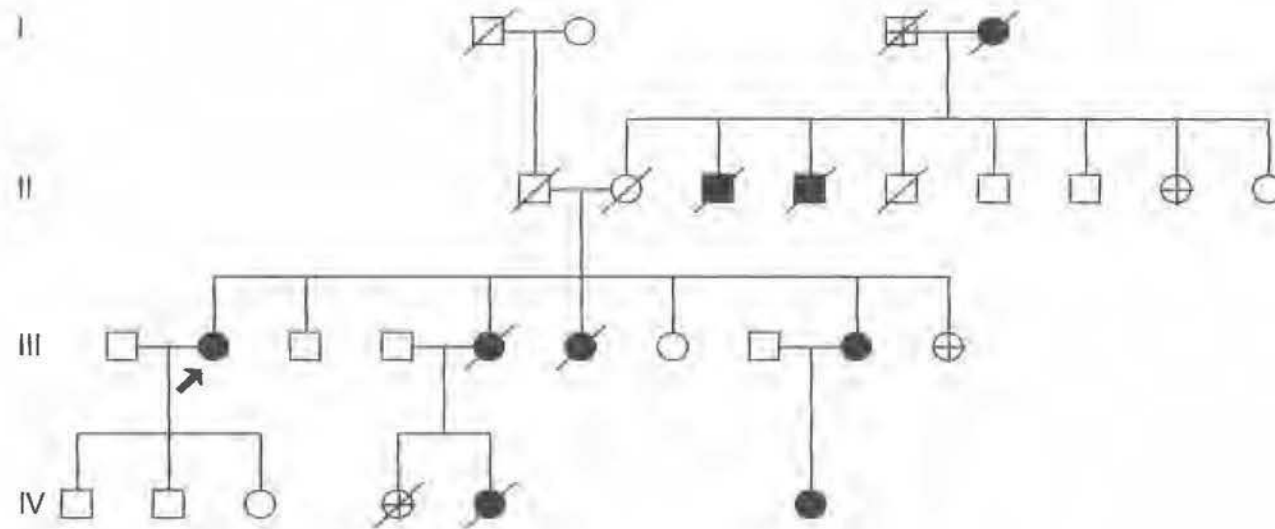


Figura 18. Genealogía de la familia código CM19

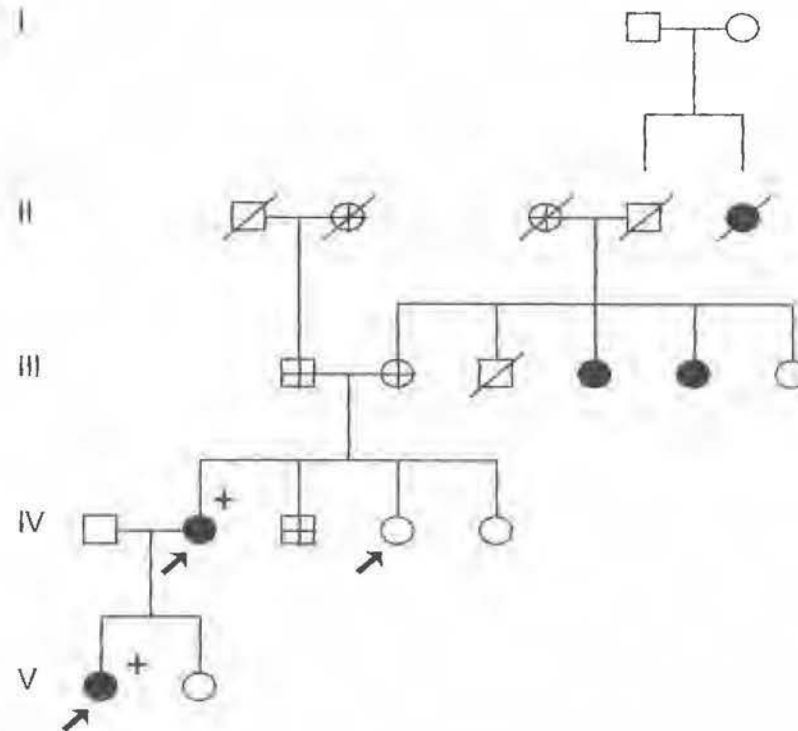


Figura 19. Genealogia de la familia código CM20

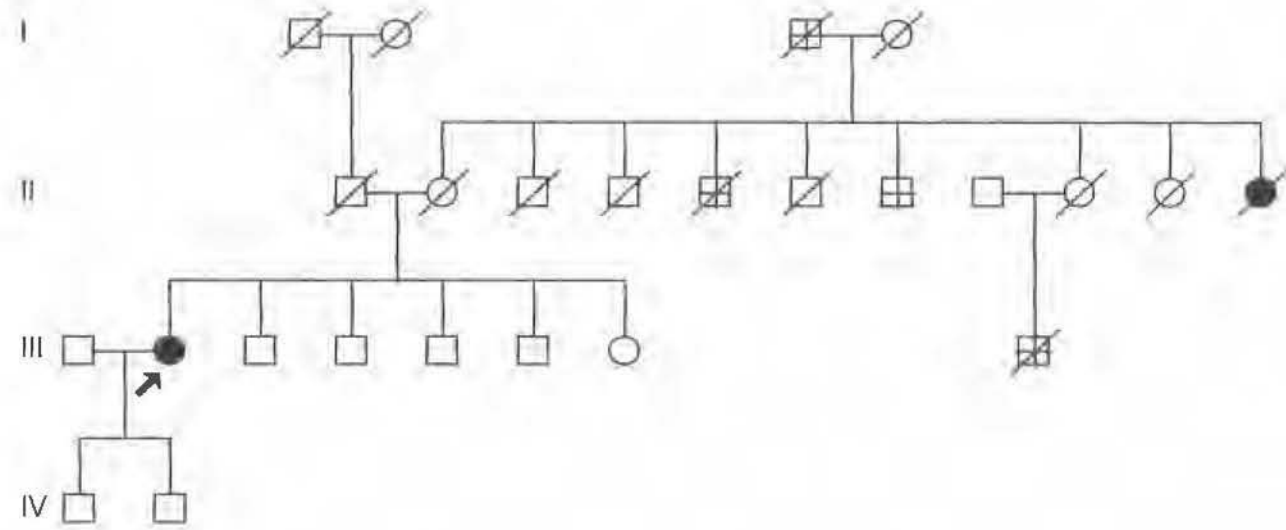


Figura 20. Genealogía de la familia código CM21

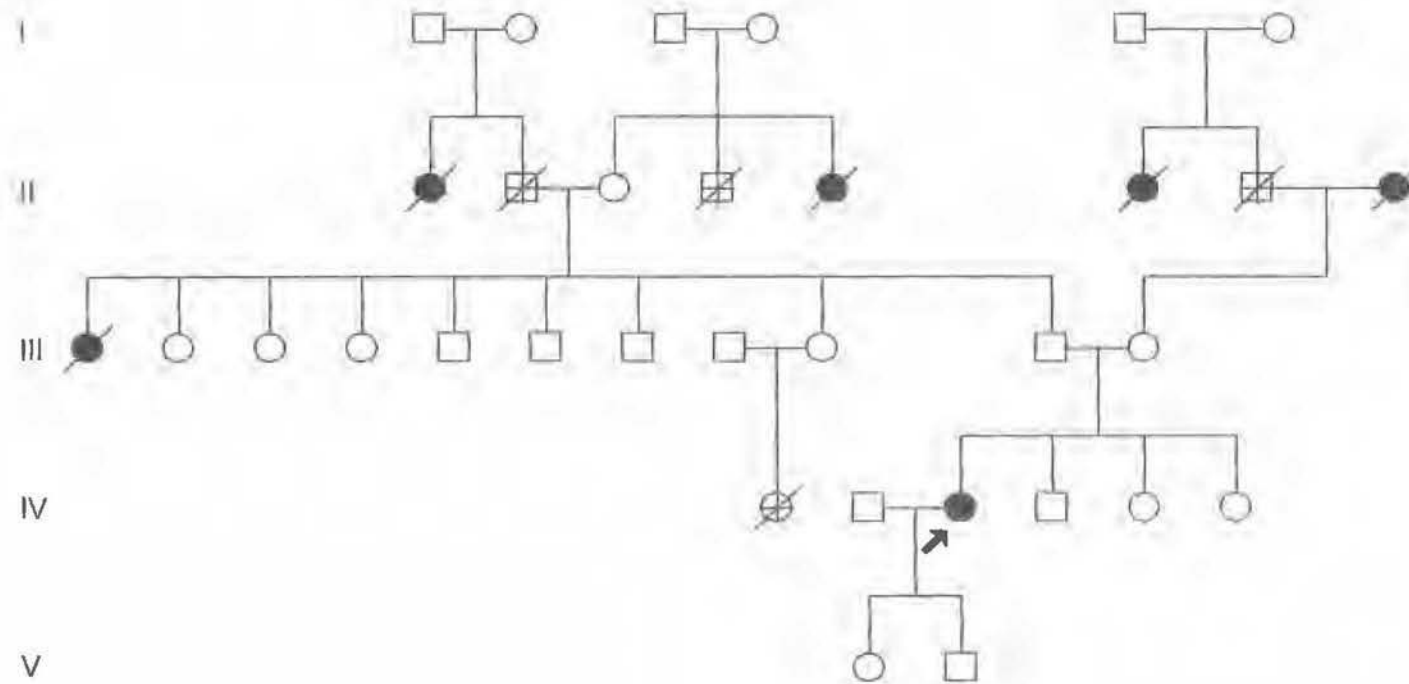


Figura 21. Genealogía de la familia código CM22

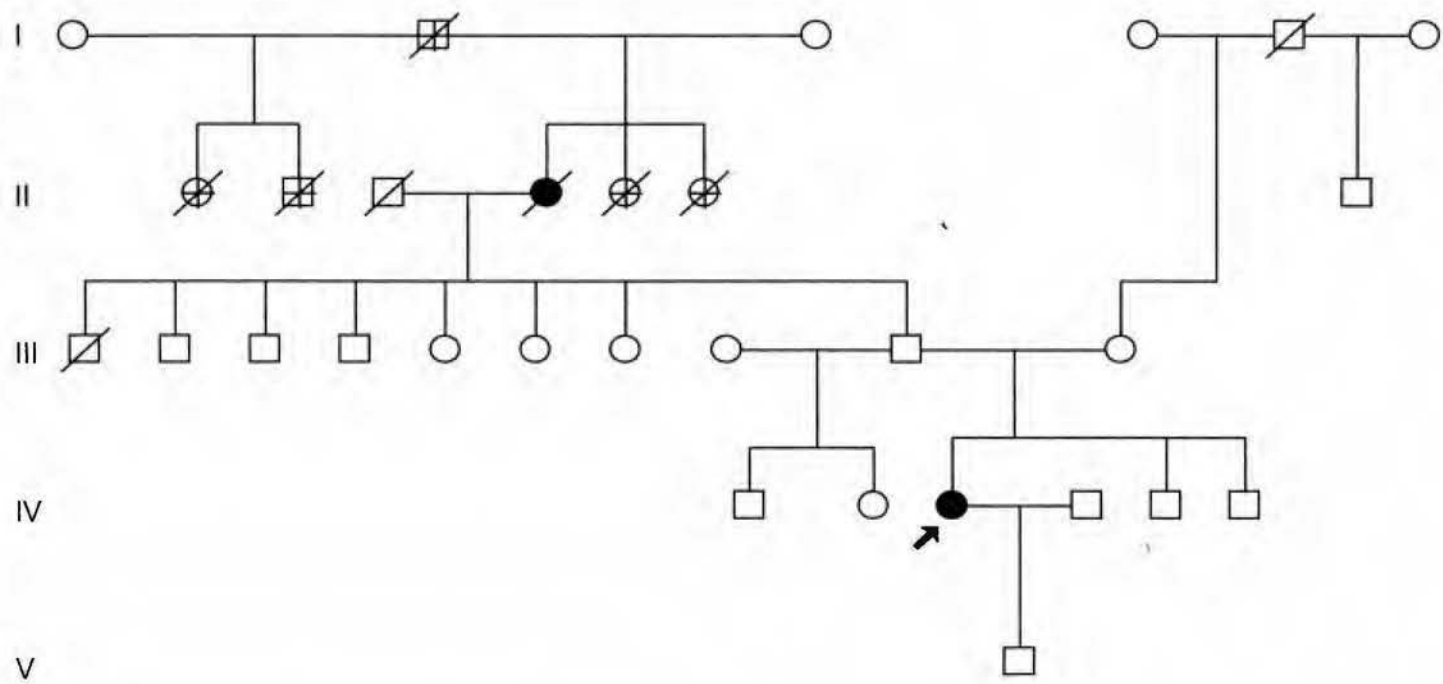


Figura 22. Genealogía de la familia código CM23

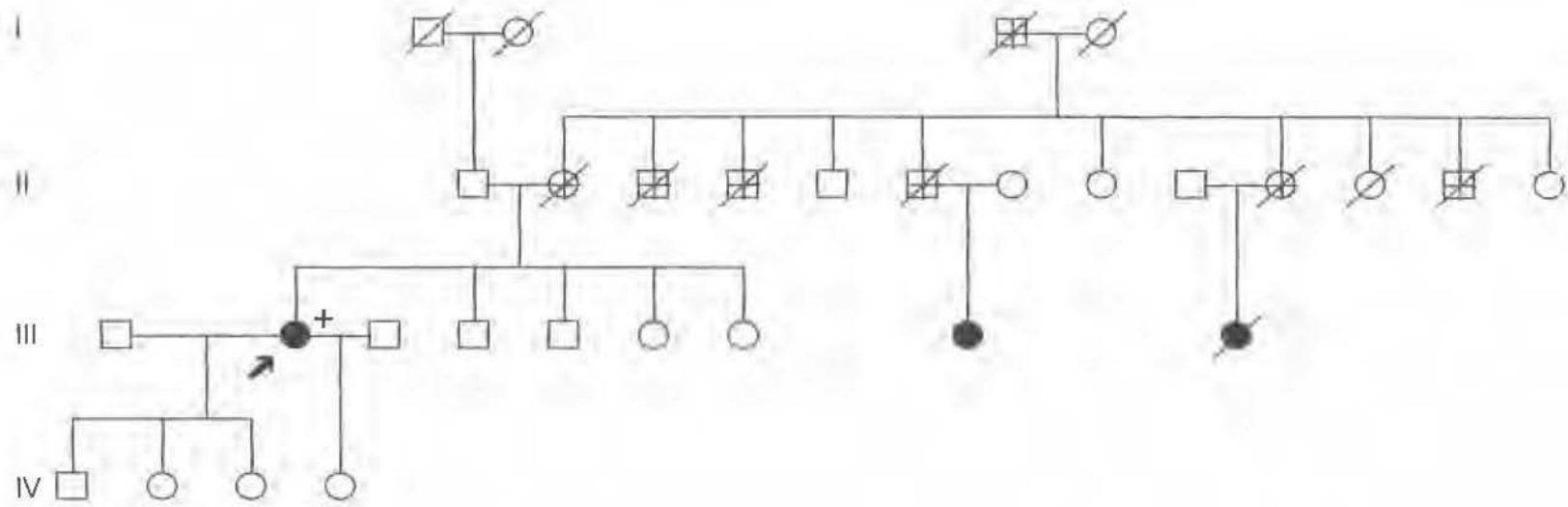


Figura 23. Genealogía de la familia código CM24

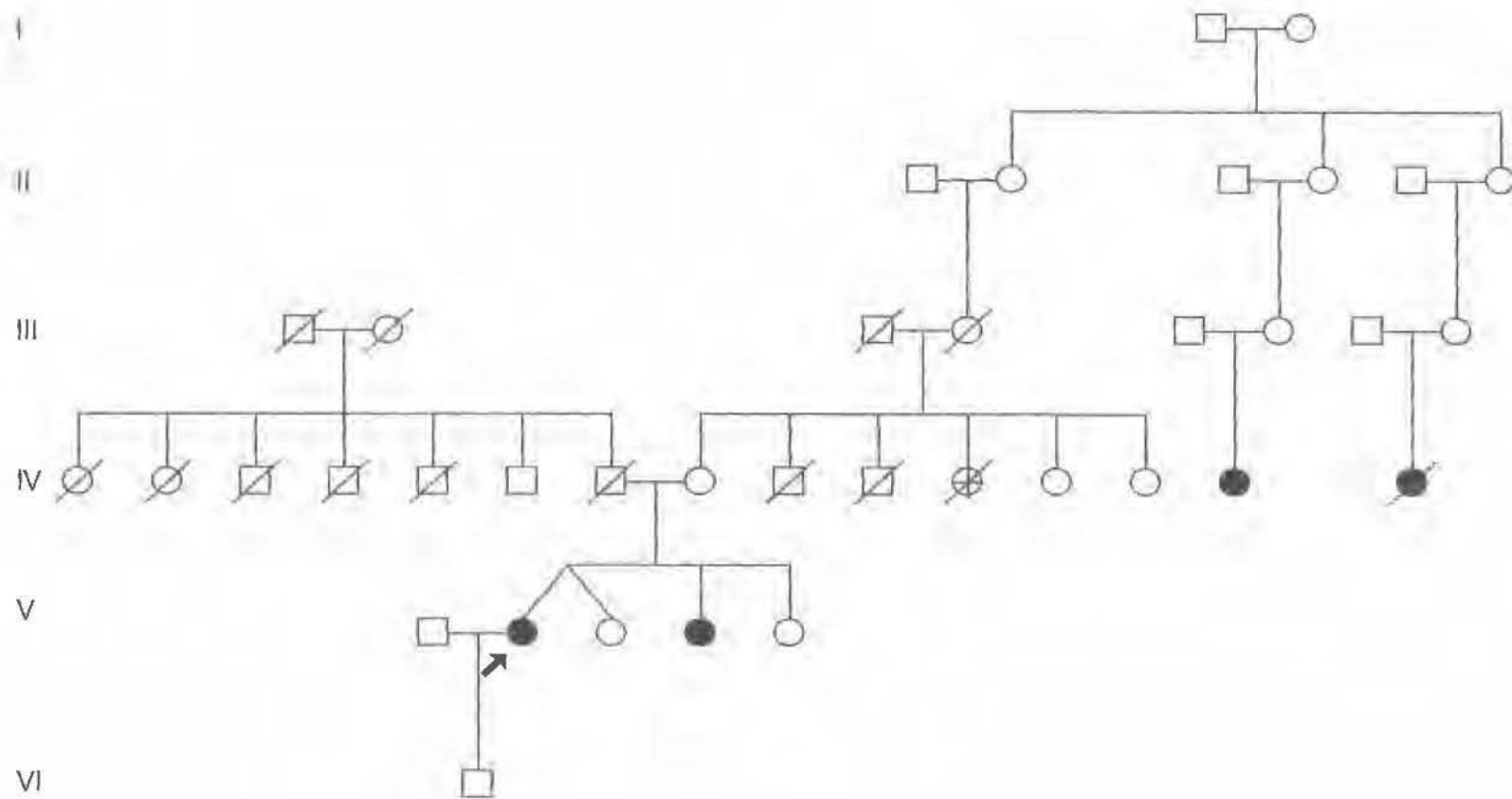


Figura 24. Genealogía de la familia código CM25

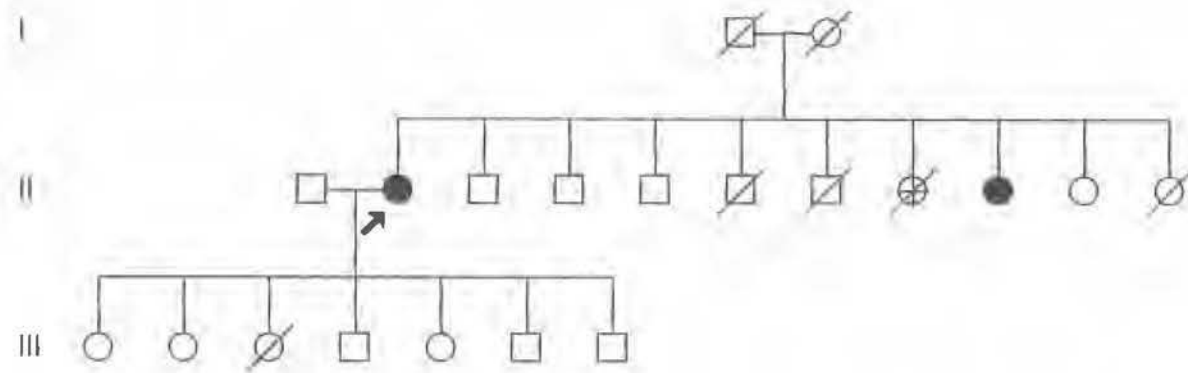


Figura 25. Genealogía de la familia código CM26

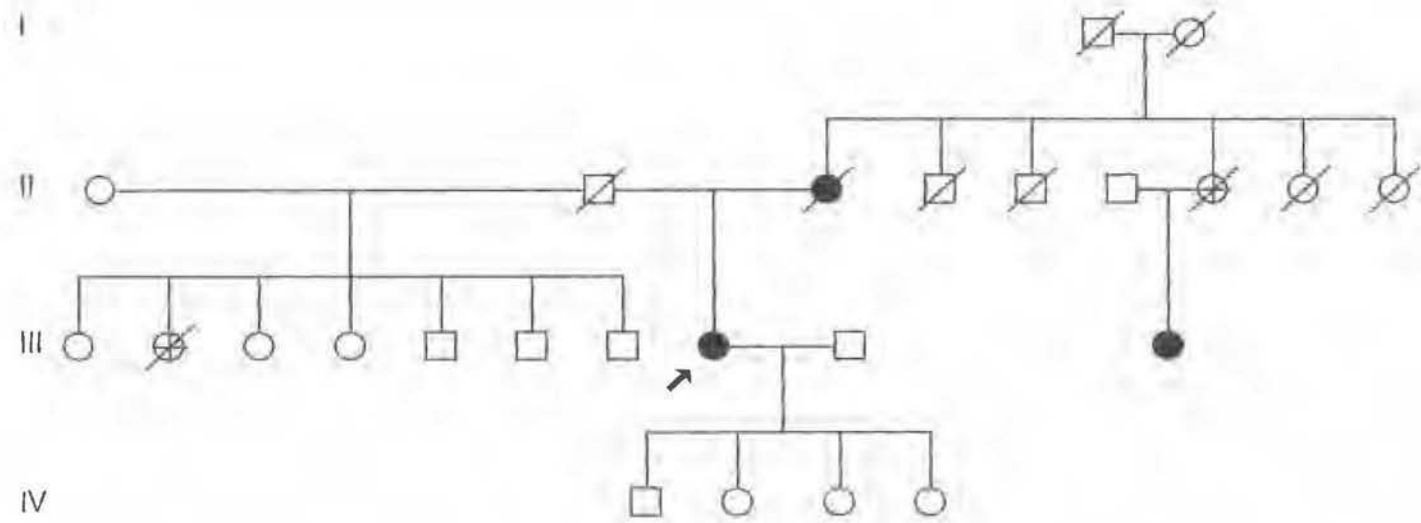


Figura 26. Genealogía de la familia código CM27

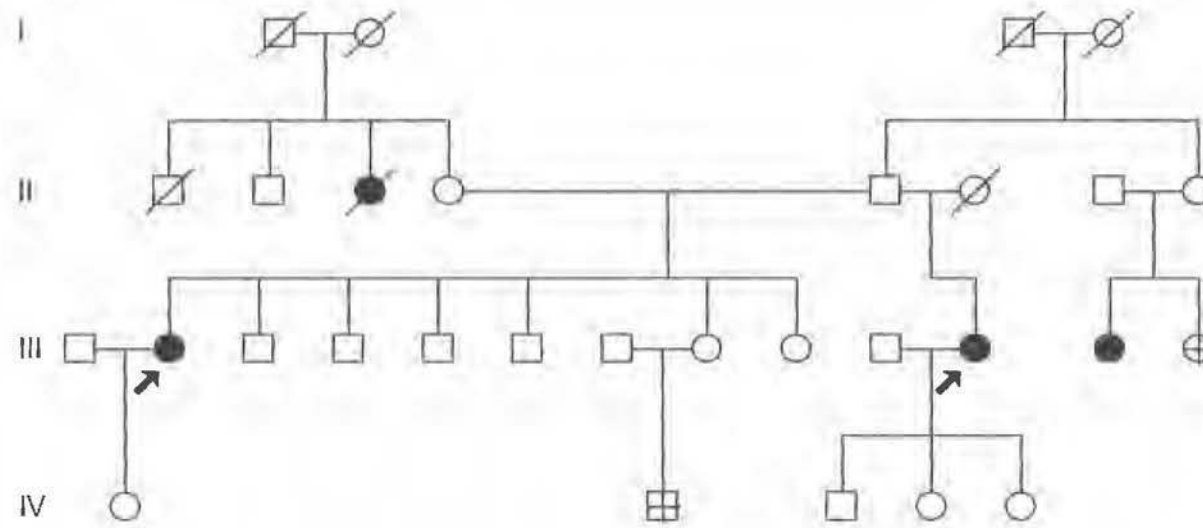


Figura 27. Genealogía de la familia código CM28

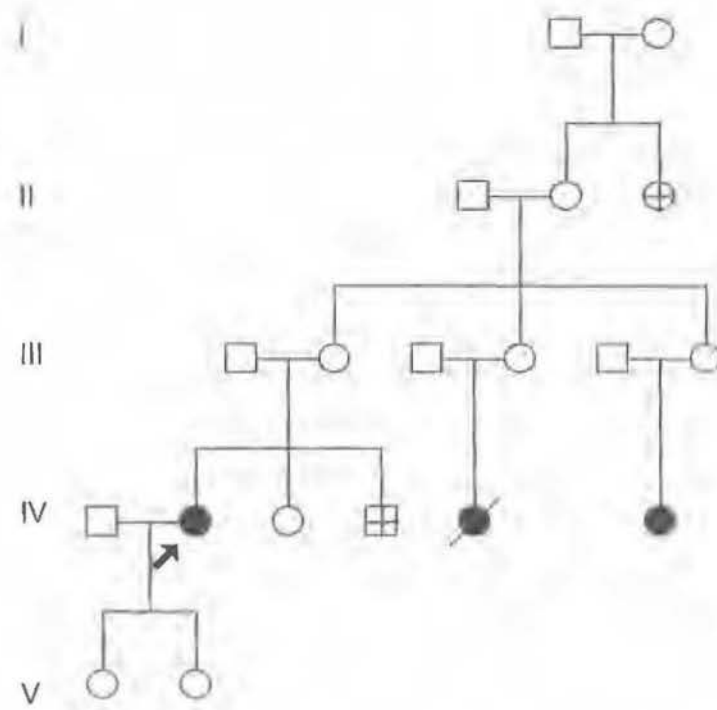


Figura 28. Genealogía de la familia código CM29

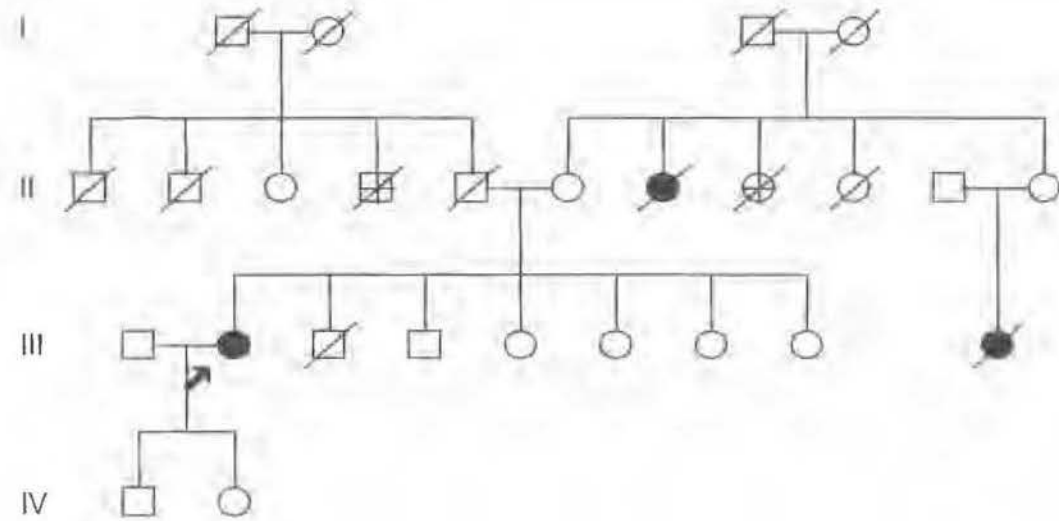


Figura 29. Genealogía de la familia código CM30

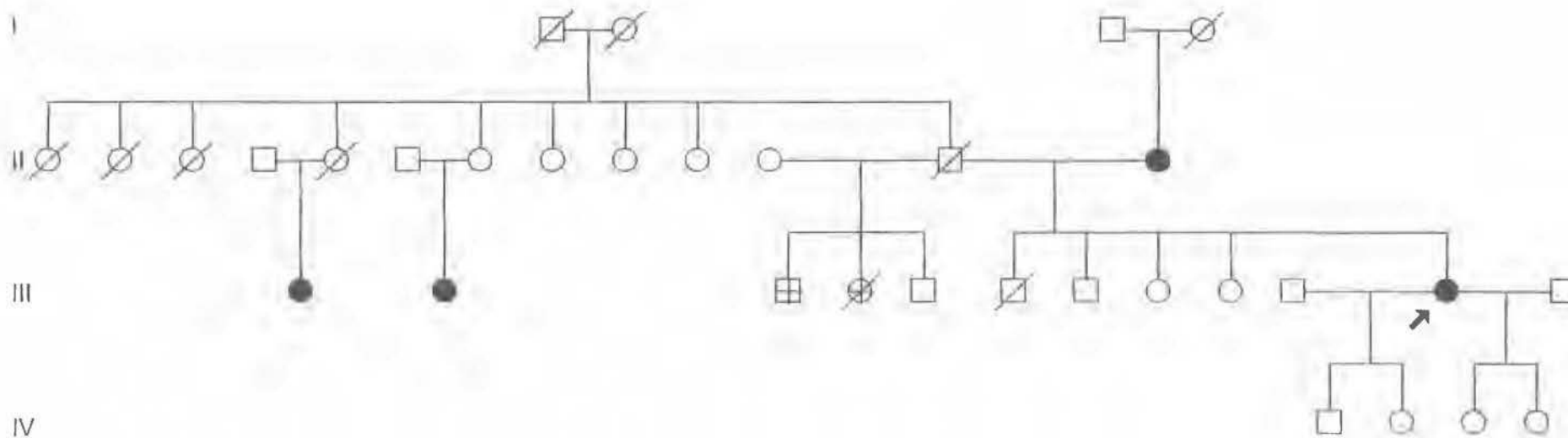


Figura 30. Genealogía de la familia código CM31

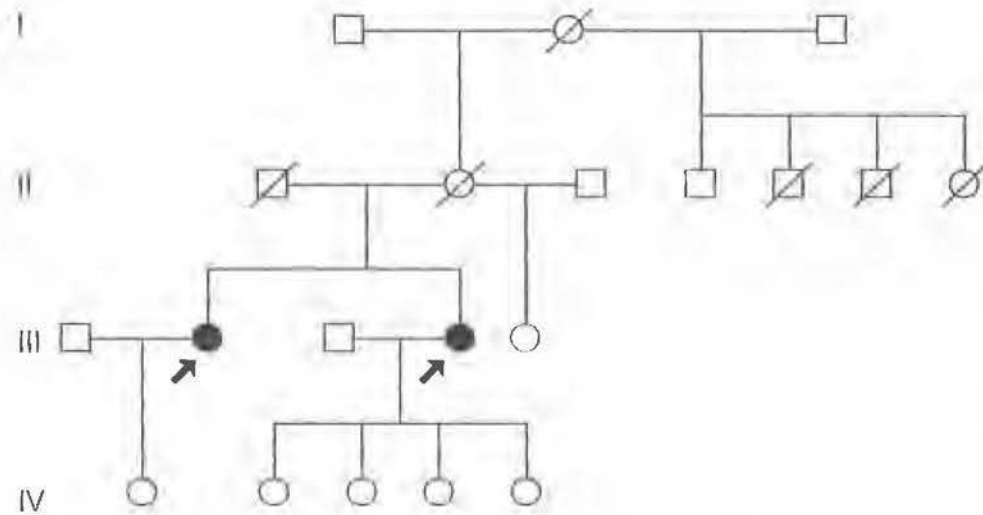


Figura 31. Genealogía de la familia código CM32

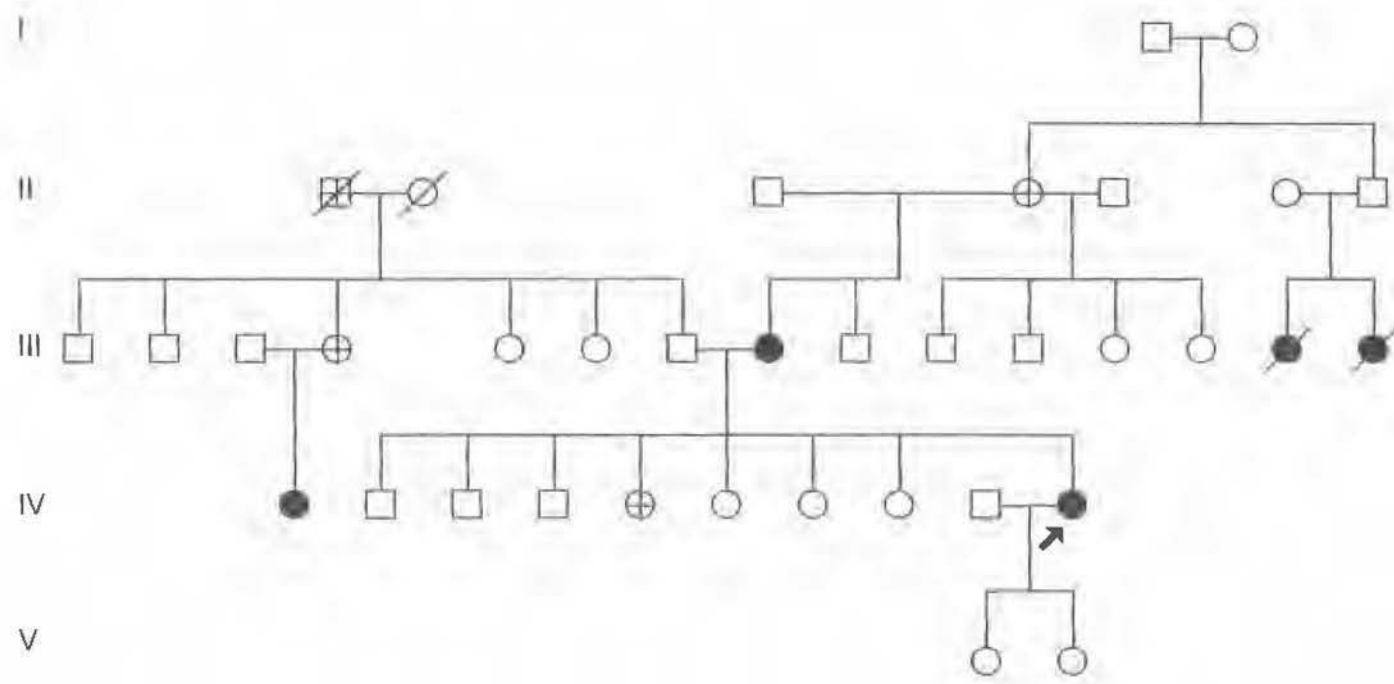


Figura 32. Genealogía de la familia código CM33

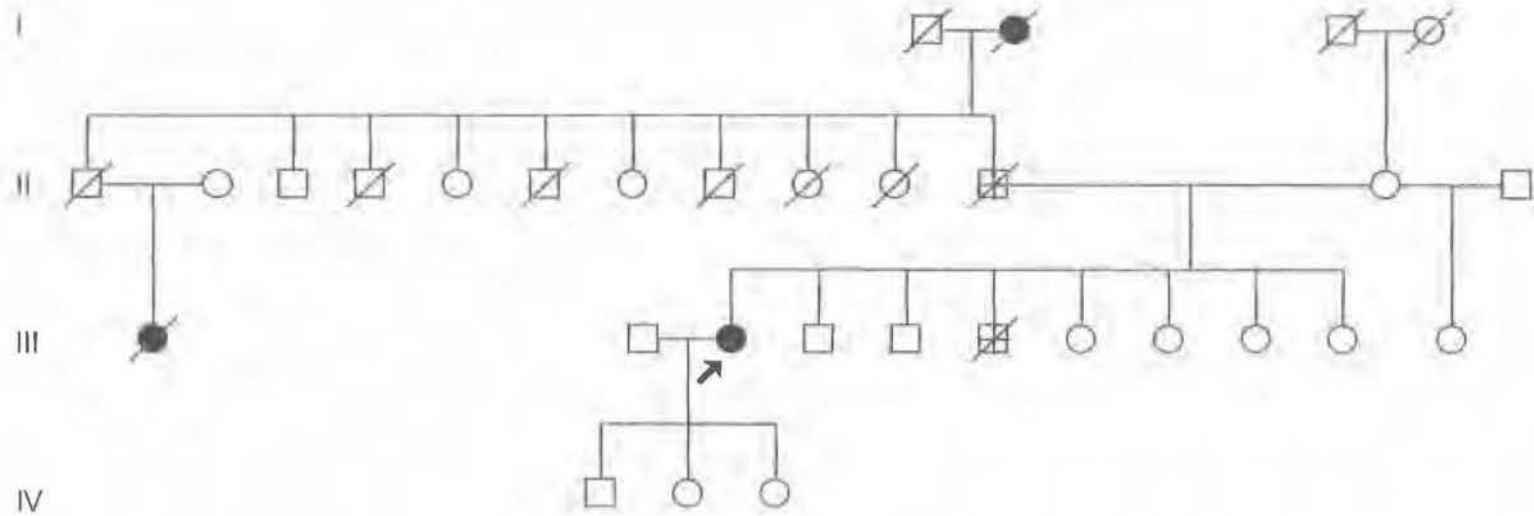


Figura 33. Genealogía de la familia código CM34

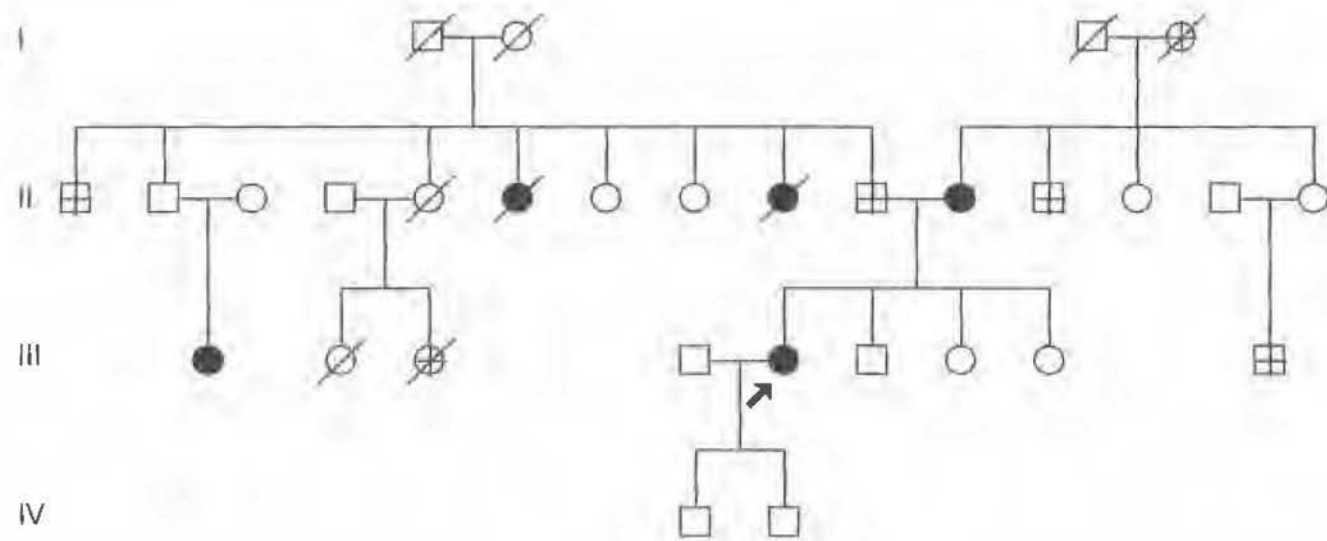


Figura 34. Genealogia de la familia código CM37

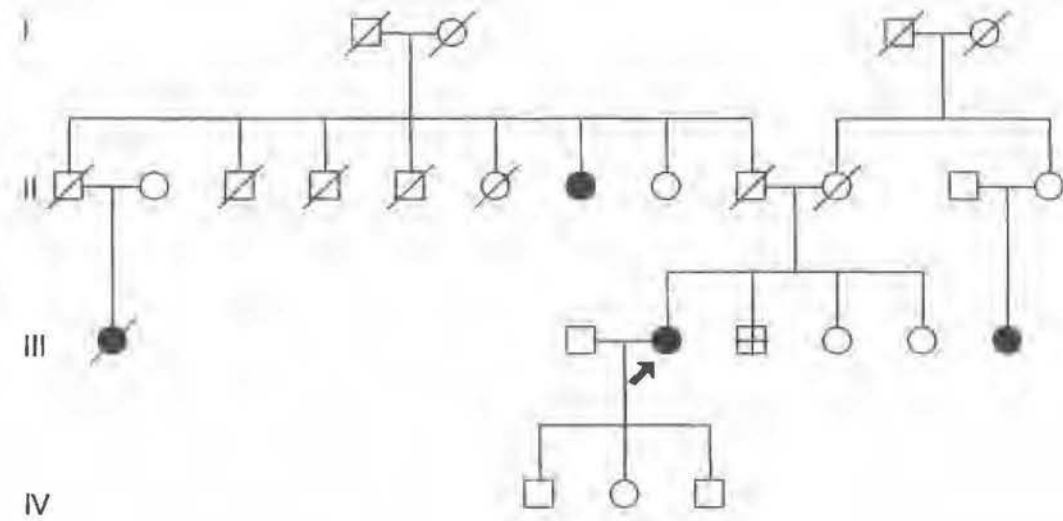


Figura 35. Genealogía de la familia código CM38

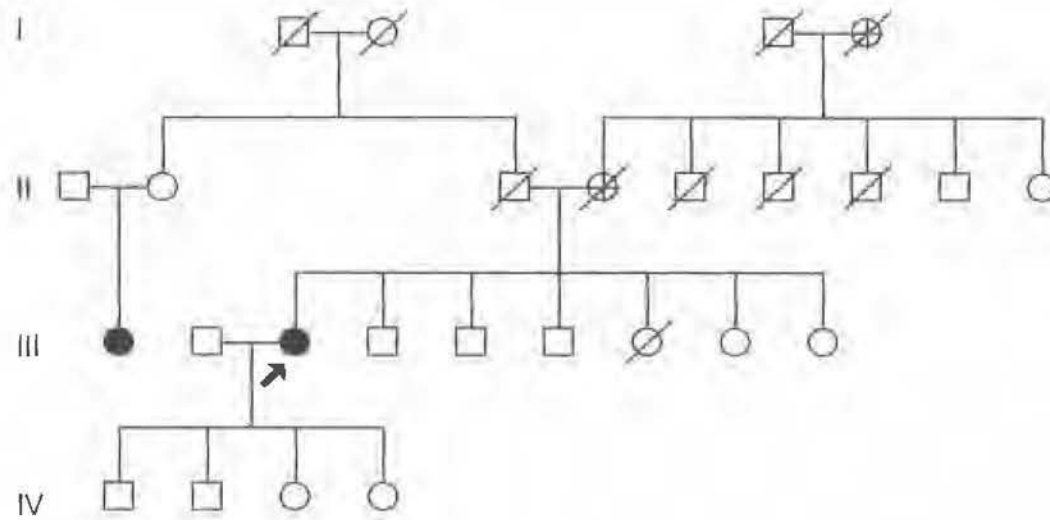


Figura 36. Genealogía de la familia código CM39

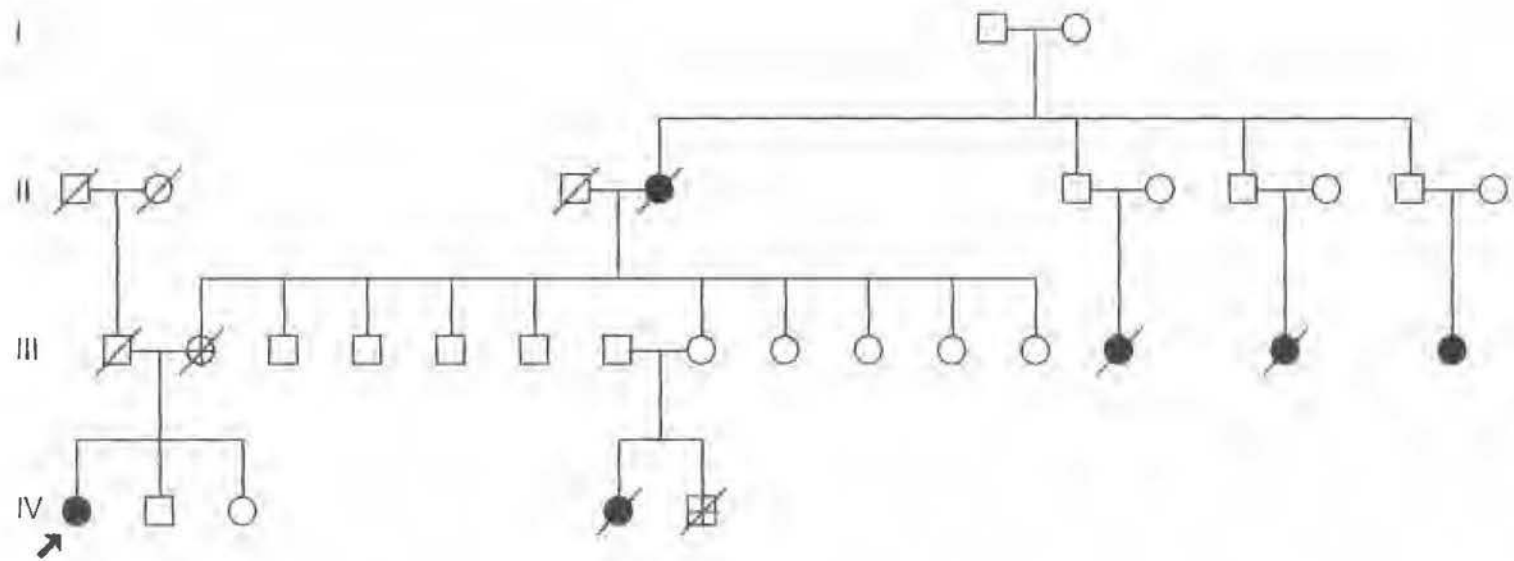


Figura 37. Genealogía de la familia código CM40

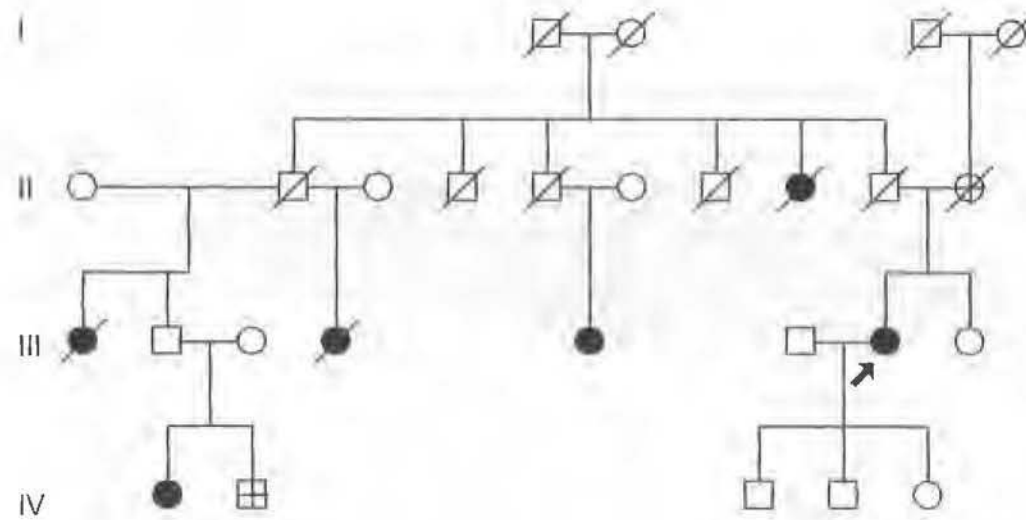


Figura 38. Genealogía de la familia código CM41

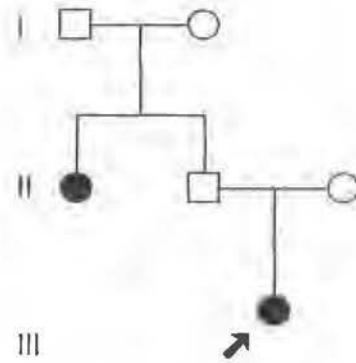


Figura 39. Genealogía de la familia código CM42

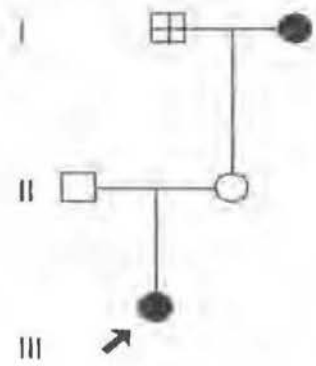


Figura 40. Genealogía de la familia código CM43

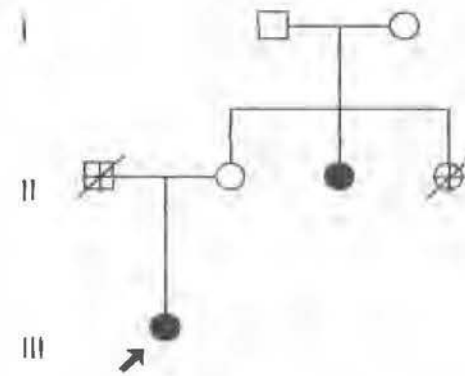


Figura 41. Genealogía de la familia código CM45

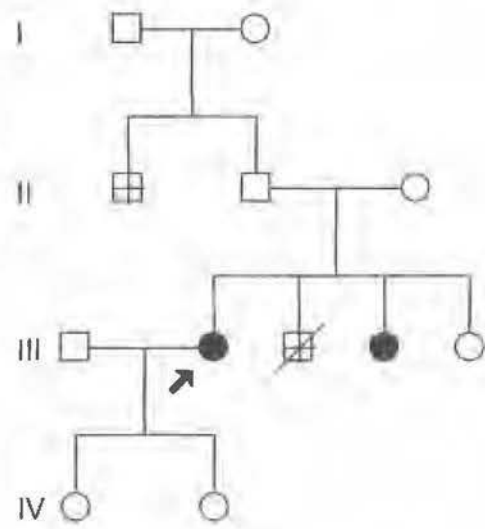


Figura 42. Genealogía de la familia código CM46

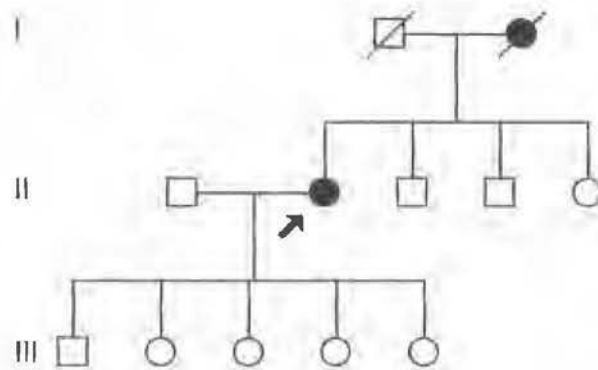


Figura 43. Genealogía de la familia código CM47

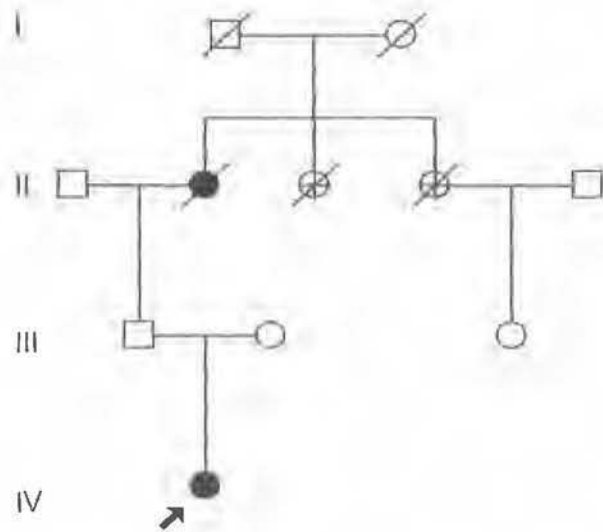


Figura 44. Genealogía de la familia código CM48

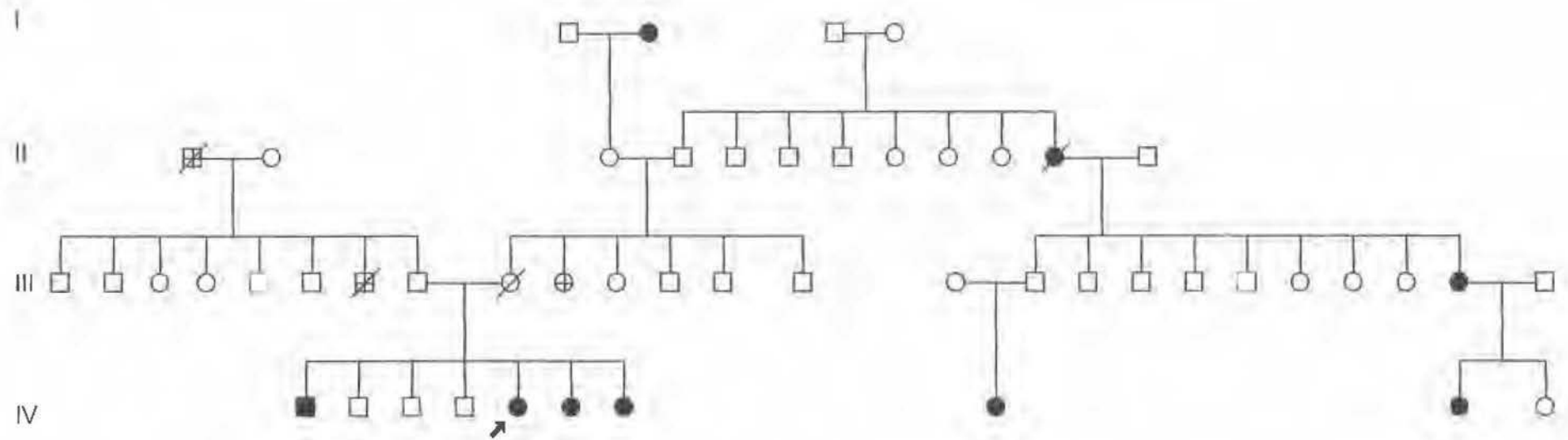


Figura 45. Genealogía de la familia código CM49

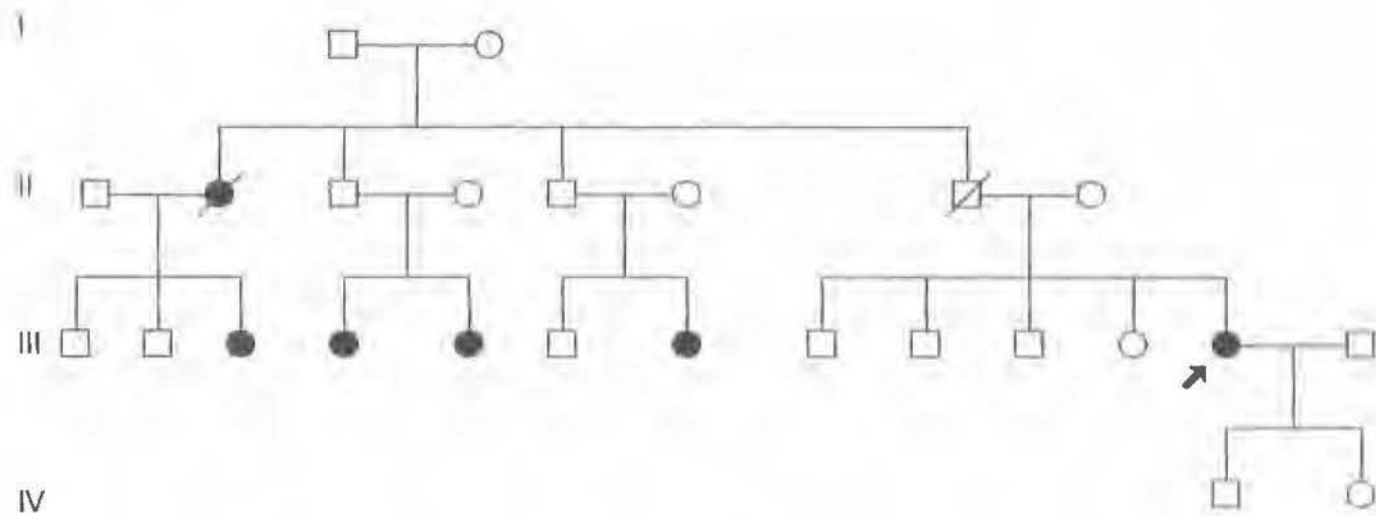


Figura 46. Genealogía de la familia código CM51

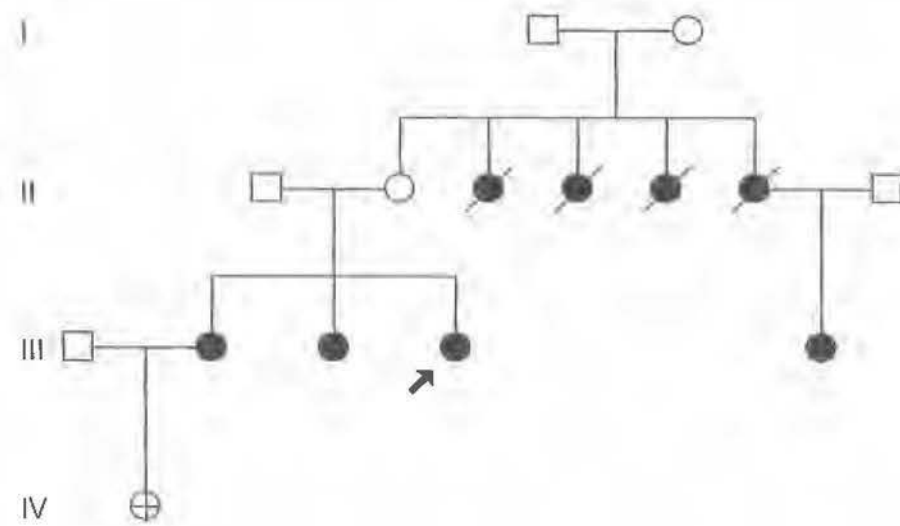


Figura 47. Genealogía de la familia código CM52

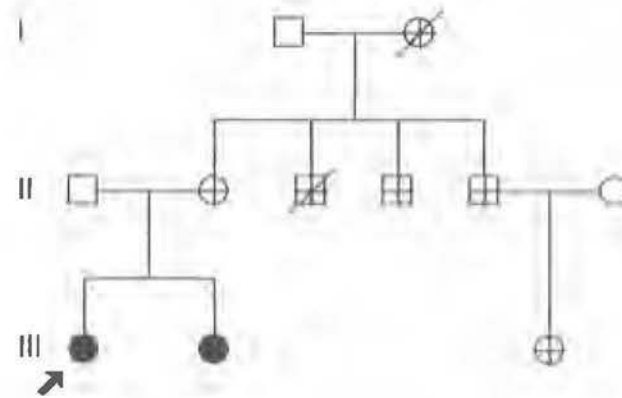


Figura 48. Genealogía de la familia código CM53

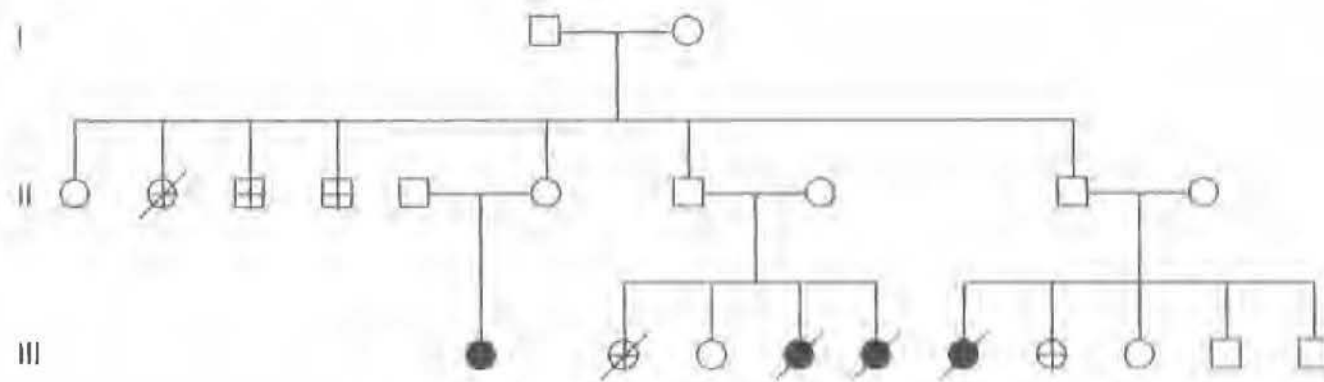


Figura 49. Genealogía de la familia código CM55

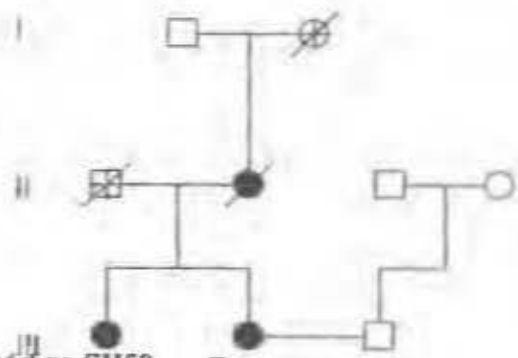


Figura 50. Genealogia de la familia código CM58

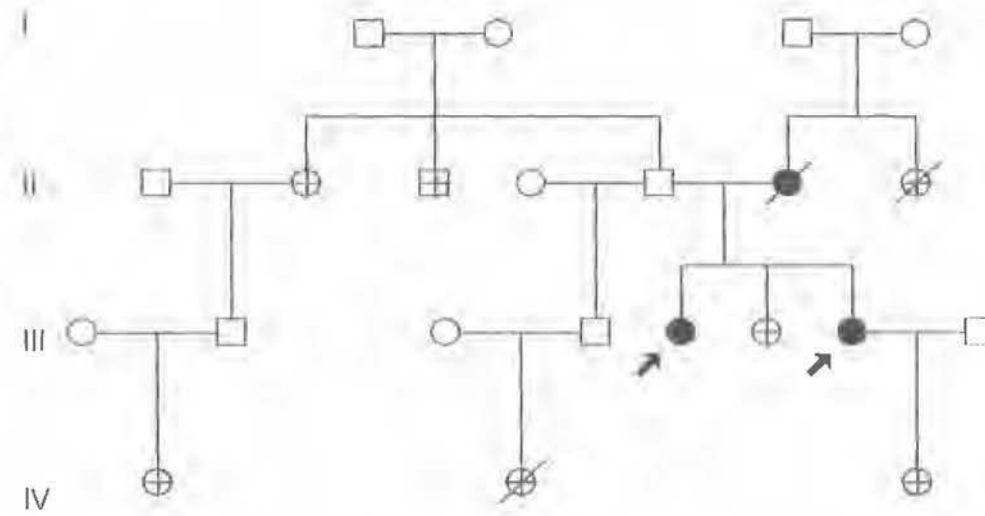


Figura 51. Genealogía de la familia código CM57

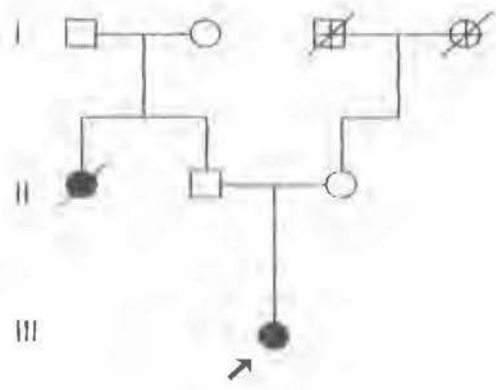


Figura 52. Genealogía de la familia código CM58

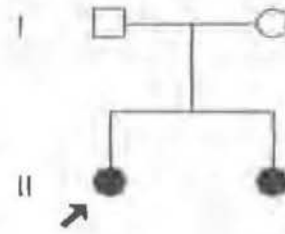


Figura 53. Genealogía de la familia código CM59

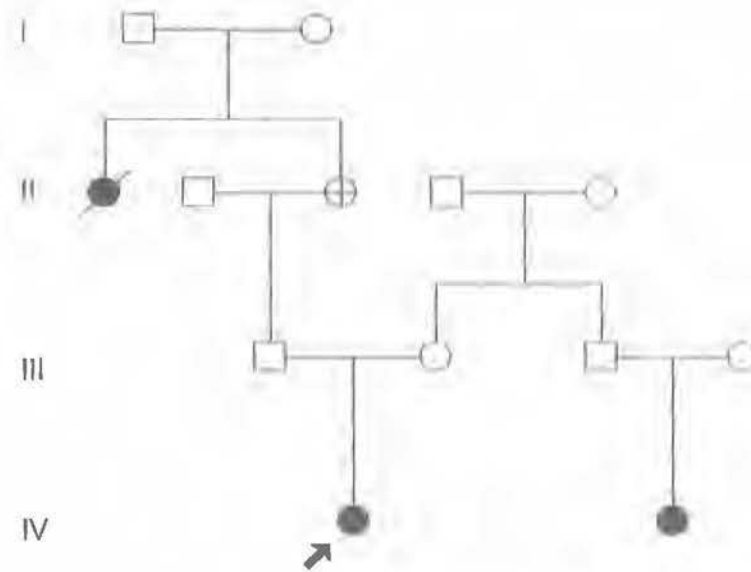


Figura 54. Genealogía de la familia código CM60

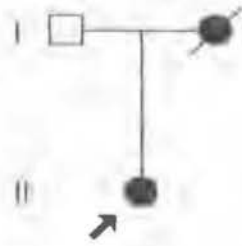


Figura 55. Genealogía de la familia código CM61

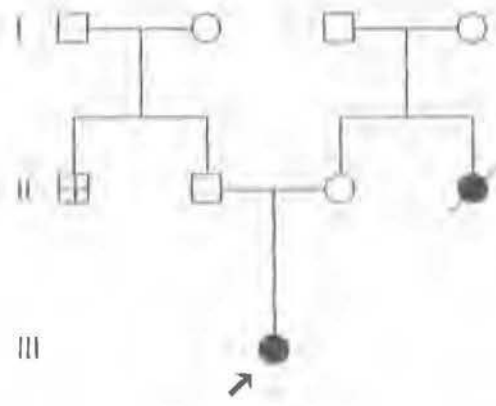


Figura 56. Genealogía de la familia código CM62

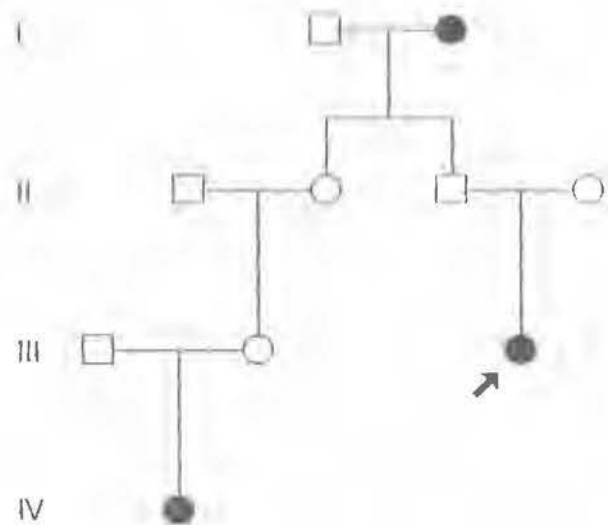


Figura 57. Genealogía de la familia código CM63

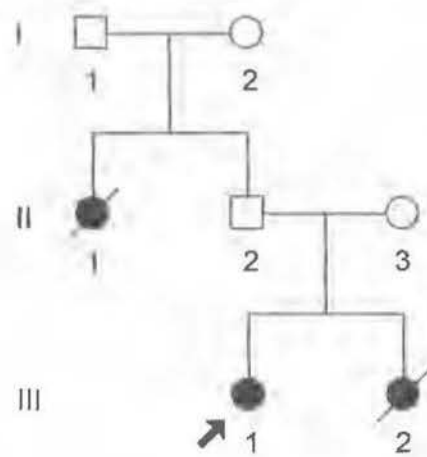


Figura 58. Genealogía de la familia código CM64

Significado de la simbología

Mujer afectada con cáncer de mama: ●

Mujer afectada a la que se le realizó examen genético: ●

Mujer afectada a la que se le realizó examen y dio resultado positivo: ●+

Mujer afectada que se le realizó el examen y dio resultado negativo: ●-

Mujer sana: ○

Hombre sano: □

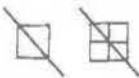
Mujer afectada con otro tipo de cáncer: ⊕

Hombre afectado con Otro tipo de cáncer: ⊞

Mujer fallecida:



Hombre Fallecido:



Cuadro 1 Características de las familias seleccionadas para el estudio

Familia	Casos	Casos en mujeres	Edad de diagnóstico	Casos en hombres	Edad de diagnóstico	Casos de CO	Edad de diagnóstico	Otros tipos de cáncer presentes en la familia
CM 02	7	5	51,44,40,desc	0		0		Estómago,pulmón,piel,próstata,útero
CM 03	7	7	>50,>50,>50, <50,<50,<50/ bl,45	0		0		Linfático,próstata,hígado,colon
CM04	7	7	70,50,50,49,4 9,47,30Bi	0		1	50	Gástrico,póstata,piel,pulmón,útero
CM05	7	7	55,90,61,61,5 8,75,58	0		0		Gástrico,vejiga
CM06	5	5	desc,desc,57, desc,40	0		0		Piel,pulmón
CM7	3	3	56,desc,44	0		0		ninguno
CM8	5	5	desc,52,52,4 5,40	1	50	0		Próstata
CM9	8	8	68,desc,71,d esc,desc,desc c 38,45	0		1	32	Próstata
CM10	5	5	desc,66,desc, 38,41,40	0		0		Próstata,gástrico
CM11	3	3	37,40,45	0		0		Próstata,gástrico,hígado,cerebro
CM12	4	4	70,50,54,36	0		0		Gástrico
CM13	2	2	47,36	0		0		Pancreas
CM14	2	2	35,44	0		0		Gástrico,cuello,
CM15	4	4	45,70,52,42	0		0		Pulmón,leucemia,colon,
CM16	5	5	47,68,41,42,3 6,52	0		0		Gástrico,garganta,cerebro,colo n,
CM17	2	2	50,37	0		0		Gástrico,
CM18	3	3	23,50,39	0		0		Huesos,gástrico,páncreas,próstata
CM19	10	8	60,65,68,56,4 57,59,bl,44,22	2	20,60,	0		Gástrico,útero,matris
CM20	4	4	>50,>60,42/5 5bl,30	0		0		Póstata,piel,gástrico
CM21	2	2	40,35	0		0		Pulmón,garganta,ojo,gástrico
CM22	3	3	50,53,30	0		0		Leucemia,torax,
CM23	2	2	desc,38	0		0		Colon,cabeza útero
CM24	3	3	49,38,45	0		0		Huesos,gástrico,hígado
CM25	4	4	38,50,42,47	0		0		Linfoma
CM26	2	2	51,desc	0		0		Cerebro
CM27	3	3	65,51,50	0		0		Gástrico,garganta
CM28	3	3	51,46,52	0		0		Gástrico,pulmón
CM29	3	3	29,38,desc	0		0		Leucemia,linfoma
CM30	3	3	desc,51,desc	0		0		Pulmón
CM31	5	2	83,54	0		0		Próstata,gástrico
CM32	2	2	62,65	0		0		ninguno
CM33	3	1	40	0		3	desc,Desc,desc	Cerebro,piel
CM34	3	3	65,50,53	0		0		Hígado,cerebro
CM37	4	4	65,55,40,41	0		1	42	Gástrico,páncreas,útero
CM38	4	4	72,desc,55,d esc	0		0		ninguno
CM39	2	2	44,53	0		0		Pulmón
CM40	3	2	55,39	0		4	52,desc,desc, desc	Cervix cerebro

Cuadro 1 Características de las familias seleccionadas para el estudio (continuación).

Familia	casos	Casos en mujeres	Edad de diagnóstico	Casos en hombres	Edad de diagnóstico	Casos de CO	Edad de diagnóstico	Otros tipos de cáncer presentes en la familia
CM41	6	6	84,40,65,65,60,55	0		0		Garganta
CM42	2	2	80,60,00	0		0		Próstata
CM43	2	2	50,37	0		0		Gástrico
CM45	2	2	55,45	0		0		Pulmón, hígado
CM46	2	2	62,48	0		0		Hígado, Colon
CM47	2	2	76,64	0		0		ninguno
CM48	2	2	<50,39	0		2	70,<50	Cerebro
CM49	6	6	Desc Desc 70,47,35,44,37	1	desc	0		Utero
CM51	6	6	35,40,48,35,45,42	0		0		prostata
CM52	8	8	desc,<40,desc,desc,45,43,44,45	0		0		Linfático
CM53	2	2	<50,31	0		1	80	Utero,riñon,próstata,piel,garganta
CM55	4	4	45,45,35,37	0		1	38	Cerebro
CM56	3	3	70,57,48	0		0		Gastrico
CM57	3	3	50,63,57	0		0		Hígado, piel,cervix,leucemia
CM58	2	2	45,38	0		0		hígado, gastrico
CM59	2	2	63,59	0		0		
CM60	2	3	desc,28,56	0		0		Gastrico
CM61	2	2	41,32	0		0		ninguno
CM62	2	2	54,54	0		0		Estomago
CM63	3	3	desc,43,desc	0		0		ninguno
CM64	3	3	desc,59,32	0		0		ninguno

