
Detección de mutaciones en el gen p53 en el cáncer de mama familiar y esporádico en la población Navarra

J.M. Lera¹, C. Napal², M. García Delgado³, G. López García⁴, L. Abascal¹, F. Vicente²

INTRODUCCIÓN

Cáncer de mama, factores de riesgo y factores pronósticos

En la mayoría de los países desarrollados el cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en la mujer; en Navarra se estima que una de cada 14 mujeres desarrollarán cáncer de mama a lo largo de su vida¹. En España el cáncer de mama supone el 16,4% de las muertes en la mujer; esta proporción es mayor en los grupos de edad entre 25 y 44 años (33,5%) y entre 45 y 64 años (25,7%)². Estudios multidisciplinarios han permitido establecer que factores de riesgo, como la edad, antecedentes familiares, factores hormonales, radiaciones ionizantes y factores sociales, nivel socioeconómico alto y residencia en países desarrollados son parámetros que aumentan el riesgo de padecer cáncer de mama.

Según los antecedentes familiares el cáncer de mama se puede dividir en: cáncer de mama esporádico (sin historia familiar de cáncer de mamario en dos generaciones); cáncer de mama familiar cuando

aparece dicha neoplasia en dos parientes en primer grado en ausencia de cáncer de mama hereditario; cáncer de mama hereditario, cuando aparece en una mujer con antecedentes familiares y compatible con transmisión autosómica dominante y alta penetrancia (Lynch)³.

Genética del cáncer de mama

Estudios por medio de citometría de flujo y citogenética han permitido observar que el cáncer de mama presenta aneuploidía aproximadamente en el 40-60% de los casos, y múltiples alteraciones cromosómicas en el 70% de los tumores.

Por medio de la biología molecular se ha visto, que el cáncer puede surgir como consecuencia del acúmulo de alteraciones genéticas que interfieren el control normal del crecimiento y diferenciación celular. Estas alteraciones pueden agruparse en: activación de protooncogenes e inactivación de genes supresores de tumores.

El gen p53 es el más frecuentemente mutado en todos los cánceres. Es un gen de los denominados supresores del crecimiento tumoral, aunque también puede

ANALES Sis San Navarra 1997, 20 (Supl. 3): 39-43.

1. Servicio de Cirugía General. Hospital de Navarra.
2. Centro de Salud de Barañain.
3. Departamento de Genética. Universidad de Navarra.
4. Departamento de Obstetricia y Ginecología. Clínica Universitaria.

Correspondencia:
Concepción Napal
C. S. Barañain
Avda. Comercial s/n
3110 Barañain
Tfno. 279211

actuar como oncogen ya que se sabe que la proteína p53 mutante anómala, puede adquirir capacidad de transformación celular por sí misma. Otra función importante es la de intervenir en la reparación del DNA por lo que se denomina "guardián del genoma"⁴. Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 17 en la banda 17p 13.1⁵.

El gen p53 codifica una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos y su vida media es inferior a 30 minutos. Cuando se produce un daño en el DNA por sustancias carcinogénicas, radiaciones y otros, el mismo DNA estimula la producción de p53 y esta acumulación nuclear de p53 produce la detención de la célula en fase G1, del ciclo celular, induce la restauración y estimula la apoptosis si no puede repararse el DNA.

Las mutaciones en el gen p53 pueden ser por sustitución o sin sentido. En el cáncer de mama el porcentaje de mutaciones varía entre el 17% y el 40%, y la mayoría se producen en los exones 5 a 8. También se ha demostrado que éstas, se encuentran frecuentemente en tres puntos calientes que corresponden a los codones 248, 273 y 175⁶. La mayoría son transversiones, lo que indica que factores externos pueden estar jugando un papel importante en el cáncer de mama⁷.

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Determinar las mutaciones en los exones 5 a 8 del gen p53 en la población navarra en individuos pertenecientes a familias afectadas por cáncer de mama familiar y en pacientes con cáncer de mama esporádico.

2. Comparar las mutaciones encontradas en el gen p53 en el tejido tumoral entre individuos con carcinoma de mama familiar y esporádico.

MATERIAL Y MÉTODOS

La recogida de muestras se llevó a cabo entre las pacientes diagnosticadas de carcinoma de mama en 1992 que acudieron al Servicio de Cirugía General del Hospital de Navarra y al Servicio de Ginecología de la Clínica Universitaria de Navarra. Las muestras de los tumores fueron cedidos por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Navarra.

Se encontraron 19 familias con cáncer de mama familiar de las que se estudiaron 14 tumores y 55 muestras de sangre periférica. Además se estudiaron 22 tumores esporádicos.

El método utilizado para la detección de mutaciones, se presenta en esquema en la figura 1. Comenzó con la extracción de

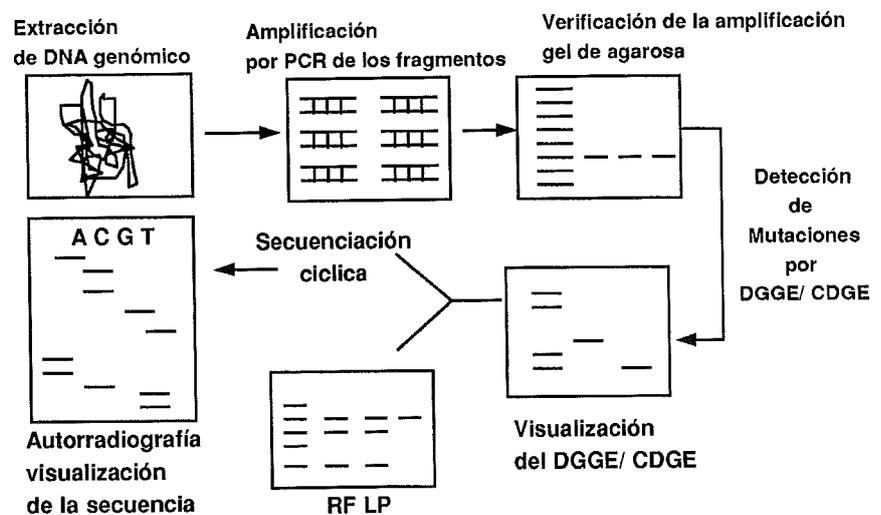


Figura 1. Esquema del estudio de mutaciones en el gen p53.

DNA genómico de sangre periférica, tejido tumoral en fresco o incluido en parafina y de células en cultivo, por medio de tratamiento con proteinasa K y extracción con fenol-cloroformo.

Estudiamos las regiones más conservadas del gen amplificando mediante PCR, cinco fragmentos que incluyen los exones 5, 6, 7 y 8. Los cebadores utilizados para los exones 5, 7 y 8 corresponden a los publicados por Borresen y cols.⁸ y los utilizados para el exón 6 los publicados por Hamelin y cols.⁹. Se optimizaron las condiciones de PCR para cada exón. Una vez obtenido el producto de amplificación se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa. La detección de mutaciones se llevó a cabo mediante electroforesis del producto de amplificación de un gel con gradiente desnaturante (DDGE) o electroforesis en un gel con concentración constante de desnaturante (CDGE). Se optimizaron, la concentración de desnaturante para el CDGE y el gradiente de desnaturante para el DDGE y el tiempo de electroforesis para ambos. La detección de mutaciones por medio del DDGE/CDGE, se basa en que fragmentos que se diferencian en un solo nucleótido presentan dife-

rente temperatura de fusión y esta diferencia se traduce en un cambio en la movilidad electroforética en presencia de agentes desnaturantes como formamida y urea.

Las muestras de DNA que presentaron un patrón electroforético alterado en DGGE o CDGE fueron secuenciadas para determinar exactamente las características de mutación. El exón 6 se secuenció con Sequenase versión 2.0 y el resto de exones mediante secuenciación cíclica.

Las muestras que presentaron patrón electroforético alterado en el exón 6 se digirieron con enzima de restricción *Taq I*, que pone de manifiesto la presencia del polimorfismo (CGA → CGG) en el codón 213.

RESULTADOS

El total de mutaciones encontradas considerando juntos los tumores de mama familiar y esporádico fue de 9 mutaciones en 36 cánceres de mama (27,7%). De 22 tumores esporádicos 4 presentaron mutación (18,1%), mientras que de 14 tumores familiares se encontró mutación en 5 de ellos (35,7%). En la tabla 1, se describen las

Tabla 1. Incidencia de mutaciones en el gen p53 en nuestra serie.

Nº de tumores	Nº de mutaciones	Exón 5 Frag. A	Exón 5 Frag. B	Exón 6 Frag. E	Exón 7 Frag. C	Exón 8 Frag. D
36	9 (27,7%)	1 (2,77%)	0	*	5 (13,88%)	3 (9,16%)
22 Esporádicos	4 (18,1%)	1	0	0	2 (11%)	1 (4,5%)
14 Familiares	5 (35,7%)	0	0	0	** 3 (21,4%)	2 (14,2%)

*Polimorfismo - 1 en tejido tumoral esporádico y 6 en muestras de sangre periférica, de tres familias con cáncer de mama familiar.

**Exón 4 - En la familia 8 encontramos mutación en el tejido tumoral y sangre periférica de la paciente, y en dos integrantes de su familia.

mutaciones encontradas en cada exón. No encontramos mutaciones en el exón 5 fragmento B, ni en el exón 6, fragmento E. En éste último se encontró polimorfismo en una muestra tumoral (4,5%) y en tres familias con cáncer de mama familiar (15,5%).

En el exón 7 fragmento C, fue donde se encontró mayor número de mutaciones y en la familia número 8, en la que apreciamos patrón electroforético alterado en el tumor de la paciente, encontramos el mismo patrón alterado en sangre periférica de la misma paciente, de su madre (que también había presentado cáncer de mama) y de una hermana de 27 años que no ha presentado la enfermedad. Otra hermana estudiada no presentó patrón electroforético alterado.

DISCUSIÓN

Al estudiar las células neoplásicas a nivel molecular, se ha visto que más de un centenar de genes diferentes pueden sufrir mutaciones, deleciones, translocaciones o duplicaciones, y pueden contribuir a la formación de un tumor. De todos los genes implicados, el principal factor de riesgo de la tumorigénesis ocurre cuando aparecen defectos en genes que controlan la respuesta a daños en el DNA, estabilidad cromosómica y capacidad proliferativa de células normales.

Uno de estos genes es el p53 que modula la expresión de genes importantes en la reparación del DNA, la división celular y la muerte por apoptosis. Por ello, es de esperar que tenga gran importancia en la génesis y evolución del cáncer¹⁰.

El rango de mutaciones encontradas en el cáncer de mama en los exones 5, 6, 7 y 8 oscila entre 15%¹¹ y 59,3%¹², dependiendo entre otros factores del método utilizado para la detección, raza de la paciente, número de exones estudiados, tipo histológico y estadio del tumor.

Al revisar la bibliografía se aprecian aparentemente diversos porcentajes pero al analizarlos detalladamente las diferencias no son tan importantes. Así, Borrensén y cols.⁸ encontraron 36,4% de mutaciones, pero en tejido tumoral mamario en el cual previamente habían detectado pérdida de heterocigosidad para esa

zona del cromosoma. En 1996 Hartman y cols.¹² encuentran un alto índice de mutaciones (59,3%) en el gen p53 en cáncer de mama en mujeres japonesas de Hirosaki. Se trata de una población con alto índice de cáncer de mama y las mutaciones detectadas son transversiones lo que nos hace pensar que son debidas a carcinógenos externos. Hartman y cols.¹³, reuniendo en su trabajo pacientes de diversas razas (japonesa, caucásica y negra), encuentran 42% de mutaciones pero es que además de los exones 5 a 8 se analizan también los exones 4, 9 y 10.

En nuestra serie hemos encontrado 27,7% de mutaciones, frecuencia relativamente alta, en comparación con los trabajos de Mazars y cols.¹⁴ y Marchetti y cols.¹⁵, que se puede explicar por el alto porcentaje de pacientes con cáncer de mama familiar incluidos en este estudio (28,7%).

El polimorfismo en el exón 6 aparece en 15,7% de pacientes con cáncer de mama familiar, cifras muy superiores a las encontradas por Mazars y cols.¹⁴. Este alto porcentaje de polimorfismo puede estar relacionado con el tamaño de la muestra, o bien deberse a que el mismo sea más frecuentemente en la población navarra.

El alto porcentaje de mutaciones en la línea germinal de los pacientes con síndrome de Li-Fraumeni¹⁶, unido a la alta incidencia de mutaciones en el gen p53 en el cáncer de mama esporádico¹⁷, nos hicieron pensar a nosotros como a otros investigadores que las mutaciones en el p53 pudiera estar relacionado con la aparición y transmisión del cáncer de mama. Ninguno de los autores que estudiaron el cáncer de mama familiar hasta la fecha, encontraron mutaciones en la línea germinal¹⁸⁻²¹. En nuestra serie encontramos una mutación en la línea germinal en una familia con cáncer de mama familiar, pero no podemos asegurar que sea responsable de la transmisión de la enfermedad, ya que Toguchida y cols.²² encuentran 2% mutaciones en la línea germinal en la población general.

Del presente trabajo se puede concluir que:

1. El total de mutaciones detectadas en los dominios altamente conservados (exones 5 al 8) del gen p53, en tejido tumoral mamario fue de 27,7%. En el cáncer de

mama esporádico el porcentaje fue del 18,1%, frente a 35,7% en cáncer de mama familiar, no encontrando diferencias significativas.

2. En los miembros de una familia con cáncer de mama familiar se detectó una mutación en el gen p53 en la línea germinal.

3. El porcentaje de polimorfismo en el codón 213 en el cáncer de mama familiar fue de 15,7% frente a 4,5% en el cáncer de mama esporádico.

BIBLIOGRAFÍA

- ASCUNCE N, DEL MORAL A, MURILLO A, ALFARO C, APESTEGUÍA L, ROS J et al. Early detección programme for breast cancer in Navarra, Spain. *Eur J Cancer Prev* 1994; 3 (Supl 1): 41-48.
- GONZÁLEZ CA, MARTÍNEZ C. El cáncer en la mujer. La mujer y la salud en España. Informe básico. Vol 3. Madrid. Ministerio de Asuntos Sociales. Instituto de la Mujer. 1992.
- LYNCH HT. *Cancer genetics*. Springfield: CC Thomas. 1976.
- LANE DP. p53 guardián of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
- MILLER C, MOHANDAS T, WOLF D, PROKOCIMER M, ROTTER V, KOEFFER PH. Human p53 localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 1986; 319: 783-784.
- HOLLSTEIN M, SHOMER B, GREENBLATT M, SOUSSI T, HOVING E, MONTESANO R et al. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilations. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 141-146.
- GREENBLATT MS, BENNETT NP, HOLLSTEIN M, HARRIS CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer biology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.
- BORRESEN AL, HOVIG E, SMITH SORENSEN B, MALKIN D, LYSTAD S, ANDERSEN TI et al. Constant denaturant gel electrophoresis as a rapid screening technique for p53 mutations. *Proc Nat Acad Sci* 1991; 88: 8405-8409.
- HAMELIN R, JEGO N, LAURENT-PUIG P, VIDAUD M, THOMAS G. Efficient screening of p53 mutations by denaturing gradient gel electrophoresis in colorectal tumor. *Oncogene* 1993; 8: 2213-2220.
- CHANG F, SYRJANEN S, SYRJANEN K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1009-1022.
- DAVIDOFF AM, KEINS BJM, IGLEHART JD, MARKS JR. Maintenance of p53 alterations throughout breast cancer progression. *Cancer Res* 1991; 51: 2605-2610.
- HARTMANN A, BLASZYK U, SAITOH S, TSUSHIMA K, TAMURA Y, CUNNINGHAM JM et al. High frequency of p53 gene mutations in primary breast cancers in Japanese women, a low-incidence population. *Br J Cancer* 1996; 73: 896-901.
- HARTMANN A, BLASZYK H, Mc GOVERN RM, SCHROEDER JJ, CUNNINGHAM J, DE VRIES EMG et al. p53 gene mutations inside and outside of exon 5-8: the patterns differ in breast and other cancers. *Oncogene* 1995; 10: 681-688.
- MAZARS GR, JEANTEUR P, LYNCH H, LENOVI G, THEILLET C. Nucleotide sequence polymorphism in a hotspot mutation region of the p53 gene. *Oncogene* 1992; 7: 781-782.
- MARCHETTI A, BUTTITTA F, GIRLANDO S, DALLA-PALMA P, PELLEGRINI S, FINA P et al. mdm2 gene alterations and mdm2 protein expression in breast carcinomas. *J Pathol* 1995; 175: 31-38.
- FREBOURG T, BARBIER N, YAN Y, GARBER JE, DREYFUS M, FRAUMENI J et al. Germ-line mutations in 15 families with Li-Fraumeni Syndrome. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 608-615.
- SOUSSI T, LEGROS Y, LUBIN R, ORY K, SCHLICHTHOLZ B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 57: 1-9.
- PROSSER J, ELDER PA, CONDIE A, MAC FADYEN I, STEEL CM, EVANS HJ. Mutations in p53 do not occur for hereditary breast cancer: A study in five affected families. *Br J Cancer* 1991; 63: 181-184.
- BORRESEN AL, ANDERSEN TI, CARBER J, BARBIERPIRAUX N, THORLACIUS S, EYJORD J et al. Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer Res* 1992; 52: 3234-3236.
- WARREN W, EELES RA, PONDER BA, EARTON DF, AVERILL D, PONDER MA et al. No evidence for germline mutations in exon 5-9 of the p53 gene in breast cancer families. *Oncogene* 1992; 7: 1043-1046.
- PREUDHOMME C, FENAUX P, PEYRAT JP, FOURNIER J, BONNETERRE J, VENNIN P. Absence of germline mutations of exon 5 to 8 of the p53 gene in 26 breast cancer families from the north of France. *Eur J Cancer* 1993; 29: 1476-1478.
- TOGUCHIDA J, YAMAGUCHI T, RITCHIE B, BEAUCHAMP R, DAYTON SH, HERRERA GE et al. Mutation spectrum of the gene in bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1992; 52: 6194-6199.