



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Caracterización molecular y prevalencia de las
variantes genéticas en *BRCA1/2* en el Síndrome de
Cáncer de Mama y Ovario Hereditario en la Región
de Murcia

D. Xavier Gabaldó Barrios

2014

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Interna



TESIS DOCTORAL

**Caracterización molecular y prevalencia de las
variantes genéticas en *BRCA1/2* en el Síndrome de Cáncer
de Mama y Ovario Hereditario en la Región de Murcia**

Memoria para optar al grado de Doctor
presentada por

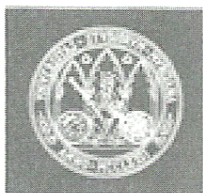
Xavier Gabaldó Barrios

Bajo la dirección de los Doctores:

Dr. José Luis Alonso Romero

Dr. Francisco Ruiz Espejo

Dra. M^a Desamparados Sarabia Meseguer



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dr. JOSÉ LUIS ALONSO ROMERO, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia y profesor asociado de la Universidad de Murcia del Área de MEDICINA en el Departamento de MEDICINA INTERNA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PREVALENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN BRCA1/2 EN EL SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO EN LA REGIÓN DE MURCIA**", realizada por D. XAVIER GABALDÓ BARRIOS, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

A stylized handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke.

En Murcia, a 17 de Julio de 2014



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dr. FRANCISCO RUIZ ESPEJO, facultativo especialista en Análisis Clínicos en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca en Murcia, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PREVALENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN BRCA1/2 EN EL SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO EN LA REGIÓN DE MURCIA**", realizada por D. XAVIER GABALDÓ BARRIOS, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del Dr. Francisco Ruiz Espejo, escrita sobre una línea vertical.

En Murcia, a 17 de Julio de 2014



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Dra. M^a DESAMAPARADOS SARABIA MESEGUER, facultativo especialista en Análisis Clínicos en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca en Murcia, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y PREVALENCIA DE LAS VARIANTES GENÉTICAS EN *BRCA1/2* EN EL SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO EN LA REGIÓN DE MURCIA**", realizada por D. XAVIER GABALDÓ BARRIOS, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping loops and strokes.

En Murcia, a 17 de Julio de 2014

A mis padres

A mi hermano

A Carmen

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis: José Luis Alonso, Paco Ruiz y Amparo Sarabia, sin ellos este proyecto no se hubiese podido llevar a cabo. Porque cada uno me ha aportado la confianza, el entusiasmo por el trabajo y la inquietud necesaria para poder continuar en esta enriquecedora experiencia.

A todos los que forman parte del Laboratorio de Diagnóstico Genético, quienes han formado parte de algún u otro modo de este trabajo. En especial a mi *resi pequeña* Ana Isabel, amiga y, además de compañera de laboratorio, de viajes, de buceo, de montaña,...; y M^a Ángeles, por su cariño y disposición, y porque juntos nos iniciamos en la búsqueda de nuestra ansiada *autonomía*.

A la Unidad de Consejo Genético, por su colaboración en este proyecto y, sobre todo, a Encarna Cuevas, por su ayuda prestada en la recogida de gran cantidad de información.

A todos mis amigos *murcianicos*, con los que he compartido tantas cosas durante estos años y que, por desgracia, a muchos ya no os puedo ver tan frecuentemente como antes.

A mis tres *resis* de promoción Julio, Cari y María; menudos cuatros años pasamos.

A Julio (nuevamente) y a Lidia, por su infinita ayuda en todo y su siempre acogida en mis visitas a Murcia durante el desarrollo de este trabajo.

A toda mi familia, la que mejor me ha comprendido y apoyado durante este período. Y en especial, a mis padres, quienes me han transmitido los valores que tengo; y a mi hermano Víctor, por su confianza y ánimos.

Y, cómo no, a Carmen. Sin ella, esta tesis no hubiese sido lo mismo. Sus ánimos, sus ganas de ayudar, su entendimiento, su cariño,... tantas cosas... Has sido la persona más especial que me ha acompañado durante esta aventura, y las que todavía nos restan por compartir.

A cada uno de vosotros, **GRACIAS**.



Índice

ABREVIATURAS	I
---------------------	----------

LISTA DE TABLAS	V
------------------------	----------

LISTA DE FIGURAS	XI
-------------------------	-----------

<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>3</u>
----------------------------	-----------------

<u>1 INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA</u>	<u>3</u>
--	-----------------

1.1	INCIDENCIA	3
1.2	FACTORES DE RIESGO	3
1.2.1	SEXO	4
1.2.2	EDAD	4
1.2.3	FACTORES CONDICIONANTES DE LA MAMA	5
1.2.4	FACTORES HORMONALES	5
1.2.5	HISTORIA REPRODUCTIVA Y MENSTRUAL	6
1.2.6	ESTILO DE VIDA	7
1.2.7	FACTORES AMBIENTALES	10
1.2.8	FACTORES PSICOSOCIALES	11
1.2.9	HISTORIA FAMILIAR Y GENÉTICA	11

<u>2 CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO (CMOH)</u>	<u>12</u>
--	------------------

2.1	GENES DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE MAMA	12
2.2	PRINCIPALES GENES DE SUSCEPTIBILIDAD AL CMOH: BRCA1 Y BRCA2	14

<u>3 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE BRCA1 Y BRCA2</u>	<u>15</u>
---	------------------

3.1	ESTRUCTURA DEL GEN Y DE LA PROTEÍNA BRCA1	15
3.1.1	DOMINIOS FUNCIONALES DE <i>BRCA1</i> Y SUS PROTEÍNAS DE UNIÓN	15
3.1.2	FUNCIONES DE <i>BRCA1</i>	17
3.2	ESTRUCTURA DEL GEN Y DE LA PROTEÍNA BRCA2	27
3.2.1	DOMINIOS FUNCIONALES DE <i>BRCA2</i> Y SUS PROTEÍNAS DE UNIÓN	27
3.2.2	FUNCIONES DE <i>BRCA2</i>	29
3.3	INTERCONEXIONES FUNCIONALES ENTRE BRCA1 Y BRCA2	33
3.3.1	<i>PALB2</i> CONECTA <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>	34
3.3.2	VÍA COMÚN DE LAS FUNCIONES DE <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>	35
3.4	BRCA1 Y BRCA2 EN LA TUMOROGÉNESIS	38
3.4.1	PÉRDIDA DE LA HETEROGOCIGOSIDAD (LOH)	38
3.4.2	PÉRDIDA DE LA EXPRESIÓN DE <i>p53</i>	38
3.4.3	PÉRDIDA DE LA FUNCIÓN DE <i>ATM</i> O <i>CHK2</i>	39

4	<u>CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO DE LOS GENES BRCA EN CMOH</u>	39
4.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS	40
4.1.1	<i>BRCA1</i>	41
4.1.2	<i>BRCA2</i>	42
4.1.3	<i>BRCAX</i>	44
5	<u>ESPECTRO MUTACIONAL DE LOS GENES BRCA1 Y BRCA2</u>	45
5.1	TIPOS DE VARIANTES SEGÚN EL EFECTO FISIOPATOLÓGICO	45
5.1.1	VARIANTES PATOGENICAS	47
5.1.2	VARIANTES NO PATOGENICAS	51
5.1.3	VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO (“UNCLASSIFIED VARIANTS” Ó UVs)	53
6	<u>IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO</u>	58
6.1	EL PROCESO DEL ASESORAMIENTO GENÉTICO	58
6.2	CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PACIENTES	60
6.3	ESTUDIO GENÉTICO	61
6.4	MANEJO DE LOS PACIENTES TRAS EL ESTUDIO GENÉTICO	63
6.4.1	MANEJO DE PACIENTES AFECTADOS PORTADORES DE MUTACIONES <i>BRCA</i>	63
6.4.2	MANEJO DE PACIENTES SANOS PORTADORES DE MUTACIONES <i>BRCA</i>	64
6.4.3	MANEJO DEL RIESGO DE CÁNCER DE OVARIO	65
6.4.4	DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL	66
7	<u>TÉCNICAS DE BIOLOGÍA DE MOLECULAR</u>	66
7.1	SECUENCIACIÓN MASIVA (NEXT GENERATION SEQUENCING)	66
7.1.1	PIROSECUENCIACIÓN	67
7.2	MLPA (MULTIPLEX LIGATION PROBE AMPLIFICATION)	70
7.3	PCR A TIEMPO REAL (QPCR)	70
7.4	ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES	73
7.5	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO: MÉTODOS IN SILICO	74
7.5.1	PROPIEDADES DE LOS AMINOÁCIDOS SUSTITUIDOS	74
7.5.2	MÉTODOS DE ANÁLISIS DE CONSERVACIÓN	75
7.5.3	MÉTODOS BAYESIANOS	77
7.5.4	REDES NEURONALES ARTIFICIALES (NEURAL NETWORK)	78
7.5.5	SOFTWARE DE APOYO A DECISIONES (“DECISION-SUPPORT SOFTWARE”)	78
	<u>OBJETIVOS</u>	83
1	<u>JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO</u>	83
2	<u>OBJETIVOS</u>	85

1	PACIENTES EN ESTUDIO	89
1.1	SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES	89
1.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS DE LOS PACIENTES	90
1.2.1	INFORMACIÓN DETALLADA DE LA HISTORIA ONCOLÓGICA DEL CÁNCER DE MAMA Y/U OVARIO DEL CASO ÍNDICE:	90
1.2.2	INFORMACIÓN DEL TIPO DE CÁNCER DE LA HISTORIA FAMILIAR EN LOS FAMILIARES DE PRIMER Y SEGUNDO GRADO.	91
2.	FLUJO DE TRABAJO	92
3.	EXTRACCIÓN DE ADN	93
4.	AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO	95
4.1	AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES DE INTERÉS EN BRCA1 Y BRCA2	95
4.2	VERIFICACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN	99
4.3	PURIFICACIÓN DE LOS AMPLICONES	99
5.	SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DIRECTA	100
6.	SECUENCIACIÓN MASIVA (NEXT GENERATION SEQUENCING)	101
7.	ESTUDIO DE GRANDES REORDENAMIENTOS EN LOS GENES BRCA1 Y BRCA2	102
7.1.1	ANÁLISIS DE FRAGMENTOS	105
8.	PCR A TIEMPO REAL (OPCR)	106
9.	ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES	108
10.	NOMENCLATURA DE LAS VARIANTES Y SIMBOLOGÍA DE LOS ÁRBOLES GENEALÓGICOS	111
11.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS VARIANTES	112
12.	MÉTODOS ESTADÍSTICOS	117

RESULTADOS **121**

1	<u>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES</u>	<u>121</u>
2	<u>VARIANTES DETECTADAS EN <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i></u>	<u>123</u>
2.1	<i>MUTACIONES PUNTUALES EN <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i></i>	123
2.1.1	VARIANTES PATOGENICAS	123
2.1.2	VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO (UVs)	203
2.1.3	VARIANTES PROBABLEMENTE NO PATOGENICAS Y VARIANTES NO PATOGENICAS	214
2.2	<i>GRANDES REORDENAMIENTOS GÉNICOS DETECTADOS EN <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i></i>	222
2.2.1	GRANDES REORDENAMIENTOS GÉNICOS EN <i>BRCA1</i>	222
2.2.2	GRANDES REORDENAMIENTOS GÉNICOS EN <i>BRCA2</i>	222
3	<u>COMPROBACIÓN POR OPCR DE LOS GRANDES REORDENAMIENTOS GÉNICOS DETECTADOS</u>	<u>229</u>
3.1	COMPROBACIÓN DE LA DELECCIÓN DEL EXÓN 2 (<i>BRCA2</i>)	230
4	<u>ESTUDIO DE MICROSATÉLITES DE LA VARIANTE PATOGENICA C.1918C>T (<i>BRCA1</i>)</u>	<u>232</u>
5	<u>ESTUDIOS DE CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO</u>	<u>234</u>
5.1	CÁNCER DE MAMA	235
5.1.1	CÁNCER BILATERAL	236
5.1.2	CÁNCER DE MAMA EN VARÓN	236
5.1.3	CARCATERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS	236
5.2	CÁNCER DE OVARIO	239
5.2.1	CÁNCER DE MAMA Y OVARIO	239
5.2.2	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS Y CLÍNICAS	239
5.3	TIPO DE CÁNCER DE LOS ANTECEDENTES FAMILIARES DE LOS CASOS ÍNDICE	241

DISCUSIÓN **245**

1	<u>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES</u>	<u>245</u>
2	<u>ESPECTRO MUTACIONAL DE NUESTRA POBLACIÓN</u>	<u>246</u>
2.1	<i>MUTACIONES PUNTUALES EN <i>BRCA1</i> Y EN <i>BRCA2</i></i>	248
2.1.1	VARIANTES PATOGENICAS	248
2.1.2	VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO (UVs)	257
2.1.3	VARIANTES PROBABLEMENTE NO PATOGENICAS Y VARIANTES NO PATOGENICAS	261

2.2	GRANDES REORDENAMIENTOS GÉNICOS DETECTADOS EN <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>	263
3	ESTUDIOS DE CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	266
3.1	CÁNCER DE MAMA	267
3.2	CÁNCER DE OVARIO	270
3.3	TIPO DE CÁNCER DE LOS ANTECEDENTES FAMILIARES DE LOS CASOS ÍNDICE	271
4	RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL TEST GENÉTICO SEGÚN CRITERIOS CLÍNICOS	271
	<u>CONCLUSIONES</u>	<u>277</u>
	<u>ANEXOS</u>	<u>281</u>
	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>319</u>

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AF	Anemia de Fanconi
Align-GVGD	<i>Align-Grantham Variation Grantham Deviation</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AVA	<i>GS Amplicon Variant Analyzer</i>
BB2	<i>Bead buffer 2</i>
bCM	Cáncer de mama bilateral
bCMO	Cáncer de mama bilateral y ovario
BDD	<i>Bead Deposition Device</i>
BER	Escisión de bases
BIC	<i>Breast International Cancer</i>
CM	Cáncer de mama
CMO	Cáncer de mama y ovario
Cút	Cáncer de útero
CMOH	Cáncer de mama y ovario hereditario
CO	Cáncer de ovario
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
Cp	<i>Crossing point</i>
DBD	Dominio de unión a ácido desoxirribonucleico
DCIS	Carcinoma ductal in situ
DDR	<i>DNA damage response</i> , respuesta al daño del ácido desoxirribonucleico
DGP	Diagnóstico genético preimplantacional

dHPLC	Cromatografía Líquida desnaturalizante de Alto Rendimiento
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DSB	<i>Double strand DNA breaks</i> , rotura de la doble hebra de ácido desoxirribonucleico
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico bicatenario
<i>emPCR</i>	PCR en emulsión
ESE	<i>Exonic splicing enhancer</i>
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
GWAS	<i>Genome-wide association scans</i> , estudios pangenómicos de asociación
GMS	<i>Grantham matrix score</i>
HapMap	<i>Haplotype</i>
HER	Receptores Her2/neu
HGMD	<i>Human Genetic Mutation Database</i>
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
HSF	<i>Human Splice Finder</i>
HRMCA	<i>High resolution melting curve analysis</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IMC	Índice de masa corporal
ISE	<i>Intronic splicing enhancer</i>
ISS	<i>Intronic splicing silencer</i>
LOH	<i>Loss of heterogocigocity</i> , pérdida de heterogocigosidad
LOVD	<i>Leiden Open Variation Database</i>
LR	<i>Likelihood ratio</i> , razón de verosimilitud
LSDB	<i>Locus specific database</i>

MAF	Frecuencia mínima alélica
MES	<i>MaxEntScan</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MPC	Separador magnético
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGC	<i>Next generation sequencing</i> , secuenciación masiva
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i> , unión de extremos no homólogos
NLS	Señal de localización nuclear
NSGC	Sociedad nacional americana de asesores genéticos
nsSNP	<i>Nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms</i>
OCCR	<i>Ovarian cancer cluster region</i> , región del grupo de cáncer de ovario
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	Pares de bases
Polyphen-2	<i>Polymorphism Phenotyping v2</i>
PPi	Pirofosfato inorgánico
PTP	<i>PicoTiterPlate</i>
qPCR	PCR cuantitativa ó a tiempo real
RD	Ratio de dosis génica
RE	Receptores estrogénicos
RH	Recombinación homóloga
RM	Resonancia magnética
RP	Receptores de progestágenos
RPA	Proteína de replicación A
RR	Riesgo relativo
RRSO	Salpingo-ovariectomía

SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SSA	<i>Single-strand annealing</i> , anillamiento de cadena sencilla
SSCP	Análisis de ácido desoxirribonucleico conformacional
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico monocatenario
SSF	<i>Splice Site Finder</i>
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
STS	<i>Sequence-tagged site</i>
TE	Tampón estándar
THS	Terapia hormonal sustitutiva
TNBL	<i>Triple-negative basal-like breast cancers</i>
UMD	<i>Universal Mutation Database</i>
UTDD	<i>Ultra Turrax Tube Drive</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> , región no traducida del gen
UV	<i>Unclassified variant</i> , variante de efecto clínico desconocido
vCM	Cáncer de mama en varón

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las funciones de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> en la reparación del ADN junto con sus dominios y proteínas de unión.	37
Tabla 2. Resumen de las características clínico-patológicas según el estatus <i>BRCA1/2</i> .	44
Tabla 3. Clasificación de variantes según efecto fisiopatológico.	46
Tabla 4. Propuesta de clasificación de las variantes y su correlación con la recomendación clínica.	58
Tabla 5. Cuadro-resumen de las medidas preventivas de los pacientes portadores de mutaciones <i>BRCA1</i> o <i>BRCA2</i> para cáncer de mama y de ovario.	65
Tabla 6. Significado de los resultados de GV, GD y los grados de conservación en <i>Align-GVGD</i> .	75
Tabla 7. Criterios de selección de pacientes para el test genético recomendados por la SEOM.	89
Tabla 8. Grupos de exones de <i>BRCA1</i> para su amplificación por PCR, temperatura de anillamiento, concentración de cebadores y reactivos disponibles.	96
Tabla 9. Programas de amplificación para <i>BRCA1</i> .	97
Tabla 10. Grupos de exones de <i>BRCA2</i> amplificados por PCR, temperatura de anillamiento, concentración de cebadores y reactivos utilizados.	98
Tabla 11. Programas de amplificación para <i>BRCA2</i> .	99
Tabla 12. Reacción de secuenciación.	100
Tabla 13. Etapas de la técnica de MLPA.	104
Tabla 14. Secuencias de los cebadores y tamaño de los alelos de los marcadores polimórficos de <i>BRCA1</i> utilizados para construir los haplotipos.	108
Tabla 15. Esquema de la PCR de microsatélites.	110

Tabla 16. Resumen de las herramientas bioinformáticas utilizadas en la predicción patógena de las UVs.	117
Tabla 17. Características clínicas de los cánceres de mama y cánceres de ovario diagnosticados en nuestro estudio.	122
Tabla 18. Variantes genéticas en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> detectadas en nuestra población.	123
Tabla 19. Variantes patogénicas que cambian el marco de lectura junto con las características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.	127
Tabla 20. Variantes patogénicas causadas por cambios sin sentido (<i>nonsense</i>), junto con las características del caso índice y sus familiares.	148
Tabla 21. Variante patogénica causada por un cambio de aminoácido (<i>missense</i>), junto con las características del caso índice y sus familiares.	154
Tabla 22. Variantes patogénicas con efecto en el <i>splicing</i> , junto con las características del caso índice y sus familiares.	157
Tabla 23. Variantes patogénicas que cambian el marco de lectura junto con las características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.	173
Tabla 24. Variantes patogénicas sin sentido (<i>nonsense</i>), junto con las características del caso índice y sus familiares.	191
Tabla 25. Variantes patogénicas de efecto en el <i>splicing</i> , junto con las características del caso índice y sus familiares.	197
Tabla 26. Variantes de significado clínico incierto (UVs) de <i>BRCA1</i> detectadas y clasificadas. Se añaden características del caso índice y sus familiares.	205
Tabla 27. Predicciones <i>in silico</i> sobre las variantes de origen desconocido en <i>BRCA1</i> .	206
Tabla 28. Variantes de significado clínico incierto (UVs) de <i>BRCA2</i> detectadas y clasificadas.	209

Tabla 29. Predicciones <i>in silico</i> sobre las variantes de origen desconocido en <i>BRCA2</i> .	211
Tabla 30. Variantes probablemente no patogénicas detectadas en <i>BRCA1</i> según criterios de probabilidad.	214
Tabla 31. Variantes no patogénicas detectadas en <i>BRCA1</i> según criterios de IARC.	215
Tabla 32. Relación de polimorfismos detectados en <i>BRCA1</i> en nuestra población.	216
Tabla 33. Variantes probablemente no patogénicas detectadas en <i>BRCA2</i> según criterios de probabilidad.	218
Tabla 34. Variantes no patogénicas definitivas detectadas en <i>BRCA2</i> según criterios de probabilidad.	219
Tabla 35. Relación de polimorfismos detectados en <i>BRCA2</i> en nuestra población.	220
Tabla 36. Grandes reordenamientos génicos detectados en <i>BRCA2</i> .	222
Tabla 37. Resultados de <i>crossing point</i> (Cp) de cada dilución en las muestras <i>wildtype</i> y delección del exón 2.	231
Tabla 38. Ratio de dosis génica (RD) de cada dilución calculado a partir del método $2^{-\Delta\Delta C_p}$.	234
Tabla 39. Casos según el test del estudio genético y el tipo de cáncer del caso índice.	237
Tabla 40. Características clínicas de los cánceres de mama según los grupos <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> y <i>BRCAX</i> .	236
Tabla 41. Características clínicas de los cánceres de mama según los grupos <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> y <i>BRCAX</i> .	238
Tabla 42. Características clínicas de los cánceres de ovario según los grupos <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> y <i>BRCAX</i> .	240

Tabla 43. Características según el tipo histológico y el estadio clínico (FIGO) de los cánceres de ovario según los grupos <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> y <i>BRCAx</i> .	241
Tabla 44. Frecuencias de tipos de cánceres distintos al cáncer de mama observados en las familias de los casos índice pertenecientes, según el grupo de los casos <i>BRCA1/BRCA2</i> positivos y <i>BRCAx</i> .	242
Tabla 45. Prevalencia de las variantes según su efecto fisiopatológico de nuestro estudio junto con las recomendaciones de vigilancia sugeridas por el trabajo de Plon y col. en función del nivel IARC.	248
Tabla 46. Tipos de variantes patogénicas detectadas en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .	249
Tabla 47. Variantes patogénicas recurrentes de los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> de nuestro estudio.	249
Tabla 48. Prevalencia del CM en función de la edad de diagnóstico en los casos índice y familiares portadores de variante patogénica en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .	252
Tabla 49. Variantes patogénicas puntuales en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> con mayor número de casos portadores detectados.	257
Tabla 50. Variantes <i>missense</i> en los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> con mayor probabilidad patógena según el resultado global de las herramientas <i>in silico</i> .	260
Tabla 51. Variantes <i>splicing</i> en los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> con mayor probabilidad patógena según el resultado global de las herramientas <i>in silico</i> .	261
Tabla 52. Comparación de los tipos de cáncer encontrados en los casos índice y familiares entre los afectados portadores de la delección del exón 2 (<i>BRCA2</i>) y el resto de mutaciones puntuales patogénicas en <i>BRCA2</i> .	266
Tabla 53. Características histológicas e inmunohistoquímicas de los cáncer de mama de los casos índice <i>BRCA1+</i> , <i>BRCA2+</i> y <i>BRCAx</i> .	270

Tabla 54. Rendimiento diagnóstico en nuestro estudio de algunos criterios clínicos recomendados por la SEOM y otros criterios clínicos propuestos.	273
Tabla B1. Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de cada exón de <i>BRCA1</i> y tamaño del fragmento que generan.	284
Tabla B2. Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de cada exón de <i>BRCA2</i> (excepto el exón 11) y tamaño del fragmento que generan.	285
Tabla B3. Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación del exón 11 de <i>BRCA2</i> y tamaño del fragmento que generan.	286
Tabla C1. PCR multiplex (PCR1).	287
Tabla C2. Condiciones en el termociclador Verity (Applied Biosystems) en la PCR1.	288
Tabla C3. PCR2 (Incorporación de las MIDs).	289
Tabla C4. Condiciones PCR2.	289
Tabla C5. Volúmenes de los plexes del mismo MID.	289
Tabla C6. Purificación de los amplicones.	290
Tabla C7. Diluciones seriadas con tampón TE para la cuantificación de la librería de amplicones.	291
Tabla C8. Pasos a seguir en la purificación de amplicones.	291
Tabla C9. Preparación de los reactivos, aceite de emulsión, <i>Mock-Mix</i> y pre-emulsión (<i>EmPCR</i>).	292
Tabla C10. Preparación de las <i>Mix Live Amp</i> y la librería de ADN (<i>emPCR</i>).	294
Tabla C11. Emulsión y amplificación (<i>emPCR</i>).	294
Tabla C12. Recuperación de las <i>beads</i> .	295
Tabla C13. Recuperación de las <i>beads</i> .	296

Tabla C14. Enriquecimiento de las <i>beads</i> .	297
Tabla C15. Preparación del <i>Bead Buffer 2</i>	300
Tabla C16. Montaje de la <i>Bead Deposition Device</i> .	301
Tabla C17. Preparación de las beads de ADN, packing beads, beads de PPiase y enzimáticas.	302
Tabla C18. Tabla C17. Depósito de las capas de cada tipo de <i>bead</i> .	304
Tabla C19. <i>Wash</i> y cebado del Gs Junior (<i>Roche Diagnostics</i>).	306

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proporción de pacientes con cáncer de mama familiar debido a las mutaciones germinales en los genes del cáncer de alta, moderada y baja penetrancia.	14
Figura 2. Esquema de los dominios funcionales de BRCA1 y sus proteínas de unión.	17
Figura 3. Proceso enzimático de la ubiquitinación.	17
Figura 4. Estructura del heterodímero conformado entre el dominio RING de BRCA1 (rosa) y el dominio RING de BARD1 (azul)	18
Figura 5. Vías de reparación de las DSBs del ADN.	19
Figura 6. Esquema de la participación de <i>BRCA1</i> en la señalización y la reparación de los DSBs a través del complejo <i>Abraxas-RAP80</i> .	20
Figura 7. PCR en emulsión (<i>emPCR</i>).	21
Figura 8. Mecanismo de secuenciación con la cámara CCD del equipo (pirosecuenciación).	23
Figura 9. Esquema de un ciclo de <i>qPCR</i> mediante la unión con <i>SYBR Green I</i> .	23
Figura 10. Imagen de un ciclo PCR donde se indica el <i>crossing point</i> (Cp), el cual se encuentra por encima del valor umbral o ruido de fondo de la fase exponencial del ciclo de PCR.	24
Figura 11. Esquema de los dominios funcionales de <i>BRCA2</i> y sus proteínas de unión.	29
Figura 12. Diagramas de las secuencias de la proteína RAD51 y BRCA2 y el procesamiento de una DSB.	31
Figura 13. Interacciones entre las proteínas de la recombinación homóloga (RH) y sus dominios.	35
Figura 14. Mutaciones y variantes del gen <i>BRCA1</i> en familias españolas con cáncer de mama y ovario hereditario.	51

Figura 15. Mutaciones y variantes del gen <i>BRCA2</i> en familias españolas con cáncer de mama y ovario hereditario.	51
Figura 16. Esquema explicativo de la técnica de la pirosecuenciación.	67
Figura 17. PCR en emulsión (<i>emPCR</i>).	69
Figura 18. Mecanismo de secuenciación de la cámara CCD del equipo (pirosecuenciación).	70
Figura 19. Esquema de un ciclo de <i>qPCR</i> mediante la unión con <i>SYBR Green I</i> .	72
Figura 20. Imagen de un ciclo PCR donde se indica el <i>crossing point</i> (Cp).	72
Figura 21. Gráfica de los grados de conservación de <i>Align-GVGD</i> en función de las variables GD y GV.	76
Figura 22. Secuencias consenso críticas presentes en el sitio de empalme 5', el punto de ramificación y el sitio de empalme 3'.	79
Figura 23. Esquema cronológico de la metodología empleada en la identificación de variantes en los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> de los pacientes de nuestro estudio.	93
Figura 24. Mutaciones y variantes del gen <i>BRCA1</i> en familias españolas con cáncer de mama y cáncer de ovario hereditario.	94
Figura 25. Mutaciones y variantes del gen <i>BRCA2</i> en familias españolas con cáncer de mama y cáncer de ovario hereditario.	95
Figura 26. Equipo 454 <i>Gs Junior</i> (Roche Diagnostics).	101
Figura 27. Proceso descriptivo de MLPA (<i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i>).	103
Figura 28. Equipo <i>LightCycler</i> (Roche Diagnostics).	106
Figura 29. Imagen donde se indica la ΔC_p entre dos muestras, cuyo valor nos permitirá calcular los ratios de la dosis génica (RD).	107

Figura 30. Posiciones de los marcadores microsatélites en el cromosoma 17q21.	109
Figura 31. Simbología empleada en la configuración de los árboles genealógicos.	111
Figura 32. Algoritmo seguido en nuestro estudio para la clasificación de las variantes detectadas.	114
Figura 33. Distribución según el tipo de cáncer de los casos índice de nuestro estudio.	121
Figura 34. Variantes patogénicas detectadas en el gen <i>BRCA1</i> , junto con los dominios y proteínas de unión más importantes para su función.	125
Figura 35. Cambio en el marco de lectura en <i>BRCA1</i> (variante c.68_69delAG).	126
Figura 36. Árbol familiar de la familia F34 de casos portadores de la variante c.68_69delAG en <i>BRCA1</i> .	130
Figura 37. Árbol familiar de casos portadores de la variante c.68_69delAG en <i>BRCA1</i> .	131
Figura 38. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.68_69delAG en <i>BRCA1</i> .	132
Figura 39. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.70_73dup en <i>BRCA1</i> .	134
Figura 40. Árbol familiar de casos portadores de la variante c.290_291delCA en <i>BRCA1</i> .	136
Figura 41. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.835delC en <i>BRCA1</i> .	137
Figura 42. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.1859delT en <i>BRCA1</i> .	138

Figura 43. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.1912_1912delG en <i>BRCA1</i> .	140
Figura 44. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.2285_2286delGA en <i>BRCA1</i> .	141
Figura 45. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.3331_3334delCAAG en <i>BRCA1</i> .	143
Figura 46. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.3331_3334delCAAG en <i>BRCA1</i> .	144
Figura 47. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.3770_3771delAG en <i>BRCA1</i> .	145
Figura 48. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.5263_5264insC en <i>BRCA1</i> .	147
Figura 49. Electroferograma de un cambio sin sentido en <i>BRCA1</i> (variante c.1918C>T).	147
Figura 50. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.1612C>T en <i>BRCA1</i> .	149
Figura 51. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.1918C>T en <i>BRCA1</i>	151
Figura 52. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.3280A>T en <i>BRCA1</i> .	153
Figura 53. Electroferograma de una mutación missense patogénica (c.181T>G).	153
Figura 54. Árbol familiar del caso portador de la variante c.181T>G en <i>BRCA1</i> .	155
Figura 55. Variante patogénica que afecta al <i>splicing</i> (c.212+1G>A).	156
Figura 56. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.211A>G en <i>BRCA1</i> .	159

Figura 57. Árbol familiar de casos portadores de la variante c.212+1G>A en <i>BRCA1</i> .	161
Figura 58. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.212+1G>A en <i>BRCA1</i> .	162
Figura 59. Árbol familiar de un caso portador de la variante c.212+1G>A en <i>BRCA1</i> .	163
Figura 60. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.4357+1delG en <i>BRCA1</i> .	164
Figura 61. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.5123C>A en <i>BRCA1</i> .	167
Figura 62. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.5123C>A en <i>BRCA1</i> .	168
Figura 63. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.5277+1G>A en <i>BRCA1</i> .	170
Figura 64. Variantes patogénicas detectadas en el gen <i>BRCA2</i> , junto con los dominios y proteínas de unión más importantes para su función.	171
Figura 65. Electroferograma de un cambio en el marco de lectura en <i>BRCA2</i> (c.8201delC).	172
Figura 66. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.262_263delCT en <i>BRCA2</i> .	175
Figura 67. Árbol familiar del caso portador de la variante c.1597delA en <i>BRCA2</i> .	176
Figura 68. Árbol familiar del caso portador de la variante c.1608dupT en <i>BRCA2</i> .	178
Figura 69. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.3264dupT en <i>BRCA2</i> .	179
Figura 70. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.4936_4939delGAAA en <i>BRCA2</i> .	181

Figura 71. Árbol familiar del caso portador de la variante c.5073dupA en <i>BRCA2</i> .	182
Figura 72. Árbol familiar del caso portador de la variante c.5669_5673delATGGC en <i>BRCA2</i> .	183
Figura 73. Árbol familiar del caso portador de la variante c.6491_6494delAGTT en <i>BRCA2</i> .	185
Figura 74. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.8201delC en <i>BRCA2</i> .	186
Figura 75. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.9026_9030delATCAT en <i>BRCA2</i> .	188
Figura 76. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.9310_9311delAA en <i>BRCA2</i> .	190
Figura 77. Electroferograma de un cambio sin sentido (<i>nonsense</i>) en <i>BRCA2</i> (c.3455T>G).	190
Figura 78. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.2095C>T en <i>BRCA2</i> .	192
Figura 79. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.3455T>G en <i>BRCA2</i> .	194
Figura 80. Árbol familiar de los casos portadores de la variante patogénica c.3922G>T.	196
Figura 81. Electroferograma de una variante con efecto en el splicing en <i>BRCA2</i> .	196
Figura 82. Árbol familiar de los casos portadores de la variante patogénica c.7007G>A.	198
Figura 83. Árbol familiar del caso portador de la variante c.7977-1G>A en <i>BRCA2</i> .	200
Figura 84. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.9117G>A.	202

Figura 85. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.9117G>A en <i>BRCA2</i> .	203
Figura 86. A. Cromatograma del análisis de fragmentos donde se señala la delección del exón 2 en <i>BRCA2</i> . B. Análisis del perfil de picos.	223
Figura 87. Árboles familiares de casos portadores de la delección del exón 2 en <i>BRCA2</i> .	226
Figura 88. Árboles familiares de casos portadores de la delección del exón 2 en <i>BRCA2</i> .	227
Figura 89. A. Cromatograma del análisis de fragmentos donde se señala la amplificación del exón 21 en <i>BRCA2</i> . B. Análisis del perfil de picos.	228
Figura 90. Árbol familiar de los casos portadores de la amplificación del exón 21 en <i>BRCA2</i> .	229
Figura 91. Curvas de amplificación por <i>qPCR</i> (<i>LightCycler</i>), en la parte inferior se muestra el cálculo del <i>crossing point</i> (Cp).	230
Figura 92. Recta de regresión con los valores Cp de la muestra control (WT) y la muestra con la delección (mut).	231
Figura 93. Análisis de fragmentos de cinco pacientes del marcador 17-3858 mediante el soporte informático <i>Seqscape</i> v. 2.5.	232
Figura 94. Árboles genealógicos con los haplotipos tras su análisis con marcadores de microsatélites en <i>BRCA1</i> .	233
Figura 95. Diagrama de barras que representa la frecuencia de los tipos de cáncer de los casos índice en función del resultado del estudio genético.	235
Figura 96. Diagrama de barras que representa la frecuencia de los tipos de cáncer de los casos índice en función de la población <i>BRCA1</i> y la población <i>BRCA2</i> .	240

Figura 97. Tasas de casos <i>BRCA</i> + de nuestro estudio según los criterios clínicos de la SEOM.	245
Figura 98. Mapa de España en el cual se indica el área poblacional de estudio y las variantes patogénicas recurrentes más importantes de los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .	250
Figura 99. Prevalencia del cáncer de mama de casos índice y familiares portadores de variante patogénica en <i>BRCA1</i> y en <i>BRCA2</i> a la edad de ≤ 30 años, ≤ 40 años y ≤ 50 años.	252
Figura 100. Tipos de cáncer de los casos índice y familiares portadores de variante patogénica en <i>BRCA1</i> según la localización en el gen.	255
Figura 101. Tipos de cáncer de los casos índice y familiares portadores de variante patogénica en <i>BRCA2</i> según la localización en el gen.	256
Figura 102. Frecuencia de casos índice con cáncer de mama masculino según los grupos <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRCAX</i> , sin riesgo y riesgo no conocido.	267
Figura C1. Esquema explicativo de la PCR2. En ella se incorporan los adaptadores A y B, las secuencias de 4 pb <i>Key</i> y la secuencia MID que identifica a cada paciente.	288
Figura C2. Esquema de los reactivos del kit <i>emPCR Reagents</i> .	292
Figura C3. Dispositivo UTDD.	292
Figura C4. Montaje de la pipeta <i>transpette</i> para la recuperación de las <i>beads</i> .	295
Figura C5. Pasos en el montaje de la <i>Bead Deposition Device</i> .	301
Figura C6. Puerto de carga del dispositivo BDD.	301
Figura C7. Esquema metodológico del depósito de capas según el tipo de <i>bead</i> .	306
Figura C8. Procesos de lavado y cebado del Gs Junior a seguir antes de la secuenciación.	307

Figura C9. Procesos de lavado y cebado del Gs Junior a seguir antes de la secuenciación.	308
Figura C10. Sección de <i>filters</i> en el programa <i>GS Run Browser</i> .	310
Figura C11. Sección de <i>Wells</i> en el programa <i>GS Run Browser</i> .	311
Figura C12. Ejemplo del esquema resumen de las variantes que nos clasifica el programa <i>GS Amplicon Variant Analyzer</i> .	312
Figura C13. Ejemplo de un alineamiento de lectura con el programa <i>Amplicon Variant Analyzer</i> de una variante en heterocigosis.	313
Figura C14. Ejemplo de un alineamiento de lectura con el programa <i>Amplicon Variant Analyzer</i> de una variante en homocigosis.	313



Introducción

1 INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA

1.1 Incidencia

El cáncer de mama es la principal causa de mortalidad por cáncer en las mujeres en todo el mundo, con una estimación de 1,68 millones de nuevos casos y más de 521.000 muertes sólo en 2012 [1]. En los países de la Unión Europea la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama antes de los 75 años es del 8% [2]. En España, la incidencia de cáncer de mama es una de las más bajas de Europa, se calcula que se diagnostican anualmente 22.000 casos de cáncer de mama, siendo la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres con un 30% del total de los tumores diagnosticados [3]. Y, por lo que se refiere a la región de Murcia, cada año 560 mujeres son diagnosticadas de un cáncer de mama invasivo y cerca de 180 mueren por esta causa, con un 4% de los fallecimientos totales en mujeres [4]. Se presentaron tasas de 84/100.000 mujeres, situándose en la media de las regiones españolas que disponen de información sobre incidencia basada en registros poblacionales de cáncer [5].

La implementación de programas de detección precoz, junto con los avances diagnósticos y terapéuticos, se han traducido en un incremento de la supervivencia, que se sitúa, según datos recientes de *European Cancer Registry-4 (EUROCARE-4)* por encima del 80% a los cinco años del diagnóstico en España [6]. Por ello, la mortalidad ha perdido validez a la hora de estudiar la frecuencia de aparición de estos tumores, aunque sigue siendo el único indicador disponible para estudiar la variabilidad geográfica dentro y fuera de nuestro país. A nivel internacional, las grandes diferencias observadas hace medio siglo en la mortalidad por este tumor tienden a desaparecer, proporcionando un patrón mucho más homogéneo.

1.2 Factores de riesgo

La etiología del cáncer de mama es desconocida, y sólo un 30% de los tumores de mama pueden ser atribuidos a factores de riesgo conocidos.

La investigación sobre las causas del cáncer de mama ha progresado hasta el punto de que se puede describir con relativa certeza el perfil de las mujeres con alto riesgo de la enfermedad. También se está ganando comprensión de la biología subyacente, incluyendo las influencias hormonales y los cambios moleculares que

contribuyen a su desarrollo. Estas diversas líneas de investigación científica están convergiendo, y sugieren que el cáncer de mama se produce como consecuencia de combinaciones de factores y eventos, tales como la herencia de la susceptibilidad genética, la exposición a agentes carcinógenos, los niveles de algunas hormonas endógenas, el propio sistema inmunológico y cambios en la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN) en las células de la mama que pueden ocurrir fortuitamente. La mayoría de los factores de riesgo de cáncer de mama reconocidos se refieren a uno o más de estos factores y a situaciones individuales. Se sabe que los factores ambientales y de estilo de vida deben contribuir al riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, la mayoría de las exposiciones, eventos ambientales y estilo de vida asociados con el riesgo de cáncer de mama no se establecen necesariamente como causas de la enfermedad, sino que sirven como marcadores estratificados del riesgo. Los factores de riesgo para padecer cáncer de mama se exponen a continuación [7]:

1.2.1 Sexo

El cáncer de mama afecta a hombres y mujeres, sin embargo, la incidencia es mucho más alta en las mujeres. En general, las mujeres tienen un riesgo 100 veces mayor de cáncer de mama que los hombres [8]. El sexo femenino, por tanto, puede ser considerado un factor de riesgo importante para el cáncer de mama. Aunque existen muchas diferencias potenciales entre los hombres y las mujeres, éste es uno de los indicios más fuertes que indican que las hormonas femeninas juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer de mama [7].

1.2.2 Edad

La edad es otro de los mayores factores de riesgo para el cáncer de mama. Aunque el cáncer de mama puede ocurrir en edades tempranas de la vida, en general, es una enfermedad del envejecimiento. Para una mujer de 40 años el riesgo es de 1 cada 69, 1/38 a los 50 años, y de 1/27 a los 60 años [9]. Alrededor del 75% de los casos de cáncer de mama se producen después de los 50 años de edad; lo cual también sugiere, que las hormonas ováricas y otras hormonas femeninas estarían involucradas en el cáncer de mama. La edad se considera que es un sustituto probable de daños acumulados en el ADN a lo largo de la vida [7].

1.2.3 Factores condicionantes de la mama

De las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama invasivo, entre un 2-11% desarrollará cáncer contralateral (en la otra mama) a lo largo de su vida [10]. También hay una serie de patologías mamarias preinvasivas que se asocian con un mayor riesgo de cáncer de mama. Estos incluyen el carcinoma lobular in situ [11], carcinoma ductal in situ [12] y la hiperplasia ductal atípica [13].

Por otra parte, la densidad mamaria mamográfica se perfila como un fuerte factor de riesgo para el cáncer de mama, tanto en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas. Se estima que las mujeres con mayor grado de densidad de la mama poseen, aproximadamente, unas 5 veces más riesgo que las mujeres con poca o ninguna densidad mamaria [14].

1.2.4 Factores hormonales

Las hormonas ováricas y otras hormonas esteroideas están claramente relacionadas con el riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, sólo en la última década los investigadores han empezado a ir más allá en los estudios sobre las características reproductivas y menstruales acerca de las funciones desempeñadas por las hormonas endógenas y exógenas [7].

1.2.4.1 Hormonas endógenas

Los estudios sobre las mujeres premenopáusicas con las hormonas sexuales endógenas y riesgo de cáncer de mama son a menudo difíciles debido a que los niveles circulantes de estas hormonas varían durante el ciclo menstrual. Pero en mujeres posmenopáusicas, sí existen estudios que proporcionan una fuerte evidencia de que las hormonas circulantes son verdaderamente un fuerte marcador de riesgo en mujeres posmenopáusicas y no simplemente una consecuencia de la producción de la hormona relacionada con el tumor [15]. Se han visto asociaciones entre niveles altos de estrógenos y andrógenos [15], así como niveles elevados de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) [16].

1.2.4.2 Hormonas exógenas

En cuanto a las fuentes exógenas de hormonas, mujeres con terapia hormonal pueden tener un riesgo de cáncer de mama más alto que las no medicadas, sobre todo para un uso prolongado y la combinación de estrógeno y progesterona en la Terapia

Hormonal Sustitutiva (THS) [17]. Los resultados de los anticonceptivos orales son más incongruentes y el aumento del riesgo, en su caso, es probable que sea pequeño y disminuya gradualmente después de su abandono [18].

1.2.5 Historia reproductiva y menstrual

La historia reproductiva y características del ciclo menstrual representan algunos de los factores de riesgo más fuertemente establecidos para el cáncer de mama. Las mujeres que habían tenido su primer ciclo menstrual a los 12 años o más tienen un riesgo ligeramente menor de cáncer de mama (10-25%) que las mujeres que tuvieron la menarquia a una edad inferior [19].

Las mujeres posmenopáusicas tienen entre un 15-50% de riesgo menor de cáncer de mama que las mujeres premenopáusicas a la misma edad y maternidad [17;20]. Además, en las mujeres posmenopáusicas el riesgo relativo aumenta con la edad de la menopausia; ya que se ha demostrado que el riesgo de cáncer de mama es más bajo para las mujeres que experimentan la menopausia a edades inferiores a 40 años (~50% del riesgo para mujeres premenopáusicas), mientras que para las mujeres que experimentan una menopausia tardía (por ejemplo ≥ 55 años) el riesgo de cáncer de mama es similar al de las mujeres premenopáusicas a esa misma edad [17]. Mujeres que han tenido hijos tienen un riesgo del 10-30 % menor de cáncer de mama que las mujeres nulíparas [21]. Para las mujeres que tienen su primer hijo a edades más avanzadas (por ejemplo, después de 29 años) el riesgo de cáncer de mama es un 40 % mayor que para las mujeres que tienen su primer hijo antes de los 25 años, independientemente del número de hijos y la duración de la lactancia materna [22].

La lactancia materna se asocia con un menor riesgo de cáncer de mama. Además del efecto protector de tener niños, las mujeres que amamantan en total por lo menos tres años tienen aproximadamente una reducción adicional del 10-20% en el riesgo en comparación con las mujeres que no amamantan [23]. No hay evidencia establecida de una asociación entre la interrupción del embarazo y el riesgo de cáncer de mama [24].

El efecto protector de la reproducción se piensa que es debido a cambios permanentes que se producen en las células epiteliales de mama durante el tercer trimestre en preparación para la lactancia. Estas células más maduras (es decir, diferenciadas) se cree que son menos vulnerables a los daños en el ADN que pueden

conducir al cáncer, por lo que el riesgo de cáncer de mama durante los años después de un embarazo a término se reduce [25].

1.2.6 Estilo de vida

El cáncer de mama es más frecuente en poblaciones occidentales y en subpoblaciones de mayor nivel socioeconómico dentro de sus países [26]. Esto sugiere, que los factores de estilo de vida relacionados con la occidentalización y la riqueza se asocian con un mayor riesgo de cáncer de mama; y apoyan la idea de que el cáncer de mama se ve influenciada, al menos en parte, por la exposición ambiental o por los continuos cambios de estilo de vida a lo largo del tiempo.

Como ya hemos mencionado con la historia reproductiva y el uso de hormonas exógenas, otros comportamientos de estilo de vida se asocian con el riesgo de cáncer de mama, a menudo como consecuencia de la alteración de los niveles de cualquiera de las hormonas tisulares o circulantes.

1.2.6.1 Obesidad

Las mujeres obesas (índice de masa corporal, $IMC \geq 31 \text{ kg/m}^2$) parecen tener un riesgo de cáncer de mama antes de la menopausia casi un 50 % menor que las mujeres delgadas ($IMC < 21 \text{ kg/m}^2$) [27]. También está claro que las mujeres con sobrepeso y obesidad ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$) tienen un riesgo de cáncer de mama después de la menopausia 20 a 40 % mayor que las mujeres delgadas ($IMC < 21 \text{ kg/m}^2$) [27]. No se han explicado los mecanismos que subyacen a esta asociación. Se ha sugerido que las mujeres de mayor peso son más propensas a experimentar niveles más bajos de estrógenos y progesterona; y, en consecuencia, una reducción del riesgo de cáncer de mama, en parte debido a ciclos menstruales más frecuentes en los que no se da la ovulación [28]. Recientemente, se ha visto que la obesidad premenopáusica provoca un efecto protector en los tumores con receptores hormonales positivos y no en los tumores de receptores estrogénicos y progestágenos negativos [29].

La actividad física regular parece disminuir el riesgo de cáncer de mama después de la menopausia, sobre todo a través del control de peso; aunque existen evidencias limitadas que lo haga antes de la menopausia [28].

1.2.6.2 Dieta

El papel de la dieta en el desarrollo de cáncer de mama es probablemente menos importante que en algunos otros tipos de cáncer (por ejemplo, cabeza y cuello o colorrectal).

El consumo de grasas animales (saturadas) como la de la carne roja, en particular, se asocia con varios tipos de cáncer. Considerando que el aumento de las tasas de cáncer de mama se observan en países con mayores niveles de consumo de grasas, estudios epidemiológicos de consumo de grasa deberían encontrar relaciones claras o coherentes con el riesgo de cáncer de mama [30]. Sin embargo, todavía no hay evidencias con respecto a una asociación entre el consumo elevado de grasa de la carne roja y aumento del riesgo de cáncer de mama sigue siendo limitada y el efecto, si lo hay, es probable que sea pequeño [31]. Una alternativa para explicar esta asociación es que la grasa de la dieta y el contenido energético de los alimentos están fuertemente correlacionados, y es posible que el consumo total de calorías que conduce a la obesidad podría ser el verdadero problema [7]. Además, las diferencias en otros factores de riesgo de cáncer de mama entre los países occidentales y los demás países no se han tenido debidamente en cuenta en los estudios internacionales de la dieta [7]. Algunos estudios europeos sí que apoyan la teoría de que el consumo de grasas monoinsaturadas como los del aceite de oliva o los ácidos grasos omega 3 del pescado, podrían reducir el riesgo de cáncer de mama, aunque sin resultados concluyentes [32]. Un menor número de estudios se han centrado específicamente en la ingesta de grasa de origen animal [33], las investigaciones a gran escala de ácidos grasos específicos no han concluido asociaciones positivas para el cáncer de mama, y los análisis que grasa según sea el origen animal o vegetal han sido prácticamente los mismos [34].

Aunque algunos estudios han encontrado que una dieta de alto índice glucémico aumenta el riesgo de cáncer de mama, la mayoría de los estudios de cohortes y metaanálisis no han mostrado esta asociación (o han mostrado una relación sólo entre ciertos grupos de mujeres) [35;36]. Existe un creciente interés en la relación entre la insulina y el riesgo de cáncer de mama, algunos estudios han mostrado un aumento del riesgo de cáncer de mama entre las mujeres posmenopáusicas con altos niveles de insulina, incluyendo las mujeres que producen altos niveles de insulina o que tienen altos niveles de insulina en sangre (hiperinsulinismo) [37-39] y las mujeres que tienen

diabetes tipo 2 [40-43]. Entre las mujeres premenopáusicas, los hallazgos sobre una posible relación entre los niveles de insulina y el riesgo de cáncer de mama son menos claros [44;45].

Es posible que el alto consumo de verduras o frutas se asocie con una pequeña disminución en el riesgo de cáncer de mama, pero la evidencia es limitada [46]. Los fitoestrógenos, son menos potentes que los estrógenos endógenos y hay todavía poca evidencia que apoye un papel protector en el cáncer de mama, al menos en la edad adulta [32]. Una serie de vitaminas, incluyendo A y C, se sabe que funcionan como antioxidantes, por lo que podrían proteger contra el daño del ADN, aunque hay resultados todavía poco claros en la disminución del riesgo de cáncer de mama [47]. Algunos estudios han encontrado que la vitamina D (a través de la dieta o dieta más la luz solar) reduce el riesgo de cáncer de mama [48-52]. Otros estudios, incluyendo un meta-análisis de 11 estudios, no han encontrado ninguna relación entre la vitamina D y el riesgo de cáncer de mama [53-60]. Se necesitan más estudios para saber si la vitamina D afecta el riesgo de cáncer de mama. Para el resto de alimentos, existe una asociación todavía menos constante y estadísticamente no significativa en los nutrientes estudiados [7].

Por el contrario, el consumo de bebidas alcohólicas, ya sea cerveza, vino o licores, se asocia con el riesgo de cáncer de mama. Por cada bebida estándar adicional al día (10 g de alcohol/día), el riesgo de cáncer de mama aumenta en torno al 7 % [61].

1.2.6.3 Tabaco

La relación entre el tabaquismo y el riesgo de cáncer de mama es complicada. Los estudios epidemiológicos han demostrado asociaciones positivas, inversas y nulas entre fumar cigarrillos y el cáncer de mama. Al menos tres estudios críticos que examinaron la literatura publicada sobre el tabaquismo y el cáncer de mama concluyeron que el tabaquismo podría estar asociado con un pequeño incremento en el riesgo de cáncer de mama, especialmente para fumadores de larga duración [62-64]. Quizá, debido a las posibles propiedades antiestrógenas del humo del tabaco [64], se compensen los efectos cancerígenos del tabaco, resultando un efecto neto muy pequeño en el riesgo total de cáncer de mama [7]. Tampoco hay pruebas convincentes de que el tabaquismo pasivo se asocie con este tipo de cáncer [65].

1.2.7 Factores ambientales

La investigación sobre las relaciones entre las exposiciones ambientales y el riesgo de cáncer de mama resulta más compleja que la investigación sobre exposiciones relacionadas como el estilo de vida individual; la dificultad principal es la evaluación de la exposición.

1.2.7.1 Radiaciones

Hasta la fecha existen pruebas de que la exposición a altas dosis de radiación ionizante aumenta el riesgo de cáncer de mama [30;66], mientras que la exposición a bajas dosis de radiación a partir de aparatos médicos es probable que tenga un efecto pequeño, si lo hay [7]. El evitar los rayos X médicos innecesarios es una de las mejores maneras de reducir la exposición a la radiación ionizante; no obstante, en muchos casos, los beneficios superan los riesgos, como en el cribado mamográfico para la detección precoz del cáncer de mama en mujeres con edades mayores de 50 años y para las mujeres con alto riesgo de cáncer de mama, como una herramienta para el diagnóstico de diversas enfermedades o lesiones y como una manera efectiva para tratar algunos tipos de cáncer.

Un estudio de mujeres portadoras de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* se plantea la posibilidad de que algunos subgrupos de mujeres estén en mayor riesgo de exposición a radiaciones ionizantes debido al aumento de la susceptibilidad a causa de las variantes heredadas en los genes implicados en la reparación de ADN [67]. Se necesita más investigación en esta área para confirmar y ampliar estos resultados a las variantes en otros genes de función similar.

1.2.7.2 Campos electromagnéticos

La literatura científica sobre la exposición a campos electromagnéticos y el riesgo de cáncer de mama fue revisada por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), en 2002 [68] y actualizada en 2006, en un artículo de revisión que concluyó que la evidencia disponible en la actualidad no sugiere un mayor riesgo de cáncer de mama relacionado con la exposición a campos electromagnéticos [69].

1.2.7.3 Trabajo nocturno

Una serie de estudios epidemiológicos demuestran la creciente evidencia de una asociación entre los altos niveles de melatonina y una disminución del riesgo de cáncer

de mama [70]. De todos modos, existen todavía pocas evidencias para apoyar la hipótesis que trabajadores en el turno de noche tengan más riesgo de padecer cáncer de mama.

1.2.7.4 Productos químicos

Se ha demostrado en estudios en animales que más de 200 productos químicos dañan el ADN, promueven el desarrollo de tumores y su crecimiento, o alteran el desarrollo de la glándula mamaria [71]. Sin embargo, tan sólo se han encontrado pequeñas evidencias y poco congruentes con tetraclorodibenzo p-dioxina en relación con el cáncer de mama [72]. De hecho, un problema importante con este estudio y con estudios ocupacionales en general es que cualquier forma de asociación con el cáncer de mama puede ser debido a otras exposiciones químicas y ocupacionales.

1.2.8 Factores psicosociales

La evidencia de una relación entre los factores psicosociales y el riesgo de cáncer de mama es muy débil. Los resultados con respecto a la represión emocional, especialmente de la ira y la pérdida de un ser querido, demostraron que se asocia con el riesgo de cáncer de mama [73], aunque existe controversia entre los estudios [74;75]. La mayoría de los estudios han investigado las asociaciones entre los eventos estresantes de la vida y el riesgo de cáncer de mama, pero sólo unos pocos han examinado el estrés en sí y sus resultados eran no congruentes [76-78]. Por otro lado, pocos estudios se han realizado con el suficiente rigor para descartar definitivamente un papel menos importante de los factores estresantes psicosociales [7].

1.2.9 Historia familiar y genética

Las mujeres con una historia familiar de cáncer de mama tienen de 1,5 a 3,9 veces más probabilidades de desarrollar cáncer de mama que las mujeres sin antecedentes familiares, en función del número y grado de parentesco de los miembros de la familia afectados [79]. Aunque esta asociación podría surgir a causa del entorno compartido y estilo de vida, también puede ser debido a la susceptibilidad genética heredada.

2 CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO (CMOH)

De todos los factores de riesgo reconocidos para el desarrollo del cáncer de mama (CM) el más importante es el de la historia familiar. Se ha visto que aumenta el riesgo en individuos con un mayor número de familiares afectados con CM y la disminución de la edad a la que fueron diagnosticados.

Dentro de los objetivos principales en la lucha contra el cáncer se encuentra la identificación de los genes implicados en el desarrollo tumoral. Las proteínas codificadas por estos genes normalmente regulan procesos tales como proliferación, diferenciación y muerte celular. También se relacionan con tumorigénesis las que intervienen en la reparación del ADN.

La gran mayoría de los cánceres de mama son de tipo esporádico. Ciertas células de la mama acumulan aberraciones genéticas que desembocan en la aparición del tumor. Los tumores esporádicos parece que surgen debido a errores combinados de múltiples genes de baja penetrancia junto con la influencia de los factores ambientales y otros factores de riesgo [80;81].

Mientras que diversos estudios estiman que alrededor del 27% de CM es debido a factores hereditarios [82], sólo el 5-10 % de CM tienen un fuerte componente hereditario, con sólo un 4-5% debido a genes de alta penetrancia y que se transmiten con un patrón autosómico dominante [83-86].

2.1 *Genes de susceptibilidad al cáncer de mama*

Los genes de predisposición suelen ser supresores de tumores: transmiten continuamente señales de carácter negativo sobre la proliferación celular y su inactivación provoca, por defecto, divisiones descontroladas [87]. Heredar una copia dañada del gen aumenta la predisposición al cáncer, pero es necesaria otra mutación para inactivarlo completamente y que se inicie la transformación neoplásica.

Se pueden clasificar este tipo de genes de acuerdo a su riesgo relativo a un tipo particular de cáncer [88] (**fig. 1**):

- a) Genes de alta penetrancia:** están asociados con un riesgo relativo (RR) de CM mayor que 5. Dentro de este grupo, sólo alrededor del 25% de los pacientes con cáncer se pueden atribuir a mutaciones en la línea germinal en

dos genes de alta susceptibilidad para CM: *BRCA1* [85] y *BRCA2* [89]. Las mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2* confieren un riesgo acumulativo promedio del 65 o 39% para CM, respectivamente y del 39 o 11% para el cáncer de ovario en edad de 70 años, respectivamente [90]. Además, destacaríamos mutaciones en otros genes en los que el CM tiene una prevalencia menor y que se estima que causan alrededor del 5% de los CM familiares: *TP53*, *PTEN*, *STK11* y *CDH1* [91-95] (**fig. 1**).

b) Genes de moderada penetrancia: Confieren un RR de cáncer entre 1,5 y 5. Han sido descritos genes implicados en la anemia de Fanconi (AF) en aproximadamente el 5% de los CM hereditarios, dada su segregación incompleta en familiares afectados y su odds ratio (OR) <3; tal es el caso de *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* y *XRCC2* [96-99]. Además, presentan penetrancia similar otros genes no involucrados en la AF, como *ATM*, *CHEK2*, *NBS1*, *RAD50*, *RAD51D* y *RAD51B* [100-104] (**fig. 1**).

c) Genes de baja penetrancia: Se presentan con RR en torno al 1,5. Se han identificado mayoritariamente mediante estudios pangenómicos de asociación (GWAS: *genome-wide association scans*) de cientos de miles de *single nucleotide polymorphism* (SNP) en extensas series de miles de casos de CM y controles. Recientemente se han identificado 41 genes de baja susceptibilidad que, junto con los 26 genes previamente identificados, podrían explicar alrededor del 14 % del riesgo de CM familiar [105] (**fig. 1**).

Sin embargo, hay todavía alrededor de un 51% de pacientes con CM familiar que no muestran mutación en cualquiera de estos genes, y se clasifican en la categoría de no-*BRCA1/2* o familias *BRCAX*. Estas familias pueden, o bien llevar una mutación en un gen del CM de moderada penetrancia sin haber sido identificado o podría justificarse por un modelo verdaderamente poligénico, por lo que la susceptibilidad se confiere por la acción articulada de varios *loci* de baja penetrancia [106-110].

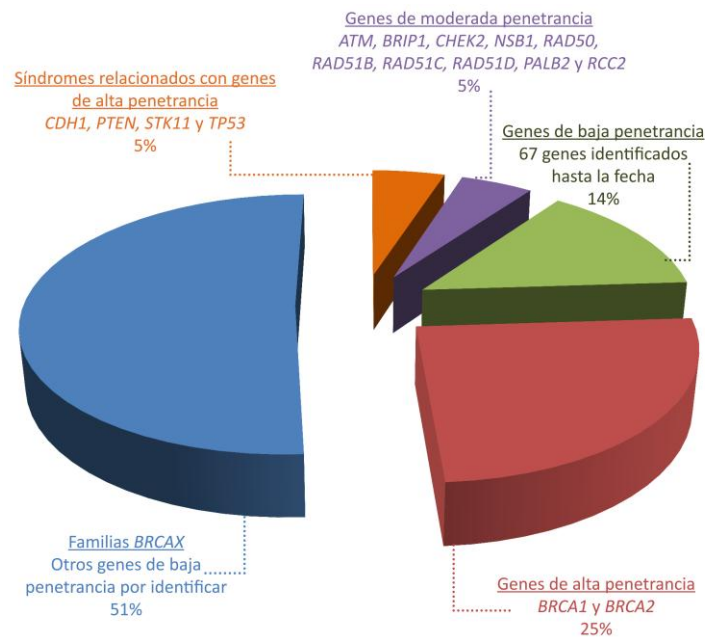


Figura 1. Proporción de pacientes con cáncer de mama familiar debido a las mutaciones germinales en los genes del cáncer de alta, moderada y baja penetrancia (modificado de Melchor y col. [111]).

2.2 Principales genes de susceptibilidad al CMOH: *BRCA1* y *BRCA2*

Como se ha comentado, se han identificado dos genes principales de susceptibilidad y de alta penetrancia: el gen *BRCA1*, localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21) y el gen *BRCA2*, localizado en el brazo largo del cromosoma 13 (13q12).

De tal manera, que estos genes serían los responsables de la mayoría de casos de cáncer de mama hereditario, a pesar de que aproximadamente sólo el 25% de familias con agregación familiar y una aparente predisposición son portadores de mutaciones en *BRCA1* o en *BRCA2* [111] (**fig. 1**).

La expresión de *BRCA1* y *BRCA2* en condiciones normales está relacionada con el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales mamarias, especialmente durante la gestación y la lactancia. Aunque estos genes se expresan de forma ubicua, parece que su actividad repercute especialmente en las células de la mama [112;113].

Las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* no suelen aparecer en cáncer esporádico [83;114;115] y las tasas de mutación varían en las poblaciones debido a los diversos efectos fundadores [116].

Estos genes actúan en la reparación de ADN (en su forma germinal evitan la transformación neoplásica), y siguen un modelo de herencia autosómico dominante de alta penetrancia. Los portadores de mutaciones en alguno de estos genes tienen un riesgo alto de desarrollar cáncer de mama y/u ovario a lo largo de su vida. Por tanto, la detección de estas mutaciones permite la localización de individuos asintomáticos portadores que tienen un riesgo alto de desarrollar un cáncer en el transcurso de su vida.

3 ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE *BRCA1* Y *BRCA2*

3.1 Estructura del gen y de la proteína *BRCA1*

El análisis de ligamiento de familias con múltiples casos de cáncer de mama y cáncer de ovario (CO) permitió identificar en 1990 la primera región cromosómica (17q21) candidata a contener un gen de alto riesgo en cáncer de mama hereditario [84]. En 1994, mediante clonación posicional se identificó el gen causal, denominado *BRCA1* (BReast CAncer gene 1) [MIM *113705] [85].

BRCA1 es un gen que consta de 24 exones, de los cuales el primero no es codificante y el exón 11 es el de mayores dimensiones. Genera diversos transcritos, y la mayor atención se ha centrado en la proteína de mayor tamaño de 1863 aminoácidos (p220); pero la isoforma más corta de 1399 aminoácidos (*BRCA1-IRIS*), podría tener una actividad oncogénica inesperada [117].

3.1.1 Dominios funcionales de *BRCA1* y sus proteínas de unión

BRCA1 alberga una región amino-terminal altamente conservada (dominio *RING*), un dominio *coiled-coil* y dominios en tándem en la región carboxilo-terminal (dominios *BRCT*) (**fig. 2**).

El dominio *RING* es un motivo en el que se encuentran numerosas ligasas de ubiquitina (E3) y es reconocido como una importante estructura que media la ubiquitinación de proteínas. Las secuencias que abarcan el dominio *RING* median una asociación estable con *BARD1* (*BRCA1 associated RING domain protein 1*) [118]. La formación heteromérica del dímero *BRCA1/BARD1* ha estado implicada en el mantenimiento de la estabilidad genómica y en la supresión tumoral a través de su participación en la señalización de los daños del ADN, la reparación del ADN y la regulación de la transcripción [119]. Existen estudios que demuestran que la ubiquitinación de *CtIP* (proteína que interactúa con *CtBP*), una proteína que está

involucrada en la reparación de la DSB a través de su asociación con el complejo *MRN* (el cual se compone por *MRE11*, *RAD50* y la proteína del síndrome de rotura Nijmegen 1, *NBS1*), podría ser una vía de elección para la reparación de la rotura de la doble hebra (*double strand DNA breaks*, DSB), como lo es la supresión *CtIP*-dependiente que promovería la recombinación homóloga (RH) e inhibiría la unión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end joining*) [120]. A pesar de ello, existen estudios que muestran controversia en esta teoría, como veremos más adelante.

El dominio *coiled-coil* de *BRCA1*, interactúa con el dominio N-terminal *coiled-coil* del *PALB2*, fundamental en la conexión entre *BRCA1* y *BRCA2*. Este complejo está específicamente involucrado en la reparación DSB mediante RH [121;122].

Y, finalmente, el dominio *BRCT*: un motivo que une proteínas fosforiladas y está presente en muchas proteínas que responden a daños del ADN [123;124]. Se trata de dominios de unión fosfopeptídicos esenciales para elegir como diana los sitios de ADN dañado. Son dominios conservados en múltiples proteínas que intervienen en la respuesta al daño en el ADN (*DNA damage response*, DDR) y son responsables de la asociación de *BRCA1* con proteínas serin-fosforiladas en motivos SXXF mediante *ATM*. Entre las proteínas que interactúan con *BRCA1*, encontramos *abraxas*, *BRIP1* y *CtIP* [125].

El hecho que estos dominios altamente conservados sean diana con frecuencia de muchas mutaciones clínicamente importantes indican que son fundamentales para la función de *BRCA1*. Curiosamente, se han encontrado en otras partes de la región codificante regiones de aminoácidos evolutivamente conservadas, lo que sugiere que mucho queda por esclarecer acerca del gen *BRCA1* [119].

Podríamos decir que *BRCA1* es una composición de numerosos supercomplejos, donde cada uno de ellos juega un papel en la activación de la respuesta al DDR, en el control de la activación del ciclo celular y/o en la reparación de la DSB.

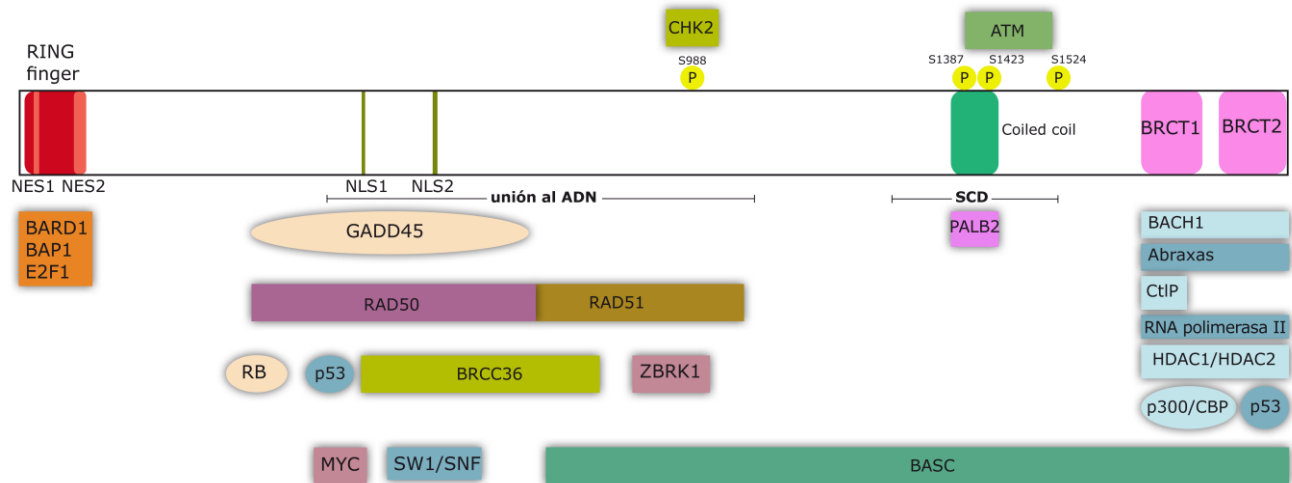


Figura 2. Esquema de los dominios funcionales de *BRCA1* y sus proteínas de unión.

3.1.2 Funciones de *BRCA1*

3.1.2.1 Actividad ubiquitina-ligasa

La ubiquitinación es el proceso por el cual una proteína se modifica por unión covalente de cadenas de mono o poliubiquitina [126]. En la reacción intervienen tres enzimas: una activadora (E1), una conjugadora (E2), y una ubiquitina ligasa (E3). El proceso requiere ATP y comienza con la formación de un puente tiol-éster entre una cisteína de la enzima activadora (E1) y la glicina C-terminal de la ubiquitina, de modo que la ubiquitina se une a la E1; después, se transfiere la ubiquitina de la E1 a la enzima conjugadora E2. Finalmente, una ubiquitina-ligasa E3 traspasa la ubiquitina de la E2 a una lisina de la proteína diana. Parece que la E3 primero se autoubiquitina y luego pasa la ubiquitina directamente al sustrato (**fig. 3**).

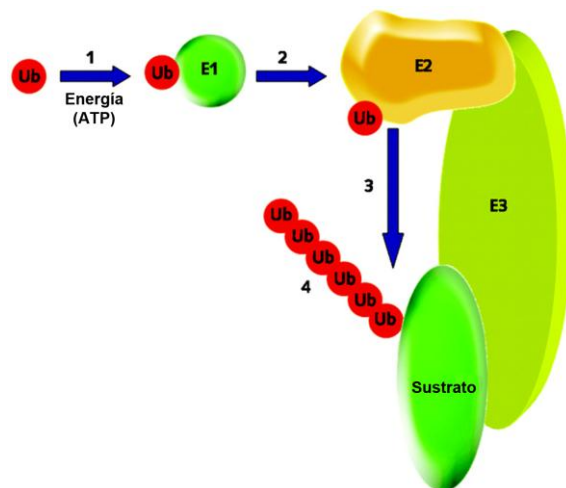


Figura 3. Proceso enzimático de la ubiquitinación (modificado de Reinstein y col., 2006 [127]).

La ubiquitinación tradicionalmente se relaciona con marcaje de proteínas para su degradación por el proteasoma, pero recientemente se ha descrito la ubiquitinación como forma de activar o reprimir distintos factores de transcripción.

El dominio *RING* N-terminal de *BRCA1* interactúa con otro dominio *RING* conformacionalmente similar, *BARD1*, que contiene un dominio *RING* N-terminal y dominios tándem C-terminales de *BRCT* [128], y así constituir un heterodímero E3 ligasa [129-131]. Se requiere la interacción de *BARD1* para estabilizar la conformación apropiada del dominio *RING* del *BRCA1* para la actividad E3 [130]. El *RING finger* de *BRCA1* interactúa con E2 de *UBCh5*, mientras que el papel del dominio *RING* de *BARD1* todavía se desconoce [132] (**fig. 4**).

Se ha visto que existe autoubiquitinación de *BRCA1* cuando se une a *BARD1* y la ubiquitinación estabiliza *BRCA1* y aumenta su actividad E3, lo que sugiere un efecto *feed-back* positivo para su actividad. La ubiquitinación de *BRCA1* conforma una variedad de procesos que dependen de los diferentes destinos según los sustratos en los que podría estar involucrada la reparación de DSBs y la remodelación de la cromatina [132-136].

No obstante, recientemente, ha habido publicaciones que muestran controversia acerca de la relación entre la actividad ligasa E3 de *BRCA1/BARD1* en la DSB [137] y en la supresión tumoral [138]. Por lo que podemos concluir que no está definida satisfactoriamente la función de la ligasa E3, a pesar de que muchas mutaciones patogénicas se encuentran en el dominio *RING*, lo cual sugiere que podría haber otra función proteica asociada al dominio *RING* todavía no esclarecida y, quizá, más relacionada con la estabilidad del heterodímero *BRCA1/BARD*.

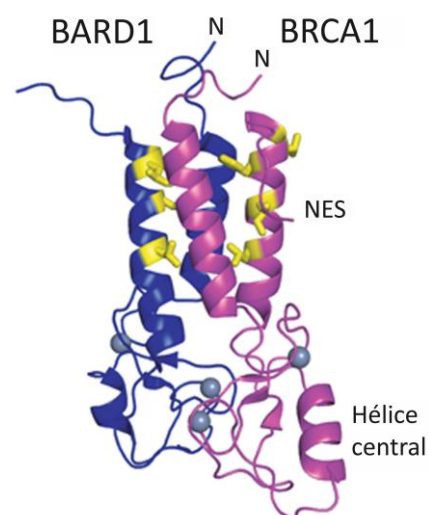


Figura 4. Estructura del heterodímero conformado entre el dominio *RING* de *BRCA1* (rosa) y el dominio *RING* de *BARD1* (azul) (modificado de Clark y col., 2012 [139]).

3.1.2.2 Señalizador y reparador de roturas de ADN

El genoma eucariota se encuentra bajo un estrés continuado, y uno de sus resultados es la generación constante de daño en el DNA [140]. Una de las lesiones del ADN más tóxicas para una célula es la DSB. Esto es debido a que afecta a ambas hebras de la doble hélice, por lo tanto no hay cadena complementaria intacta disponible como molde para la reparación [141]. Una sola DSB sin reparar puede dar lugar a la inestabilidad genética y la tumorigénesis [142]. Las DSBs pueden surgir a partir de fuentes endógenas, como la replicación y las endonucleasas celulares, y también a partir de fuentes exógenas, como la radiación ionizante (RI) y muchos regímenes de quimioterapia [143]. En consecuencia, las células han desarrollado una serie de vías de reparación de las DSBs para tratar estas lesiones. Las dos principales vías de reparación son la recombinación homóloga (RH) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ). RH utiliza secuencias de ADN homólogas como molde para la reparación, mientras que NHEJ liga los extremos del ADN expuestos a las DSBs sin el uso de una homología significativa. RH predomina en células en fase S, cuando una cromátida complementaria está disponible como molde para su reparación, y es un proceso de alta fidelidad [144]. NHEJ se piensa que es activo durante todo el ciclo celular, y es más propenso a errores en comparación con RH. Se ha descrito otra vía de reparación de DSB relacionada con *BRCA1*, el anillamiento de cadena sencilla (*single-strand annealing*, SSA), que se hibrida a secuencias repetitivas adyacentes a la DSB, dando como resultado una delección entre las repeticiones [145] (**fig. 5**).

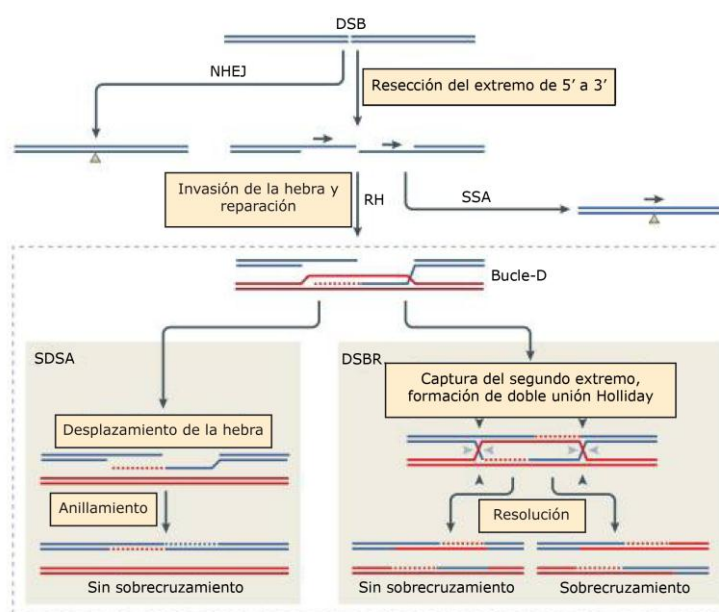


Figura 5. Vías de reparación de las DSBs del ADN. La RH se inicia con la resección del extremo creando un extremo 3'' de hebra sencilla que puede invadir otra hebra molde para iniciar la reparación. Las vías alternativas de RH (vía de hibridación dependiente de síntesis de hebra o SDSA y reparación de la DSB o DSBR) se generan a partir de la formación del bucle-D. NHEJ implica la unión de extremos no homólogos de ADN. El SSA ocurre cuando la resección del extremo se produce en secuencias repetitivas. Modificado de Moynahan y col. 2010 [146].

- *BRCA1* y la recombinación homóloga (RH)

BRCA1 interviene directamente en la RH mediada por la reparación de DSB. *BRCA1* se une a la DSB a través de su asociación al complejo *Abraxas-RAP80*, facilitada por los sitios de unión de ubiquitina que tiene la proteína *RAP80* [147;148]. *Abraxas* se une directamente al dominio *BRCT*, mientras que *RAP80* interactúa con *BRCA1* indirectamente a través de *abraxas* [149]. *RAP80* se une a la polihistona H2AX ubiquitinada, cuyas modificaciones son importantes en la respuesta al daño de ADN [150], acumulando por ello *BRCA1* al DNA dañado [149] (**fig. 6**). Por lo tanto, podemos afirmar que la localización de *BRCA1* mediada por *abraxas* tiene un papel en la respuesta al daño del ADN.

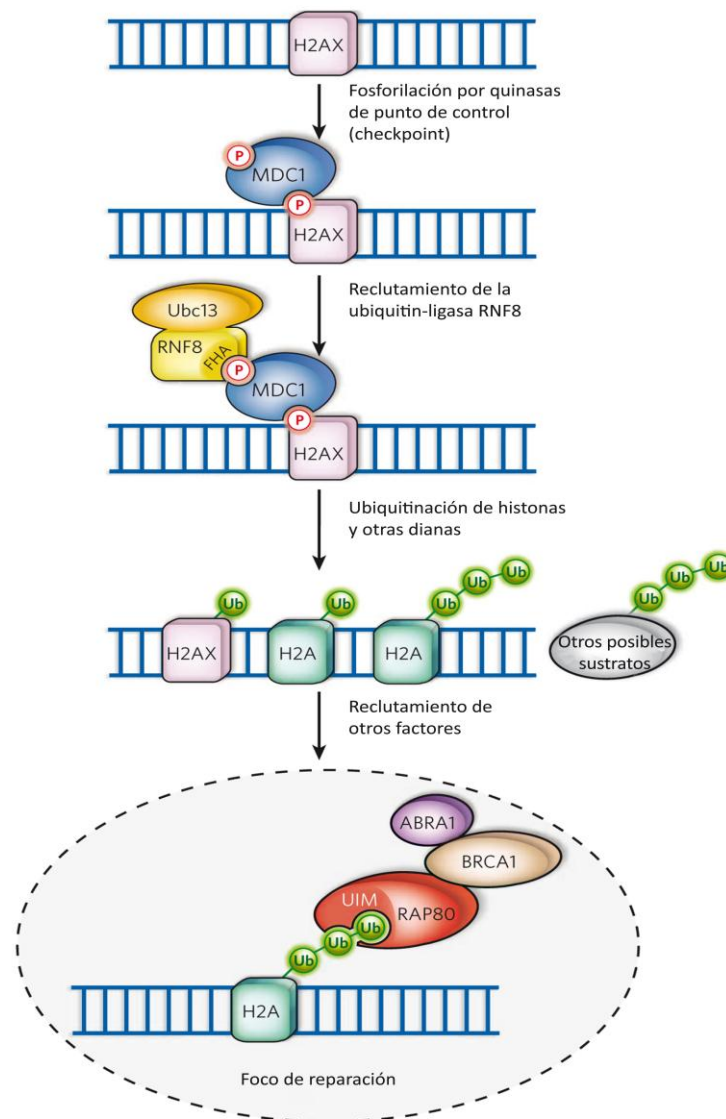


Figura 6. Esquema de la participación de *BRCA1* en la señalización y la reparación de los DSBs a través del complejo *Abraxas-RAP80* (modificado de Bergink y col., 2009) [151].

Además, *BRCA1* también está involucrado en el proceso de DSB a través de su interacción con *CtIP* y el complejo *MRN*, el cual tiene un importante papel en la detección del daño y en el proceso de señalización *ATM* [152-156]. Para facilitar esta reparación del ADN, los DSBs necesitan ser procesados para generar regiones de ADN de una sola hebra (*ssDNA*), que permiten la asimilación de la proteína de reparación en la recombinación del ADN: la proteína *RAD51*. Se piensa que *BRCA1* podría actuar como una estructura compacta para estabilizar la formación del complejo *MRN-CtIP*, lo cual es importante para la resección final de ADN [157-159] (**fig.7**).

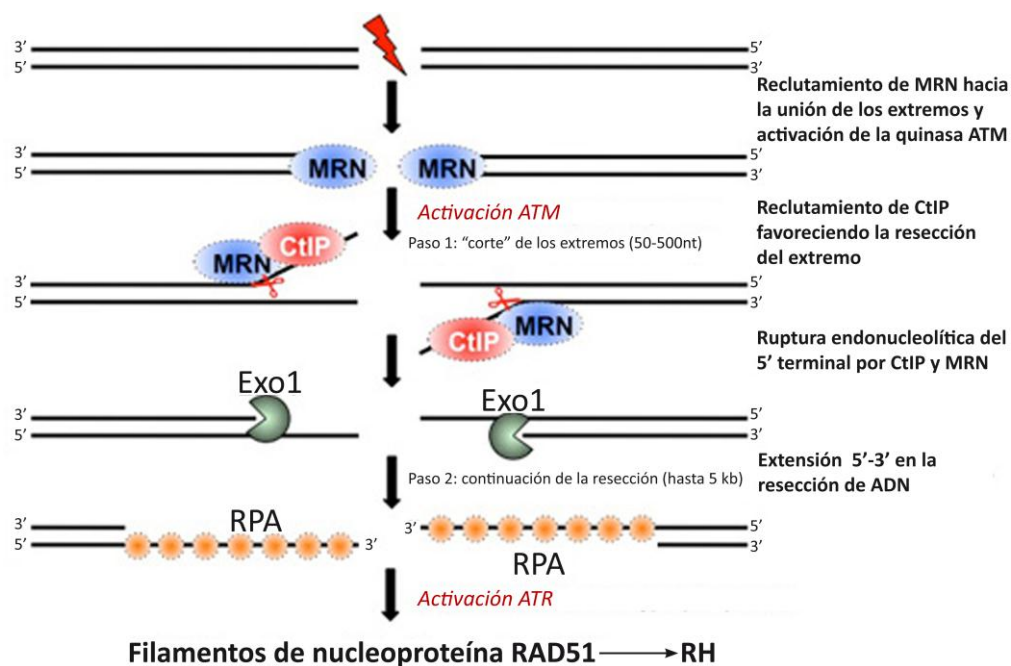


Figura 7. Mecanismo de reparación de la DSB a través del complejo de *MRN* de *BRCA1*.

También se ha visto la implicación de *BRCA1* en la última fase de la RH mediante el reclutamiento de la proteína *RAD51* hacia los *loci* de ADN dañado mediante su interacción con *PALB2* y *BRCA2* [122;160]. Dicha interacción es posible debido a la fosforilación del S988 de *BRCA1* mediada por *CHK2* [161].

La RH parece ser más importante para corregir los errores por replicación que los daños exógenos del DNA en el DSB, en cuyo caso podrían ser utilizadas otras vías de reparación [161]. De manera similar, la supresión tumoral estaría íntimamente

relacionada con la corrección de errores de la replicación en lugar de la reparación del DSB, todo ello explicaría la relación entre la RH y la supresión tumoral.

- ***BRCA1* y las vías de reparación NHEJ y SSA**

BRCA1 podría desempeñar otras funciones a partir de otras vías de reparación de ADN, incluyendo NHEJ y el SSA [162]. El papel de *BRCA1* es algo controvertido en NHEJ, ya que se ha observado que lo podría facilitar [163], reprimir [164;165] o no tener ningún efecto [166].

3.1.2.3 Regulador del ciclo celular

Además de un papel directo en la reparación de DSB, *BRCA1* posee otras funciones que promueven la estabilidad genómica y la supervivencia celular. Tras la generación de daños en el ADN, las regulaciones del ciclo celular se activan deteniendo las células y, de esta manera, les da tiempo para reparar el daño antes de progresar.

Si no se resuelve el daño, las células pueden permanecer detenidas hasta que se activa una vía apoptótica. En ausencia de tales respuestas de control, no se podrá dar el tiempo suficiente para que el DSB esté totalmente reparado antes de la entrada en mitosis y puede conducir a la inestabilidad del genoma, que se manifiesta mediante procesos como la pérdida cromosómica y/o su segregación anómala (*missegregation*).

El complejo *BRCA1-BARD1* está implicado en la activación de los puntos de control de G1/S (a través de la fosforilación de *BRCA1* mediante *ATM* o *ATR*), la fase S y G2/M [167;168] (**fig.9**). El macrocomplejo *TOBP1* (*BRCA1-BRIP1-DNA topoisomerase II-binding protein 1*) y *BACH1* parecen ser necesarios en el control de la fase S y la replicación de ADN [124;169-173] (**fig.9**). Mientras que el macrocomplejo *BRCA1-abraxas-RAP80* parece estar involucrado en el punto de control G2/M en respuesta al daño de ADN inducido por radiaciones ionizantes [161] (**fig.9**).

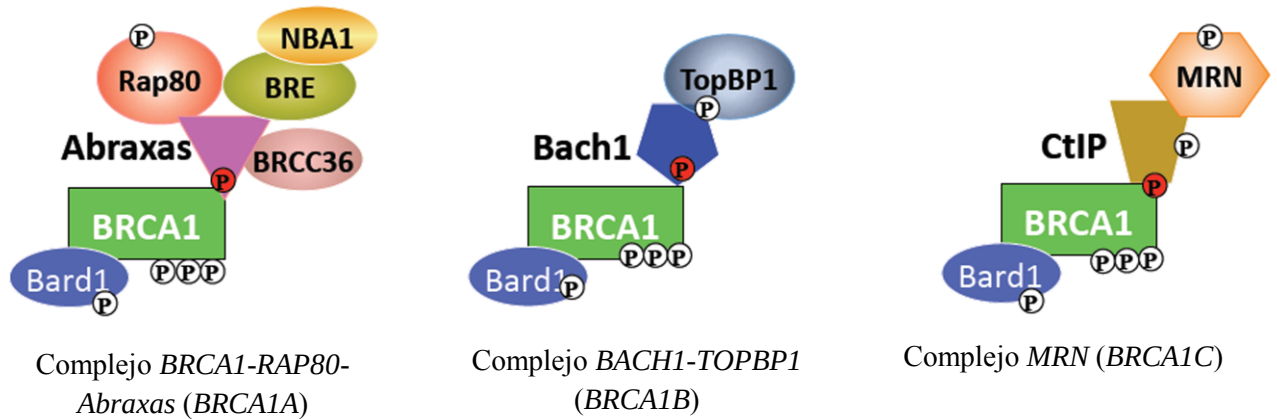


Figura 8. Esquema de los complejos *BRCA1*-RAP80-Abraxas, *BACH1*-TOPBP1 y *MRN*; también llamados complejos *BRCA1A*, *BRCA1B* y *BRCA1C*, respectivamente (modificado de Wang B., 2012 [174]).

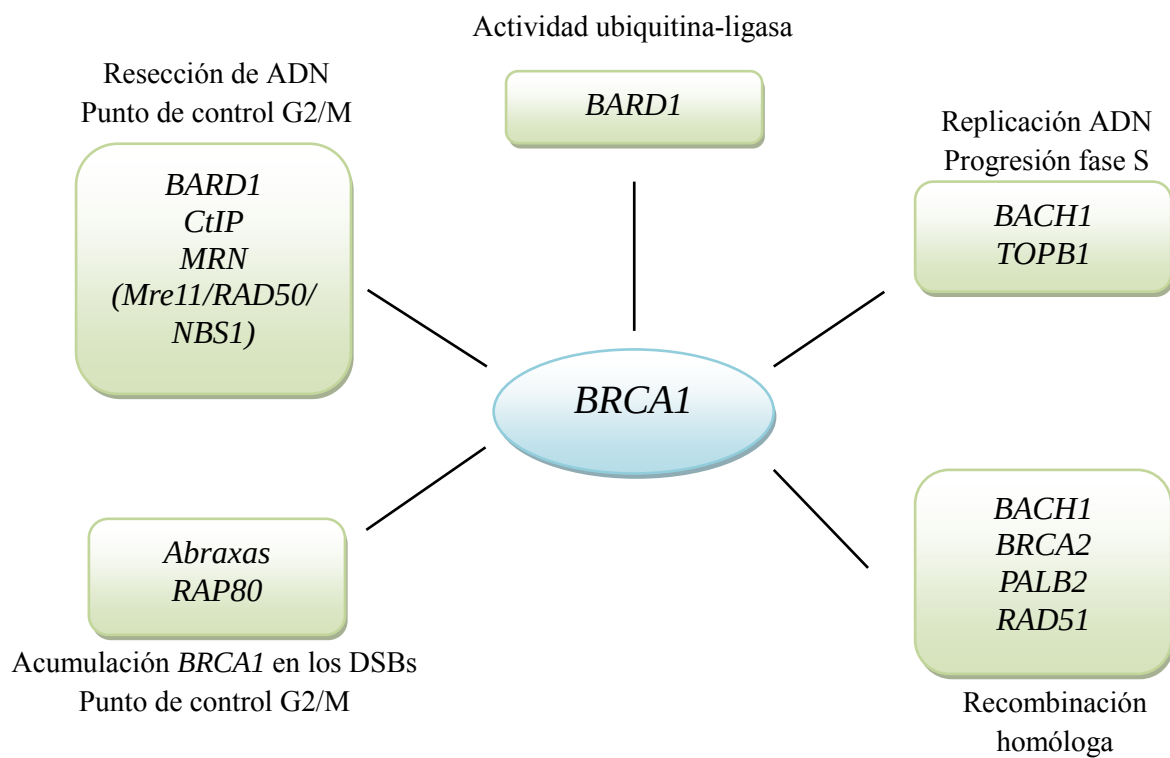


Figura 9. Esquema de los de los diversos complejos proteicos en los que se sabe que *BRCA1* es una subunidad importante, junto con su función conocida. (modificado de O'Donovan y col., 2010 [175]).

3.1.2.4 Regulador transcripcional

Además de su papel en la reparación del ADN y la regulación del ciclo celular, el gen *BRCA1* también actúa como un regulador transcripcional. La actividad transcripcional de la región C-terminal de *BRCA1* fue identificada por primera vez cuando se vio que se fusionaba con el dominio de unión al ADN de *GAL4* [176;177]. Poco después de este hallazgo, se vio que el dominio *BRCT* de *BRCA1* interactuaba con la holoenzima RNA polimerasa II [178]. Se han encontrado otros reguladores de transcripción que pueden interactuar con *BRCA1* (**Fig. 10**). Estudios actuales han establecido firmemente el papel de *BRCA1* como un regulador transcripcional, actuando bien como activador o como repressor [179;180]. Ha sido un tema de debate que *BRCA1* se una al ADN directa o indirectamente, pero sí que es bien aceptado que interactúa con el ADN no sólo para reparar el ADN dañado, sino también para regular la transcripción.

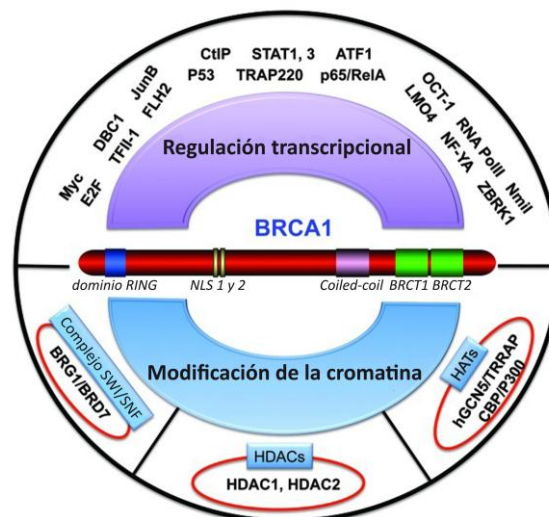


Figura 10. Dominios funcionales de *BRCA1* y proteínas relacionadas con la regulación transcripcional (modificado de Chang y col. 2013 [192]).

Varios estudios se han centrado en el efecto global del *BRCA1* en la expresión génica, ya sea por su sobreexpresión o su *knockdown* [181-184]. Un estudio reciente identificó las dianas directas de transcripción de *BRCA1* mediante la combinación de los datos de expresión de genes con sitios de unión *BRCA1* detectados tras su análisis ChIP-chip [185]. Sorprendentemente, sólo 44 de los 1294 genes cuya expresión está

alterada por *BRCA1* parecen ser dianas directas transcripcionales de *BRCA1*, lo que sugiere que la mayoría de las dianas de transcripción pueden ser reguladas indirectamente por *BRCA1*. Curiosamente, el grupo más común regulado transcripcionalmente de forma directa fueron los genes que codifican los factores de transcripción (27%). La desregulación de estos factores de transcripción es probable que contribuya a los cambios en el perfil de expresión de un gran número de genes que están aparentemente regulados de manera indirecta por *BRCA1*.

De entre los reguladores de la transcripción con los cuales interactúa *BRCA1*, quizá deberíamos destacar *p53*. *BRCA1* puede interactuar directamente con *p53* y estimular su actividad transcripcional. Curiosamente, en los estudios de los cánceres relacionados con *BRCA1* humanos, la incidencia de mutaciones de *p53* (más del 80%) es considerablemente más alto que en los cánceres de mama esporádicos (25%) [186;187]. Se ha sugerido que debido a anomalías cromosómicas creadas por la deficiencia de *BRCA1*, se provoca la activación de *p53* y la expresión de *p21*, dando como resultado una supresión del ciclo celular o la senescencia. Por la misma razón, parece que se requiere una mutación de *p53* para el desarrollo del cáncer de mama relacionado con *BRCA1* porque además, las aberraciones cromosómicas debido a la deficiencia de *BRCA1* podrían activar la *p53*, lo cual conduce a la detención del ciclo celular, apoptosis y/o senescencia de las células tumorales. En un estudio reciente, se encontró que *p53* media la exportación nuclear de *BRCA1* *wildtype* a través de su interacción con la proteína *p53* y, posiblemente, mediante la interrupción de la interacción *BRCA1/BARD1* [188]. Se ha sugerido que este mecanismo podría aumentar la sensibilidad celular hacia agentes que dañan el ADN como las radiaciones ionizantes y que la pérdida de función de *p53* podría poner en peligro la exportación nuclear de *BRCA1* en los cánceres de mama esporádicos con *BRCA1* funcional, resultando una mayor resistencia a los agentes que dañan el ADN. En consecuencia, podemos decir que la interacción funcional de *BRCA1* y *p53* es bastante compleja y puede influir en la patogénesis molecular del cáncer de mama, el DDR de las células tumorales, y su sensibilidad a los agentes que dañan el ADN incluyendo fármacos quimioterapéuticos y las radiaciones ionizantes.

Además de la complejidad de la regulación transcripcional de *BRCA1*, se ha podido observar que *BRCA1* interactúa con algunos modificadores de la cromatina

(Fig.10). Entre estos, las histonas deacetilasas *HDAC1* y *HDAC2* fueron los primeros en ser identificados y se demostró que se unen al dominio C-terminal *BRCT* de *BRCA1* [189]. Esta interacción con las HDAC permitió relacionar la actividad transcripcional de *BRCA1* mediante la alteración de la estructura de la cromatina, la cual es más accesible para la maquinaria transcripcional. *BRCA1* también interactúa con *p300/CBP*, una histona acetiltransferasa [190]. Todo ello ha hecho asociar la participación de *BRCA1* en la regulación epigenética, hipótesis apoyada además por el estudio que muestra su interacción con la subunidad *BRG1* del complejo *SWI/SNF* [191]. El complejo *SWI/SNF* juega un papel en la modificación de las histonas por hidrólisis de ATP y puede activar o reprimir la transcripción. Más recientemente, se descubrió que *BRCA1* puede unirse a otra subunidad de este complejo, *BRD7*. Esta interacción parece ser esencial para el reclutamiento de *BRCA1* hacia los promotores del receptor α de estrógeno (*ESR1*).

3.1.2.5 Papel de *BRCA1* en los telómeros

Los telómeros son extremos de los cromosomas que contienen varias longitudes de repeticiones de ADN hexaméricas (TTAGGG en células de mamíferos), son de interés en el contexto de la reparación del ADN por varias razones:

- si los extremos del cromosoma han sido reconocidos como DSBs, ello podría conllevar a inestabilidad genómica debido a la unión de extremos y a translocaciones;
- por el contrario, la telomerasa es reclutada para DSBs internos, donde potencialmente podría generar un telómero, con consecuencias desastrosas,
- el daño del ADN puede provocar el acortamiento de los telómeros, y
- este acortamiento de telómeros puede conducir a inestabilidad cromosómica y desarrollo del cáncer [193;194].

Por otra parte, las células tumorales que no expresan la telomerasa, el complejo enzimático que añade TTAGGG a los telómeros, utiliza un alargamiento alternativo de los telómeros (*alternative lengthening of telomeres* o ALT), un método de mantenimiento de los telómeros que implica la recombinación del ADN y utiliza algunas de las mismas proteínas de reparación del ADN involucradas en la reparación de DSB [195].

Un grupo de proteínas que se unen al complejo proteico de los telómeros es el complejo *MRN*, en el que estaría implicada la señalización *ATM* [196]. Ante esta situación, una cascada de señalización similar a la inducida por los DSBs se activa y puede dar lugar a la detención del ciclo celular, la senescencia o apoptosis.

Además del complejo *MRN*, varios estudios implican a *BRCA1* como regulador de la longitud de los telómeros y su estabilidad [197-201], además de otras proteínas asociadas a DDR (*Ku*, DNA-PKcs y *RAD51D*) [202].

3.2 Estructura del gen y de la proteína *BRCA2*

En 1995 se identificó el *BRCA2* (BRest Cancer gene 2) [MIM *600185], el segundo gen de alta penetrancia implicado en cáncer de mama hereditario [89;203]. El *BRCA2* se trata de un gen más grande que *BRCA1*, está localizado en el cromosoma 13q y tiene 27 exones. Codifica una proteína de 3418 aminoácidos (frente a los 1863 aminoácidos de *BRCA1*), aunque tiene menos motivos estructurales identificados.

Al contrario de las múltiples funciones de *BRCA1*, la función principal de *BRCA2* es la RH, la cual es en base a su capacidad para unirse a la recombinasa de invasión de cadena (*strand invasion recombinase*) *RAD51*.

3.2.1 Dominios funcionales de *BRCA2* y sus proteínas de unión

BRCA2 contiene ocho repeticiones *BRCT*, entre los residuos aminoacídicos 1009 y 2083. Cada uno de los cuales se puede unir a *RAD51*, y a un dominio de unión al ADN (*DNA domain*) (**fig.11**). *BRCA2* media el reclutamiento de la recombinasa *RAD51* hacia los DSBs, y aunque *RAD51* no sea por sí solo esencial para la RH, también es responsable de la función supresora de tumores de este proceso de reparación [204].

El dominio de unión a ADN (*DBD*) se une al ADN monocatenario (ssDNA) y al bicatenario (dsDNA). El *DBD* contiene cinco componentes (**fig.11**): un dominio de α helicoidal de 190 aminoácidos, tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*) que son una especie de módulos que unen el ssDNA, y un dominio tower (*TD*) que sobresale a partir de *OB2* y se une al dsDNA [205]. El dominio helicoidal, *OB1* y *OB2* también se asocian con la proteína *DSS1* (*deleted in split-hand/split-foot syndrome*), que se ha relacionado con la estabilización de la proteína *BRCA2* [148;206-208].

Como ya hemos mencionado anteriormente, *PALB2* interactúa con *BRCA2* y a través del cual se localizarían los DSB junto con los *BRCA1*. El extremo N-terminal de *BRCA2* es el que se uniría a *PALB2* en los aminoácidos 21-39 [209] (**fig.11**).

Además, el extremo C terminal de *BRCA2* contiene una *NLS* y una quinasa dependiente de ciclina (*CDK*), sitio de fosforilación en S3291, que también se une a *RAD51* [210] (**fig.11**). Se desconoce si esta asociación es importante para la supresión de la carcinogénesis en mama y ovario. Esta región C terminal se trata de un dominio denominado *Exon 27* o *TR2*, una región de tan sólo 35-70 aminoácidos codificados por el último exón (exón 27) [211;212] (**fig.11**). La unidad *TR2* contiene un residuo de serina (Ser3291), altamente conservado en mamíferos y pollos, y que sería el fosforilado por una quinasa dependiente de ciclina.

Las mutaciones puntuales dentro de las repeticiones *BRC* que comprometen las interacciones con *RAD51* se encuentran en individuos con el síndrome de CMOH [213]. Las repeticiones *BRC* tienen pequeñas diferencias en su secuencia y se unen a *RAD51* con afinidad variable por imitación de la estructura a los monómeros de *RAD51* [214]. Además de facilitar el reclutamiento de *RAD51* hacia el ssDNA, las repeticiones *BRC* aceleran el desplazamiento de la proteína de replicación A (RPA) desde ssDNA hacia el *RAD51* [89], bloquean la nucleación *RAD51* en el ADN de doble cadena y facilita la formación de filamentos de *RAD51* en el ssDNA debido al mantenimiento de la forma activa de ATP del *RAD51*, la cual va dirigida al ssDNA [215].

Un nuevo dominio ha sido recientemente identificado debido a su capacidad por interactuar con la proteína *DMC1* [216]. Se le ha denominado motivo *PhePP* (**fig.11**), debido a su importancia crítica en los residuos de Phe2406, Pro2408 y Pro2409 en dicha interacción. Y, también sería importante destacar un dominio de unos 85 residuos identificado en el extremo aminoterminal de la proteína *BRCA2* (**fig.11**) y que podría tener una actividad en la activación de la transcripción [217], pero no se tienen pruebas convincentes a favor de esta actividad en la actualidad.

Gran parte de nuestro conocimiento de *BRCA2* procede de estudios en porciones de la proteína *BRCA2* o investigaciones procedentes de ortólogos de *BRCA2*, como *Brh2* en *U. maydis* y *BRC- 2* en *Caenorhabditis elegans* [215;218-221]. La comprensión detallada de la función de *BRCA2* en mamíferos se ha visto obstaculizada por la imposibilidad de aislar la proteína en longitud completa, ya que se trata de 3.418

aminoácidos en los seres humanos. De todos modos, recientemente, tres grupos independientes han purificado y validado funcionalmente con éxito el *BRCA2* humano entero [222-224]. Estudios futuros utilizando la proteína *BRCA2* en su longitud completa ayudarán a mejorar nuestra comprensión de la estructura y su función.

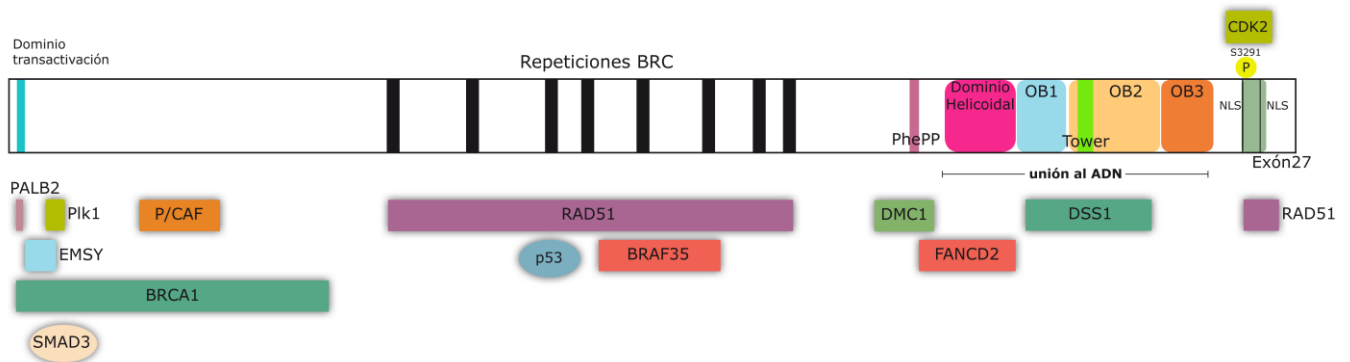


Figura 11. Esquema de los dominios funcionales de *BRCA2* y sus proteínas de unión.

3.2.2 Funciones de *BRCA2*

3.2.2.1 Regulador de la citocinesis

La inactivación de las proteínas *BRCA* no se limita únicamente a provocar aberraciones estructurales en los cromosomas, sino que también favorece la aneuploidía [225;226]. De hecho, la aneuploidía es también una característica común en las células cancerosas de los portadores de una mutación *BRCA*. Estas observaciones plantean la cuestión de si los genes *BRCA1* o *BRCA2* tienen funciones cuya inactivación podría interferir con la segregación de los cromosomas durante la mitosis, lo que lleva a la generación de células hijas con un número anormal de cromosomas.

Por otra parte, se ha visto que los tumores con mutaciones *BRCA2* han sufrido una sustancial amplificación del centrosoma [227;228]. Una amplificación del centrosoma se conoce como el resultado de los efectos directos sobre el proceso de duplicación del centrosoma en fase temprana S, desacoplamiento de la replicación del ADN a partir de la duplicación del centrosoma, y la división celular interrumpida debido a un fallo de la citocinesis.

3.2.2.2 Reparador de ADN

- *BRCA2* y la recombinación homóloga (RH)

Se ha visto que *RAD51* cataliza el paso bioquímico definitivo de la RH: el intercambio de las hebras [229;230], durante los cuales el ADN monocatenario (ssDNA) invade el ADN dúplex homólogo, desplazando la hebra idéntica del dúplex y la formación de un desplazamiento bucle (bucle D). *RAD51*, de manera similar a su homólogo bacteriano, *RecA*, es una ATPasa dependiente de ADN que forma filamentos helicoidales de nucleoproteína con la ssDNA [231;232].

Determinaciones estructurales de una repetición *BRC*, la *BRC4*, han identificado dos módulos distintos dentro de un péptido de 33 aminoácidos que contribuyen a la unión con *RAD51* [214;233] (**fig.12**). La región amino-terminal de *BRC4* adopta una estructura en horquilla que imita el motivo de oligomerización de *RAD51*, ocupando bolsillos hidrófobos que normalmente estarían ocupados por un monómero de *RAD51* adyacente en un filamento [214]. Este mimetismo proporciona una explicación estructural basada en cómo las repeticiones *BRC* interfieren con la RH cuando ésta se sobreexpresa en células [220], aunque es de suponer que también promueva la función de *RAD51* en su contexto habitual. La región C-terminal *BRC4* forma una α -hélice y contribuye a la unión con *RAD51* mediante la ocupación de un bolsillo hidrofóbico distinto [233]. Por tanto, podemos decir que la complejidad en la unión existe incluso dentro de una sola repetición *BRC*.

Los resultados con *BRC4*, el cual representa sólo el 1% de *BRCA2*, plantean la pregunta sobre el papel de la parte restante de la proteína. La estructura de una región de ~ 800 aminoácidos bien conservada desde el extremo C terminal mostró que *BRCA2* es un proteína de unión a ssDNA (*ssDNA binding*) [205]. Esta región de *BRCA2* se compone de cuatro dominios globulares dispuestos de una manera lineal (*OB*) y un quinto dominio, que tiene una región *coiled-coil* extendiéndose como una *tower* (**fig.12**).

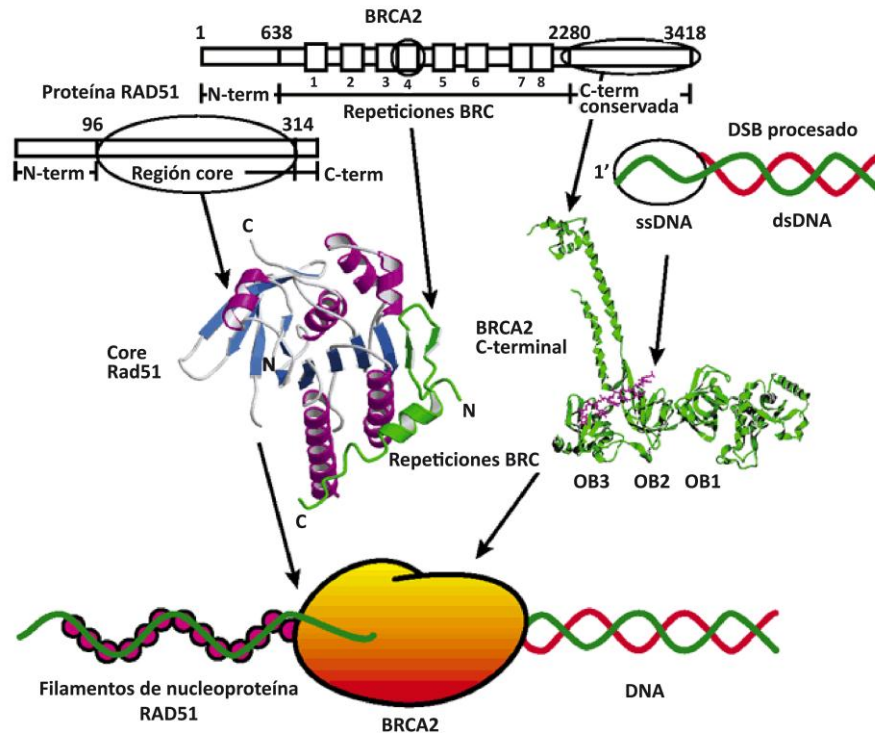


Figura 12. Diagramas de las secuencias de la proteína *RAD51* y *BRCA2* y el procesamiento de una DSB (modificado de Kowalczykowski y col., 2002 [234]).

- *BRCA2* y la ruta de la anemia de Fanconi (AF)

La AF es una enfermedad genética rara que se caracteriza por una alta incidencia de cáncer y trastornos en el desarrollo [235]. En contraste con la herencia monoalélica de las mutaciones encontradas en adultos con tumores, la herencia bialélica de mutaciones *BRCA2* se limita a la AF del subtipo D1 [236], lo que representa menos de un pequeño porcentaje de todos los casos de AF y cuya incidencia global es de sólo uno por 350.000 nacidos vivos [237;238]. Las mutaciones *BRCA2* que se encuentran en pacientes con anemia de Fanconi D1, también se denominan alternativamente como *FANCD1* y suelen dar un síndrome con características clínicas distintas a la AF clásica, incluyendo un mayor riesgo de cáncer de mama y de tumores malignos en la infancia como el meduloblastoma y el tumor de Wilms [239].

En contraste con los síndromes de CMOH, las mutaciones de *BRCA2* en pacientes con AF-D1 afectan a ambos alelos en la línea germinal, con mutaciones diferentes en cada alelo dando lugar a la llamada heterocigosidad [240]. Curiosamente, varias de las

mutaciones *BRCA2* detectadas en un principio como bialélicas en la AF también ocurren de forma monoalélica en los CMOH, lo cual indica que la herencia germinal de una mutación idéntica o bien en uno o en ambos alelos tiene diferentes consecuencias fenotípicas. Esto podría explicar la diferencia entre los efectos de la pérdida parcial de la función de *BRCA2* en todos los tejidos durante el desarrollo embrionario (para mutaciones bialélicas en la AF) frente a la rara inactivación del segundo alelo en tan sólo unas pocas células somáticas posteriormente a lo largo de la vida (debido a mutaciones monoalélicas en CMOH). Además de la AF-D1, hay por lo menos otros 12 grupos genéticamente distintos de AF (denominado AF-A, -B, -C, -D1, -D2, etc.), cada uno de los cuales está asociado a mutaciones recesivas en un gen diferente (conocidos como *FANCA*, *FANCB*, etc.).

Una característica de las células AF es su hipersensibilidad a los agentes de entrecruzamiento (*cross-linking agents*) del ADN. Tres de los trece grupos de complementación de la AF son el resultado de mutaciones en *BRCA2*, *PALB2* y *BACH1*. Se ha propuesto que la reparación de los enlaces cruzados entre cadenas de ADN puede requerir la RH, y por tanto, el papel de *BRCA2* en la AF puede ser debido a su contribución a esta RH. Es tentador atribuir un papel de *BRCA1* en AF debido a la participación de múltiples proteínas que interactúan con *BRCA1* en la prevención de la enfermedad de AF, pero hasta el momento no existe ninguna evidencia convincente que explique tal función.

3.2.2.3 Papel en la interrupción de la replicación

Un trabajo reciente ha abierto la posibilidad que *BRCA2* proteja la hebra naciente de su degradación en la interrupción del proceso de replicación [241]. Por tanto, además de su papel en la reparación por RH, estos resultados implican otro papel de *BRCA2* en la protección de la horquilla de replicación. La evidencia fundamental que apoya estas dos funciones del *BRCA2* ha sido la disociación de la función de la variante, S3291A, cuya expresión permite una DSB normal inducida por la RH, pero con una protección defectuosa de las horquillas de replicación.

3.2.2.4 Regulador del ciclo celular

No está claro si *BRCA2* participa directamente en la regulación del ciclo celular o en funciones en los puntos de control de los ciclos celulares. La evidencia disponible sugiere que *BRCA2* media en el control de la fase G2/M al interactuar con una proteína,

el factor 35 asociado a *BRCA2* (*BRAF35*), que se une a estructuras de ADN ramificado [242]. Sin embargo, es prematuro concluir que *BRCA2* esté directamente implicada en la progresión mitótica.

Otra línea de investigación sugiere que la inestabilidad genética causada por la pérdida de la función de *BRCA2* podría desencadenar mutaciones, incluyendo genes de punto de control, como *p53* [243;243]. Estas observaciones indican claramente una función indirecta de *BRCA2* en la regulación del ciclo celular. Obviamente, se requieren más investigaciones para determinar si *BRCA2* regula el control del ciclo celular, como una función distinta a la reparación del ADN.

3.2.2.5 Regulador transcripcional

La función de *BRCA2* como regulador transcripcional tampoco está todavía clara. Se ha pensado que el producto del exón 3 *BRCA2* (aminoácidos 23-105) activa la transcripción y que una mutación *missense* (Tyr42Cys) de *BRCA2* reduce el potencial de transactivación. De todos modos, la relevancia de esta mutación para la carcinogénesis aún no se ha definido. Diferentes hallazgos a nivel molecular han resultado contradictorios, puesto que aunque el *skipping* del exón 3 estuviese asociado a un fenotipo anormal, la desaparición del exón 3 no altera el marco de lectura y todavía permanecen los sitios de unión a *RAD51* y las señales de localización nuclear (*NLS*) en la región 3' de *BRCA2* [244].

Otros estudios han relacionado la expresión de *BRCA2* con la baja regulación de la actividad basal transcripcional de *p53* [245], la modulación de la acetilación de histonas (*P/CAF* y *p300/CBP*) [246], la proteína EMSY (la cual se une al exón 3) [247-250] y, más recientemente, la *Aurora-A* quinasa [251-253].

3.3 Interconexiones funcionales entre *BRCA1* y *BRCA2*

Los tumores que se desarrollan en pacientes con mutaciones germinales heterocigotas en los genes *BRCA1* o *BRCA2* son defectuosos en la reparación mediada por la RH. Las células germinales heterocigotas deben de ser “haploinsuficientes”, pero este defecto funcional ha sido hasta ahora difícil de identificar o investigar a nivel celular. La RH defectuosa también se puede encontrar en cánceres de mama esporádicos a pesar de la ausencia de mutación germinal en ninguno de estos elementos cruciales de la vía de la RH, como se muestra en estudios por hibridación genómica comparada

(aCGH) [254] y en evaluaciones funcionales de células de cáncer de mama humano [255]. Sin embargo, la naturaleza de cómo se producen estos defectos funcionales en la RH todavía no está clara. De todas formas, el defecto común en la RH indica que la función de la vía de *BRCA1-BRCA2* en la mediación de la RH es importante para la supresión tumoral tanto en el cáncer de mama hereditario como en el esporádico.

3.3.1 *PALB2* conecta *BRCA1* y *BRCA2*

PALB2 se une directamente tanto a *BRCA1* como a *BRCA2* y, de ese modo, proporciona un enlace físico entre las dos proteínas [121;122;160]. El dominio *coiled-coil* N-terminal de *PALB2* interactúa con el dominio *coiled-coil* de *BRCA1*, y el extremo C-terminal de *PALB2* interactúa con el extremo N-terminal de *BRCA2* conformando un dominio β -hélice *WD40* que está implicado comúnmente en interacciones proteína-proteína [209;255].

La interacción de *PALB2* con *BRCA2* ha demostrado ser esencial para proporcionar *RAD51* hacia la RPA unida a la ssDNA [209]. Por otra parte, la interacción de *BRCA1-PALB2* es un requisito previo para el reclutamiento de *BRCA2* y *RAD51* hacia el sitio dañado del ADN y para la RH, pero no tiene ningún impacto en la activación mediada por *BRCA1* del punto de control de la fase S [121;122]. Toda esta evidencia apoya una jerarquía de reclutamiento a los sitios dañados de ADN: *BRCA1* no depende de ninguna de estas proteínas para la formación de focos nucleares, pero *PALB2* muestra cierta dependencia de *BRCA1*. En cambio, la formación de focos nucleares de *BRCA2* requiere de *PALB2*, mientras que la formación de focos de *RAD51* requiere de las tres proteínas (**fig. 13**).

Además, se ha demostrado que la fosforilación de *BRCA1* en S988 por *CHK2* promueve la formación del complejo *BRCA1-BRCA2-PALB2*, lo que puede explicar por qué la mutación en este sitio elimina la RH [256]. Actualmente, se desconoce si hay otros reguladores del complejo *BRCA1-PALB2-BRCA2*.

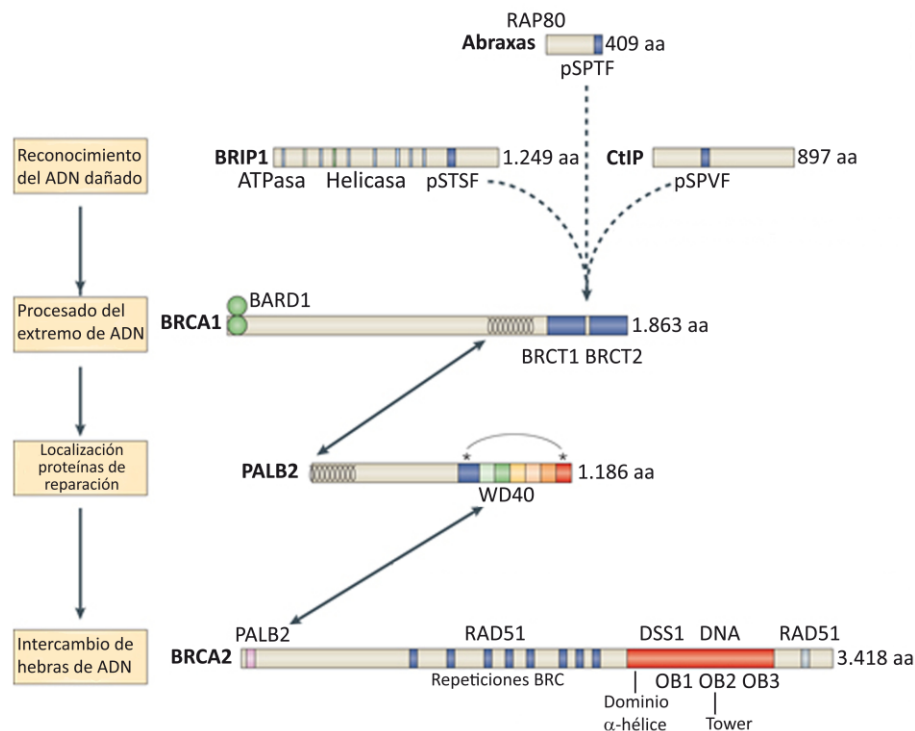


Figura 13. Interacciones entre las proteínas de la recombinación homóloga (RH) y sus dominios (modificado de Moynahan y col., 2010 [146]).

3.3.2 Vía común de las funciones de *BRCA1* y *BRCA2*

Hemos visto que *BRCA1* participa en la señalización de la respuesta al daño de ADN (DDR), en la activación de punto de control, en la RH y también podría desempeñar un papel en otros procesos de reparación del ADN, como NHEJ y SSA. Por el contrario, *BRCA2* está principalmente involucrado en RH. Los síndromes en seres humanos asociados con mutaciones en la línea germinal de *BRCA1* o *BRCA2* son casi idénticos, y el único vínculo funcional común entre las dos proteínas *BRCA* es la vía RH. Por lo tanto, parece razonable concluir que la vía de la RH es fundamental para la protección del genoma y que ésta se interrumpe en tumores que surgen en estos portadores de la mutación. La vía de la anemia de Fanconi, que incluye a *BRCA2*, tiene cierta coincidencia funcional con la vía de *BRCA1-BRCA2*, sin embargo el síndrome de la anemia de Fanconi (causado por defectos en los componentes de la vía de la anemia de Fanconi) es marcadamente diferente al síndrome del CMOH y se caracteriza por

anemia, anormalidades esqueléticas y predisposición a carcinomas de células escamosas. Además, la herencia de la anemia de Fanconi es autosómica recesiva (debido a la herencia de dos alelos hipomórficos), mientras que el síndrome del CMOH muestra herencia autosómica dominante, con la pérdida del segundo alelo (pérdida de heterocigosidad (LOH)) en los tipos de cáncer que surgen en los portadores de la mutación. El efecto de un alelo *BRCA1* o de *BRCA2* defectuoso en línea germinal debe causar haploinsuficiencia de RH para poder desencadenar las posteriores alteraciones genéticas que producen el cáncer. Presumiblemente, la haploinsuficiencia de un solo alelo defectuoso tiene diferentes impactos biológicos en comparación con la herencia bialélica de alelos hipomórficos. A pesar de ello, el número total de familias en el mundo que han sido diagnosticados con anemia de Fanconi causada por defectos en los genes de la vía *BRCA1-BRCA2* (*BRCA2* (también como *FANCD1*)), *BACH1* (también como *FANCI* o *BRIP1*), *PALB2* (también como *FANCD2*), *RAD51C* (también como *FANCF*) o *SLX4* (también como *FANCL*) es pequeña, y el que estos pacientes muestren todos los rasgos característicos de la anemia de Fanconi ha sido motivo de debate [257].

En la vía de la RH mediada por *BRCA1-BRCA2*, las funciones aguas arriba (*upstream*) de *BRCA1* en el gen *BRCA2*, son dependientes del gen *BRCA1*. En células de mamíferos, la RH también puede ocurrir a través de una vía alternativa, independiente de la *BRCA1-BRCA2*, la vía dependiente de *RAD52*. Cuando la función de *BRCA2* se interrumpe en una célula tumoral, *RAD52* ayuda a la célula a mantener su viabilidad. De hecho, las células que pierden al mismo tiempo *RAD52* y *BRCA1*, *RAD52* y *PALB2* o *RAD52* y *BRCA2* [258] exhiben letalidad sintética. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis que los genes *BRCA1* y *BRCA2* están conectados en una vía de RH común que sirve para reparar los DSBs, daños en las horquillas de replicación o en los huecos de las hebras hijas. Mutaciones germinales de genes relacionados con esta vía de RH común están asociadas con el síndrome de CMOH, lo que sugiere que esta vía resulta crucial en la actividad supresora de tumores. Las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son la causa predominante del síndrome de CMOH, aunque de forma menos común también lo pueden ser mutaciones en *ATM* y *CHK2*. Las mutaciones en *PALB2* que conllevan al síndrome de CMOH son muy poco frecuentes en comparación con las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* [258].

Tabla 1. Resumen de las funciones de *BRCA1* y *BRCA2* en la reparación del ADN junto con sus dominios y proteínas de unión.

Función	Dominio	Uniones directas	Uniones Indirectas
<i>BRCA1</i>			
Reclutamiento hacia los sitios de ADN dañado	<i>BRCT</i>	<i>Abraxas</i>	<i>RAP80</i>
Resección del extremo de ADN	<i>BRCT</i> y <i>RING?</i>	<i>CtIP</i>	Complejo <i>MRN</i>
Punto de control G2/M	<i>BRCT</i>	<i>Abraxas</i>	<i>RAP80</i>
	<i>BRCT</i>	<i>CtIP</i>	Complejo <i>MRN</i>
	SCD (fosforilación en S1423 y S1524)	<i>ATM</i>	Complejo <i>MRN</i>
Punto de control de la fase S	SCD (fosforilación de S1387)	<i>ATM</i>	Complejo <i>MRN</i>
	<i>BRCT</i>	<i>BRIP1</i>	<i>TOPBP1</i>
Reparación durante la replicación de ADN	<i>BRCT</i>	<i>BRIP1</i>	<i>TOPBP1</i>
Recombinación homóloga (RH)	<i>Coiled-coil</i> y fosforilación de S988	<i>PALB2</i>	<i>BRCA2</i>
<i>BRCA2</i>			
Recombinación homóloga (RH)	<i>BRC</i>	<i>RAD51</i>	
	<i>DBD</i> (Dominio de unión al ADN)	<i>DSS1</i>	
	Región N-terminal	<i>PALB2</i>	<i>BRCA1</i>
	Región C-terminal	<i>RAD51</i>	<i>CDK2</i>

3.4 *BRCA1* y *BRCA2* en la tumorigénesis

Comunes alteraciones genéticas están asociadas con mutaciones heterocigotas en *BRCA1* o *BRCA2*, y éstas incluyen la pérdida del alelo salvaje (*wildtype*) y pérdida de heterocigosidad (LOH) de *BRCA1* o el de *BRCA2*, pérdida de *TP53* (que codifica *p53*), y la pérdida de *ATM* o la función *CHK2*. Estas alteraciones adicionales pueden permitir que las células puedan eludir los controles de punto de control y evadir la apoptosis, y con ello iniciar la tumorigénesis. El hecho de que los portadores de mutación tanto de *BRCA1* como de *BRCA2* presenten estas alteraciones somáticas similares confirma, nuevamente, que su papel en la mediación de la reparación por RH es importante para la supresión tumoral.

3.4.1 Pérdida de la heterocigosidad (LOH)

Cuando un tumor se desarrolla en pacientes con síndrome de CMOH causado por la mutación *BRCA*, se ha pensado inicialmente que es debido a la pérdida de la heterocigosidad (LOH), como se esperaría de un supresor tumoral. Sin embargo, más recientemente, este dogma está siendo cuestionado [259-261].

La LOH en *BRCA* se cree que ocurre ya sea por supresión o por conversión de genes. Cuando LOH ocurre, en el caso de una mutación germinal en *BRCA1* se da la pérdida del alelo *wildtype BRCA1* pero no del alelo *wildtype BRCA2*, y viceversa. Un patrón similar de LOH se observó en los pacientes portadores de mutación *BRCA1* o *BRCA2* y el hecho de que sólo uno de los genes *BRCA* se viera afectado en un individuo (y no de ambos genes en un mismo individuo) sugiere que la tumorigénesis en portadores de mutación *BRCA1* y *BRCA2* es principalmente causado por la inactivación funcional de cualquiera de las dos proteínas y, como ya se ha comentado, es la deficiencia en RH la que conduce a la tumorigénesis.

3.4.2 Pérdida de la expresión de *p53*

La proteína *p53* juega un papel vital en el mantenimiento de la integridad genómica mediante la regulación de la transcripción de genes diana que están implicados en la detención del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN [262].

Anteriormente, hemos visto la relación a nivel molecular de *p53* tanto con *BRCA1* como con *BRCA2* y la alta frecuencia de mutaciones *BRCA1* con las mutaciones en *TP53*; por lo que, podría pensarse que roturas cromosómicas causadas por la pérdida

de los controles por parte de *BRCA* activarían las funciones del punto de control y/o la apoptosis dependientes de *p53* para prevenir la formación de tumores. Presiones selectivas a continuación, favorecerían la proliferación de células con pérdida de función de *p53* [161].

Futuros estudios pueden revelar que únicamente sufren deterioro las funciones de *p53* en las células *BRCA*-deficientes. Las múltiples apariciones de mutaciones que afectan a *p53* en tumores de mama asociados a *BRCA*, sugiere que estas mutaciones en *p53* se seleccionan durante la progresión maligna de los tumores asociados a mutaciones *BRCA1* o *BRCA2*. Por lo tanto, el defecto de la RH común en células con déficit *BRCA1* y *BRCA2* puede ser también responsable de la selección de estas mutaciones específicas de *p53* [161].

3.4.3 Pérdida de la función de *ATM* o *CHK2*

Al estar en la misma vía de señalización de *p53*, la pérdida de función de *ATM* o *CHK2* también favorece la letalidad embrionaria de los ratones con mutación en *BRCA1* permitiendo la formación de múltiples tumores, aunque con una frecuencia más baja en comparación con ratones con mutaciones en *BRCA1* y *TP53* [263]. Además, la expresión de *ATM* puede ser aberrante al reducirse o perderse en tumores con mutaciones *BRCA1* o *BRCA2* en comparación con los tumores esporádicos [263]. Estos datos sugieren que la inestabilidad genómica causada por mutaciones heterocigotas *BRCA* puede conducir a la selección de células *ATM*-deficientes. Aunque *ATM*, *BRCA1* y *BRCA2* están en una vía de señalización común, la pérdida adicional de la actividad de *ATM* puede contribuir a un avanzado crecimiento selectivo [264]. Este resultado aparentemente paradójico tiene sentido si se considera a las funciones *ATM* en múltiples vías de señalización del DDR.

4 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO DE LOS GENES BRCA EN CMOH

Dado que los genes *BRCA1* y *BRCA2* protegen el genoma de los errores que se producen durante la replicación del ADN, es lógico pensar que las células que son impulsadas a replicarse desarrollen alteraciones genéticas potencialmente oncogénicas en ausencia de la función de *BRCA1* o *BRCA2*. Sin embargo, la mayoría de los cánceres

se ven obligados a crecer y dividirse, por lo que esta característica por sí sola no determina por qué existe una predisposición mayor para cáncer de mama y de ovario en personas que carecen de las proteínas funcionales *BRCA1* o *BRCA2*. Una característica común es que las células epiteliales de mama y de ovario están sujetas a fuertes señales de crecimiento por estimulación hormonal durante el ciclo menstrual normal.

Han existido algunas hipótesis acerca del por qué características de crecimiento con niveles de hormona altos hacen vulnerable a la inestabilidad genética en el contexto de una deficiencia *BRCA1* o *BRCA2* como la relación entre la función *BRCA1* y la regulación de la señalización de los receptores estrogénicos (RE) [265]; otro estudio más reciente, indica un efecto de *BRCA1* en el mantenimiento de la heterocromatina, y la pérdida de *BRCA1* en ratones podría ser revertida mediante la expresión de la histona 2A fusionada a ubiquitina [266]; o, que el crecimiento hormonalmente impulsado durante cada ciclo menstrual produciría especies reactivas de oxígeno, que causaría daño oxidativo al ADN [267-270]. Este daño oxidativo del ADN podría producir estrés en la replicación, lo cual exigiría el uso de la vía de *BRCA1-BRCA2-RH*. En cualquier caso, ninguna teoría todavía ha sido demostrada con claridad.

Por otra parte, numerosos estudios sí que han permitido recoger datos patobiológicos en tumores *BRCA1*, *BRCA2* y *BRCAX* y, así, definir una compleja descripción fenotípica de todos estos subtipos de CMOH.

4.1 Características clínicas e histopatológicas

Datos de la biología, patología y genética, especialmente obtenidos por el tejido y los análisis de ADN microarray, han evidenciado la existencia de sólo unas pocas subclases principales entre los cánceres de mama. De acuerdo con esto, los CM se podrían clasificar como:

- a) lumbinales (“*luminal(epitelial)-like*”), que se caracterizan especialmente por un alto nivel de expresión de citoqueratinas lumbinales (*CK 8/18/19*), RE, receptores de progesterona (RP), *BCL2*, *P27*, etc. un bajo nivel de expresión de *P53* y *HER2*, y suelen ser de bajo grado. Dentro de este subtipo se han intentado realizar una división en dos grupos: luminal-A y luminal-B (de peor pronóstico). Esta división viene explicada más adelante.

- b) basales (“*basal(epitelial)-like*”). Incluyen las lesiones que son RE- y RP-, tiene un bajo nivel de CKs luminales, *BCL2*, *P27*, *ErbB2* y un alto nivel de expresión de *p53* y de las CKs basales 5/6 y 17. La mayoría de estos tumores son de un alto grado.
- c) “*HER2*” o “*ErbB2*”. Son un grupo de tumores que también es frecuente de encontrar, que, como su nombre indica, se compone exclusivamente de tumores que sobreexpresan *HER2* (o *ErbB2*), los cuales generalmente se caracterizan por un bajo nivel de expresión de RE, RP y *p53*.

Estas tres clases principales (“*luminal -like*”, “*basal -like*”, “*HER2*”) se han identificado tanto en los ARNm como en los niveles de proteína [271-275].

Por lo que se refiere a la división del subtipo luminal en luminal-A y luminal-B, diferentes grupos de investigadores han tenido problemas para poderlos definir desde un punto de vista inmunohistoquímico. Un grupo los empezó definiendo como luminal-A a los tumores con alta expresión de genes que regulan los RE y con resultados a largo plazo favorables y luminal B con una menor expresión de genes que regulan RE y peor pronóstico a largo plazo [276]. Se ha visto que los tumores luminal-B también demuestran una mayor expresión de genes de señalización de receptores de crecimiento, aunque los diversos estudios presentan diversos porcentajes de *HER2*+ que podrían ser luminal-B [277-279]. Otros estudios han asociado a los luminal-B como tumores de mayor proliferación [279] y en los tumores RE+/*HER2*-, la proliferación es el más fuerte predictor de riesgo de recaída precoz que diferencia los tumores de alto riesgo luminal-B de los tumores de bajo riesgo luminal-A [279;280]. Sí que podemos asegurar que queda todavía por determinar la relevancia clínica de si un cáncer de mama RE+ con sobreexpresión de *HER2* se clasifica como *HER2*+ o como luminal-B.

4.1.1 *BRCA1*

Los pacientes con mutaciones de la línea germinal en *BRCA1* generalmente desarrollan carcinomas ductales invasivos sin patrón específico con características medulares y de alto grado histológico [281;282]. La mayoría de los cánceres relacionados con el *BRCA1* se han clasificado como “triple negativo”, debido a la falta de expresión de RE, RP y *ErbB2/HER2* [283;284]. Estos tumores también muestran una alta expresión de marcadores de células basales tales como *CK5/6*, *CK14*, *CK17*, *EGFR*,

y una pérdida de la expresión de citoqueratinas luminales (*CK8/18*) [284-286]. De ahí, que en su mayoría se hayan incluido dentro del grupo de los cánceres de mama al de tipo basal triple negativo (TNBL) [281]. Además, cánceres de mama TNBL esporádicos se han asociado con la inactivación somática de *BRCA1* debido a la hipermetilación del promotor de *BRCA1*, la regulación positiva de *ID4* o la baja regulación postranscripcional [281], que han conducido a sugerir un papel central de *BRCA1* en el desarrollo de carcinomas de tipo basal [285;287]. Tanto las mutaciones *BRCA1* como los cánceres de mama esporádicos TNBL comparten un aumento de la proliferación celular (niveles altos de *Ki67*) [288], la regulación positiva de proteínas del ciclo celular (*CCNE*, *CCNA*, *CCNB1*, *p27*, *p16*, *p21*, *CDK4*, *CDK2* y *CDK1*) [284;285]; y, como ya hemos visto, mutaciones somáticas en *TP53*.

Se han planteado con un valor altamente predictivo la patología de los cánceres, la edad del diagnóstico y una historia familiar positiva en las recomendaciones en pruebas genéticas para el paciente. De hecho, la inclusión en algoritmos de características morfológicas e inmunohistoquímicas de CM en búsqueda de mutaciones, mejora la exactitud del proceso de selección con una sensibilidad del 92% y una especificidad del 86% [289]. Se puede aumentar la exactitud en la predicción para identificar a los portadores *BRCA1* si se incluye la negatividad de RE [290] y marcadores basales en carcinomas tipo TNBL [281], fenotipo basal y baja regulación en queratina luminales [291] y, por último, mediante la combinación de alta proliferación (*Ki67*) y la expresión de *EGFR* [288]. No obstante, vale la pena mencionar que estos parámetros no pueden describir todos los cánceres de portadores *BRCA1*, por lo que un paciente con un cáncer TNBL puede deberse a una mutación de la línea germinal de *BRCA1*, pero otros fenotipos no excluyen la posibilidad de dicha mutación.

4.1.2 *BRCA2*

El cáncer de mama asociado a *BRCA2* es un grupo más heterogéneo [292;293]. Aunque ningún fenotipo específico se cree que es todavía predictivo de los tumores asociados a *BRCA2*, los tumores RE+/HER2- constituyen la mayoría de los casos [293]. En particular, dos características morfológicas son significativas en este tipo de CM; márgenes lisos de desplazamiento o *pushing margins* y falta de formación de túbulos [294]. También es característico el bajo y el intermedio grado histológico [282;283;292].

Honrado y col. compararon la expresión de proteínas de reparación de ADN dentro de las clases CM familiar, demostrando que los cánceres *BRCA2* tenían sobreexpresión de *CHEK2*, así como una tinción más o menos citoplasmática de *RAD51C* nuclear, lo que permitió discriminar cánceres relacionados con *BRCA2* con los de *BRCA1* con una probabilidad estimada de al menos un 76% [295]. Mientras que Bane y col., han demostrado que los tumores asociados a *BRCA2* expresan genes implicados en la transducción de señales, la proliferación celular, la adhesión celular y la remodelación de la matriz extracelular con la activación de la vía de señalización MAPK [293].

Una mayor incidencia de mutaciones *TP53* (29-63 %) se ha descrito en tumores *BRCA2* en comparación con el cáncer de mama esporádico. Por lo que está de acuerdo con el papel potencial de *TP53* en la promoción de la génesis tumoral no sólo en *BRCA1* sino también en el cáncer de mama asociado a *BRCA2* [296-298].

Por otro lado, la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el *locus BRCA2* ha sido identificado en un subgrupo de carcinomas lobulillares de alto grado (variante pleomórfica) [299]. Sin embargo, aún no ha sido estudiada la asociación de mutaciones *BRCA2* con el desarrollo de carcinoma lobulillar pleomórfico.

La incidencia de lesiones precursoras (como carcinoma ductal in situ, DCIS) en pacientes con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* ha resultado controvertida [300-303], pero un estudio reciente utilizando la mamografía ha descrito una mayor proporción de carcinoma ductal in situ (CDIS) en pacientes asociados a mutación en *BRCA2* [304]. En ese estudio, los pacientes asociados a *BRCA2* tuvieron menos cánceres de intervalo y un tamaño de tumor favorable en comparación con los pacientes *BRCA1* [304].

De la misma manera que los cánceres de mama esporádicos muestran similitudes con los tumores *BRCA1* debido a la deficiencia de *BRCA1* mediante la regulación positiva de ID4 (ya comentado), los cánceres esporádicos con la amplificación de *EMSY* se asemejan a los cánceres *BRCA2*, probablemente debido a la interacción negativa *EMSY-BRCA2* [249;254;305].

Por último, otro aspecto importante es que el cáncer de mama masculino está más fuertemente asociado a mutaciones *BRCA2* [306]. Y, además, la serie de tipos de cáncer observados en los portadores de mutaciones *BRCA2* han demostrado que puede

desarrollar cáncer de próstata y de páncreas (entre otros) en comparación con la serie observada en los portadores *BRCA1*.

4.1.3 *BRCAX*

Los CM asociados a *BRCAX* (no *BRCA1/2*) es un grupo muy diverso que se caracteriza por ser de bajo e intermedio grado y por una proporción similar de RE+/HER2-, HER2+ y fenotipos TNBL [292;307]. En este grupo no han podido ser reproducibles características histopatológicas [308]. Sin embargo, sí que se ha descrito una asociación entre los carcinomas invasivos lobulillares y *BRCAX* [306;309].

Tabla 2. Resumen de las características clínico-patológicas según el estatus *BRCA1/2*

Fenotipo	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
Cáncer de mama	70-80% riesgo acumulado	50-60% riesgo acumulado
Expresión RE	80-90% negativo	60-65% positivo
Expresión RP	Predominantemente negativo	Positivo en la mayoría de casos
Amplificación <i>ERBB2</i>	Normalmente ausente	~15% tienen amplificación
Inicio precoz	Altamente prevalente entre los 30 y 50 años de edad	Menos prevalente entre 40 y 70 años de edad
Cánceres lobulares	Poco probable	Tan frecuentes como en el cáncer de mama esporádico (~15%)
Alto grado	Probable	Común
Citoqueratinas basales	Frecuentes	Poco común
Citoqueratinas luminales	No	Muy frecuentes
Subtipo molecular	<i>Basal-like</i>	Luminal B
Cáncer de ovario	50% riesgo acumulado	30% riesgo acumulado
Cáncer de próstata	Mutaciones fundadoras Ashkenazi tienen un riesgo mayor	20 veces mayor el riesgo (<1% de los portadores <i>BRCA2</i>)
Cáncer de páncreas	Evidencia anecdótica, pocos casos	10 veces mayor el riesgo (<1% de los portadores <i>BRCA2</i>)

5 ESPECTRO MUTACIONAL DE LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2*

Durante la última década, se han ofrecido las pruebas genéticas para detectar la presencia de mutaciones *BRCA* después del diagnóstico inicial y el tratamiento del cáncer de mama. La justificación de esta estrategia es que el conocimiento del estado de *BRCA* no tenía ninguna utilidad clínica inmediata en términos de tratamiento, y las pruebas concurrentes con un diagnóstico de cáncer de mama podía inducir ansiedad adicional en un paciente recién diagnosticado [310]. Sin embargo, la evidencia sugiere que la presencia de una mutación *BRCA* define un subgrupo de pacientes cuya gestión inmediata podría ser influenciado por esta información. Además, los costes decrecientes y la disponibilidad asistencial del análisis genético de *BRCA* nos están proporcionando información en el ámbito de la atención al paciente diariamente.

El análisis genético de *BRCA1* y *BRCA2* es laborioso y complejo, ya que son genes grandes y pocas las familias a las que finalmente se identifica una mutación. Por ello, es necesario realizar una selección muy precisa de aquellas que se pueden considerar realmente de alto riesgo y en las que está indicado el estudio. Existen criterios de selección que pueden variar ligeramente, pero en general, todos incluyen los indicios de riesgo de predisposición heredada: número de cánceres de mama y de cánceres de ovario en la familia, edad precoz de diagnóstico, presencia de cáncer de mama bilateral o masculino, etc.

Se ha demostrado que la penetrancia de las mutaciones patogénicas de estos genes en España es menor que en el resto de Europa, el riesgo de cáncer de mama hacia los 70 años para los portadores de mutación en *BRCA1* es del 52% (IC: 26-69%) y para *BRCA2* es del 47% (IC: 29-60%). Para el cáncer de ovario el riesgo es del 22% (IC: 0-40%) y 18% (IC: 0-35%), respectivamente [311]. Estas tasas de penetrancia son mucho menores que en otros estudios [312-315] y constituyen una de las razones por las que en España la incidencia de cáncer de mama es menor que en otros países.

5.1 Tipos de variantes según el efecto fisiopatológico

En cuanto a las técnicas empleadas por el rastreo de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, ya sea las técnicas de cribado que se han ido utilizando a lo largo de muchos años (análisis de ADN conformacional o SSCP, cromatografía líquida de alta resolución o dHPLC, *high resolution melting curve analysis* o HRMCA, etc.) o bien la nueva

irrupción de las metodologías de alto rendimiento de secuenciación directa, en especial la secuenciación masiva (*next generation sequencing*), nos ha llevado a la detección de un gran número de variantes que son necesarias interpretar desde una perspectiva más biológica y funcional, con una perspectiva clínica de los hallazgos. Según esta premisa, podemos clasificar las variantes de *BRCA1/2* en tres grupos (**tabla 3**).

Tabla 3. Clasificación de variantes según efecto fisiopatológico

Tipos de variantes según efecto fisiopatológico	
Variantes patogénicas (o mutaciones patogénicas)	Variantes que resultan en una función anormal del gen y en un fenotipo alterado (alta susceptibilidad al cáncer de mama).
Variantes de significado clínico desconocido (<i>unclassified variants</i> o UVs)	Variantes en la secuencia normal de un gen cuyo significado biológico en cuanto a patogenicidad o a benignidad no es conocido.
Variantes no patogénicas	Variantes que no tienen efectos adversos sobre la función del gen y no origina un fenotipo alterado. Dentro de éstas, estarían los polimorfismos genéticos (en concepto estricto, variantes con al menos una frecuencia del 1% en la población general).

Diferentes grupos de trabajo han organizado bases de datos para incluir resultados de los análisis de los diferentes laboratorios acerca de las variantes encontradas y su correcta clasificación. Entre ellas, podemos nombrar:

- a) **BIC** (www.research.nhgri.nih.gov/bic/): base de datos pública sobre variantes en *BRCA1* y *BRCA2* más extensa, completa y utilizada como referente a nivel mundial.
- b) **HGMD** (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>): Amplia base de datos privada sobre mutaciones de enfermedades hereditarias humanas en la investigación genética y genómica.
- c) **UMD** (<http://www.umd.be/BRCA1/> y <http://www.umd.be/BRCA2/>): Base de datos pública a través del esfuerzo de 16 laboratorios de diagnóstico franceses

para proporcionar información puesta al día sobre variantes en *BRCA1* y *BRCA2*.

d) **LOVD** (<http://www.lovd.nl/3.0/home>): Se trata de una base de datos pública desarrollada por *Leiden University Medical Center* en Holanda, diseñada para recopilar información de todo tipo de variantes de una gran cantidad de genes. Por lo que se refiere a *BRCA1* y *BRCA2* (<http://brca.iarc.fr/LOVD/home.php>), clasifica las variantes según la clasificación de IARC (*International Agency for Research on Cancer*).

e) **Ensembl Genome Browser** (<http://www.ensembl.org/index.html>): se trata de un proyecto de investigación bioinformática de distintos genomas eucariotas seleccionados y es de libre acceso. Funciona como una colaboración entre el *Wellcome Trust Sanger Institute* y el Instituto Europeo de Bioinformática, una división del Laboratorio Europeo de Biología Molecular. La principal ventaja que presenta esta web son sus tutoriales, bien explicados y muy prácticos, van paso a paso comentando cada una de las herramientas que ofrece.

5.1.1 Variantes patogénicas

Las variantes génicas patogénicas son aquellas mutaciones que se pueden considerar como causa principal de la alta susceptibilidad al cáncer de mama. La mayoría son alteraciones que dan lugar a una parada prematura en la traducción, lo que genera una proteína más corta (o truncada) y no funcional. Dentro de este tipo de mutaciones encontramos:

a) **Deleciones o inserciones que alteran el marco de lectura (“frameshift”)**: son mutaciones en que la delección o inserción de un nucleótido da lugar a un desplazamiento, desfase o cambio del marco de lectura de los tripletes. El resultado es una alteración importante en la secuencia de aminoácidos de la proteína y pueden originar un codón de parada aguas abajo del sitio de la mutación.

b) **Mutaciones sin sentido (“nonsense”)**: las mutaciones sin sentido, también denominadas mutaciones con terminación prematura de la proteína, generan un codón de stop (UAA, UAG o UGA) cuya consecuencia es la interrupción prematura de la traducción de la proteína.

c) **Mutaciones no sinónimas o de sentido equivocado o alterado (“*missense*”)**: son mutaciones en las que la sustitución de una base origina un nuevo triplete o codón que codifica por un aminoácido diferente. En su caracterización adquieren importancia ensayos que determinen que la funcionalidad o estructura de la proteína se vea gravemente afectada por la mutación, así como estudios poblacionales y de segregación. Este tipo de ensayos son costosos y largos, por lo que no hay muchas mutaciones *missense* claramente clasificadas como patogénicas.

d) **Deleciones o inserciones que no alteran el marco de lectura**: son pequeñas deleciones o inserciones que son múltiples de 3 y por lo tanto introducen o eliminan uno o pocos aminoácidos, pero no cambian el marco de lectura de los tripletes.

e) **Mutaciones que afectan a la maduración del ARNm (“*splicing*”)**: El resultado es la inclusión de exones nuevos o la exclusión de exones de la proteína. Dependiendo del punto de *splicing*, además pueden causar un cambio en la fase del marco de lectura.

f) **Grandes reordenamientos**: Se trata de la pérdida o amplificación de partes grandes de un gen, o incluso de la totalidad del mismo. En los genes *BRCA* se han descrito algunas de estas reestructuraciones. Los reordenamientos más comunes son aquellos en los cuales desaparecen exones enteros o fragmentos de los mismos, y las que amplifican el gen entero. En caso de que desaparezca un exón completo suele cambiar el marco de lectura y se genera una proteína truncada. En el caso de las amplificaciones de exones, aunque la proteína mantenga su longitud, la fase de lectura suele cambiar y aparece una proteína completamente distinta de la germinal. En cualquier caso son proteínas que han perdido su funcionalidad.

5.1.1.1 Mutaciones con efecto fundador

Una de las formas más útiles de acercarse a las estimaciones de penetrancia es examinar las mutaciones fundadoras, o la alta frecuencia de alelos individuales que son particulares en una población específica. El concepto de efecto fundador fue descrito

por Ernst Mayr [316] para explicar la reducida variabilidad genética de algunas pequeñas poblaciones en relación con la población ancestral.

El efecto fundador se ha utilizado para explicar las altas frecuencias de las mutaciones asociadas a enfermedades específicas en las poblaciones humanas. Una mutación que emigró o surgió *de novo* dentro de una pequeña población sería probable que tenga una frecuencia mayor entre los descendientes que si hubiera ocurrido en una población más grande. Por tanto, tales mutaciones fundadoras aparecerían como de alta frecuencia, mutaciones deletéreas en familias no relacionadas entre poblaciones cercanas que presentan, en general, una baja diversidad genética.

Cuando se describe una mutación recurrente como una potencial mutación fundadora, es importante demostrar que la mutación se produjo sólo una vez en la historia. Hay varios ejemplos de mutaciones recurrentes en *BRCA1* y *BRCA2* que surgen varias veces en diferentes poblaciones debido a que sus entornos crean secuencias particulares locales de ADN que serían puntos calientes de mutación (*hot spots*). Tales mutaciones recurrentes no representan mutaciones fundadoras. Para hacer la distinción entre las casos históricos únicos y múltiples de la misma mutación, es necesario tener en cuenta las variantes de marcadores genéticos que están lo suficientemente cerca de la mutación y que permanecen asociadas a lo largo de las generaciones, con poca o ninguna separación por recombinación meiótica. Los marcadores útiles incluirían polimorfismos de nucleótido único y los marcadores microsatélites, también conocidos como *repeticiones cortas en tándem*. Una serie de marcadores cercanos que segregan juntos como una unidad a lo largo de las generaciones constituye un haplotipo. Una mutación recurrente que se produce en un único haplotipo en una población puede ser considerada una mutación con efecto fundador, mientras que una mutación que se produce en más de un haplotipo se considera que ha ocurrido varias veces en la historia y no es una mutación fundadora.

Aunque las poblaciones fundadoras, en general, son especialmente interesantes para el descubrimiento de genes, mutaciones fundadoras en los genes *BRCA1* y *BRCA2* han sido útiles en la definición de los riesgos de mutación asociada a poblaciones específicas. Tres de las mutaciones fundadoras *BRCA1* y *BRCA2* mejor caracterizadas se encuentran en las poblaciones judías Ashkenazi: c.68_69delAG (BIC: 185delAG) en *BRCA1*, c.5266dupC (BIC: 5382insC) y c.5946delT (BIC: 6174delT) en *BRCA2* [317].

Otra mutación fundadora bien estudiada es la mutación islandesa en *BRCA2* c.771_775delTCAAA (BIC: 999del5), presente también en pequeñas poblaciones de Escandinavia y de las Islas Británicas [318]. Otras poblaciones con mutaciones fundadoras importantes incluyen aislamientos étnicos en población holandesa [319] y canadienses francófonos [320]. Mutaciones fundadoras comunes están presentes en Europa del Este (Polonia [321], Rusia [322], Bielorrusia [323] y Países Bálticos [324;325]), lo cual refleja su ascendencia común eslava. También se han observado mutaciones fundadoras en poblaciones isleñas, como Islandia [326], Groenlandia [327], Chipre [328] y las Bahamas [329]. Han sido identificadas una serie de mutaciones fundadoras en pacientes de varios países de América del Sur, aunque se han llevado a cabo pocos estudios en estas poblaciones [330;331]. Parecen ser menos importantes las mutaciones fundadoras en el Reino Unido, Europa Occidental y Meridional, Asia y África.

No obstante, por lo que se refiere a las mutaciones de efecto fundador en España, la primera descrita fue c. 211A>G (BIC: 330A>G, de origen gallego) en *BRCA1* [332] y, posteriormente, c.2808_2811delACAA (BIC: 3036del4, común en Europa) y c.9026_9030 delATCAT (BIC: 9254del5, presente en Catalunya y Levante) en *BRCA2* [333]. Además, vale la pena señalar que c.68_69delAG es la mutación más recurrente en pacientes españoles, probablemente debido a que muchos judíos sefardíes fueron obligados a convertirse al catolicismo, por lo que se trata de un probable marcador de ascendencia judía entre los españoles [334].

En las **figuras 14 y 15** se hallan las variantes encontradas en un estudio de familias españolas, observándose la alta frecuencia de las mutaciones fundadoras.

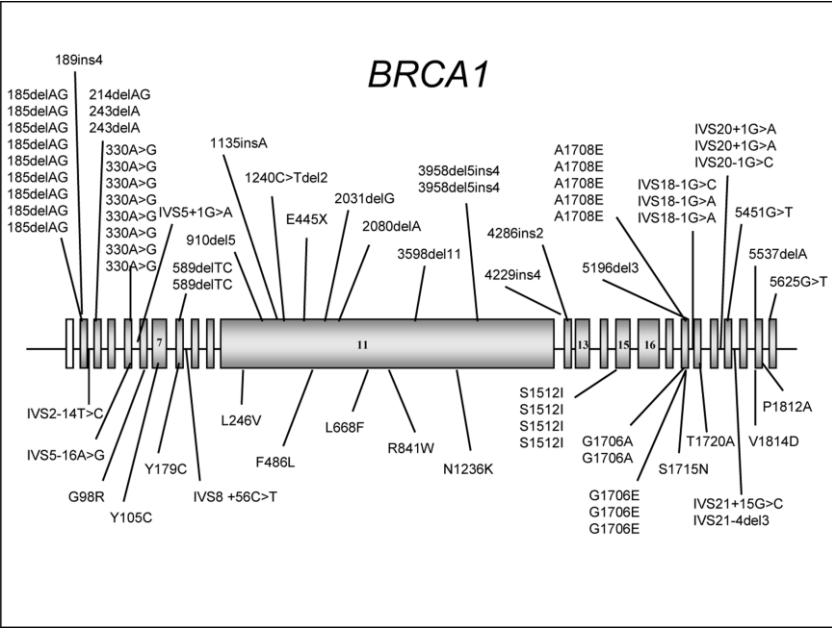


Figura 14. Mutaciones y variantes del gen *BRCA1* en familias españolas con cáncer de mama y cáncer de ovario hereditario (Diez, 2006 [335]).

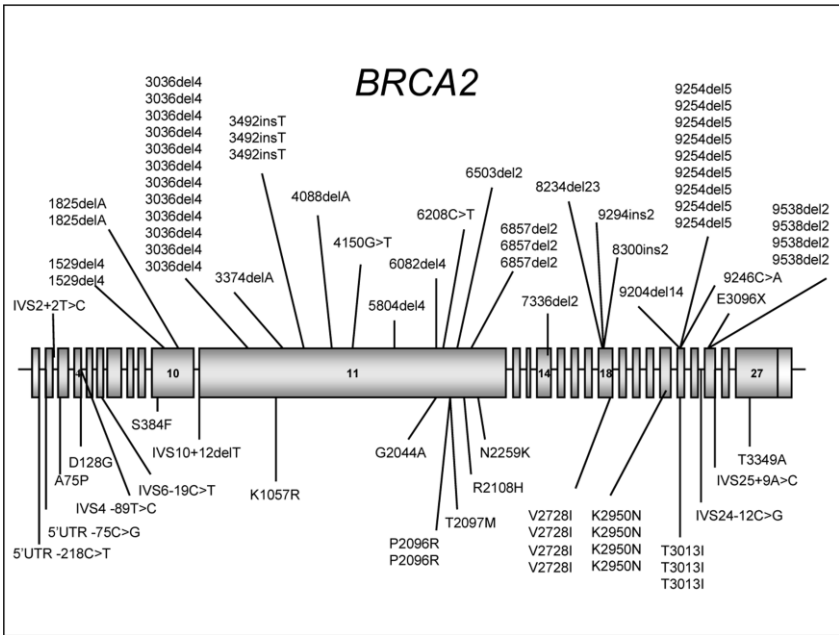


Figura 15. Mutaciones y variantes del gen *BRCA2* en familias españolas con cáncer de mama y cáncer de ovario hereditario (Diez, 2006 [335]).

5.1.2 Variantes no patogénicas

Dentro de éstas se encuentran los polimorfismos, los cuales se tratan de variaciones de la secuencia de ADN que son comunes en la población. En este caso, no sólo un alelo es considerado como la secuencia estándar, sino que en su lugar, hay dos o más alternativas igualmente aceptables. El punto de corte arbitrario entre una mutación

y un polimorfismo es de 1%, es decir, para ser clasificado como un polimorfismo, el alelo menos común debe tener una frecuencia de un 1% o más en la población. Si la frecuencia es menor, el alelo se considera como una mutación.

Es poco común que este tipo de variantes causen directamente enfermedades humanas. De todos modos, la variación de secuencias polimórficas contribuye a la susceptibilidad a la enfermedad y también puede influir en las respuestas a los fármacos. Un buen ejemplo es el alelo de la enfermedad de células falciformes: en poblaciones caucásicas se trata de una variante de secuencia rara del gen de la beta-globina, que causa un trastorno sanguíneo severamente debilitante. En ciertas partes de África, sin embargo, el mismo alelo polimórfico se debe a que confiere resistencia a la malaria.

Por otro lado, también podemos encontrar variantes no polimórficas (<1% de la población general) que no son patogénicas si se demuestra que no cosegregan con la enfermedad o se cree que no son la causa fundamental de la aparición del cáncer. Dentro de este grupo, se encuentran cambios de nucleótido que no dan lugar a cambio de aminoácido (“mutaciones silenciosas”) y que no afectan al *splicing*, mutaciones que aparecen en los intrones, en las zonas 3’ y 5’ no transcritas (zonas UTRs) que se demuestra que no afectan al *splicing*, y alguna variante de cambio de aminoácido que no repercute en la funcionalidad ni estructura de la proteína.

Finalmente, sería importante añadir el concepto de polimorfismo de una sola base o SNP (*single nucleotid polymorphism*,). Los SNPs ocurren aproximadamente una vez cada 1.000 pares de bases en el genoma, por lo que la mayor parte de los 3 millones de variaciones que se encuentran en el genoma, y la frecuencia de un polimorfismo en particular, tiende a permanecer estable en la población. A diferencia de los otros tipos de variantes, muchos SNPs se producen en los genes y en las regiones circundantes del genoma que controlan su expresión. El efecto de un único SNP en un gen puede no ser grande (tal vez influir en la actividad de la proteína codificada de una manera leve), pero incluso estos pequeños efectos pueden influir en la susceptibilidad a enfermedades comunes. Recientemente, se están dirigiendo investigaciones en descubrir nuevos *loci* que podrían explicar la mayor o menor susceptibilidad al CMOH en portadores de mutaciones en *BRCA1* y en *BRCA2* [336-338].

5.1.3 Variantes de significado clínico desconocido (*unclassified variants* o UVs)

Las variantes de significado clínico desconocido (UVs) son alteraciones en la secuencia de ADN de un gen que tiene efectos desconocidos sobre la función del producto génico o el riesgo de la enfermedad. Debido al tamaño de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, se han identificado muchas alteraciones en la secuencia de ADN que pueden ser únicas para una o sólo unos pocos pacientes y cuya relevancia clínica nunca se ha determinado. A pesar de las pruebas de los cientos de miles de pacientes, los laboratorios de análisis de los genes *BRCA* siguen encontrando variantes nuevas o raras en las secuencias genéticas. En las personas de ascendencia europea en los Estados Unidos, los resultados UVs representan aproximadamente el 5% y el 6% de las alteraciones publicadas y entre los individuos de ascendencia afroamericana, hasta en un 21% de las pruebas mostrarán una UV en *BRCA1* o *BRCA2* [339]. Se han estimado en laboratorios europeos que hasta un 15% de las alteraciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son UVs.

Estos cambios en el ADN no pueden ser actualmente considerados como patógenos o no patógenos. Resulta un inconveniente que la mayoría de las alteraciones de genes no sean interpretables por meramente descubrir una variante en la secuencia de ADN. Las UVs no introducen una señal de "stop" en el gen transcrito; y, en lugar de ello, puede haber cambios más pequeños, por ejemplo, un solo cambio de base que resulta en una mutación *missense* en la proteína codificada por el gen. También pueden estar en posiciones en el gen que tendría efectos biológicos inciertos, como estar cerca pero no inmediatamente de una región del sitio de *splice* intrón-exón. La información de estas UVs a nivel clínico, pueden causar confusión e incertidumbre tanto a los pacientes como a los clínicos. En la actualidad, desafortunadamente, hay miles de UVs únicas registradas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, con nuevas variantes que se agregan cada día.

Las LSDBs (*Locus-Specific Data Bases*) son un medio esencial para el registro de todas las variantes. Las bases de datos de mayor éxito contienen datos precisos claramente referenciados nombrando las variantes en el ADN, ARN y proteínas, e incluyen todas las observaciones relacionadas con la interpretación clínica de la

variante. Destacaríamos las bases de datos antes mencionadas *HGMD*, *BIC*, *LOVD*, *UMD* y *Ensembl* para los genes *BRCA*.

Por otro lado, en la consulta de información para descartar una probable UV, deberíamos destacar la base de datos *dbSNP* en la búsqueda de la presencia o ausencia de polimorfismos tipo SNP. Esta base de datos nos puede proporcionar la frecuencia mínima alélica (*MAF*), es decir, la frecuencia a la que el alelo menos abundante (o menor) de un SNP está presente en una población. Pero, a menudo no hay suposición acerca de la *MAF*, por lo tanto, los datos puede contener variantes tanto patógenas y no patógenas. Por lo que, no es recomendable el uso de la presencia en una base de datos de SNP como prueba de no patogenicidad en ausencia de información de frecuencia convincente.

Recientemente, se ha establecido el *ENIGMA consortium* (*Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles*; <http://www.enigmaconsortium.org>) con el fin de obtener grandes conjuntos de datos de datos de UVs en los genes de susceptibilidad al cáncer. Dada la rareza de las UVs, la posibilidad de obtener resultados de estudios internacionales podría hacer posible el establecimiento de un modelo de clasificación con el desarrollo de software bioinformático.

Se están aplicando múltiples métodos para poder interpretar una UV. De forma individual, estos métodos no son ni fiables al 100%, ni infalibles cuando se combinan, y pueden dar lugar a diferentes interpretaciones para muchas UVs. Algunas líneas de evidencia que pueden ser utilizadas para la interpretación de UVs son:

- a) **Análisis de segregación en la familia:** se centra en si la UV cosegrega (se hereda conjuntamente) con el fenotipo (cáncer de mama o de ovario) de una manera constante en función de lo esperado para las mutaciones patogénicas en el gen de interés (en este caso *BRCA1* o *BRCA2*). Debido a que los familiares de primer grado tienen un 50% de posibilidades de compartir cualquier cambio específico de ADN, este análisis requiere de un gran número de personas con la UV para construir una relación de causalidad. Para algunas enfermedades, el análisis de segregación puede ser muy poderoso. Sin embargo, dado que el cáncer de mama es muy común, y no es poco frecuente el cáncer de ovario, la información derivada de análisis de segregación para la interpretación UV de

BRCA puede ser no concluyente. Aunque puede ser de gran valor para las familias seleccionadas, la cosegregación requiere un análisis estadístico en virtud de un modelo específico de la enfermedad de herencia [340;341]. Además, sería un análisis más potente combinar el análisis de segregación de varias familias, si la misma UV se observa en varias familias.

- b) **Co-ocurrencia en *trans***: Diversos estudios relacionan que portar una mutación patogénica de *BRCA1* en ambos cromosomas provocaría la letalidad embionaria (aunque, recientemente, se ha publicado el primer caso con mutaciones bialélicas en *BRCA1* [342]), y la herencia bialélica de *BRCA2* con la anemia de Fanconi (visto anteriormente). Estas observaciones, han proporcionado una forma de reclasificar específicamente las UVs en *BRCA1* y *BRCA2* como cambios no patogénos, si por casualidad la UV se ha visto en el mismo paciente que lleva una mutación patogénica definida en el mismo gen. Sin embargo, no basta una mutación patogénica más una UV para realizar esta interpretación, ya que también hay que demostrar que la mutación y la UV se producen en diferentes alelos (que se encuentran en *trans*), en lugar de que ambos estén dentro en el mismo alelo (*cis*). Si están en *cis*, entonces el paciente todavía tiene una copia normal del gen *BRCA* y la UV todavía no se puede valorar. La determinación de *trans* vs. *cis* se puede demostrar de una forma más directa mediante la realización de análisis de *BRCA* en los familiares [343]. No obstante, estos alelos hipomórficos o de penetrancia incompleta hace muy poco que se estudian y, en la actualidad, no forman parte de la mayoría de las discusiones sobre las UVs.
- c) **Conservación evolutiva entre las especies**: Existen una serie de programas informáticos (métodos *in silico*) que permiten analizar si determinados dominios funcionales, aminoácidos individuales o pares de bases, incluso nucleótidos en una secuencia de genes se conservan a través de la evolución (análisis filogenético). Áreas de un gen que han adquirido sustanciales cambios en la secuencia de ADN en la evolución de los seres humanos se cree que son menos esenciales o no son críticos en la función de ese gen. Si la UV se encuentra en una parte muy conservada del gen, la lógica indicaría que una variación de cualquier tipo puede ser perjudicial; además, cuanto más grave sea el cambio,

más probable será que sea nocivo. Por otro lado, si la UV se encuentra en una región no conservada, tal vez esta UV no sea clínicamente relevante. Se han llevado a cabo comparaciones entre estos diferentes programas informáticos para determinar si dan lugar a conclusiones similares [344;345], subrayando una vez más que ningún método es actualmente adecuado para reinterpretar las UVs.

- d) **Estudios de ARN:** Siempre que sea posible, los estudios de ARN son los mejores medios para interpretar las consecuencias de una mutación de *splicing*, dado el alto valor predictivo de este tipo de estudios. Sin embargo, se reconoce que no todos los laboratorios cuentan con las instalaciones para llevar a cabo estos análisis y los patrones de expresión limitados pueden significar que el tejido requerido no está disponible para el análisis.
- e) **Ensayos funcionales:** Para los genes *BRCA*, se han desarrollado varios tipos diferentes de ensayos funcionales [346]. No existe un *gold standard* por el cual comparar estos resultados, ya que las mutaciones patogénicas no afectan a todos estos criterios de valoración funcionales de la misma manera, por lo que se puede recurrir a múltiples ensayos para identificar una pérdida específica de funcionalidad. De todos modos, es necesaria una validación para estar seguro que la variante encontrada en el laboratorio en realidad se correlaciona con otros métodos que distingan las variantes patogénicas de las neutrales. Un ejemplo sería el método utilizado como ensayo funcional en el dominio de unión al ADN de *BRCA2* por Guidugli y col. [347], permitiendo estudiar una región específica con una función conocida, utilizando mutaciones neutrales y patógenas conocidas para su calibración. Por lo que, este ensayo se podría usar para clasificar todas las UVs en esta región común de *BRCA2*. Desgraciadamente, no existen ensayos calibrados para la mayoría de los dominios funcionales de los genes *BRCA1* y *BRCA2*.
- f) **Estudio del fenotipo:** Las características histopatológicas de los tumores de portadores de UVs se pueden comparar con datos publicados que comparan los tumores de mama esporádicos con tumores de aquellos con mutaciones patogénicas en *BRCA*. Se han calculado diferentes odds ratio (OR) para cada característica clínica, y la combinación de todas ellas puede ayudar a diferenciar un tumor relacionado con *BRCA* de un tumor esporádico [348;349]. Grupos con

características como el estatus triple negativo se han tratado como una variable independiente, y las razones de verosimilitud (*likelihood ratio*, *LR*) se pueden combinar para obtener una probabilidad neta de patogenicidad contra la neutralidad. El hecho que los tumores de los portadores de mutaciones *BRCA1* no sean uniformes en sus características limita el poder de esta estrategia. Además, la asignación de las probabilidades son intrínsecamente inexactas, ya que distintas publicaciones varían considerablemente en sus observaciones de las características histopatológicas.

Los avances en los métodos de cálculo en los últimos 10 años se han alejado de la simple clasificación binaria de UVs como patógenas o no patógenas, ofreciendo en cambio una probabilidad numérica de patogenicidad. En el año 2000, el grupo de trabajo BIC estableció planes para desarrollar un sistema que pueda combinar varios tipos independientes de análisis mediante la combinación de los LRs para predecir la patogenicidad de UVs. Un LR compara la probabilidad de los datos observados bajo una hipótesis de patogenicidad (comparando los datos de UVs a los casos con mutaciones) frente a una hipótesis de que las UVs sea neutral. Las LRs de todas las fuentes disponibles se multiplicaron para obtener una "LR integrado" [350-353].

Con el uso de un modelo bayesiano para aquellas UVs que son cambios *missense* (que son la mayoría), se puede determinar una probabilidad a priori de la patogenicidad para cada variante mediante la evaluación de las características biofísicas de aminoácidos y la conservación evolutiva de múltiples alineamientos de secuencias de proteínas mediante métodos bioinformáticos *in silico* como el *Align-GVGD* [354]. Las demás líneas de evidencia independientes, como las descritas anteriormente (por ejemplo, la segregación se puede expresar matemáticamente como LR), se pueden integrar con una *probabilidad a priori* para generar una *probabilidad a posteriori* de patogenicidad para cada variante.

Sobre la base del valor numérico de la *probabilidad a posteriori*, el grupo IARC presentó una traducción clínica (**tabla 3**) en el que se proporciona un sistema de clasificación de cinco niveles para cada variante [351]. Los autores han propuesto cómo éstos niveles predictores de patogenicidad pueden ser utilizados para aconsejar a los pacientes sobre la vigilancia del cáncer y cuándo es razonable utilizar una variante como marcador para las pruebas de predicción en los familiares en situación de riesgo.

Los niveles 1 y 2 son probablemente neutrales; el nivel 3 sigue siendo una verdadera UV, mientras que los niveles 4 y 5 se tratan para fines clínicos como variantes patógenas.

Tabla 4. Propuesta de clasificación de las variantes y su correlación con la recomendación clínica (tabla modificada de Lindor et al, 2013 [355]).

Clase de variante	Definición	Probabilidad de patogenicidad	Pruebas clínicas	Recomendaciones de vigilancia
5	Definitivamente patogénica	> 0,99	Pruebas de riesgo en familiares para la variante	Vigilancia completa de alto riesgo
4	Probablemente patogénica	0,95-0,99	Pruebas de riesgo en familiares para la variante	Vigilancia completa de alto riesgo
3	Incierta	0,05-0,949	No utilizar como pruebas de predicción en los familiares en riesgo	Asesoramiento en base a los antecedentes familiares y a otros factores de riesgo
2	Probablemente no patogénica	0,001-0,049	No utilizar como pruebas de predicción en los familiares en riesgo	Asesoramiento como mutación no detectada
1	No patogénica	< 0,001	No utilizar como pruebas de predicción en los familiares en riesgo	Asesoramiento como mutación no detectada

6 IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO

6.1 El proceso del asesoramiento genético

La capacidad de poder distinguir pacientes portadores de una mutación en un gen de susceptibilidad al cáncer, permite a los clínicos desarrollar un apropiado asesoramiento y educación, vigilancia, y prevención. En el caso del test genético de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, nos puede proporcionar una estrategia adecuada de la gestión

clínica a utilizar, con el objetivo de aumentar la supervivencia en mujeres de alto riesgo y disminuir los costes y complicaciones innecesarias en mujeres de bajo riesgo.

La sociedad nacional americana de asesores genéticos (NSGC) define el consejo genético [356] como *“el proceso de asesoramiento que permite a los individuos entender y adaptarse a las implicaciones médicas, psicológicas y familiares de los aspectos genéticos de una enfermedad”*.

Este proceso integra los siguientes elementos:

- a) Interpretación de la historia médica y familiar para establecer el riesgo de aparición de la enfermedad genética y/o su recurrencia.
- b) Educación acerca de aspectos hereditarios, estudios genéticos, manejo clínico, prevención e investigación de la enfermedad genética.
- c) Asesoramiento para facilitar la toma de decisiones informadas y la adaptación al riesgo de desarrollar la enfermedad genética.

Este proceso de asesoramiento genético en cáncer lo podemos dividir en varias etapas:

1. Sospecha clínica de un síndrome de cáncer hereditario: elaboración del árbol genealógico detallado incluyendo al menos tres generaciones consecutivas; motivos por los que el paciente acude a la visita y evaluación de las razones que tiene para solicitar las pruebas; valoración de la percepción del riesgo de cáncer; educación sanitaria sobre prevención primaria; adopción de hábitos de vida saludables y promoción de la salud.
2. Valoración de la indicación del estudio genético: determinar si existe la sospecha clínica de un síndrome determinado del cual se conocen los genes asociados y cuyo resultado puede interpretarse a nivel clínico.
3. Información sobre las implicaciones médicas personales y familiares de la identificación de una susceptibilidad genética.
4. Asesoramiento sobre los beneficios y limitaciones de cada tipo de estudio genético: implicaciones sobre la toma de decisiones médicas de detección precoz, prevención y tratamiento, así como las limitaciones relacionadas con la

sensibilidad limitada de algunas técnicas diagnósticas o la posibilidad de identificar variantes de significado clínico desconocido.

5. Realización del estudio genético, previo consentimiento informado en los casos en que se considere indicado.

6. Interpretación e información del resultado del estudio genético cuando se haya realizado.

7. Plan de seguimiento médico en función del resultado del estudio genético o de la historia personal y familiar si no se consideró oportuno realizar el test.

6.2 Criterios de selección de los pacientes

El análisis genético de *BRCA1* y *BRCA2* es laborioso y complejo, ya que son genes grandes y pocas las familias en las que finalmente se identifica una mutación. Por ello, es necesario realizar una selección muy precisa de aquellas que se pueden considerar realmente de alto riesgo y en las que está indicado el estudio.

La historia familiar es un factor influyente bien reconocido en la evaluación de riesgo familiar de cáncer en un individuo, y es en el cual se suelen basar las unidades de consejo genético. En las familias susceptibles a CMOH, existen algoritmos tales como BOADICEA [357], BRCAPRO [358], o el sistema de puntuación de Manchester [359] para estimar tanto la probabilidad de una mutación de *BRCA* familiar dentro de la familia, así como el riesgo individual de desarrollar cáncer de mama y de ovario. En Australia, se ofrecen los tests genéticos a las familias con antecedentes de cáncer de que indican aproximadamente $\geq 10\%$ de probabilidad de tener una mutación *BRCA*, mientras que se aplican criterios menos estrictos en los Estados Unidos [360]. Por lo que se refiere a nuestra comunidad autónoma, los criterios de selección que se siguen pueden variar ligeramente, pero en general, se considera que el estudio genético está indicado según los criterios de las recomendaciones actuales de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (<http://www.seom.org/>).

No obstante, existen limitaciones reconocidas de estos criterios [360] y su interpretación debe incluir la posibilidad de que la prueba se realizó en un individuo con cáncer esporádico dentro de una familia de alto riesgo. Además, dos estudios centrados en poblaciones no seleccionadas de pacientes con CM encontraron que el 30-50% de las

mujeres con una mutación *BRCA* no tenía antecedentes familiares importantes o conocidos de cáncer de mama o de ovario [361;362].

Independientemente de la historia familiar, un número discreto de características clínicas de alto riesgo se correlaciona con una probabilidad $\geq 10\%$ con una mutación *BRCA*. Estas características incluyen la edad en el momento del diagnóstico (≤ 40 años) [363-365], criterio utilizado por la SEOM; y poblaciones con una alta prevalencia de mutaciones fundadoras *BRCA*, como las de etnia judía Ashkenazi [366], y familias de los Países Bajos, Islandia, Polonia y Suecia [319;366;367].

Por otra parte, con la llegada de los perfiles de expresión génica, se han podido estratificar los cánceres de mama en subgrupos según sus características inmunohistoquímicas. Esta información también puede ayudar a seleccionar los pacientes, como ocurre en el subgrupo de CM esporádicos de diagnóstico precoz (<40 años) triple negativos CK5/6 positivos (fenotipo basal), los cuales identifica mutaciones *BRCA1/2* en $>10\%$ de las mujeres [368]. No obstante, se ha visto que el porcentaje varía según la serie estudiada y el método utilizado para definir el fenotipo [284;369], pero está bastante aceptada la idea de que la disfunción de *BRCA1* debe tener un papel importante en el desarrollo de este fenotipo [370]. Las características histopatológicas se están incorporando en los algoritmos de historia familiar, como en BOADICEA [371] y en BRCAPRO [372] y están siendo de gran valor para enfocar las pruebas genéticas *BRCA* en la clínica.

6.3 Estudio genético

Los individuos con alta probabilidad de ser portadores de mutación en *BRCA1* y/o *BRCA2* detectados por los criterios de selección, deben ser informados en una unidad de consejo genético sobre la prueba, sus implicaciones, los posibles resultados y las consecuencias. Posteriormente, deben tomar la decisión sobre la realización o no del test genético de forma personal y autónoma. Cuando el paciente opta por la realización de la prueba genética debe conocer las posibilidades del resultado.

Podemos diferenciar cuatro tipos de resultados genéticos:

- a) **Positivo:** Se ha encontrado una mutación en *BRCA1* o *BRCA2* en el paciente que se ha sometido a la prueba genética de ambos genes. Esto significa que una persona con un resultado positivo tiene un mayor riesgo de cáncer de mama, y/o

cáncer de ovario, así como otros tipos de cáncer. Para ayudar a manejar este tipo de riesgo se pueden incluir una serie de recomendaciones como un aumento de las pruebas de *screening*, protocolos de quimioprevención o cirugía profiláctica. Los familiares de primer grado de alguien que ha dado positivo por una mutación *BRCA1* y/o *BRCA2* tienen un 50% de probabilidades de tener esa misma mutación (herencia autosómica dominante).

- b) **Verdadero negativo:** La mutación *BRCA1* o *BRCA2* ya se ha encontrado en otro miembro de la familia, y la persona que se ha sometido al test no ha heredado esa mutación. Se asume que el riesgo a algunos tipos de cáncer para la persona con un resultado negativo verdadero no es mayor que en la población general. A este tipo de personas se les suele sugerir seguir utilizando las mismas recomendaciones de cribado de cáncer que se dan a la población general.
- c) **Negativo no informativo:** No se ha encontrado mutación en los genes *BRCA1* o *BRCA2*. Esto es diferente de un resultado verdadero negativo porque ningún otro miembro de la familia ha sido testado o no se ha encontrado ninguna mutación. No está claro con este tipo de resultado si el cáncer familiar se debe a otro tipo de mutación genética, a otros factores que todavía no se comprenden o a una mutación en un gen no estudiado. Este resultado es más informativo para una persona con ciertos tipos de cáncer de lo que es para las personas que no tienen antecedentes personales de cáncer. A este tipo de personas se les suelen dar recomendaciones en base a su historia personal y familiar de cáncer.
- d) **Variante de significado clínico incierto (UV):** Se ha encontrado una alteración en los genes *BRCA1* o *BRCA2*, pero no está claro lo que significa este resultado para el riesgo de cáncer. Este tipo de resultado podrá ser reclasificado en un futuro si se obtienen más conocimientos sobre este tipo de variante. Pueden pedirse la sangre y/o muestras de tumores de otros familiares para poder avanzar en el estudio de esta variante y el riesgo de cáncer. A las personas con una variante de significado incierto se dan recomendaciones según los antecedentes personales y familiares de cáncer.

6.4 Manejo de los pacientes tras el estudio genético

A pesar de que se conocen otros genes como causantes del cáncer de mama hereditario, la mayor parte de los estudios que evalúan las estrategias de manejo clínico se han centrado en mujeres con mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*. Sin embargo, la considerable escasez de mutaciones en *BRCA* ha limitado la capacidad de ofrecer recomendaciones de manejo basadas en altos niveles de evidencia, aunque ya se comienza a disponer de información útil a partir de estudios prospectivos en cohortes y empiezan a tener un impacto fundamental en el manejo clínico, incluso aunque todavía no demuestren beneficios de supervivencia.

Debido al aumento considerable del riesgo de CM y ovario en los portadores de mutación en *BRCA* [90], deben de considerarse estrategias de prevención para reducir este riesgo (**tabla 5**), además de evaluar estas estrategias en términos de magnitud y duración del efecto protector.

Además, el profesional de la salud que atiende a portadores de mutaciones *BRCA* deberá hacer que la familia de la paciente portadora sea consciente de sus riesgos y que los miembros de la familia tengan acceso a servicios individualizados de valoración de riesgo y manejo de la enfermedad [373].

6.4.1 Manejo de pacientes afectados portadores de mutaciones *BRCA*

Los tumores basales (fuertemente asociados a *BRCA1*) representan un reto desde el punto de vista terapéutico, ya que no pueden ser manejados con tratamientos hormonales ni anti-HER2, y la quimioterapia es la única opción. Como alternativa especialmente prometedora, se está investigando mucho en los últimos años sobre la terapia con inhibidores de PARP-1 en tumores deficientes para los genes *BRCA1* y *BRCA2*. PARP-1 participa en la ruta de reparación de roturas de cadena sencilla en el ADN mediante escisión de bases (BER). Recientemente se ha publicado el ensayo clínico fase I con el inhibidor de PARP-1, Olaparib, observándose que el 60% de los pacientes con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* presentaron respuesta al tratamiento [374;375].

El riesgo significativo de cáncer contralateral [376] puede hacer que las mujeres se planteen someterse a una mastectomía bilateral para reducir el riesgo, aunque puedan ser candidatas para un tratamiento conservador acorde a su estadio tumoral. El impacto

sobre la supervivencia global de reducir el riesgo de cáncer de mama contralateral ha sido puesto en tela de juicio, ya que en el pronóstico del sujeto índice supuestamente predomina la supervivencia específica del cáncer de mama a corto y medio plazo. Sin embargo, Herrinton y colaboradores describieron una reducción del 43% en la mortalidad por cáncer de mama en 1.072 mujeres con cáncer de mama sometidas a mastectomía contralateral comparadas con 317 controles [377]. Un beneficio de supervivencia semejante no ha sido confirmado todavía entre portadoras de mutación, pese a que en dicha población se ha confirmado una gran reducción del riesgo de cáncer contralateral (91%) mediante una mastectomía preventiva [378].

6.4.2 Manejo de pacientes sanos portadores de mutaciones *BRCA*

Una proporción significativa de mujeres eligen someterse a una mastectomía a fin de reducir el riesgo. Esta intervención parece ser altamente eficaz a pesar de que no se hayan realizado estudios formales aleatorizados [377-381]. Sin embargo, el número de mastectomías a fin de reducir el riesgo varía ampliamente entre los diferentes centros y se carecen de datos de seguimiento a largo plazo, tanto en cuanto a eficacia como a los efectos psicológicos, aunque en general se estima una reducción del riesgo de en torno a un 90% [382]. Por otro lado, salpingo-ovariectomía (RRSO) supone una reducción del 53% de CM en portadoras de mutación en *BRCA*, según el estudio multicéntrico de Rebbeck y col. [383].

Para la mujeres que deciden no someterse a una mastectomía preventiva, las recomendaciones estándar de vigilancia han incluido una mamografía anual o resonancia magnética (RM) y un examen de mama semestral o trimestral, con o sin auto-exploración mensual [384]. Se recomienda a las mujeres empezar el cribado entre los 25 y 30 años.

Los estudios han demostrado que la RM es más sensible que la mamografía [385-387] y, aunque la mamografía es una alternativa mucho menos costosa a la RM, en los estudios de cohorte de portadores de mutaciones *BRCA* que fueron revisadas por mamografía solamente, se vio que la tasa de cánceres de intervalo era inaceptablemente alto.

Las medidas preventivas no-quirúrgicas, ya sean farmacológicas (con tamoxifeno) [388] o basadas en el estilo de vida [389;390], no han demostrado ser eficaces.

6.4.3 Manejo del riesgo de cáncer de ovario

La detección de cáncer de ovario mediante ultrasonografía transvaginal y mediciones CA125 son técnicas que se ofrecen frecuentemente mientras no se realiza la ovariectomía para reducir el riesgo. Sin embargo, hay muchos estudios que demuestran que no son eficaces y en un grupo de alto riesgo, el coeficiente riesgo/beneficio para la detección de cáncer de ovario parece ser desfavorable y la RRSO de reducción de riesgo parece ser una intervención más eficaz en términos de resultados médicos [383;391-393]; aunque queda un riesgo de carcinoma peritoneal primario [394].

Por tanto, se debe tener en mente el riesgo de cáncer de ovario, y las mujeres deben someterse a ovariectomías para reducir los riesgos tan pronto como sea posible después de cumplir los 35 años, siempre que esto sea congruente con sus objetivos de reproducción. La ovariectomía no sólo reducirá el riesgo de cáncer de ovario, sino que tendrá un impacto positivo sobre el riesgo de cáncer de mama [395-397].

Tabla 5. Cuadro-resumen de las medidas preventivas de los pacientes portadores de mutaciones *BRCA1* o *BRCA2* para cáncer de mama y de ovario.

Medidas preventivas portadores mutación <i>BRCA</i>		
Cáncer de mama	Vigilancia	Resonancia magnética (más sensible) o mamografía anuales
	Cirugía profiláctica	Mastectomía y salpingo-ovariectomía (en menor medida).
Cáncer de ovario	Vigilancia	Ultrasonografía transvaginal y CA 125 (poco eficaces)
	Cirugía profiláctica	Salpingo-ovariectomía

6.4.4 Diagnóstico genético preimplantacional

Debido a la herencia autosómica dominante de las mutaciones *BRCA1/2*, muchos pacientes, con frecuencia, expresan su preocupación por la transmisión de estas mutaciones a los hijos [398-400]. El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) consiste en el análisis genético de los embriones obtenidos por fertilización in vitro (FIV) y la transferencia de embriones libres de mutación a la madre para su implantación y gestación. Sin embargo, el proceso puede ser arduo y costoso, y a veces requieren múltiples ciclos farmacológicos e intentos de implantación para lograr un embarazo exitoso. Además, la consideración de PGD para los pacientes portadores introduce otra posibilidad de procedimientos médicos invasivos en una población que ya se le está pidiendo sopesar varias opciones de gestión de riesgos (por ejemplo, cirugía o vigilancia intensiva) [401]. Oktay y col. han desarrollado un método para la estimulación ovárica con letrozol (un inhibidor de la aromatasas) para mujeres con CM que desean preservar su fertilidad a través de la criopreservación de ovocitos o embriones previo a la quimioterapia [402].

7 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA DE MOLECULAR

A lo largo de nuestro estudio, hemos aplicado una serie de técnicas de biología molecular, algunas de las cuales las introducimos a continuación:

7.1 Secuenciación masiva (*next generation sequencing*)

Desde la finalización de la primera secuencia del genoma humano mediante secuenciación Sanger, la demanda de métodos de secuenciación más baratos y más rápidos se ha incrementado en gran medida. Esta demanda ha impulsado el desarrollo de métodos de secuenciación de segunda generación, secuenciación masiva o *Next Generation Sequencing* (NGS). Diversas plataformas NGS realizan secuenciación masiva en paralelo, en el que millones de fragmentos de ADN a partir de una sola muestra se secuencian al unísono. La tecnología de secuenciación masiva en paralelo facilita una secuenciación de alto rendimiento, que permite secuenciar un genoma completo en menos de un día. En la última década, varias plataformas NGS se han desarrollado debido a su bajo coste y una secuenciación de alto rendimiento. Estas

plataformas de NGS han hecho la secuenciación accesible a más laboratorios, un rápido aumento de la investigación y el diagnóstico clínico a partir de la secuenciación.

7.1.1 Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es un método de secuenciación de ADN basado en la monitorización a tiempo real de la síntesis de ADN. Esta técnica se conoce desde hace algunos años, pero gracias al impulso dado al desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación más eficientes y baratas se han conseguido una serie de mejoras que han hecho posible la aplicación de esta técnica para la secuenciación a una escala genómica y con bajo coste.

Se trata de una técnica de secuenciación de ADN basada en la detección de pirofosfato liberado (PPi) durante la síntesis de ADN. En una cascada de reacciones enzimáticas, la luz visible que se genera es proporcional al número de nucleótidos incorporados. La cascada comienza con una reacción de polimerización de ácido nucleico en el que el PPi inorgánico se libera como resultado de la incorporación de nucleótidos por la polimerasa. El PPi liberado es posteriormente convertido en ATP por la sulfúrilasa, que proporciona la energía para que la luciferasa pueda oxidar la luciferina y generar luz. Debido a que el nucleótido añadido es conocido, la secuencia de la plantilla se puede determinar (**fig. 16**).

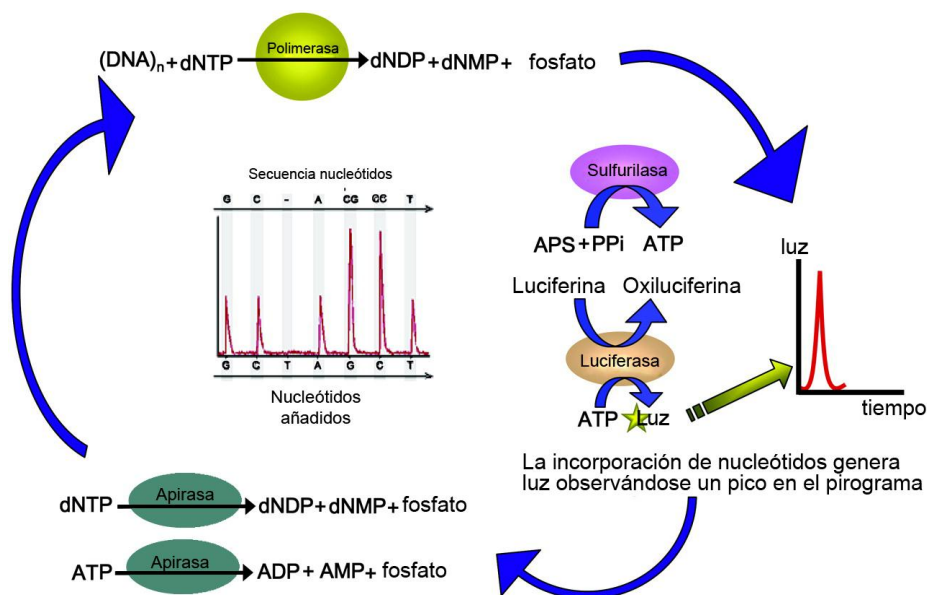


Figura 16. Esquema explicativo de la técnica de la pirosecuenciación.

Esta técnica se encuentra dividida en tres fases: **preparación de la librería de ADN** (para la selección, amplificación y secuenciación), **emPCR** (PCR en emulsión de agua y aceite de las cadenas simples seleccionadas) y **la secuenciación** (síntesis de la cadena complementaria y detección de los nucleótidos incorporados). Existen varias tecnologías basadas en los principios de la pirosecuenciación, una de ellas es el sistema *Gs Junior* de Roche que a continuación describimos como ejemplo.

7.1.1.1 Preparación de la librería de ADN

La preparación de la librería de DNA se basa en la amplificación de todas las regiones codificantes de *BRCA1* y *BRCA2* usando 5 cebadores multiplex. Posteriormente son pulidos (extremos romos) y entonces, los adaptadores A y B se ligan en ambos extremos. Estos adaptadores proporcionan las secuencias de hibridación para la posterior amplificación y secuenciación de los fragmentos de la librería. El adaptador B está biotinilado en su extremo 5', el cual permite la inmovilización de la librería mediante las perlas (*beads*) recubiertas de estreptovidina. Después de la reparación de las mellas, las hebras no biotiniladas se separan de las *beads* y se usan como librería molde de DNA de hebra sencilla (ssDNA). La librería ssDNA se analiza para determinar su calidad y mediante titulación se determina la proporción óptima (moléculas de DNA/*beads*) necesaria para la PCR en emulsión (*emPCR*).

7.1.1.2 Amplificación por PCR en emulsión (*emPCR*)

A continuación se continúa con la PCR en emulsión. La librería ssDNA se inmoviliza en las *beads*. De manera que cada *bead* contendrá una única molécula de ssDNA de la librería, que se emulsionará con los reactivos de amplificación en una micela de agua y aceite. Cada *bead* quedará englobada en su propio microreactor dentro del cual ocurrirá la amplificación mediante PCR. El resultado será una *bead* inmovilizada conteniendo fragmentos de DNA amplificados clonalmente (**fig. 17**).

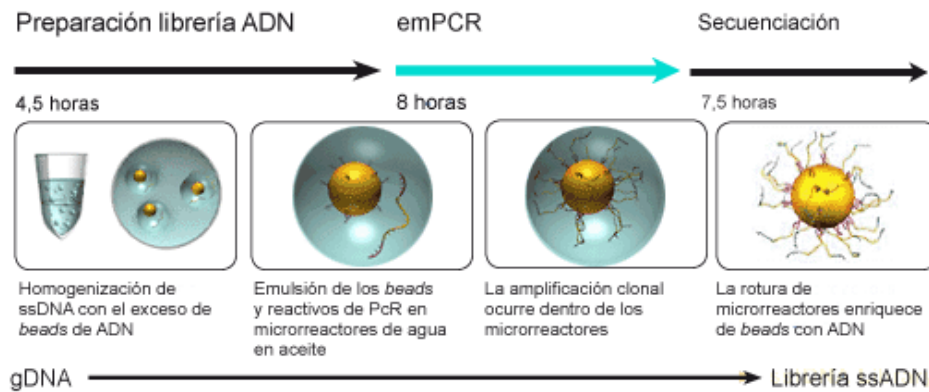


Figura 17. PCR en emulsión (*emPCR*).

7.1.1.3 Secuenciación

Ésta será la fase en que las *beads* unidas a los fragmentos de la librería ssDNA se añaden al *DNA Bead Incubation Mix* (contiene DNA polimerasa) y se distribuyen en capas dentro de la placa junto con unas *beads* de empaquetamiento que contienen luciferasa y sulfurilasa. La capa de *beads* de empaquetamiento asegura que las *beads* con DNA permanecen en el interior del pocillo durante la reacción de secuenciación. El proceso de deposición de las *beads* maximiza el número de pocillos que contienen una única *bead* con DNA amplificado (evitando más de una *bead* unida a ssDNA por pocillo). Cuando la placa (*PicoTiterPlate device*) correctamente cargada se coloca en el equipo donde los reactivos de secuenciación (tampones y nucleótidos) fluirán a través de los pocillos de la placa. Durante el flujo de nucleótidos, cada una de los cientos de miles de *beads* con millones de copias de DNA se secuencian en paralelo. Si un nucleótido es complementario a la cadena molde en algún pocillo, la polimerasa extiende la hebra existente de DNA mediante la adición de nucleótido(s). La adición de uno (o más) nucleótido(s) resulta en una reacción que genera una señal de luz que es recogida por la cámara CCD del equipo. La intensidad de la señal es proporcional al número de nucleótidos incorporados en un solo flujo de nucleótidos (**fig. 18**).

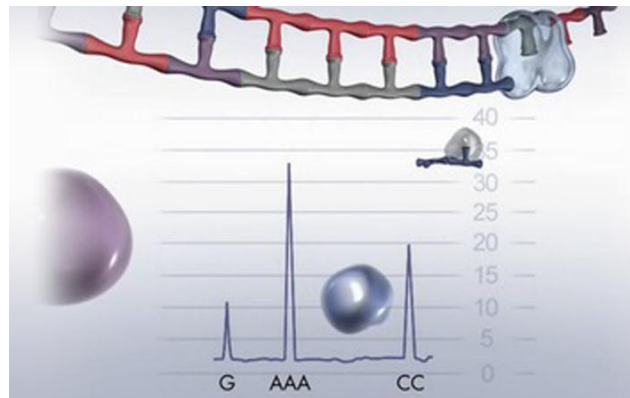


Figura 18. Mecanismo de secuenciación con la cámara CCD del equipo (pirosecuenciación).

7.2 MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*)

El MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*) es un nuevo método descrito en 2002 por J. Schouten [403] que permite la búsqueda de grandes deleciones o amplificaciones genómicas, así como la cuantificación del número de copias existente en múltiples secuencias de ADN en una misma reacción. Puede utilizarse tanto en ADN genómico como en ARNm. Requiere la hibridación específica de la secuencia, seguida de una amplificación de las sondas que hayan hibridado y un análisis semicuantitativo de los productos de PCR resultantes. Permite detectar los cambios en el número de copias de secuencias de más de 45 nucleótidos en una sola reacción. La detección en una muestra de dos regiones contiguas delecionadas proporcionaría un confirmatorio interno de la propia deleción. En el caso de la deleción de un único exón es necesaria la comprobación mediante otro método para la confirmación [404].

Entre un 5-10% de los casos de cáncer de mama hereditarios relacionados con *BRCA1* en diversas poblaciones son debidos a cambios en el número de copias de uno o más exones en dicho gen [405]. Por esta razón, en caso de resultado negativo para la secuenciación de ambos genes, se recomienda el estudio de grandes reordenamientos génicos gracias a la disponibilidad de ensayos rápidos, como lo es la técnica MLPA.

7.3 PCR a tiempo real (*qPCR*)

La característica fundamental de la *qPCR* es que podemos detectar la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo, a partir de la fluorescencia emitida por un fluoróforo durante la reacción de la polimerasa, ya que la emisión de fluorescencia producida es

proporcional a la cantidad de producto formado. Esto permite conocer y registrar la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores que se utilizan en la PCR tiempo real incorporan un lector de fluorescencia que permite leer en todo momento la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde transcurre la amplificación. Los procesos de amplificación y detección se producen de forma simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior.

Podemos clasificar las técnicas de *qPCR* según el empleo de sondas moleculares dependientes de la secuencia (sondas *TaqMan* o sondas tipo *Molecular Beacons*) o bien de fluorocromos no específicos. Nosotros empleamos el agente intercalante *SYBR Green I* como fluorocromo no específico. Se trata de un fluorocromo que en solución emite una fluorescencia muy baja que aumenta notablemente cuando se une a ADN de doble hélice. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Además, el *SYBR Green I* es una molécula extraordinariamente estable: tras 30 ciclos de amplificación sólo pierde el 6% de la actividad, por lo que es muy útil para detectar y cuantificar los productos de PCR.

Al comienzo de la amplificación, la mezcla de reacciones contiene ADN desnaturalizado, los *primers* y el *SYBR Green I*. El fluoróforo libre emite una ligera fluorescencia que aporta una señal de fondo que el programa del termociclador resta durante el análisis del proceso. Tras la unión del *primer* a la hebra de ADN, algunas moléculas del fluoróforo ya pueden unirse a la doble cadena que se forma. La unión produce un considerable incremento de la fluorescencia que emite el *SYBR Green I*.

Durante la extensión, cada vez se van uniendo más moléculas del agente fluorescente a la nueva doble cadena de ADN recién sintetizado, con el correspondiente incremento en la fluorescencia emitida. Si se controla la reacción de forma continua, se puede observar en tiempo real el aumento de la fluorescencia emitida (**fig. 19**).

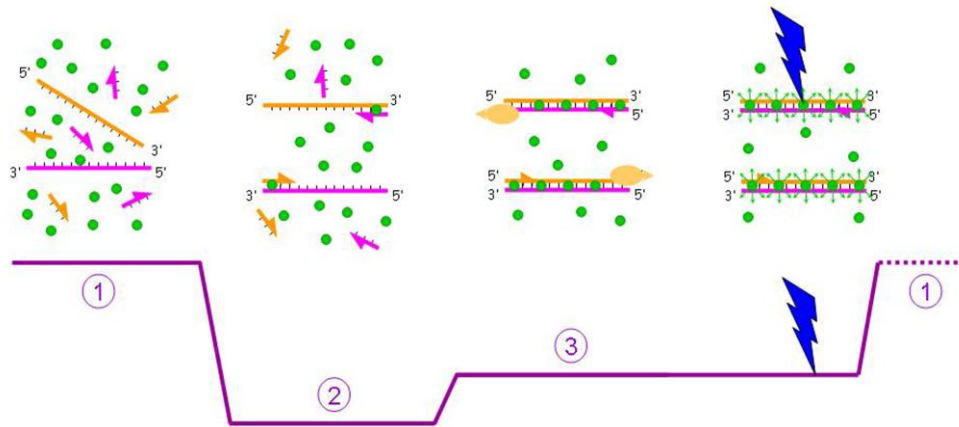


Figura 19. Esquema de un ciclo de *qPCR* mediante la unión con *SYBR Green I*. **1.** Fluorocromo en solución, como compuesto libre **2.** Fase de desnaturalización (señal de fluorescencia cae). **3.** Fase de elongación (aumenta la fluorescencia). **4.** Final de la fase de extensión del ciclo de PCR (medición de la fluorescencia emitida para controlar el aumento de la cantidad de ADN amplificado).

Para averiguar la abundancia del producto, respecto a la del control, debemos de conocer dos parámetros; por un lado, el *Cp* (*crossing point*) asociado a una determinada concentración de partida de ADN y, por otro, la eficiencia de la amplificación. El *Cp* es el ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. El *Cp* es inversamente proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra (**fig. 20**).

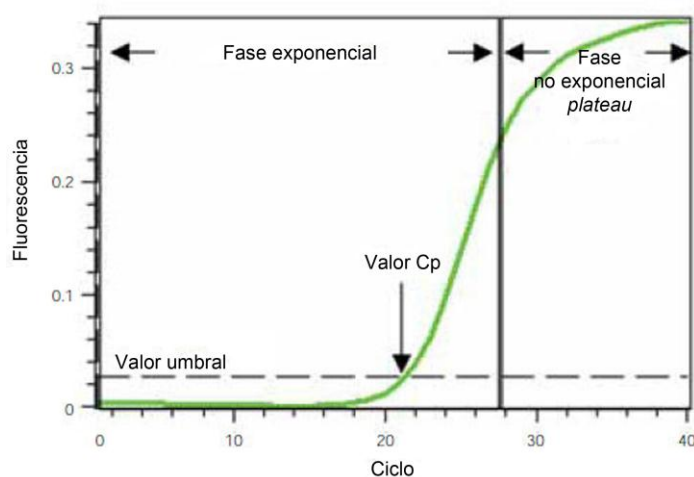


Figura 20. Imagen de un ciclo PCR donde se indica el *crossing point* (*Cp*), el cual se encuentra por encima del valor umbral o ruido de fondo de la fase exponencial del ciclo de PCR.

Como el amplicón de interés y el amplicón utilizado como control poseen distintas longitudes, cabe la posibilidad de que ambos difieran en la eficiencia de la PCR. Por ello, un requisito experimental añadido es que posean una eficiencia de amplificación similar. Si las eficiencias de los dos amplicones son iguales, dos volúmenes que tengan la misma cantidad de producto en un mismo número de ciclos tendrán la misma cantidad inicial de ADN. Una eficiencia óptima de amplificación es aquella que permite la replicación de todos los productos de PCR en cada ciclo (en cada ciclo se duplica la cantidad de producto).

$$N=N_0 \times 2^n$$

Donde **N** es el número de copias tras una serie de **n** ciclos, **N₀** es el número inicial de copias de ADN y **n** es el número de ciclos de PCR realizados. Teóricamente la eficiencia óptima en una PCR es 2, pero muchos parámetros de ésta pueden afectar a la eficiencia de la misma y, por ello, a menudo es muy diferente de 2:

$$N=N_0 \times E^n$$

7.4 Análisis de microsatélites

El ADN microsatélite, también conocido como *STR* (*Short Tandem Repeats*), se define como segmentos cortos de mono, di, tri o tetranucleótidos y constituye el 2% del genoma.

El uso de microsatélites ofrece algunas ventajas como marcador genético:

- a) Se transmite de manera mendeliana.
- b) El número de unidades de repetición puede variar de un individuo a otro.
- c) Estos marcadores se pueden utilizar para el análisis de ligamiento, pruebas de identidad, parentesco y mapeo de genes relacionados con alguna patología o características concretas.

A través de estudios de haplotipo mediante análisis de microsatélites, se han podido detectar varias mutaciones fundadoras en *BRCA1* y en *BRCA2*, como lo son las ampliamente caracterizadas en población de origen Ashkenazi c.68_69 delAG y c.5266dupC en *BRCA1* y c.5946delT en *BRCA2*.

La identificación de mutaciones recurrentes en poblaciones con una historia común de colonización o migraciones, es útil para diseños más eficientes de búsqueda de mutaciones en genes complejos y para el asesoramiento genético en estos grupos.

7.5 Análisis bioinformático: métodos *in silico*

Hoy en día, existen varias herramientas bioinformáticas disponibles que pueden predecir las consecuencias de las variantes genéticas en la estructura y función de las proteínas. Estos métodos *in silico* estudian varias características como son los cambios en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos sustituidos, la conservación evolutiva, el entorno de la secuencia de un aminoácido afectado o la alteración en las propiedades estructurales de la proteína.

A continuación presentamos algunas de estas herramientas *in silico* según el algoritmo bioinformático utilizado.

7.5.1 Propiedades de los aminoácidos sustituidos

Grantham matrix score (GMS)

La GMS se trata de una medida compuesta por el grado de sustitución de aminoácidos, teniendo en cuenta la composición de la cadena lateral, la polaridad, y el volumen molecular de los dos aminoácidos [406]. Los tres parámetros se combinan en una fórmula que da el mejor ajuste con las frecuencias relativas con las que los aminoácidos pueden sustituirse mutuamente en diversas proteínas de diferentes especies. Cuanto mayor es la puntuación, mayor es la “distancia” biofísica entre los dos aminoácidos.

Los valores en la matriz Grantham varían sustancialmente; pares estrechamente similares de aminoácidos tienen puntuaciones en el rango de 5 a 60, mientras que los pares fuertemente disímiles tienen puntuaciones por encima de 100 (la puntuación más alta es Cys-Trp, de 215). Se ha podido calcular la diferencia química media entre los aminoácidos en los que la sustitución confiere un fenotipo conocido (calculado utilizando la información de la base de datos *HGMD*), con una puntuación de 93,4; la diferencia química media entre los aminoácidos según las frecuencias del codón (que se corresponderían al modelo de los cambios *missense* al azar sin presión evolutiva), con

un 78,3; y la diferencia química media de los cambios polimórficos y variaciones interespecíficas de varios genes, con una puntuación cercana a 60 [407].

7.5.2 Métodos de análisis de conservación

Align-Grantham Variation Grantham Deviation (Align-GVGD)

Align-GVGD (<http://agvgd.iarc.fr/>) es un algoritmo que combina las características biofísicas de los aminoácidos y el alineamiento de secuencias múltiples (*multiple sequence alignment*, MSA) de proteínas para predecir dónde se clasifican las sustituciones *missense* de genes de interés en un espectro que va desde deletéreo hasta neutral. *Align-GVGD* es una extensión de la desviación de Grantham original hacia múltiples alineamientos de secuencias y verdaderas comparaciones múltiples simultáneas.

Calcula dos variables que, en conjunto, se relacionan con la severidad de la sustitución *missense*: GV y GD. GV es una medida cuantitativa que mide el grado de variación bioquímica entre los aminoácidos que se encuentran en una posición dada en el MSA y GD es una medida cuantitativa de la distancia entre la sustitución *missense* que estudiamos y la variación observada en su posición en el alineamiento (dada por GV) [408]. En la **tabla 6** y **figura 21** se representan el significado de los diferentes resultados de GV, GD y las clases de conservación posibles de las variantes tras el cálculo de estas variables.

Tabla 6. Significado de los resultados de GV, GD y los grados de conservación en *Align-GVGD*.

GV		GD		Grados de conservación	
>100	Posiciones que no tienen limitación funcional	0	Variante en la gama de especies que varían en esa posición proteica	C0	No conservada
60-65	Límite superior de una variante conservada	60-65	Límite superior de una sustitución missense conservada	C25	
				C35	
				C45	
				C55	
0	El residuo es invariante en el alineamiento	>100	Sustitución radical del aminoácido	C65	Muy conservada

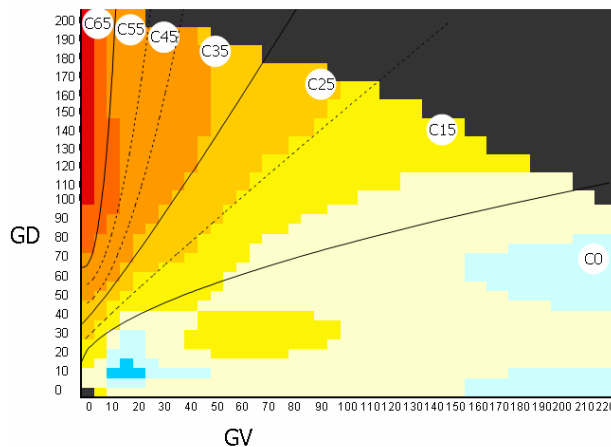


Figura 21. Gráfica de los grados de conservación de *Align-GVGD* en función de las variables GD y GV.

Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)

El algoritmo *SIFT* (<http://sift.jcvi.org/>) combina la homología de las secuencias recogidas a través de PSI-BLAST y las propiedades físicas de las sustituciones de aminoácidos para analizar si estas sustituciones se toleran o no, según el efecto previsto sobre la estructura de la proteína. En general, una posición altamente conservada es intolerante a la mayoría de las sustituciones, mientras que una posición mal conservada puede tolerar la mayoría de ellas.

Sin embargo, puede haber casos en los que no existe un número de secuencias suficiente en el conjunto de secuencias alineadas y, por tanto, no obtener un buen modelo de sustitución; ya que las pocas secuencias alineadas pueden que muestren una alta similitud y el algoritmo dé una predicción de secuencia altamente conservada. En este caso, los algoritmos predicen sustituciones neutras como patógenas, lo cual aumenta el error de falsos positivos [409]. Otra limitación del algoritmo *SIFT* es que no utiliza la estructura de la proteína para evaluar el efecto de una sustitución de aminoácido. Y se ha comprobado que la adición de una estructura de la proteína, mejora marginalmente el rendimiento de la predicción [410].

7.5.3 Métodos bayesianos

Polymorphism Phenotyping v2 (Polyphen-2)

La herramienta *Polyphen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) predice el impacto que puede causar una sustitución de un aminoácido en la estructura y/o función de una proteína humana mediante consideraciones comparativas.

Dada una sustitución de un aminoácido en una proteína, *PolyPhen-2* extrae varias características relacionadas con la secuencia y la estructura de donde se ha producido la sustitución e introduce estos datos en un clasificador probabilístico para obtener el grado de perjuicio que supone. Esta predicción se basa en reglas empíricas que se aplican a la secuencia, a la información filogenética y estructural que caracterizan la sustitución.

PolyPhen-2 predice el significado funcional de la variación mediante un clasificador Naïve Bayes. Para ello hace uso de dos pares de conjuntos de datos con los que trabaja el clasificador. Por una parte, usa el conjunto de datos *HumDiv*, que está formado por los alelos dañinos causantes de enfermedades mendelianas que se encuentran en la base de datos *UniProtKB*, junto con las diferencias entre las proteínas humanas y sus homólogos mamíferos más cercanos. Por otra, está el conjunto *HumVar*, formado por las mutaciones causantes de enfermedades humanas que se encuentran en la base de datos *UniProtKB* y el conjunto *nsSNPs* (*nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms*), sin enfermedades dañinas asociadas. El clasificador Naïve Bayes obtiene la probabilidad de que una mutación sea dañina dando una tasa o estimación de falsos positivos (posibilidad de que una mutación sea clasificada como perjudicial cuando en realidad no lo es) y verdaderos positivos (una mutación es clasificada como perjudicial y lo es).

Mutation Taster

Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), a diferencia de los algoritmos anteriores, además de analizar las variantes *missense*, es capaz de analizar las variantes sinónimas, no codificantes y pequeñas inserciones no superiores a 12 bases. En función de estos tipos de variantes se utilizan tres diferentes modelos de predicción [411]: *Without_aae*, está diseñado para las variantes sinónimas y no codificantes que no conducen a sustitución de aminoácidos pero podrían tener un efecto en el patrón de

empalme de la transcripción; *Simple_aae*, es para variantes *missense*; y *Complex_aae*, para las variantes con efecto más complejo como *framshifts* o proteínas truncadas.

Utiliza un clasificador Naïve Bayes bien satisficado debido a los datos recopilados de varias variantes consultadas. El conjunto de datos que contiene las variantes neutrales es una selección de SNPs e inserciones de *dbSNP*. La selección de SNPs se basa en las frecuencias de la población en *Haplotype Map* (HapMap), lo cual significa que la variante ha de encontrarse en al menos un 10% de la población. Este procedimiento de filtrado asegura que las variantes raras que podrían potencialmente causar enfermedades son excluidas. Los datos de variantes asociadas a enfermedad se han obtenido a partir de *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), *Human Gene Mutation Database* (HGMD) y de la literatura.

7.5.4 Redes neuronales artificiales (Neural network)

pMut

pMut (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut>) analiza variantes *missense* y funciona a dos niveles diferentes: recupera la información a partir de una base de datos local de *hotspots* mutacionales y analiza un SNP dado en una proteína específica. Los resultados se muestran en forma de varios archivos de texto y, cuando la estructura se conoce experimentalmente, están también disponibles los gráficos en 2-D y 3-D.

El programa puede simular mutaciones puntuales a lo largo de toda la secuencia (análisis mutacionales *hotspots*), lo cual ayuda a detectar las regiones donde se espera que las mutaciones tengan un gran impacto patológico. Independientemente de la selección, el programa recupera una serie de parámetros que describen la mutación a partir de su base de datos interna y las alineaciones múltiples de secuencias.

7.5.5 Software de apoyo a decisiones (“decision-support software”)

Alamut (versión 2.3)

Alamut es una aplicación de software de apoyo a las decisiones desarrollada por *Interactive Biosoftware*, para el diagnóstico de mutaciones en la genética molecular en medicina. Es una aplicación que integra la información genética proveniente de diferentes fuentes para describir variantes utilizando la nomenclatura HGVS y ayuda a interpretar su condición patógena. *Alamut* obtiene su información genómica de *Ensembl*

y la integra con datos de otras fuentes como *UniProt*, *dbSNP* y *PubMed*. Integra herramientas bioinformáticas tanto para variantes *missense* (*Align GVGD*, *SIFT*, *MutationTaster* y *PolyPhen-2*) como en predicciones del *splicing* en las distintas variantes, utilizando cinco algoritmos distintos: *SpliceSiteFinder (SSF)*, *MaxEntScan (MES)*, *NNSPLICE*, *GeneSplicer* y *Human Splicing Finder (HSF)*. Además, también emplea dos programas para identificar ESEs (*exonic splicing enhancer*) candidatos, como son *RESCUE-ESE* y *ESE Finder*. Para nuestro estudio, aplicamos únicamente este soporte informático para las predicciones de *splicing* con los algoritmos *SSF*, *MES*[412] y *NNSPLICE* [413].

La precisión de la escisión del intrón y la unión de los exones durante el empalme del preARNm se determina por el reconocimiento de secuencias de consenso bien conocidas, es decir, los sitios donadores 5'' y los aceptores 3'', además del punto de ramificación (*branch point*) (**fig. 22**).

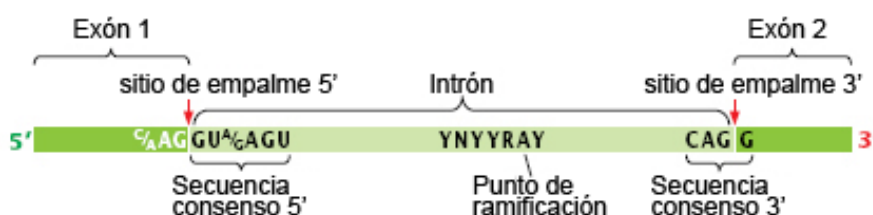


Figura 22. Secuencias consenso críticas presentes en el sitio de empalme 5'', el punto de ramificación y el sitio de empalme 3''. En la secuencia consenso que rodea el punto de ramificación (YNYYRAY), Y es cualquier pirimidina, R es cualquier purina, A es adenina, y N es cualquier base.

Las herramientas *MaxEntScan (MES)*, *SpliceSiteFinder (SSF)* y *NNSPLICE* usan el conocimiento actual sobre la base de la composición de las secuencias del sitio de empalme [414], pero ejecuta algoritmos distintos que generan una matriz de puntuación para cada sitio de empalme (sitios donador y aceptor para *SSF*, *NNSPLICE* y *MES*, además de sitio de ramificación para *SSF*). La disponibilidad de estadísticas para un gran número de sitios de empalme permite puntuar a cada lugar de un gen por su potencial como un sitio de empalme. Por lo tanto, *SSF* fue desarrollado para predecir los exones potenciales en una secuencia, utilizando una puntuación y un esquema de

clasificación basado en tablas de peso de nucleótidos (*nucleotide weight tables*) [414]. *NNSPLICE* utiliza un método basado en redes neuronales que identifica patrones de secuencia, a la vez que realiza pruebas con un conjunto de señales de empalme reales. Cuanto mayor sea el conjunto de señales de empalme real utilizado, las predicciones obtenidas serán mejores [413]. El marco de *MES* se basa en el principio de máxima entropía y utiliza grandes conjuntos de datos de los sitios de empalme humanos y tiene en cuenta las dependencias adyacentes y no adyacentes. Estos modelos de sitio de empalme asignan un *log odd ratio* (*MAXENT score*) a secuencias de 9 pb (sitio de empalme 5') o de 23 pb (sitio de empalme 3'). Cuanto más alta sea la puntuación, mayor es la probabilidad de que la secuencia sea un sitio de empalme verdadero [415].



Objetivos

1 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

A pesar de que en los últimos años se han identificado otros tipos de variantes genéticas de moderado y bajo riesgo que explican otra parte del riesgo de desarrollar CMOH, su aplicación en la práctica clínica no es posible hoy en día. Por lo tanto, en general, podemos decir que el único test genético recomendado en las guías clínicas en los casos de cáncer de mama hereditario sigue siendo el de los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

El principal objetivo de llevar a cabo la prueba genética es tratar de detectar la variante genética responsable de la patología en la familia y poder estudiar a sus miembros, identificando fehacientemente aquellos que son portadores de la mutación familiar, que podrán beneficiarse de las medidas de seguimiento intensivo y de aquellas encaminadas a la reducción del riesgo; y aquellos que no lo son, los cuales se habrán librado de la carga de ansiedad y miedo a la enfermedad que suele ser común en familias con una elevada carga de tumores.

Ya hemos visto que la prevalencia de las variantes patogénicas de los genes *BRCA1* o *BRCA2* en línea germinal varía considerablemente entre los grupos étnicos; y en algunos países, mutaciones fundadoras son responsables de una proporción significativa de casos de cáncer de mama. También se han publicado en varias regiones españolas el análisis mutacional de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en familias con cáncer de mama y ovario hereditario, mostrando una prevalencia heterogénea de mutaciones recurrentes según la zona geográfica. Sin embargo, hasta la fecha, no hay estudios integrales en la población de la Región de Murcia, que nos permitirían dar a conocer nuevas y relevantes mutaciones recurrentes en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en personas o familias con alto y moderado riesgo dentro del Programa de Consejo Genético de nuestra unidad. Además, se podría investigar la relación de los diferentes tipos de antecedentes personales o familiares con la probabilidad de albergar ese tipo de mutaciones.

Por otra parte, en los últimos años se ha demostrado que el tipo de cáncer de mama que se plantea en los portadores de variantes patogénicas en *BRCA1* y *BRCA2* difiere del cáncer de mama esporádico y los carcinomas de mama familiar con test genético *BRCA* negativo en sus características morfológicas, inmunofenotípicas y moleculares. El reconocimiento de estas diferencias, además de mejorar nuestra

comprensión de la biología del cáncer de mama hereditario, se podría utilizar como factor de riesgo de una mutación *BRCA* en un paciente dado, y estas características también se podrían utilizar para seleccionar el tratamiento más apropiado.

Otro aspecto importante es la detección de un número cada vez mayor de variantes de importancia clínica desconocida. Alrededor del 15% de las pruebas genéticas de los genes *BRCA1* y *BRCA2* nos está llevando a la identificación de UVs, y casi 2.000 UVs están incluidas actualmente en la base de datos BIC (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>) (consulta realizada el 27 de junio de 2014). La interpretación de estas UVs con respecto a la predicción sobre el efecto en la función de la proteína, y por lo tanto en el riesgo estimado de cáncer en las familias, se ha convertido en un gran reto al adaptar el asesoramiento genético y el cáncer de mama en las estrategias de prevención. Ya que, se ha de ser capaz de comunicar las posibles consecuencias de una UV de una manera cuidadosa y comprensible con una estimación objetiva de la probable patogenicidad.

Dentro de la variedad de métodos que se han desarrollado para determinar si una variante dada es patógena, se encuentran como herramientas complementarias los estudios *in silico*. Estos estudios nos podrán predecir las consecuencias de los cambios en la secuencia de ADN de una manera indirecta mediante estudios en la conservación de aminoácidos en las especies, el posible efecto de las sustituciones de aminoácidos en la estructura de proteínas o el efecto previsto en el *splicing* de ARN mensajero (ARNm).

2 OBJETIVOS

- a)** Espectro mutacional de *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes de la Región de Murcia que cumplan los criterios de selección para cáncer de mama y ovario hereditario, referidas a la Unidad de Consejo Genético del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y del Hospital Universitario Morales Meseguer durante los años 2006 y 2014.
- b)** Clasificación de las variantes encontradas en *BRCA1* y *BRCA2* de acuerdo a su tipo e implicaciones fisiopatológicas según el efecto que provocan.
- c)** Caracterización de posibles mutaciones efecto fundador y mutaciones recurrentes para averiguar el perfil mutacional en nuestra Región en los genes *BRCA1* y *BRCA2*.
- d)** Estudio pormenorizado de las variantes de efecto clínico desconocido detectadas mediante estudios *in silico*.
- e)** Detección de asociaciones entre las características clínicas e inmunohistoquímicas con los cánceres asociados a *BRCA* y los cánceres familiares con test genético negativo (*BRCAX*).



Material y métodos

1 PACIENTES EN ESTUDIO

Desde abril de 2007 hasta diciembre de 2013, se recogieron muestras de sangre periférica a los probandos pertenecientes a 396 familias con riesgo de padecer el síndrome cáncer de mama y ovario hereditario.

1.1 Selección y clasificación de los pacientes

La selección de las familias se realizó según los datos de su historia personal y familiar de cáncer en la consulta de Consejo Genético del Servicio de Oncología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia y desde marzo de 2013, además, en la consulta de Consejo Genético de la Unidad de Hematología y Oncología Médica del Hospital Universitario Morales Meseguer. Los requisitos mínimos que debe reunir un individuo para poder hacerse el estudio de los genes *BRCA1* y *BRCA2* se resumen en los criterios de selección recomendados por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (**tabla 7**).

Tabla 7. Criterios de selección de pacientes para el test genético recomendados por la SEOM*.

Criterios de alto riesgo

- Un caso de cáncer de mama a edad ≤ 40 años.
- Cáncer de mama y cáncer de ovario en la misma paciente, a cualquier edad.
- Un caso de cáncer de mama diagnosticado a edad ≤ 50 años o bilateral, y un cáncer de ovario en un familiar de primer o segundo grado.
- Tres casos de cáncer de mama u ovario (al menos uno de ovario), en familiares de primer o segundo grado.
- Dos casos de cáncer de ovario en familiares de primer o segundo grado.
- Un caso de cáncer de mama en varón, y otro caso de cáncer de mama (varón o mujer) u ovario en un familiar de primer o segundo grado.

Criterios de moderado riesgo

- Dos cánceres de mama en parientes de primer grado, diagnosticados entre los 51 y 60 años.
- Un cáncer de mama en un familiar de primer grado y otro en un familiar de segundo grado, si la suma de las edades al diagnóstico es ≤ 118 años.

* Se entiende por familiares de primer grado al padre, la madre e hijos/as. Familiares de segundo grado serían los abuelos/as y los hermanos/as.

Sin embargo, hubo casos índice que se les realizó el test genético sin presentar ninguno de los criterios de selección anteriormente indicados, a éstos se les clasificó como pacientes **sin riesgo**.

Todos los pacientes fueron debidamente informados de la naturaleza y objetivo del estudio y todos firmaron el consentimiento informado (**anexo A**) previo a la extracción de una muestra de sangre para la realización del estudio genético.

En el estudio de las familias que cumplían los criterios de selección se ofreció el estudio genético en primer lugar al caso índice que, en todos los casos posibles, había sido diagnosticado de cáncer, y en caso de varios individuos afectos en la misma familia se escogió la paciente diagnosticada de cáncer de ovario, la diagnosticada a edad más precoz, la diagnosticada de cáncer de mama bilateral o el varón diagnosticado de cáncer de mama. Como excepción, se consideró la realización del estudio genético en individuos sanos si todos los familiares afectos habían fallecido, no se podía contactar con ellos o rehusaban hacerse el estudio genético, y siempre que el resultado de dicho estudio pudiera condicionar la decisión de manejo clínico de la persona como, por ejemplo, la realización de cirugía profiláctica.

Todas las familias fueron clasificadas como portadores de una variante patogénica en *BRCA1*, portadores de una variante patogénica en *BRCA2*, grupo de las familias *BRCAx* (familias que cumplían los criterios de alto o moderado riesgo según la SEOM y el caso índice tuvo un test genético negativo) y el grupo de los cánceres sin riesgo familiar (familias que no cumplían los criterios de la SEOM y tuvieron el test genético negativo).

1.2 Características clínicas e inmunohistoquímicas de los pacientes

A los pacientes clasificados como portadores *BRCA1*, portadores *BRCA2* o *BRCAx*, tras la consulta de las historias clínicas, se valoró la siguiente información:

1.2.1 Información detallada de la historia oncológica del cáncer de mama y/u ovario del caso índice:

- a) Evaluación del riesgo según criterios clínicos de la SEOM
- b) Tipo de cáncer

- c) Edad del diagnóstico
- d) Histología del cáncer de mama y/u ovario
- e) Estadificación: de T (tamaño o extensión del tumor primario), N (grado de diseminación a los ganglios linfáticos) y estadio del tumor en cáncer de mama según *American Joint Committee on Cancer* [416] y el estadio del tumor en cáncer de ovario según *FIGO Staging System*.
- f) Inmunohistoquímica de los cánceres de mama: receptores estrogénicos, receptores Her-2/neu (HER) y clasificación molecular. En el caso de los receptores Her-2/neu se consultó el método de herceptest y si éste daba un resultado ambiguo (2+) se confirmó mediante análisis con *fluorescence in-situ hybridation* (FISH). Por lo que se refiere a la clasificación molecular, sobre la base de los perfiles de inmunohistoquímica, los cánceres de mama fueron clasificados de acuerdo con los siguientes subtipos moleculares: *luminal A* (RE+ y/o RP+, HER-), *luminal B* (RE+ y/o RP+, HER+), *HER2 positivo* (RE- y RP-, HER+) y *triple negativo* (RE-, RP-, HER2 -) [417].

En los casos de cánceres de mama bilaterales se registraron los datos clínico-patológicos tanto del primer tumor como del cáncer contralateral. Algunos datos no fue posible recopilarlos por ausencia de la información en la fuente consultada.

1.2.2 Información del tipo de cáncer de la historia familiar en los familiares de primer y segundo grado.

En el caso de estar afectados los familiares de primer y segundo grado del caso índice en estudio, se registraron cualquier tipo de cáncer además de los cánceres de mama y/u ovario.

2. FLUJO DE TRABAJO

Todas las muestras de sangre total procedentes de los casos índice fueron enviadas a laboratorios externos para su amplificación y secuenciación desde abril de 2007 hasta mayo de 2013. En estos laboratorios se emplearon las siguientes técnicas de secuenciación (**figura 23**):

A. Casos índice

A.1 Secuenciación de exones y zonas colindantes de *BRCA1* y *BRCA2*:

- Método de modificación de Sanger por secuenciación automática de electroforesis capilar.
- Secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*):
 - Pirosecuenciación (*Gs Junior 454*, Roche Diagnostics).
 - Secuenciación por terminador reversible (*MiSeq*, Illumina).

A partir de mayo de 2013, tras la puesta a punto de la técnica, se procesaron los siguientes casos índice mediante la tecnología de pirosecuenciación (*Gs Junior 454*, Roche) en nuestro laboratorio de diagnóstico genético del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario de la Virgen de la Arrixaca (**figura 23**).

A.2 Tecnología MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

En caso de no encontrar variantes patogénicas, en el laboratorio de Diagnóstico Genético (HCUVA) se procedió a realizar un *screening* de los reordenamientos génicos mediante esta técnica (**figura 23**). Los casos positivos se comprobaron por una técnica alternativa: PCR a tiempo real (*qPCR*).

B. Familiares

Un flujo de trabajo distinto tuvieron las muestras de los familiares en el rastreo de una mutación concreta: se realizó la amplificación y secuenciación en nuestro laboratorio de todas las muestras mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación automática de electroforesis capilar por modificación del método de Sanger (**fig. 23**).

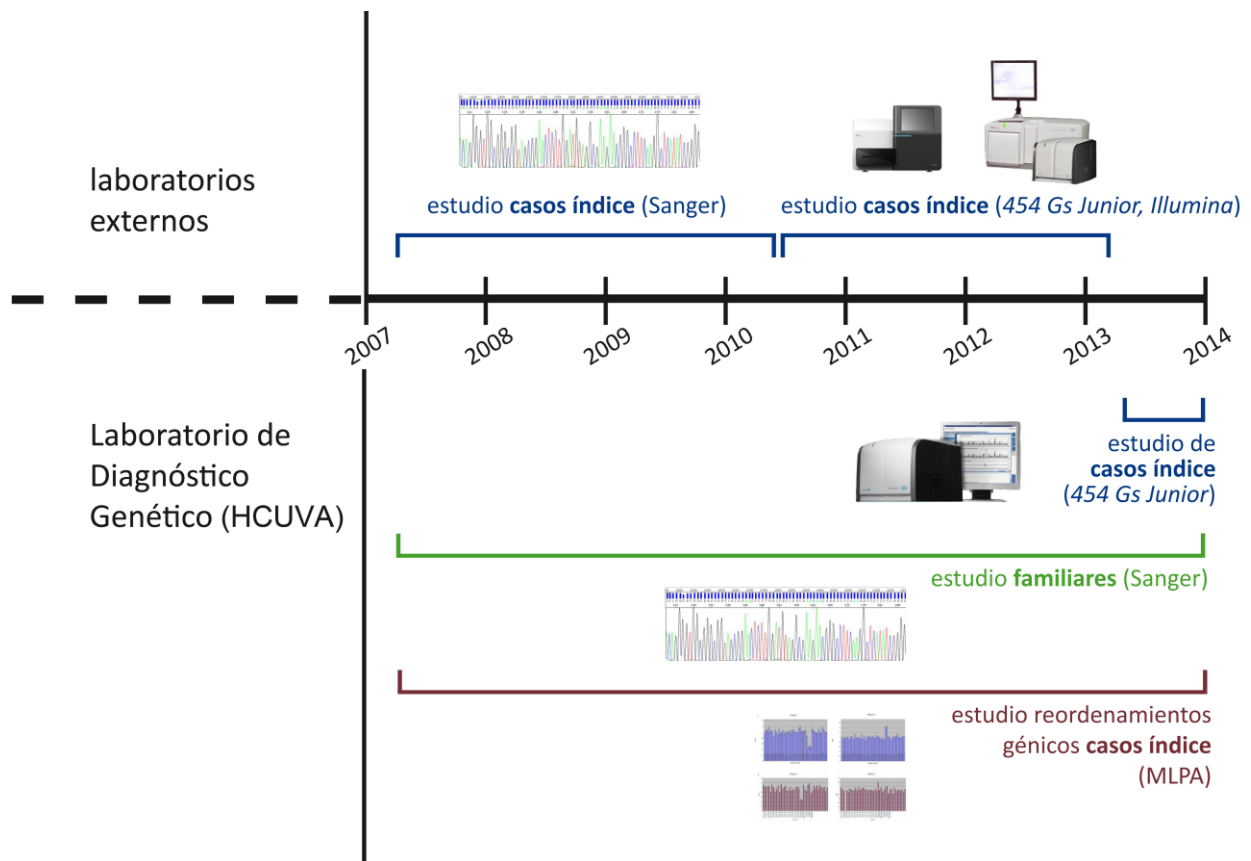


Figura 23. Esquema cronológico de la metodología empleada en la identificación de variantes en los genes *BRCA1* y *BRCA2* de los pacientes de nuestro estudio.

3. EXTRACCIÓN DE ADN

Se extrajo el ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico de todos los casos índices y sus familiares mediante el sistema automático de Promega (*Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit*) (**Figura 24**) a partir de 400 μ L de sangre periférica, extraída en tubo con anticoagulante EDTA.

Las muestras de ADN se almacenaron a una concentración de 20 ng/mL y a una temperatura de -20°C incluyéndose en la ADNteca del Laboratorio de Diagnóstico Genético.

La técnica se basa en la actuación de unas partículas paramagnéticas que funcionan como una fase sólida móvil que optimiza la captación, lavado y elución de la

muestra. El equipo transporta estas partículas paramagéticas a través de los reactivos de purificación de los cartuchos y se mezclan durante el proceso de purificación.



Figura 24. A. Maxwell 16 System. B. Guía de utilización del Maxwell 16. C. Esquema detalle de la extracción de ADN.

Se midió la concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría utilizando el equipo de *Thermo Scientific*, *Nanodrop 1000* (**Figura 25**). Para valorar la concentración, se determinó a una absorbancia (A) de 260 nm, a la que absorben los ácidos nucleicos, y así obtener la relación con una longitud de onda a 280 nm, a la que absorben las proteínas. Se determinó el ratio A260/A280 nm con la finalidad de obtener la calidad del ADN extraído, considerándose un ratio entre 1,5-1,8 como aceptable.

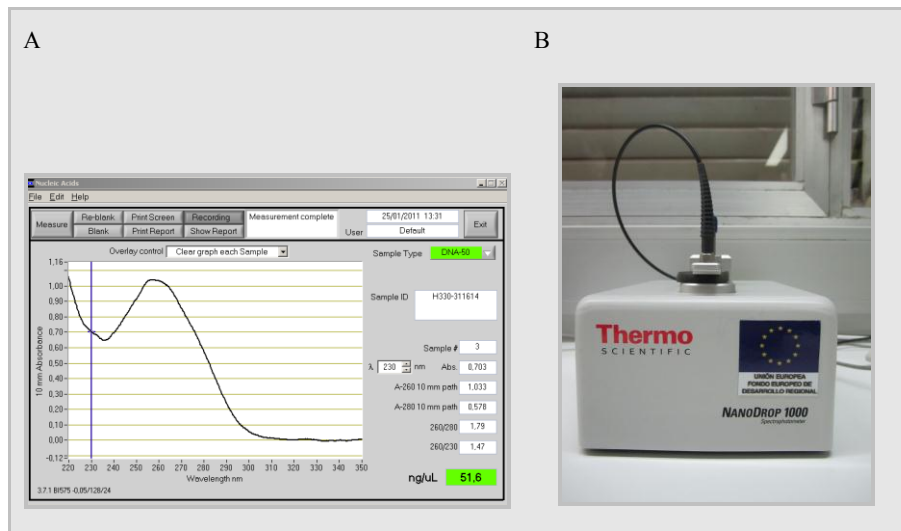


Figura 25. A. Curva de absorbancia de una muestra de ADN. **B.** Nanodrop1000 (Thermo).

4. AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO

4.1 Amplificación de los exones de interés en *BRCA1* y *BRCA2*

Se amplificaron los exones codificantes de interés del gen *BRCA1* [OMIM *113705] y los del gen *BRCA2* [OMIM *600185] de los familiares con una variante génica patogénica en los casos índice y para confirmar las variantes patogénicas identificadas por secuenciación masiva en nuestro equipo *Gs Junior*. La amplificación se realizó mediante la técnica de PCR, así como las fronteras intrón-exón y exón-intrón mediante cebadores específicos que anillaban en la zona intrónica. El exón 11 de cada gen y los exones 10, 14, 18 y 27 de *BRCA2*, debido a su gran tamaño, fueron amplificados en varios fragmentos ordenados de 5'' a 3''. Los exones 1 de ambos genes y el 4 de *BRCA1* no se analizaron por no ser codificantes.

Los cebadores disponibles para las amplificaciones de los exones de *BRCA1* y *BRCA2* vienen detallados en el **anexo B**. En la **tabla 8** se describen los grupos de exones de *BRCA1*, la concentración de cebadores y los reactivos utilizados. Por lo que se refiere a los programas de amplificación utilizados, se hallan descritos en la **tabla 9**.

Tabla 8. Grupos de exones de *BRCA1* para su amplificación por PCR, temperatura de anillamiento, concentración de cebadores y reactivos disponibles.

<i>BRCA1</i>				
GRUPO	Tª de anillamiento	Exones	Concentración cebadores (μ M, vol. final 25 μ L)	Reactivos PCR
A	62°C	2	0,4	Para un volumen final de 25 μL, concentraciones finales: - Buffer 1X - $MgCl_2^*$ = 1,5 mM - dNTPs = 0,2 mM - Taq Hot Start polimerasa (GoTaq, Promega) = 0,625 U - ADN: 50 ng
B	55-45°C	3	0,2	
		5	0,4	
		8	0,4	
		11.01	0,2	
		11.05	0,2	
		11.07	0,2	
		11.08A	0,4	
		11.08B	0,2	
		11.09A	0,2	
		11.10	0,4	
		11.12	0,2	
		12	0,2	
		17	0,4	
		20	0,2	
		21	0,2	
		23	0,2	
		24	0,2	
C	60-50°C	6	0,4	
		7	0,2	
		13	0,4	
		15	0,4	
		16	0,4	
D	53°C	22	0,2	
		9	0,4	
E	55°C	11.02	0,4	
		11.03	0,4	
		11.04	0,4	
		11.09B	0,4	
		14	0,2	
F	57°C	11.06	0,4	
G	58°C	11.11	0,4	
H	65°C	18	0,4	
I	50°C	19	0,4	

*Para los exones 6, 9, 19 y 11.06 se utilizaron unas concentraciones de $MgCl_2$ de 2mM

Tabla 9. Programas de amplificación para *BRCA1*.

Temp.	Tiempo	ciclos	Temp.	Tiempo	ciclos	Temp.	Tiempo	ciclos
94°C	2"		94°C	2"		94°C	1"	
94°C	30***	x40 ciclos	92°C	40***	x20 ciclos	92°C	40***	x20 ciclos
62°C	30***		55°C (-0,5°C /ciclo)	40***		60°C (-0,5°C /ciclo)	40***	
72°C	2"		92°C	40***	x20 ciclos	92°C	40***	x20 ciclos
72°C	10"		45°C (+1*** /ciclo)	40***		50°C (+1*** /ciclo)	40***	ciclos
Grupo A			Grupo B			Grupo C		
Temp.	Tiempo	ciclos	Temp.	Tiempo	ciclos	Temp.	Tiempo	ciclos
94°C	2"		94°C	8"		94°C	2"	
94°C	30***	x30 ciclos	94°C	30***	x30 ciclos	94°C	30***	x30 ciclos
53°C	30***		55°C	30***		57°C	30***	
72°C	2"		72°C	2"		72°C	2"	
72°C	10"		72°C	10"		72°C	10"	
Grupo D			Grupo E			Grupo F		
Temp.	Tiempo	ciclos	Temp.	Tiempo	ciclos	Temp.	Tiempo	ciclos
94°C	2"		94°C	2"		94°C	2"	
94°C	30***	x30 ciclos	94°C	30***	x30 ciclos	94°C	30***	x30 ciclos
58°C	30***		65°C	30***		50°C	30***	
72°C	30***		72°C	2"		72°C	2"	
72°C	5"		72°C	10"		72°C	10"	
Grupo G			Grupo H			Grupo I		

Los grupos de exones de *BRCA2*, la concentración de cebadores y los reactivos utilizados se encuentran en la **tabla 10**. Los programas de amplificación utilizados para *BRCA2* se hallan descritos en la **tabla 11**.

Tabla 10. Grupos de exones de *BRCA2* amplificados por PCR, temperatura de anillamiento, concentración de cebadores y reactivos utilizados.

BRCA2				
GRUPO	Tª de anillamiento	Exones	Concentración cebadores (µM, vol. final 25 µL)	Reactivos de PCR
A	60-50°C	2	0,2	Para un volumen final de 25 µL, concentraciones finales: - Buffer 1X - MgCl ₂ * = 1,5 mM - dNTPs = 0,2 mM - Taq Hot Start polimerasa (GoTaq, Promega) = 0,625 U - ADN: 50 ng
		3	0,2	
		4	0,2	
		9	0,2	
		10D	0,2	
		15	0,2	
		21	0,2	
B	55-45°C	5 y 6	0,2	
		7	0,2	
		8	0,2	
		10A	0,2	
		10B	0,2	
		10C	0,2	
		11(todos)	0,2	
		12	0,2	
		13	0,2	
		14A	0,2	
		14B	0,2	
		16	0,2	
		17	0,2	
		18A	0,2	
		18B	0,2	
		19	0,2	
		20	0,4	
		22	0,4	
		23	0,2	
		24	0,2	
		25	0,2	
		26	0,2	
		27A	0,2	
27B	0,4			

*Para el exón 27B se utilizaron unas concentraciones de MgCl₂ de 1mM

Tabla 11. Programas de amplificación para *BRCA2*.

Temp.	Tiempo	ciclos	Temp.	Tiempo	ciclos
94°C	1''		94°C	2''	
94°C	40'''	x20	92°C	40'''	x20
60°C (-0,5°C /ciclo)	40'''	ciclos	55°C (-0,5°C /ciclo)	40'''	ciclos
92°C	40'''	x20	92°C	40'''	x20
50°C (+1''' /ciclo)	40'''	ciclos	45°C (+1''' /ciclo)	40'''	ciclos
Grupo A			Grupo B		

4.2 Verificación de la amplificación

Se verificó la correcta amplificación de los fragmentos mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 2% con tampón TBE 1x (Tris 89mM – ácido bórico 89 mM – EDTA (2mM) a pH 8,4 de *Bio-Rad* (161-0770)) utilizando para el revelado *GelRed* (0,1 mL *GelRed*/1 mL gel) (*GelRed Nucleic Acid Gel Satin*, 10000X en agua. *Catalog number*: 41003. *Biotium*). Se cargaron aproximadamente 3 µL de producto amplificado junto con 1 µL de tampón de carga (0,25% (W/V) azul de bromofenol, 0,25% (W/V) cianol xileno, 30% (V/V) de glicerol en agua). Se utilizó para el revelado el trasiluminador *Alpha Innotech* y la cámara *PowerShot A640 AiAF* de *Canon*.

4.3 Purificación de los amplicones

A continuación se purificaron los amplicones mediante un método enzimático, con el kit *Exosap-It*. Este kit incluye dos enzimas, la exonucleasa I, que elimina las cadenas simples de ADN residuales que se puedan formar en la PCR o restos de cebadores y una fosfatasa alcalina que elimina los restos de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP). Se mezclan 5 µL del producto de reacción de PCR con 2 µL de *Exosap-It*, se incuba 15' a 37 °C y seguidamente 15' a 80 °C en un termociclador para la inactivación de la enzima.

5. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DIRECTA

Se utilizó la secuenciación automática como técnica para rastrear la alteración de la secuencia en los familiares de un caso índice con una mutación patogénica conocida y como confirmatorio de las variantes génicas patogénicas detectadas por secuenciación masiva en nuestro laboratorio.

Tras la purificación del amplicón y utilizando los mismos cebadores que para la PCR, se realizó la reacción de secuenciación. Para confirmar los posibles cambios en la secuencia se hizo una secuenciación bidireccional.

Para ello, se empleó el Kit *BigDye Terminator* (BDt) v1.1 de *Applied Biosystems*, una adaptación de la reacción enzimática dideoxi de Sanger (1977). El programa del termociclador que se utilizó para la reacción de secuenciación consta de un desnaturalización a 96 °C 1', seguido de un programa de 25 ciclos de tres temperaturas, 96 °C 10'', 50 °C 5'' y 4' a 60 °C terminando a 4 °C indefinidamente. Se trabajó con un volumen final de 5 µL; 1,75 µL *buffer enhancer sequencing* (10X), 1,5 µL agua miliQ, 0,25 µL de BDt v1.1, 0,5 µL cebador (*Forward* o *Reverse* 3,2 mM) y por último 1 µL del producto de PCR (**tabla 12**).

Tabla 12. Reacción de secuenciación.

Reacción de secuenciación	V (µL)
H ₂ O	1,5
<i>Buffer enhancer sequencing</i>	1,75
<i>Primer F ó R</i> (3,2 µM)	0,5
<i>Big Dye</i>	0,25
Producto PCR	1,0
Vol. total	5

Tras la reacción de secuenciación, se eliminaron los restos de dNTP's sobrantes y posibles impurezas con las columnas de *EdgeBio (Performa DTR (Dye Terminator Removal) Gel Filtration Cartridges*. El kit se basa en la descripción de Sambrook y col. (1989) [418] de filtración de ADN en gel para separar fragmentos de más de 16 pares de bases (pb) de restos de dideoxinucleótidos marcados, dNTP's y otras sales o compuestos de bajo peso molecular (elimina hasta el 98% de sales presentes).

Se centrifugaron las columnas a 3000 rpm durante 2 minutos. Se retiró el agua restante y se colocó la columna en un vial nuevo de 1,5 ml. Se añadieron a los 5 μ L de la reacción de secuenciación 10 μ L de agua miliQ, el volumen final (15 μ L) lo depositamos en el centro de la columna. Se volvió a centrifugar a 3000 rpm durante 2 minutos para así recoger el precipitado al que se le añadieron 10 μ L de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems), desnaturalizante químico de la doble hebra del ADN. Seguidamente, se traspasaron las muestras purificadas a una placa de 96 pocillos (*MicroAmpTM. Optical 96-Well Reaction Plate. Applied Biosystems*) adaptada para el secuenciador.

Las secuencias fueron analizadas por electroforesis capilar a través del equipo ABI3130 (*Applied Biosystems*), utilizando cuatro capilares de 50 cm y polímero POP7 (*Applied Biosystems*). Las condiciones electroforéticas fueron las siguientes: tiempo de carrera 45 minutos, temperatura de 60°C y el tipo de análisis fue *Sequencing Analysis*.

Los análisis de las secuencias se realizaron con los soportes informáticos suministrados por la casa *Applied Biosystems: Foundation Data Collection v. 3.0, Sequencing Analysis v. 5.2 y Seqscape v. 2.5*.

6. SECUENCIACIÓN MASIVA (*Next Generation Sequencing*)

En nuestro laboratorio se ha puesto a punto la tecnología de pirosecuenciación mediante el 454 Gs Junior (*Roche Diagnostics*) (**fig. 26**) hasta trabajar a pleno rendimiento desde septiembre de 2013.



Figura 26. Equipo 454 Gs Junior (*Roche Diagnostics*).

Analizamos unos 7 pacientes en cada procedimiento de amplificación y análisis de los genes *BRCA*. Para ello, fue necesario continuar una serie de pasos recomendados por el fabricante a lo largo de unos siete días de trabajo. Se siguieron los siguientes procesos (todos los pasos se hallan detallados en el **anexo C**):

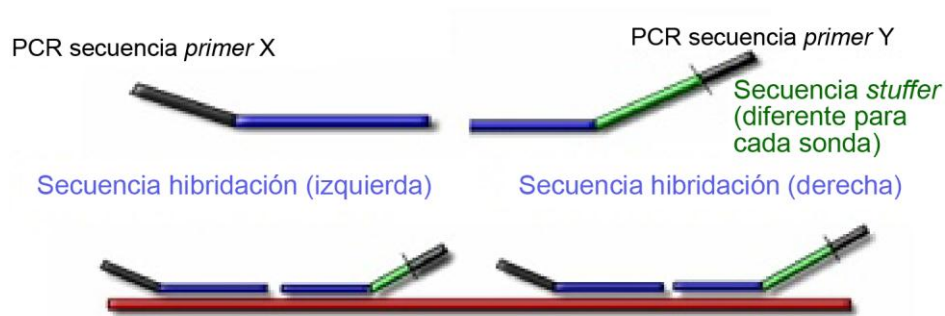
- a) **Preparación de la librería de ADN:** Las amplificaciones se realizaron utilizando el kit *BRCA MAST Assay v2.1* (Cat MR-0012.040) y para la incorporación de las MIDs y las secuencias específicas de los adaptadores A y B a cada muestra se emplearon los kits *454 MID kit1-8* (Cat. ML-0008.192) y el *Amplification Reagent del MASTRDx kit*, respectivamente.
- b) **PCR en emulsión (*emPCR*):** Para la PCR se utilizó el kit *emPCR Reagents* (Ref. 05996538001) y para la recuperación de las *beads*, lavado y su enriquecimiento el kit *emPCR oil and breaking kit* (Ref 05996511001).
- c) **Secuenciación:** Para ello, ensamblamos el dispositivo *Bead Deposition Device* con la placa *PicoTiterPlate device*, la cual la habremos rellenado con las *beads* de las muestras junto con las demás tipos de *beads* suministradas por los kits *Gs Junior Titanium Control Bead kit* y *Gs Junior Titanium Sequencing kit*. Tras colocarlo en el equipo, procedimos a la secuenciación mediante el programa informático *Gs Junior Sequencer*.
- d) **Análisis de los datos:** Para la evaluación de los datos empleamos el soporte informático *GS Run Browser* y para su interpretación el soporte informático *GS Amplicon Variant Analyzer (AVA)*.

7. ESTUDIO DE GRANDES REORDENAMIENTOS EN LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2*

En la técnica de MLPA para el estudio de estos reordenamientos usamos el *SALSA MLPA KIT* para *BRCA1* y *BRCA2* (100 reacciones) de *MRC Holland*. Las sondas utilizadas en el kit para la detección de grandes reordenamientos génicos vienen indicadas en el **anexo D**. Se optimizó la técnica en el termociclador *Verity* (*Applied Biosystems*) que facilita distintas opciones de programa que son necesarias en este caso. Se hicieron los cálculos siempre para una muestra de más.

Para cada ensayo se incluyeron dos muestras como controles en las que no se hubiera detectado ninguna mutación causal. El protocolo de la técnica de MLPA para la detección de grandes reordenamientos se compone de 5 pasos (**fig. 27 y tabla 13**).

1. Desnaturalización e hibridación



2. Ligación



3. PCR con los *primers* universales X e Y

Amplificación exponencial de sólo las sondas ligadas



4. Análisis de fragmentos

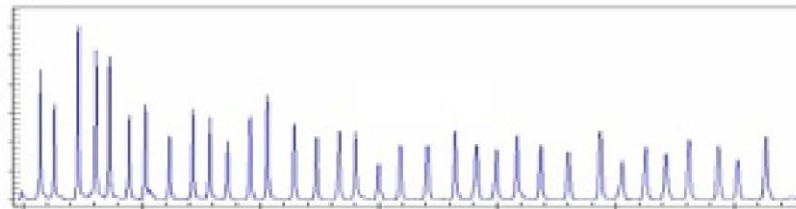


Figura 27. Proceso descriptivo de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*).

Tabla 13. Etapas de la técnica de MLPA

1. Desnaturalización de ADN e hibridación de sondas Primeramente se desnaturalizaron 5 µL de ADN (20ng/µL) 5' a 98°C. Se enfrió y pausó a 25°C antes de abrir el termociclador y se añadieron 1,5 µL de SALSA probemix y 1,5 µL de MLPA buffer a cada tubo. Se mezcló e incubó 1' a 95°C seguido de 18 horas a 60°C (paso limitante debido a la evaporación del volumen de reacción, 8 µL).
2. Reacción de ligación Se redujo la temperatura hasta 54°C y se añadieron 32 µL de la mezcla de ligación (3 µL de Ligase buffer A, 3 µL Ligase buffer B y 25 µL de agua miliQ. Se añade 1 µL de Ligase-65) y se homogenizó bien. Se incubó 15' a 54°C seguido de 5' a 98°C.
3. Reacción de PCR Se preparó la <i>Master Mix</i> de la polimerasa, la cual constaba para cada reacción de 7,5 µL de agua miliQ, 2 µL de SALSA PCR Mix y 0,5 de SALSA Polymerase. Posteriormente a cada tubo se le añadieron 10 µL de la <i>Master Mix</i> de la polimerasa. El programa de PCR constó de 35 ciclos de 30'' 95 °C, 30'' 60 °C y 60'' a 72 °C. Finalmente se termina con una incubación de 20' a 72°C.
4. Separación de los productos de amplificación mediante electroforesis Se mezclaron 12 µL de Formamida Hi-Di, 1 µL de producto de amplificación y 0,5 µL del marcador de tamaño utilizado, en nuestro caso LIZ500, y se desnaturalizó 5' a 95°C.
5. Electroforesis capilar en modo de análisis de fragmentos

7.1.1 Análisis de fragmentos

En este paso se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Electroforesis capilar con el analizador *ABI3130* (*Applied Biosystems*).
- b) Análisis y visualización de los resultados con el software *GeneMapper v. 4.0* (*Applied Biosystems*). En la que deberemos tener en cuenta:
 - Fragmentos control “DQ” (*DNA quantity*). Los cuales dan lugar a productos de amplificación de 64, 70, 76 y 82 pb. Estos cuatro fragmentos sirven de control, ya que serán más evidentes si la cantidad de ADN de nuestras muestras es muy baja. Estos fragmentos no requieren una reacción de ligación para ser amplificados, por lo que son visibles incluso cuando falla la etapa de ligación.
 - Fragmentos control "DD" (*DNA denaturation*) de 88, 92 y 96 pb. Fragmentos que consisten en dos sondas sintéticas, cuyo propósito es avisarnos de que el ADN no se ha desnaturalizado por completo. Los fragmentos de 88 pb y de 96 pb son específicos de secuencias que se localizan en islas CpG muy difíciles de desnaturalizar. Si los productos de amplificación de éstos son mucho menores que los de 92 y 127-454 pb, entonces la desnaturalización del ADN de nuestras muestras puede haber sido incompleta y nuestros resultados poco fiables.
- c) Análisis del perfil de picos. Se abrieron como un archivo de Excel y se eliminaron los picos sobrantes que no correspondían a ningún locus control ni a ningún exón de *BRCA1* o *BRCA2*. Mediante una plantilla de análisis se normalizaron las áreas relativas con respecto a las áreas de los controles sanos. A continuación, se comprobó la existencia de una posible amplificación o delección en el gen. Utilizamos los rangos de referencia utilizados por otros grupos de investigación e indicados por la casa comercial (*MRC Holland*), considerando un valor por debajo de 0,6 sospechoso de delección y por encima de 1,4 de duplicación, utilizando siempre dos controles sanos como referencia. Ambos se tendrían que confirmar posteriormente. Debemos tener en cuenta que quizás algunos polimorfismos

interfieran en la hibridación de alguna sonda y pudiera generar un falso positivo.

8. PCR A TIEMPO REAL (*qPCR*)

Para la comprobación de los reordenamientos detectados por MLPA en nuestro estudio, utilizamos el método de PCR a tiempo real o cuantitativa (*real time PCR* o *qPCR*) como técnica alternativa. Utilizamos el método de *qPCR* con el equipo de *LightCycler* (*Roche Diagnostics*) (**fig. 28**). Se utilizaron los mismos *primers* que se emplearon en la amplificación para la secuenciación automática por electroforesis capilar (según el exón de estudio).



Figura 28. Equipo *LightCycler* (*Roche Diagnostics*).

Las muestras donde se detectaron reordenamientos génicos y las muestras control se diluyeron de forma seriada y se amplificaron para cada exón diana a concentraciones de 100, 50, 25, y 12,5 ng por reacción. Los *C_p* de cada amplificación se determinaron por el software *LightCycler* versión 3.5 usando el máximo de la segunda derivada. La eficiencia de cada reacción de PCR se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$E=10^{-1/\text{pendiente}} \quad [419]$$

Para cada muestra de ADN se amplificaron en 20 μL por reacción, la cual contenía 0,2 μM de cada *primer* y 1X de *Mix Takara SYBR^R Premix Ex TaqTM* (*Tli RNase H plus*) (lote AK 1801), la cual contenía la Taq Polimerasa, los dNTPs, Mg^{+2} , *Tli RNasa H* y *SYBR Green*.

La amplificación se realizó en el *LightCycler* a una preincubación de 95°C 10 minutos seguidos de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C 10''', anillamiento a 60°C (temperatura específica de la deleción del exón 2) 10''' y extensión a 72°C 12'''.

Posteriormente, se calcularon los ratios de la dosis génica de cada exón utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta\text{Cp}}$, previamente descrito [404;420;421], comprobando las mismas eficiencias y asumiendo que todas ellas resultaran ser 2. De esta manera, el ratio de la dosis génica se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{RD} = 2^{-\Delta\text{Cp}}$$

Donde ΔCp equivale a la diferencia entre los valores Cp de la muestra diana y de la muestra control (**figura 29**).

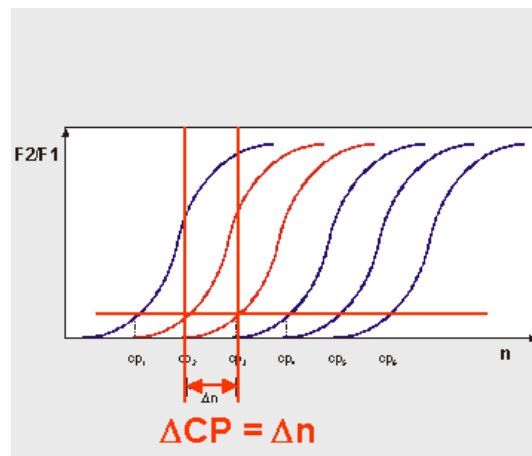


Figura 29. Imagen donde se indica la ΔCp entre dos muestras, cuyo valor nos permitirá calcular los ratios de la dosis génica (RD).

9. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES

La técnica de microsatélites se ha utilizado para el estudio de 2 familias portadoras de una misma mutación conocida para demostrar el efecto fundador y que comparten un ancestro común.

Dos individuos y seis miembros de la familia fueron genotipados por marcadores microsatélites polimórficos dentro de *BRCA1* y en sus zonas flanqueantes. Como controles, veinticuatro individuos españoles no emparentados (de diferentes áreas de Murcia) también se genotiparon, además de estimarse las frecuencias de los alelos.

Los cuatro marcadores microsatélites fueron D17S1326 (en 5' de *BRCA1*), D17S855 (intrón 20), 17-3858 (en 3' de *BRCA1*) y 17-3930 (en 3' de *BRCA1*). Las secuencias de los cebadores de amplificación para los marcadores D17S1326 y D17S855 se encuentran en la base de datos de sitios de secuencia identificada (STS, *sequence-tagged site*) de la NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) denominada UniSTS (UniSTS) [422]; mientras que las secuencias de los cebadores de los marcadores microsatélites 17-3858 y 17-3930 fueron obtenidas del trabajo publicado por Sagi y col. [423]. Las secuencias de cebadores y el tamaño de los alelos de los marcadores polimórficos utilizados para construir los haplotipos se encuentran en la **tabla 14**. Y el orden de los marcadores y las distancias relativas entre sí se muestran en la **figura 30**.

Tabla 14. Secuencias de los cebadores y tamaño de los alelos de los marcadores polimórficos de *BRCA1* utilizados para construir los haplotipos.

Marcadores microsatélites en <i>BRCA1</i>			
Marcador	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Tamaño alelo (pb)
D17S1326	FAM* 5'-CAGCTGATATTTCACAGGACT-3''	5'-AGAGCAAAACTCCATCTCAAACA-3''	89-108
D17S855	FAM* 5'- GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG-3''	5'- ACACAGACTTGTCCTACTGCC-3''	139-152
17-3858	FAM* 5'-CATTCTCATTTCCAGTATAGAGG-3''	5'-AGATCTTCTACCAGGCTCTTAGC-3''	122-136
17-3930	FAM* 5'-GATAAACTAGTTTTTGCCAG-3''	5'-TGTAATCTCAGGGCAAAGG-3''	289-308

*Los *primers forward* se marcaron con el fluoróforo FAM para poder determinar el tamaño de los fragmentos en función del otro fluoróforo (LIZ-500), empleado en el análisis de fragmentos.

Cada marcador se amplificó con PCR utilizando un kit de PCR de microsatélites *Type-it Microsatellite PCR Kit* (Cat. N° 206241) (Qiagen). Previamente, se reconstituyeron los viales de primers liofilizados con tampón estándar (TE) hasta una concentración de 100 μ M. Posteriormente, en un mismo tubo añadimos 10 μ l de cada primer (20 μ l en total) y añadimos 480 μ l de TE, obteniendo de esta manera 500 μ l de mix de primers (*Forward* y *Reverse*), cuya concentración fue de 2 μ M para cada primer.

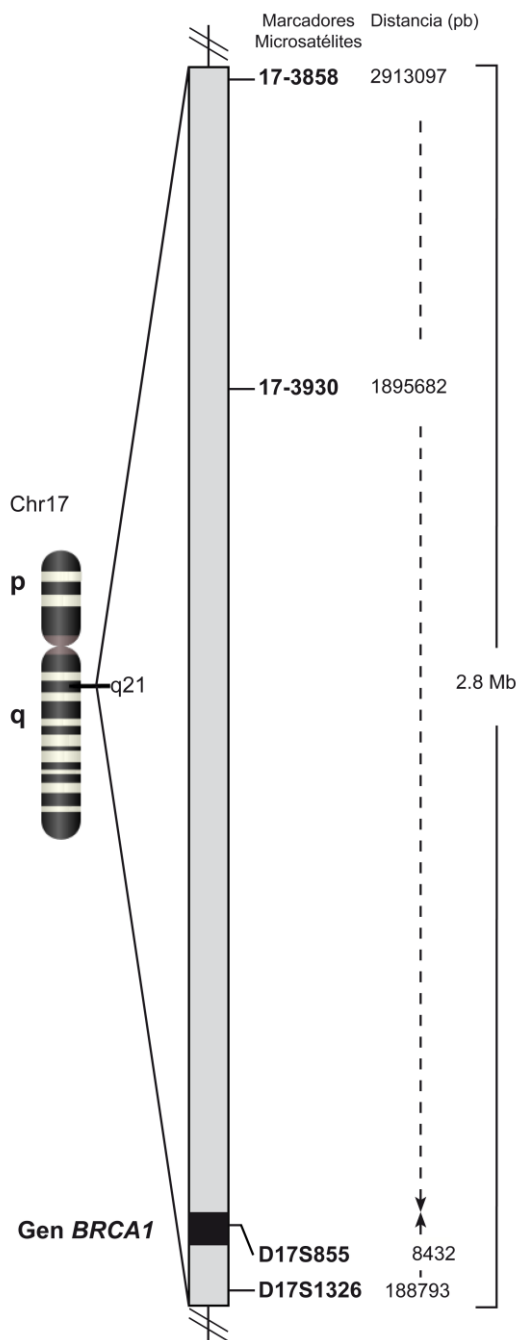


Figura 30. Posiciones de los marcadores microsatélites en el cromosoma 17q21. Las distancias en pares de bases (pb) se indican en relación al gen *BRCA1*. Los marcadores seleccionados se encuentran dentro o flanqueando dicho gen, extendiéndose sobre una región de 2,8 Mb.

El programa de amplificación utilizado consta de varios pasos: 5' a 95° (activación de la polimerasa de la Master Mix), 28 ciclos de 3 temperaturas: 30'' 95°; 90'' a 57° y 30'' a 72°; una extensión final de 30' a 60° y a 4° indefinidamente. Para la PCR de microsatélites utilizamos los reactivos y cantidades señalados en la **tabla 15**.

Tabla 15. Esquema de la PCR de microsatélites.

PCR de microsatélites	V (μL)
H ₂ O	6,5
Master Mix	12,5
Solución Q	2,5
Primer (2μM cada cebador)	2,5
ADN (20ng/μL)	1,0
Vol. total	25

La muestra una vez amplificada se introdujo en el analizador *ABI 3130* para la electroforesis capilar y el posterior análisis de fragmentos. Para ello se mezcló 1 μL de producto de amplificación con 12μL de formamida Hi-Di y 0,5 μL del marcador de tamaño LIZ-500 (*Gene Scan- 500 LIZ Size Standard. Part.Nº 4322682*) y se dispuso durante 5 minutos a 95°C.

Los datos obtenidos tras el análisis de fragmentos en el analizador *ABI 3130* se realizaron mediante el software *Genemapper v 4.0*, facilitado por *Applied Biosystems*. Cada microsatélite amplificado se repite un número de veces determinado en el alelo paterno y materno y se representa mediante un pico. Dependiendo del número de repeticiones obtendremos un pico con mayor o menor tamaño.

Posteriormente, lo haplotipos se reconstruyeron de forma manual en las dos familias informativas. El origen geográfico de las familias se dedujo del lugar de origen del portador de la mutación con mayor edad o del familiar afectado con mayor edad y más probable de ser portador.

10. NOMENCLATURA DE LAS VARIANTES Y SIMBOLOGÍA DE LOS ÁRBOLES GENEALÓGICOS

La nomenclatura de las distintas variantes localizadas sigue la normativa propuesta por la *Human Genome Variation Society (HGSV)* (<http://www.hgvs.org/>) [424].

En la **figura 31** se indican los símbolos utilizados en la elaboración de un árbol genealógico: los varones se representan como cuadrados y las hembras como círculos. Los individuos afectados de algún tipo de cáncer se indican rellenando los cuadrados o los círculos de color negro. La línea diagonal indica que el individuo está fallecido. Dos individuos unidos por una línea transversal en la parte superior indican que éstos son gemelos. El caso índice se indica con una flecha, y éste no tiene necesariamente que estar afectado, sino que puede que simplemente consulte por la presencia de antecedentes familiares. El símbolo + indica que es portador de la variante patogénica, mientras que el símbolo – se refiere a no portador. Los pequeños círculos hacen referencia a que el paciente está pendiente del estudio genético (**fig. 31**).

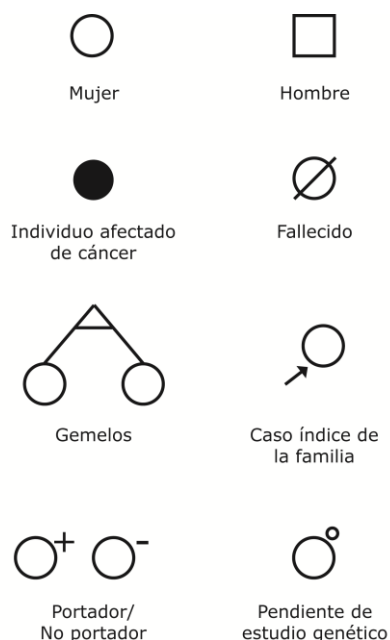


Figura 31. Simbología empleada en la configuración de los árboles genealógicos.

11. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS VARIANTES

Con el objeto de conocer si las mutaciones encontradas se habían descrito previamente y conocer su significado patogénico se utilizaron las bases de datos:

a) *The Breast Cancer Information Core* (BIC) (www.research.nhgri.nih.gov/bic/). Base de datos que se utiliza como referente en la búsqueda de información de las distintas variantes en *BRCA1* y *BRCA2*. Según su efecto fisiopatológico, clasifica las variantes como clínicamente importante, desconocido o clínicamente no importante.

b) *Human Gene Mutation Database* (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Existe información sobre gran cantidad de enfermedades hereditarias. Nos permite conocer citas bibliográficas de cada variante, analiza las propiedades biofísicas de los aminoácidos sustituidos, realiza análisis de conservación (PSI-BLAST) y calcula predicciones de algunos estudios *in silico* (SIFT y MutPred).

c) *Leiden Open Variation Database* (LOVD) (<http://BRCA.iarc.fr/LOVD/>). Tiene información sobre una gran cantidad de genes. Importante información sobre citas bibliográficas y nos permite conocer la clasificación IARC propuesta por Plon y col. [351].

d) *Universal Mutation Database* (UMD) (<http://www.umd.be/BRCA1/> y <http://www.umd.be/BRCA2/>). Base de datos con información de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Nos indica las propiedades biofísicas de los aminoácidos sustituidos, análisis de algunos programas *in silico*, la existencia de co-ocurrencia en trans con otras mutaciones patogénicas y citas bibliográficas de la variante en cuestión.

e) *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Plataforma pública estadounidense referente mundial en información biomédica y genómica, tiene gran cantidad de bases de datos según la información y características de la búsqueda. Utilizamos la base de datos *dbSNP* (repositorio central tanto para sustituciones como pequeñas eliminaciones e inserciones de bases de nucleótidos únicos) para obtener información sobre el posible efecto fisiopatológico de la variante y de su

frecuencia en población europea (a través de la información de *Haplotype Map*; *HapMap*).

f) *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Nos permite obtener importante información genómica, genética, filogenética, fenotípica, bibliográfica y de su frecuencia en distintas poblaciones de las variantes. Obtuvimos información de la frecuencia en población europea (*HapMap*), aunque en algunos casos también dispone de datos en población ibérica.

Tras la búsqueda exhaustiva en todas estas bases de datos, clasificamos las variantes de la siguiente manera (ver algoritmo en **fig. 32**):

- **Variantes patogénicas:** serían aquellas variantes con información contrastada de su patogenicidad en las distintas bases de datos, aquellas de nueva descripción que causan un codón de parada prematuro y truncamiento de la proteína o aquellas variantes con un nivel IARC = 5.
- **Variantes probablemente patogénicas:** Aquellas a las que se le conoce un nivel IARC = 4.
- **Variantes de efecto clínico desconocido (UV):** Aquellas variantes clasificadas con un nivel IARC = 3, o bien, se desconoce todavía su clasificación por falta de estudios que lo corroboren y, además, que no cumplan los criterios de probabilidad de no patogenicidad propuestos.
- **Variantes probablemente no patogénicas:** Aquellas variantes clasificadas con un nivel IARC = 2 o, en su defecto, que cumplan alguno de los siguientes criterios de probabilidad de no patogenicidad:
 - a) Variantes descritas en Deffenbaugh (2002) [425], o Tavtigian (2005) [408] o descritas en *trans* con alguna mutación deletérea en el mismo gen del mismo individuo.
 - b) Variantes consideradas neutras usando métodos de probabilidad multifactoriales, utilizando el punto de corte recomendado de 100:1 a favor de neutralidad (Goldgar 2004 [426] y Chevenix-Trench 2006 [348]).

- **Variantes no patogénicas:** Entrarían las variantes de poca frecuencia alélica con un nivel IARC = 1 y los polimorfismos (aquellas variantes presentes en nuestra población, en población española según Díez y col. [333] o registrada en *HapMap* con una frecuencia alélica $\geq 1\%$).

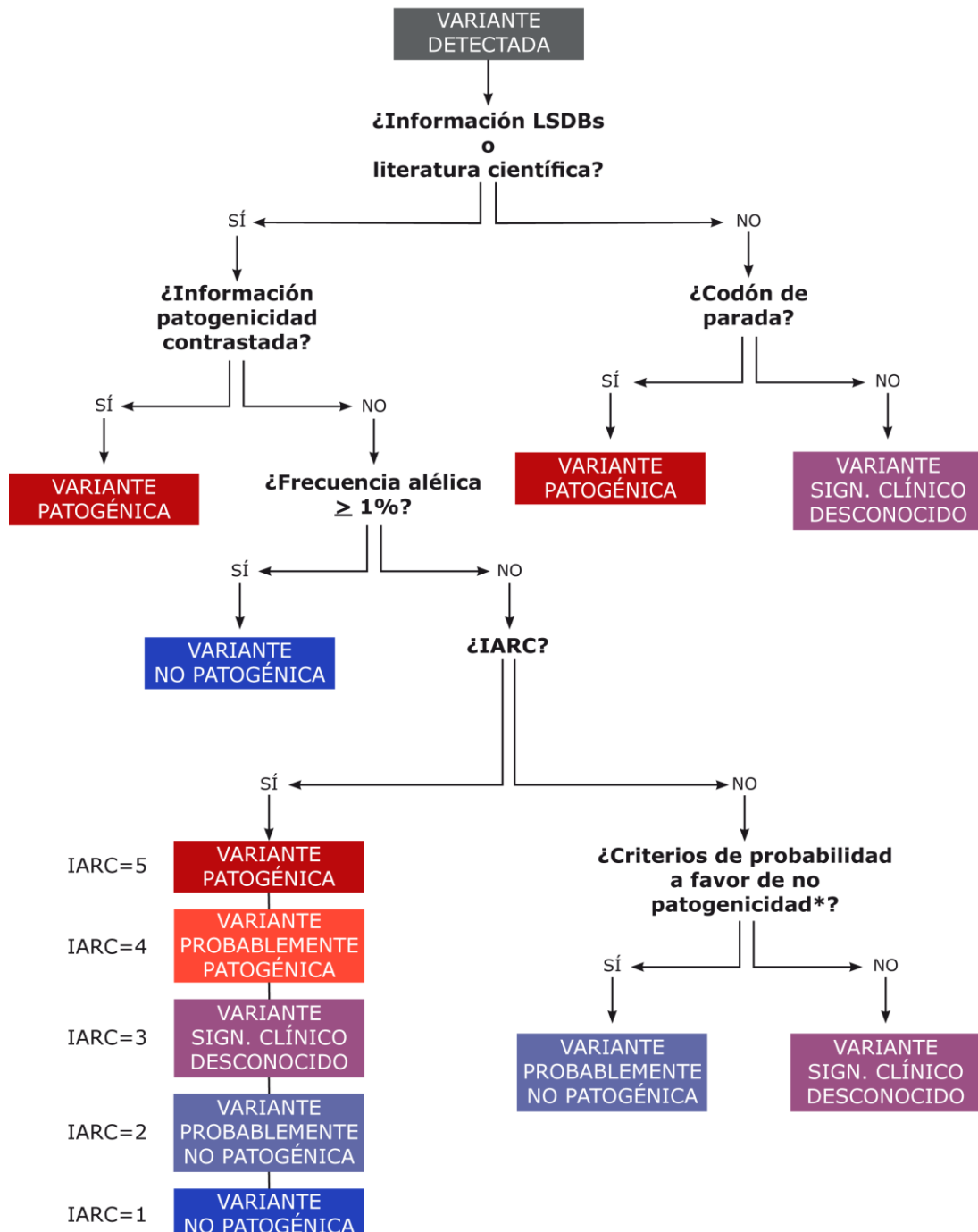


Figura 32. Algoritmo seguido en nuestro estudio para la clasificación de las variantes detectadas.

LSDBs: Locus Specific Databases, bases de datos.

*Criterios propuestos: a) descritas en Deffenbauch (2002) [425], Tavtigian (2005) [408] o en *trans.*; b) Punto de corte 1:100 a favor de neutralidad según Goldgar (2004) [426] o Chevenix-Trench (2006) [348].

A todas las variantes de significado clínico desconocido (UVs) se les aplicaron análisis a través de herramientas bioinformáticas (estudios *in silico*), para poder predecir el efecto de estas variantes sobre la proteína. Se realizaron estudios en las propiedades de los aminoácidos sustituidos (*Grantham matrix score*), de análisis de la conservación interespecífica y las características biofísicas de los aminoácidos sustituidos (*Align-GVGD*), de predicción del efecto patógeno de las variantes *missense* (*SIFT*, *Pmut*, *Polyphen-2*), de predicción de forma teórica del efecto de las variantes en el *splicing* (*SpliceSiteFinder*, *MaxEntScan (MES)* y *NNSPLICE*, a través del soporte informático *Alamut*) y de estudios conjuntos de los factores anteriores (*Mutation Taster*).

11.1 Análisis *in silico*

Grantham matrix score (GMS)

Decidimos dicotomizar como punto de corte 60, como han aplicado otros estudios [427].

Align-Grantham Variation Grantham Deviation (Align-GVGD)

Los alineamientos se calcularon en función de la especie de máxima profundidad de alineamiento: el erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*). Clasifica las variantes en función del grado de conservación: clase C0 (no conservado), C25, C35, C45, C55 ó C65 (muy conservado).

Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)

Utilizamos la versión de *SIFT* llamada *SIFT single protein tools*, la cual ofrece predicciones detalladas para una única proteína y sus sustituciones. Introdujimos las secuencias a comparar en formato *Blink*, que se basa en el análisis de una sola proteína y acepta como entrada el número identificador GI de la proteína proporcionado por la base de datos *protein* de la NCBI. Determinamos el parámetro *best BLAST hits*, para asegurarnos el alineamiento con secuencias de organismos ortólogos; excepto en las predicciones con avisos de baja confianza; donde aplicamos *all BLAST hits*, y si el problema persistió dirigimos la búsqueda a bases de datos más grandes (*SIFT Sequence*), donde introdujimos la proteína en formato FASTA, como así se recomienda

[428]. El sistema elimina por defecto las secuencias más de un 90% idénticas entre sí. *SIFT* considera variantes no toleradas (patógenas) a puntuaciones $<0,05$.

Polymorphism Phenotyping v2 (Polyphen-2)

Se introdujo manualmente el identificador de la proteína (*BRCA1* o *BRCA2*) de la base de datos *UniProtKB*, el codón donde se produce la variación y, el cambio de aminoácido producido. Las mutaciones son catalogadas como benignas ($<0,452$), posiblemente dañinas ($0,453-0,956$) o probablemente dañinas ($0,957-1,000$).

Mutation Taster

En el programa informático se introdujo la identificación del transcrito para *BRCA1* o *BRCA2* según la base de datos *Ensembl* y, a continuación, el cambio a estudiar. *Mutation Taster* clasifica la variante en polimorfismo o patogénico. Si la probabilidad es menor de 0,5, la variante se clasifica como polimorfismo y de la otra manera como patógena. Además de la actual clasificación, *Mutation Taster* da también el valor p.

pMut

A través de la página de internet del programa bioinformático, introdujimos el código *SwissProt* de la proteína *BRCA1* o *BRCA2* y las posiciones de las variantes que estudiamos. El alineamiento de secuencias múltiples se realizó a partir de PSI-BLAST. Los resultados llegan al correo electrónico referenciado y, éstos pueden ser patológicos ($>0,5$) o neutrales ($\leq 0,5$) para la variante estudiada.

Alamut (versión 2.3)

En el análisis bioinformático hemos utilizado los algoritmos de predicciones del *splicing* en las UVs y no sólo en las variantes intrónicas, sino también en las variantes silentes y variantes *missense*, puesto que el proceso de empalme podría verse afectado también en estas últimas, especialmente cuando se forman secuencias de dinucleótidos de AG o GT. Tuvimos en cuenta la predicción cuando dos o más programas mostraron resultados similares, para poder asegurarnos de una mayor exactitud en la predicción del efecto sobre el *splicing* [429].

Tabla 16. Resumen de las herramientas bioinformáticas utilizadas en la predicción patógena de las UVs.

Método	Tipo de variantes analizadas	Algoritmo	Predicción
Grantham matrix score (GMS)	<i>missense</i>	Propiedades de aminoácidos sustituidos	Efecto patógeno de las variantes <i>missense</i>
Align-GVGD	<i>missense</i>	Análisis de conservación	
SIFT	<i>missense</i>	Análisis de conservación	
Poliphen-2	<i>missense</i>	Métodos bayesianos	
pMut	<i>missense</i>	Redes Neuronales Artificiales	
MutationTaster	Intrónicas, silentes y <i>missense</i>	Métodos bayesianos	Efecto patógeno de las variantes <i>missense</i> y en el <i>splicing</i>
Splice Site Finder	Intrónicas, silentes y <i>missense</i>	Tablas de peso de nucleótidos	Efecto de las variantes en el <i>splicing</i>
NNSplice	Intrónicas, silentes y <i>missense</i>	Redes Neuronales Artificiales	
MaxEntScan	Intrónicas, silentes y <i>missense</i>	Principio de máxima entropía	

12. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Las variables cuantitativas con una distribución normal se describieron mediante la media y la desviación típica. Mientras que las variables cuantitativas que no siguieron una distribución normal se describieron mediante mediana y rango. Las variables cualitativas se presentaron en forma de tabla incluyendo las frecuencias relativas y absolutas.

Las condiciones de aplicación de los análisis estadísticos se verificaron previamente a los mismos. La normalidad se contrastó mediante el test de Kolmogorov–Smirnov y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene. En caso de incumplimiento de alguna de las condiciones se procedió al análisis mediante pruebas no paramétricas.

La homogeneidad de la población con respecto a variables demográficas, antecedentes médicos y otros parámetros clínicos se analizó basalmente. Para las variables cuantitativas se desarrollaron comparaciones de pruebas no paramétricas de U-Mann-Whitney entre los dos brazos de estudio. En el caso de las variables cualitativas se compararon mediante el test exacto de Fisher o test de chi-cuadrado de Pearson (χ^2), según requerimientos del número de casos.

En todos los estudios, las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de p asociado a la prueba estadística de contraste era menor de 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v 15.0.



Resultados

1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

De los 396 casos índice a los que se le hizo el estudio genético, 19 (4,8%) procedieron del Hospital Universitario Morales Meseguer y, el resto, fueron reclutados en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

La distribución según el tipo de cáncer diagnosticado de los casos índices viene indicada en la **figura 33**; y las características clínicas de los CM y los cánceres de ovario diagnosticados vienen descritos en la **tabla 17**.

De todos los casos, según los criterios de selección de pacientes de la SEOM, 265 (66,9%) fueron clasificados como alto riesgo, 41 (10,4%) de moderado riesgo y a 71 se les consideró sin riesgo (17,9%) (19 casos, el 4,8%, no pudieron clasificarse por falta de información de los antecedentes familiares del caso índice). En total, 70 (17,7%) tuvieron una variante patogénica en *BRCA1/2* tras el estudio genético.

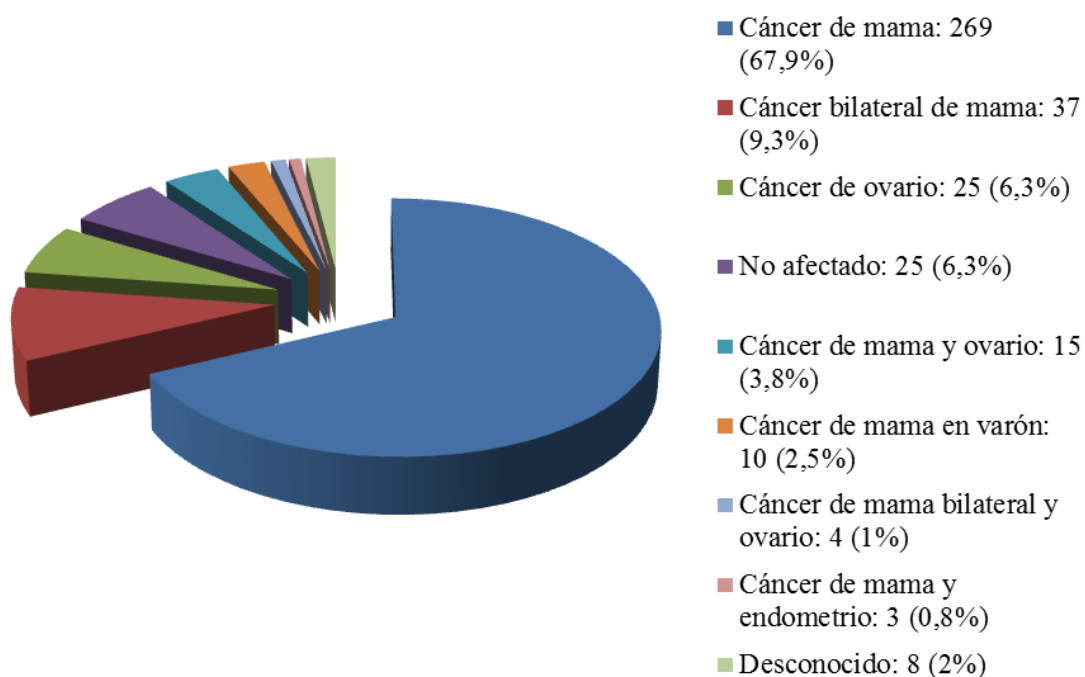


Figura 33. Distribución según el tipo de cáncer de los casos índice de nuestro estudio.

Tabla 17. Características clínicas de los cánceres de mama y cánceres de ovario diagnosticados en nuestro estudio*.

Cáncer de mama		Cáncer de ovario	
Año de diagnóstico (%)		Año de diagnóstico (%)	
Media	43,28 ± 10,86 años	Media	49,42 ± 14,58 años
< 40 años	151 (38,1)	< 50 años	22 (5,6)
> 40 años	178 (44,9)	> 50 años	23 (5,8)
Tipo Cáncer de mama (%)		Co-afectación (%)	
CM unilaterales	297 (87,87)	Cáncer de ovario	25 (56,82)
CM bilaterales	41 (12,13)	Cáncer de ovario y mama	19 (43,18)
Subtipo histológico (%)		Subtipo histológico (%)	
Ductal	249 (62,9)	Seroso	15 (51,72)
Lobulillar	15 (3,8)	Mucinoso	6 (20,69)
Medular	14 (3,5)	Endometroide	5 (17,24)
Coloide	2 (0,5)	Células claras	1 (3,45)
Filoides	1 (0,3)	Transicional	1 (3,45)
Papilar	1 (0,3)	Origen mulleriano	1 (3,45)
Estadío (%)		Estadío FIGO (%)	
0	10 (2,5)	I-A	6 (20)
I	60 (15,2)	I-B	1 (3,3)
II-A	73 (18,4)	I-C	4 (13,3)
II-B	45 (11,4)	II-A	1 (3,3)
III-A	30 (7,6)	II-B	0 (0)
III-B	18 (4,5)	II-C	2 (6,7)
IV	2 (0,5)	III-A	1 (3,3)
		III-B	2 (6,7)
		III-C	10 (33,3)
		IV	3 (10)

*algunos datos de cada parámetro no están disponibles

2 VARIANTES DETECTADAS EN *BRCA1* Y *BRCA2*

Tras el análisis en los genes de *BRCA1* y *BRCA2* de los 396 casos índice con criterios de riesgo de CMOH, se registraron un total de 162 variantes genéticas diferentes (160 mutaciones puntuales y 2 reordenamientos génicos) con la siguiente distribución, según la clasificación acorde a su efecto fisiopatológico (**tabla 18**):

Tabla 18. Variantes genéticas en *BRCA1* y *BRCA2* detectadas en nuestra población.

	Variantes Patogénicas	Variantes de significado clínico desconocido	Variantes probablemente no patogénicas y no patogénicas	
<i>BRCA1</i>	20 (12,35%)	11 (6,79%)	36 (22,22%) VPN: 1 (0,62%) VNP: 35 (16,05%)	67 (41,36%)
<i>BRCA2</i>	19 (11,72%) MP: 17 (10,49%) RG: 2 (1,23%)	33 (20,37%)	43 (26,54%) VPN: 5 (3,09%) VNP: 38 (20,37%)	95 (58,64%)
	39 (24,07%)	44 (27,16%)	79 (48,76%)	162 (100%)

MP: Mutaciones puntuales; RG: reordenamientos génicos

VPN: Variantes probablemente no patogénicas; VNP: Variantes no patogénicas

2.1 Mutaciones puntuales en *BRCA1* y *BRCA2*

2.1.1 Variantes patogénicas

Las variantes patogénicas son la causa principal del alto riesgo a cáncer de mama y/u ovario y las responsables de la aparición de la enfermedad. Antes de enumerar las mutaciones patogénicas encontradas, debemos aclarar que las variantes nuevas de cambio de fase de lectura o aparición de un codón de parada prematuro, al generar una proteína truncada, se han considerado como patogénicas. No se detectaron variantes probablemente patogénicas (IARC = 4) ni en *BRCA1* ni en *BRCA2*.

2.1.1.1 Variantes patogénicas en *BRCA1*

De las 67 mutaciones encontradas en *BRCA1*, 20 fueron consideradas patogénicas. De ellas, 16 ya estaban descritas en la bibliografía y 4 son de nueva descripción. En concreto, de las ya descritas, hay nueve mutaciones que cambian el marco de lectura por inserciones o pérdidas, cinco mutaciones que alteran el procesamiento del ARN, un cambio de aminoácido que es considerado patogénico y un cambio de nucleótido que da lugar a un codón de parada prematuro. Las cuatro mutaciones nuevas que describimos son dos que cambian el marco de lectura y dos con un cambio de nucleótido que da lugar a un codón de parada prematuro.

Para cada variante patogénica realizaremos un análisis molecular del cambio producido, una pequeña revisión de su distribución en otras regiones geográficas, una descripción de las familias portadoras y un estudio genotipo-fenotipo global de todas ellas. La relación de estas variantes en función del tipo de cambio se encuentra a continuación:

A. Variantes patogénicas tipo *frameshift*

- **c.68_69delAG**
- **c.70_73dup**
- **c.290_291delCA**
- **c.835delC**
- **c.1859delT**
- **c.1912_1912delG**
- **c.2285_2286delGA**
- **c.3331_3334delCAAG**
- **c.3583delC**
- **c.3770_3771delAG**
- **c.5263_5264insC**

B. Variantes patogénicas tipo *nonsense*

- **c.1612C>T**
- **c.1918C>T**
- **c.3280A>T**

C. Variantes patogénicas tipo *missense*

- **c.181T>G**

D. Variantes patogénicas que afectan al *splicing*

- **c.211A>G**
- **c.212+1G>A**
- **c.4357+1delG**
- **c.5123C>A**
- **c. 5277+1G>A**

En la **figura 34** se hallan representadas este tipo de variantes según su localización en el gen *BRCA1*.

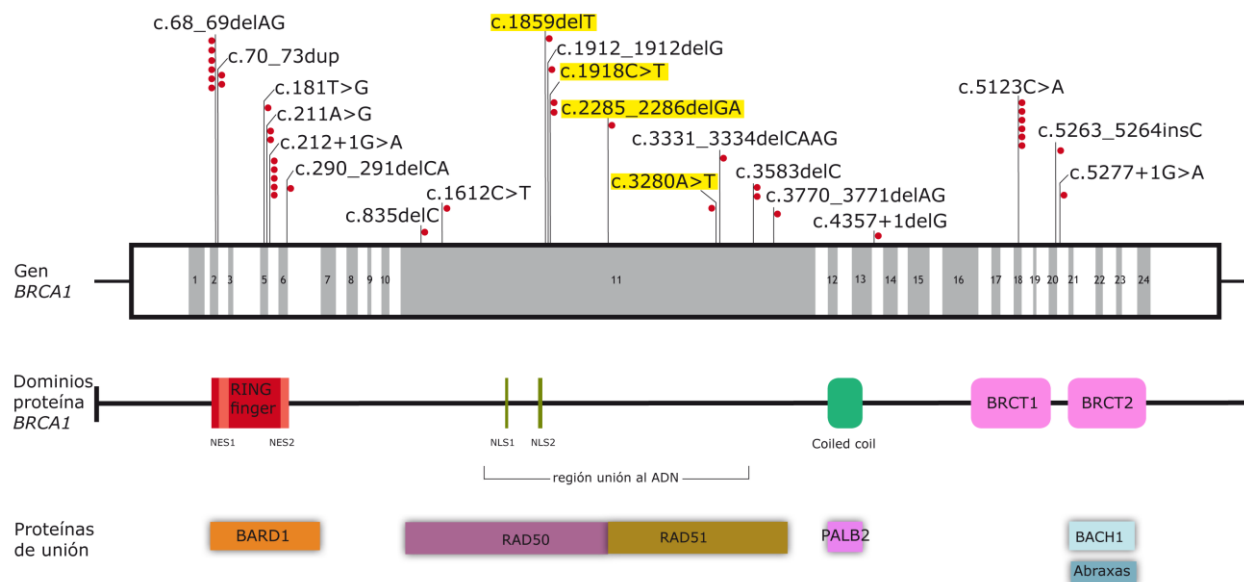


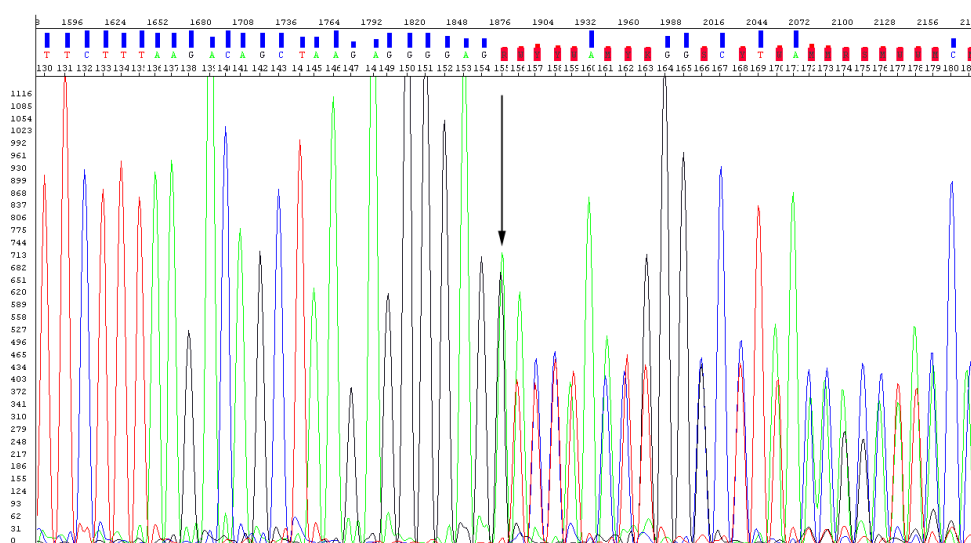
Figura 34. Variantes patogénicas detectadas en el gen *BRCA1*, junto con los dominios y proteínas de unión más importantes para su función.

El **círculo rojo** indica cada familia afectada por la variante; en **amarillo** se señalan las variantes patogénicas de nueva descripción en este estudio.

A. Cambios en el marco de lectura (*frameshift*)

Hemos encontrado once alteraciones que provocan un desfase del marco de lectura y dan lugar a un codón de parada prematuro (nueve pérdidas y dos inserciones). Por otro lado, todas las variantes de este grupo inducen la aparición de una proteína *BRCA1* truncada y no funcional, ya que carece de algunos de los dominios importantes para su actividad. Las características de estas mutaciones se detallan en la **tabla 19**.

A.



B.

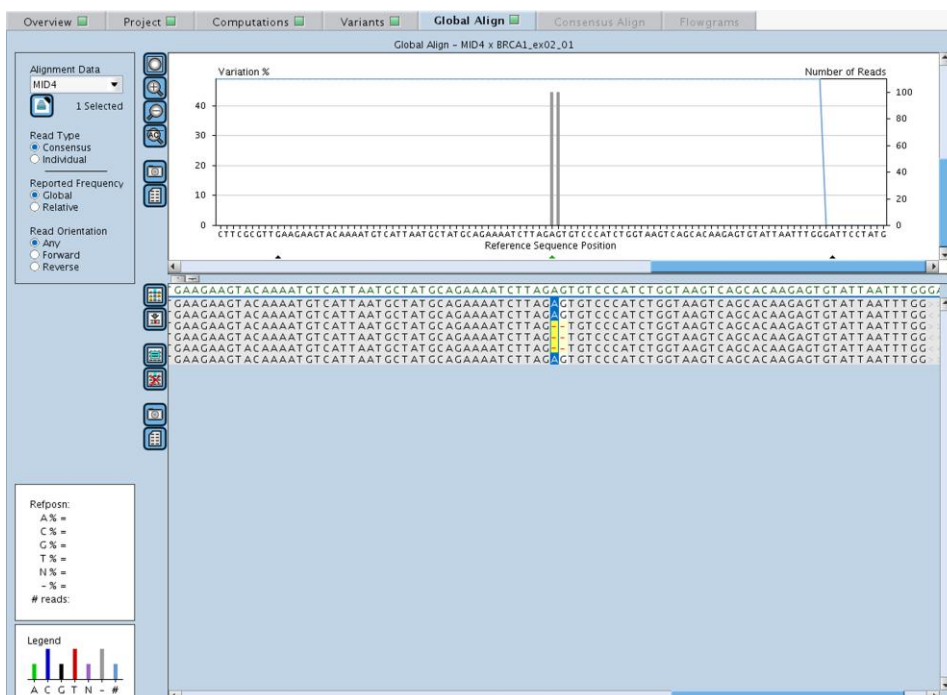


Figura 35. Cambio en el marco de lectura en *BRCA1* (variante c.68_69delAG). **A.** Electroferograma **B.** Alineamiento de lectura con el programa *Amplicon Variant Analyzer*.

Tabla 19. Variantes patogénicas que cambian el marco de lectura junto con las características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.

Exón/ Intrón	Cambio de ADNc	Cambio de proteína	Nº casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia†	Referencias
2	c.68_69delAG	p.Glu23Valfs*39	6	F34	bCMm(≤ 40)	bCM (≤ 40) + CM ≤ 40	Díez y col. 2003 [333] BIC
				F91	bCMm (≤ 40)	bCM (≤ 40)	
				F210	CM ≤ 40	CM ≤ 40	
				F252	CM	CM + CM ≤ 40	
				F288	CM ≤ 40	2CM + CO	
				F308	CO	2CO+CM	
2	c.70_73dup	p. Pro25Leufs*42	2	F209	bCMO (≤ 40)	bCMO (< 40) + CM < 40	Díez y col. 2003 [333] BIC
				F256	CM < 40	2CM < 40	
6	c.290_291delCA	p. Thr97fs*105	1	F94	bCMm	bCM	Bergman y col. 2005 [430] BIC
11	c.835delC	p.His279Metfs*297	1	F16	CM	4CM + CMO	BIC
11	c.1859delT	p.Ile620fs*625	1	F20	CO	2CO	No descrita
11	c.1912_1912delG	p.Glu638Asnfs*650	1	F407	CMO	CMO	Díez y col. 2003 [333] BIC
11	c.2285_2286 delGA	p.Arg762fs*766	1	F176	CM ≤ 40	CM ≤ 40 + CM	No descrita
11	c.3331_3334 delCAAG	p.Gln1111fs*1115	1	F153	bCM	bCM + CM	Durocher y col. 1996 [431] BIC
11	c.3583delC	p. His1195fs*1209	2	F63	CO	CO	Cardeñosa y col. 2008 [432] HGMD
				F322	CO	CO	
11	c.3770_3771 delAG	p.Glu1257fs*1265	1	F106	CMO	CMO + bCM	Takahashi y col. 1995 [433] BIC
20	c.5263_5264insC	p.Gln1756profs*1829	1	F304	CM	CM+ CM ≤ 40	Simard y col. 1994 [434] BIC

CM: Cáncer de mama; CM ≤ 40 : Cáncer de mama con un diagnóstico menor o igual a 40 años; bCM: Cáncer de mama bilateral; CO: Cáncer de ovario; bCMm: Cáncer de mama bilateral metacrónico; bCMs: Cáncer de mama bilateral sincrónico; bCMO: Cáncer bilateral y cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario.

† En las características del tipo de familia se tuvieron en cuenta el caso índice y sus familiares de primer y segundo grado.

c.68_69delAG

Se trata de una de las mutaciones más prevalentes en nuestra población de estudio, con 6 familias afectadas (8,57% de las familias *BRCA*+ y 15,38% de las familias *BRCA1*+). Esta mutación *frameshift* ocurre en el codón 23, exón 2, y provoca la creación de un codón de parada en la posición 39. Esta alteración conduce a la terminación prematura de la traducción y el truncamiento de la proteína. Como consecuencia de producirse al inicio del gen, se perdería parte del dominio *RING* y dominios tan importantes para el funcionamiento de la proteína como la región de unión al ADN, el dominio *coiled coil* y los dominios *BRCT1* y *BRCT2*.

La mutación c.68_69delAG es una de las mutaciones fundadoras de los judíos Ashkenazi, y se ha encontrado con prevalencias significativas en todas las poblaciones excepto en la africana (2,2%-15,2%), encontrándose la más alta en poblaciones de Europa Central [435]. En España está presente en casi el 1,9% de las familias con alto/moderado riesgo de CMOH y estudios de haplotipo indican un origen común de la mutación española (sefardí) y la población judía Ashkenazi [436].

a) Descripción de las familias

- F34 (**fig. 36**): El caso índice (III:1) fue diagnosticado de cáncer de mama bilateral metacrónico a los 39 y 51 años de edad. El primer diagnóstico fue en la mama derecha con carcinoma ductal invasor (T2N1M0, receptores inmuohistoquímicos desconocidos) y la mama izquierda con carcinoma ductal invasor (triple negativo, receptor p53 + y ki67 >30%). Su tía paterna (II:3) tuvo cáncer de mama diagnosticado a los 65 años y su abuela también por la rama paterna fue diagnosticada de cáncer de mama a los 38 años. El caso índice ha tenido dos hijos varones en el que uno de ellos (IV:1) se comprobó que era portador de la mutación, mientras que el otro (IV:2) fue negativo.
- F91 (**fig. 37A**): El caso índice (II:11) fue diagnosticado de cáncer bilateral metacrónico a los 35 y 36 años de edad. El primer diagnóstico en la mama derecha se trató de un carcinoma ductal infiltrante (pT2pN0, triple negativo) y al año siguiente en la mama izquierda tuvo un carcinoma ductal infiltrante (pT1bpN1, triple negativo). No hubo más antecedentes familiares de cáncer

de mama y ovario, únicamente un cáncer de cabeza y cuello diagnosticado a los 68 años en su padre (I:1). Se les realizó el estudio genético a 5 hermanos, de los cuales 4 (II:3, II:7, II:9 y II:18) son portadores de la variante patogénica (dos de ellos son mujeres) y una mujer resultó ser negativa (II:13).

- F210 (**fig. 37B**): El caso índice (IV:4) fue diagnosticado de CM ductal infiltrante moderadamente diferenciado a los 40 años (pT4pN1Mx, RE+ 93%, RP+ 63%, HER2- y p53+ 18%). Tiene tres tías por parte materna (II:6, II:7 y II:14) afectadas con CM a los 40 años, un cáncer ginecológico a los 75 y un cáncer de mama a los 47 años (esta última siendo negativa para la variante patogénica). Se les ha realizado el estudio a un hermano (IV:5) (positivo), una hermana (IV:10) (negativo) y su padre (II:4) (positivo); todos ellos no afectados por ningún tipo de cáncer. Todo indica que dicha variante ha sido heredada por parte paterna.
- F252 (**fig. 37C**): Caso índice (III:7) diagnosticada de CM a los 42 años de edad (triple negativo, CK5 +, p53 +, ki67 70-80%). Tiene una prima hermana (III:2) con cáncer de mama a los 56 años también portadora de la variante. Su hermana (III:6) ha sido diagnosticada a los 37 años de cáncer de mama y otra prima hermana (III:5) a los 49 años también de CM. Su padre (II:3), su tío paterno (II:5) y su abuela paterna (I:2) han sido diagnosticados de cáncer de colon. Mientras que otro tío (II:2), también por parte del padre, fue diagnosticado de cáncer digestivo a los 68 años.
- F288 (**fig. 38A**): Caso índice (IV:2) diagnosticado a los 23 años de carcinoma ductal de mama en la mama izquierda (pT2pN2, RE+ 64%, RP+ 12%, Ki67+ 82%, y Her2-). Su madre (III:9) fue diagnosticada a los 44 años y es también portadora de la mutación. Su abuela materna (II:3) falleció a los 46 años diagnosticada de cáncer ginecológico a los 44 años. Además, la hermana de la madre del caso índice (III:7) falleció por CM a los 45 años. Tiene una tía (III:5) con test negativo para dicha variante y los tres hermanos restantes de la familia están pendientes de estudio.
- F308 (**fig. 38B**): Caso índice (II:13) diagnosticada a los 55 años de carcinoma seroso papilar de ovario (estadio IIIC). Su hermana (II:10) también es

portadora de la variante y fue diagnosticada de CM a los 61 años de edad. Además tiene tres hermanos más (II:5, II:6 y II:13) diagnosticados con cáncer de páncreas, pulmón y una carcinomatosis peritoneal de probable origen ovárico, respectivamente. Los demás hermanos no están afectados y están pendientes de estudio; además, de todos los hijos del caso índice y de sus hermanos afectados.

b) Estudios genotipo-fenotipo:

N° portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
17	8 (47)	41 (23-61)	2 (11,8)	1 (5,9)	55	0

Un estudio en 28 portadores ingleses que presentaban la mutación c.68_69delAG indicó que se trata de una variante de menor penetrancia en comparación con otras mutaciones en el mismo gen [437]: de los 28 pacientes portadores, 15 (56%) fueron diagnosticados de cáncer, y se estimó una mediana de edad de diagnóstico de cáncer de mama en 55 años. Este estudio estaría de acuerdo con la baja penetrancia detectada en nuestra población, aunque no así con la edad de diagnóstico.

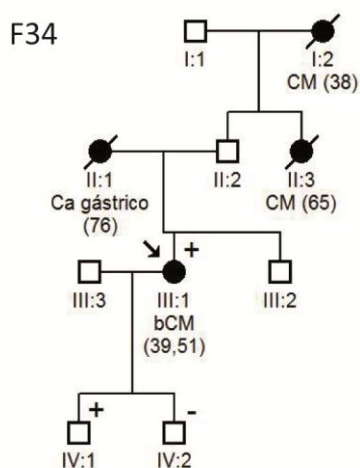


Figura 36. Árbol familiar de la familia F34 de casos portadores de la variante c.68_69delAG en *BRCA1*.

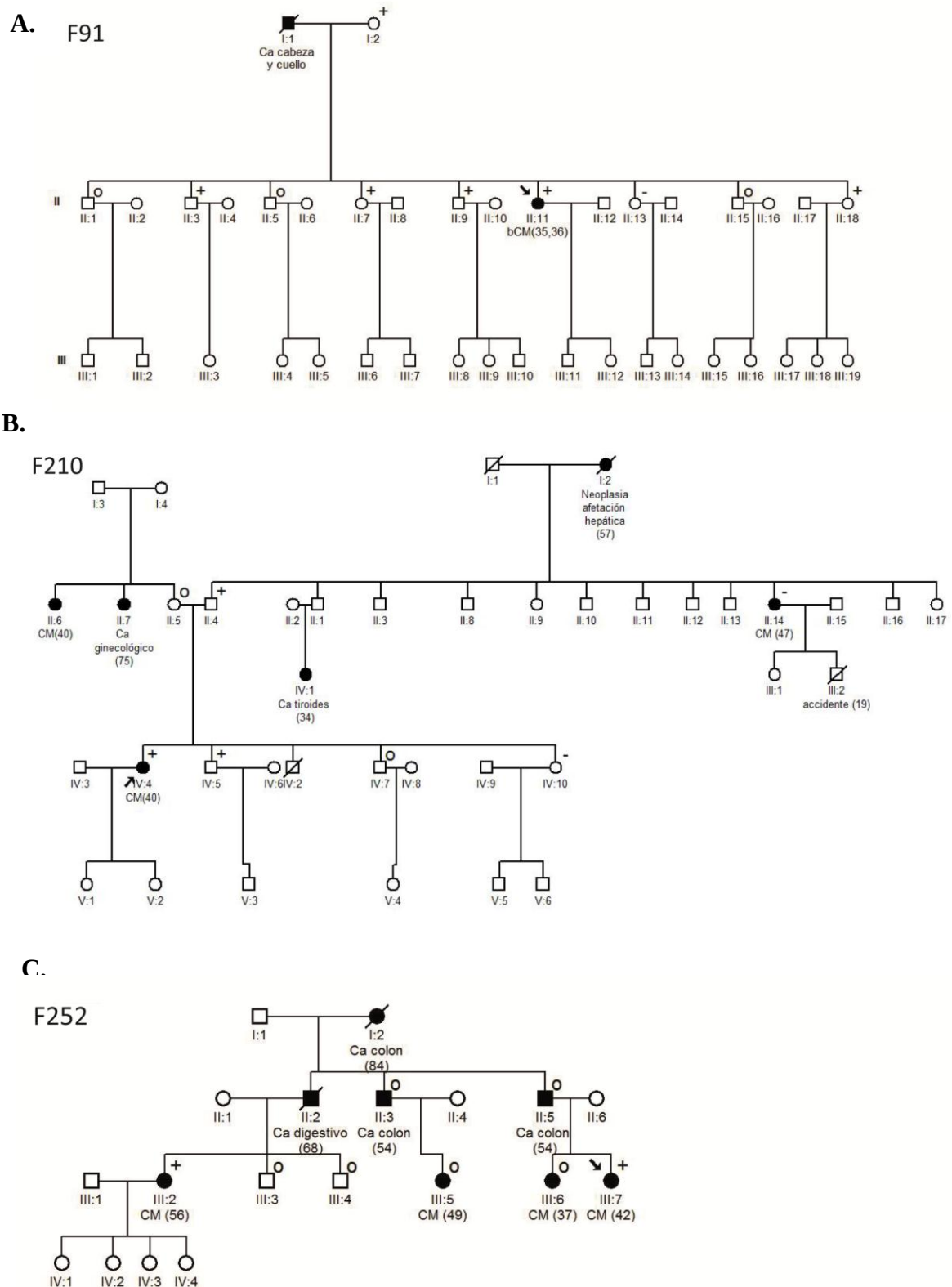
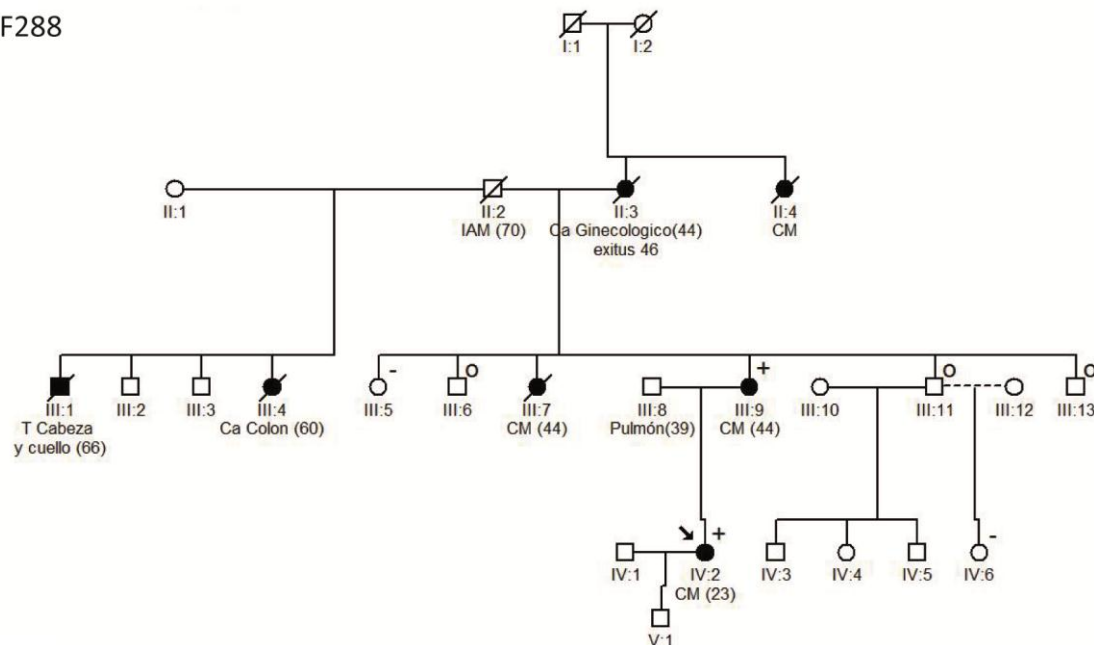


Figura 37. Árbol familiar de casos portadores de la variante c.68_69delAG en *BRCA1*. En **A** F91, en **B** F210 y en **C** F252.

A.

F288



B.

F308

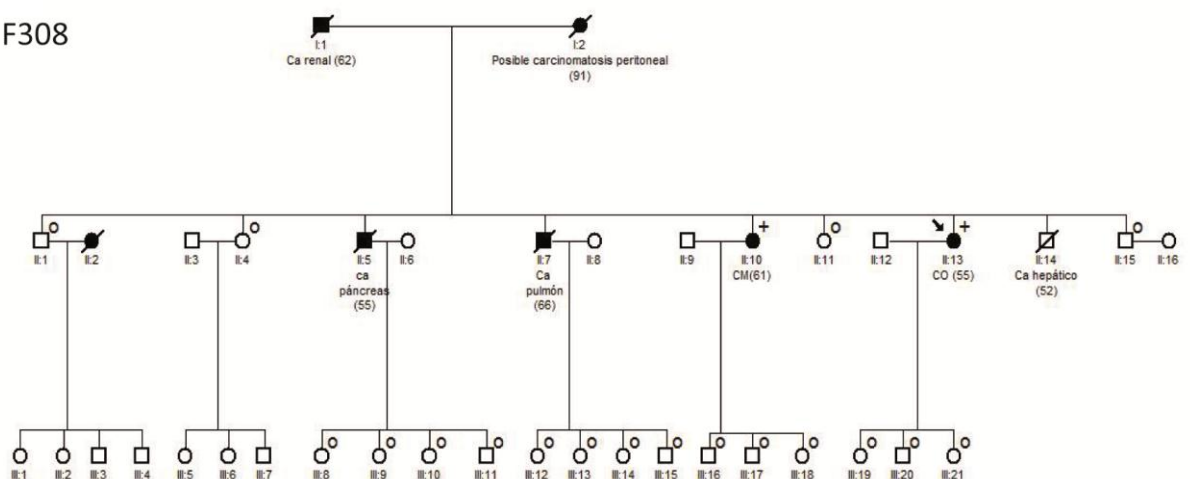


Figura 38. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.68_69delAG en *BRCA1*. En **A** F288 y en **B** F308.

c.70_73dup

Variante presente en 2 familias portadoras (2,86% de las familias *BRCA+* y 5,13% de las familias *BRCA1*). Esta variante se encuentra en el exón 2 del gen *BRCA1*, altera la pauta de lectura provocando en el codón 42 una parada prematura y provocando el truncamiento de la proteína. Al igual que la variante anterior, se verían

afectados todos los dominios importantes de la proteína: *RING*, la región de unión al ADN, *coiled coil* y ambos dominios *BRCT*.

Esta variante fue descrita por primera vez en 1997 en un estudio que relacionaba la diferencia fenotípica en dos gemelas portadoras de esta mutación [438]. Posteriormente se ha publicado en otros trabajos con mayor número de casos índice, como en Díez y col. (2003), considerándose una variante detectada únicamente en España [333]. Descrita en la base de datos BIC.

a) Descripción de las familias

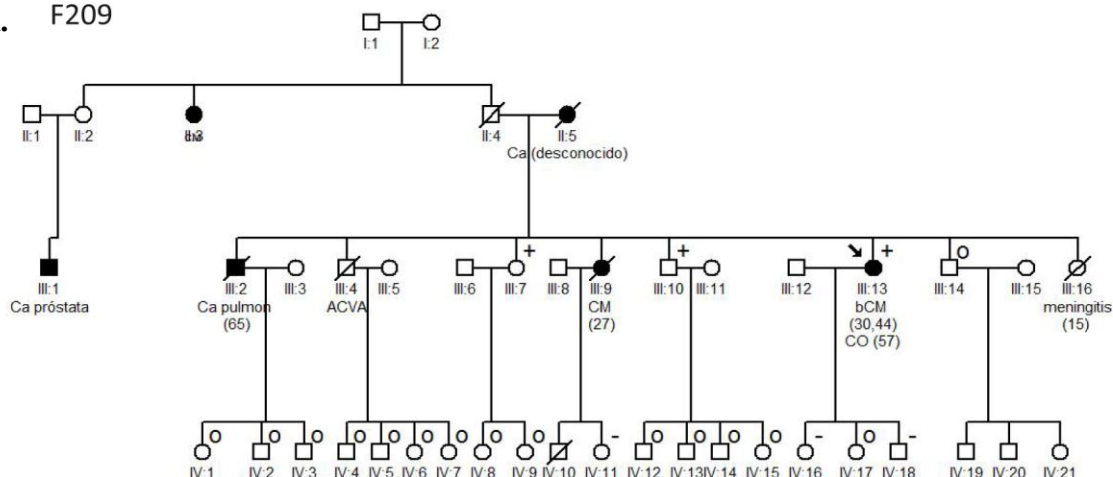
- F209 (**fig. 39A**): Caso índice (III:13) con cáncer bilateral metacrónico a los 30 y 44 años de edad y un cáncer ovárico a los 57. El primer tumor diagnosticado fue en la mama izquierda del tipo histológico medular atípico y sin afectación ganglionar (receptores inmunohistoquímicos desconocidos); posteriormente, en la mama derecha tuvo un carcinoma ductal infiltrante pobremente diferenciado también sin afectación ganglionar (RE+,RP-, Her-, p53<20%, Ki67<15%) y a nivel ovárico tuvo un adenocarcinoma pobremente diferenciado, de origen mulleriano. Tiene una hermana fallecida con un cáncer de mama diagnosticado a los 27 años y otro hermano también fallecido con cáncer de pulmón a los 65 años. A dos hermanos vivos (III:7 y III:10) se les realizó el cribado para dicha variante siendo positivos ambos y quedando pendiente de estudio otro hermano varón (III:14). Están pendientes de estudio la siguiente generación, menos dos casos (IV:11 y IV:16) que se ha comprobado que no son portadores de esta variante patogénica.
- F256 (**fig. 39B**): Caso índice (IV:3) con carcinoma ductal infiltrante en la mama izquierda moderadamente diferenciado (pT1bpN0, triple negativo). Su madre (III:3) fue diagnosticada a los 39 años de CM y su abuela por parte paterna (II:2) también de CM a los 65 años. Tiene una prima hermana (IV:1) con CM a los 33 años.

b) Estudios genotipo-fenotipo:

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
5	2 (40)	45,5 (33-58)	1 (20)	0	-	0

El trabajo de Díez y col. [333], encontró esta variante mayoritariamente en cánceres de mama menores de 50 años (5 pacientes frente a una paciente con edad mayor de 50 años).

A. F209



B. F256

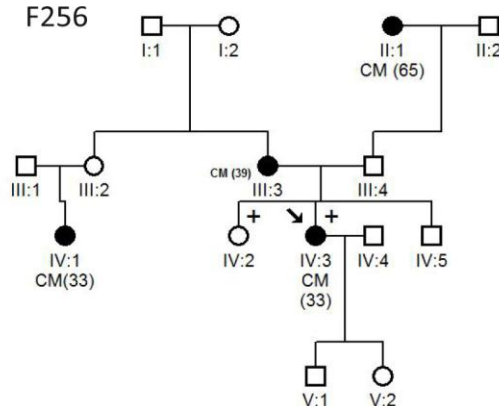


Figura 39. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.70_73dup en *BRCA1*. En A F209 y en B F256.

c.290_291delCA

Mutación presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 2,56% de las familias *BRCA1*+), situada en el exón 6 del gen *BRCA1*. Provoca una parada prematura en el codón 105 de la proteína. En esta posición el dominio *RING* no se vería afectado; pero, en cambio, los demás dominios que permiten desempeñar la función como reparador de ADN no estarían en la proteína transcrita truncada.

Fue descrita por primera vez en un estudio poblacional en la región oeste de Suecia [430], donde se concluyó que era una mutación única en esta población. No hay más publicaciones que evidencien la presencia de dicha variante. Ha sido descrita en las bases de datos *BIC* y *HGMD*.

a) Descripción de las familias

- F94 (**fig. 40**): Caso índice (III:5) con cáncer de mama bilateral. A los 30 años tuvo un carcinoma medular en la mama izquierda (T2N0MX; RE-, RP+ en un 25%, Ki67 de un 75% y *Cerb2* + débil), y a los 39 se le diagnosticó un carcinoma ductal infiltrante en la mama contralateral (pT1cN0; RE+ 40%, RP+ 95%, Ki67 45%, p53+ 95%, *Bcl2* + 64%). Su padre (II:3) fue diagnosticado de cáncer de recto a los 63 años y su abuela paterna de cáncer ginecológico a los 59. A dos hermanos del caso índice (III:3 y III:9) se le ha comprobado que son portadores de esta variante patogénica, mientras que los otros tres hermanos (III:1, III:7 y III:8) son negativos; todos ellos no están afectados por ningún tipo de cáncer.

b) Estudios genotipo-fenotipo:

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
3	1 (33,3)	30	1 (33,3)	0	-	0

No se han encontrado estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica.

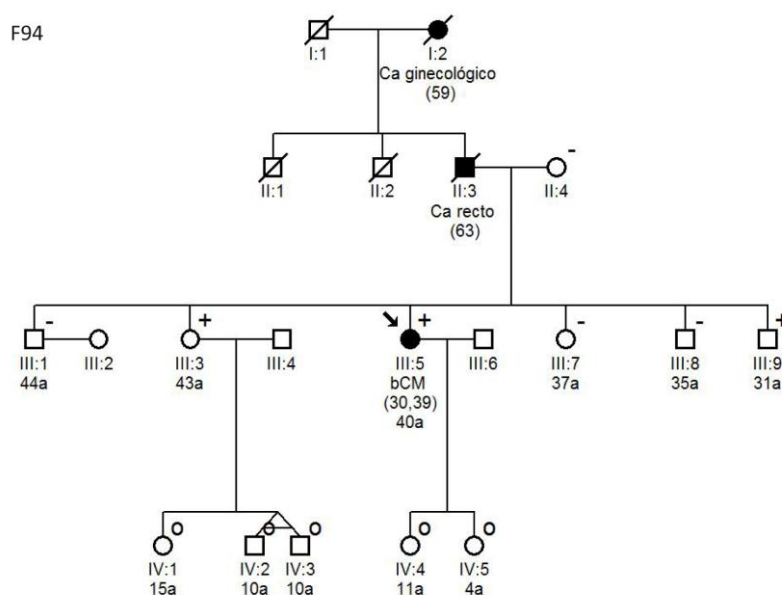


Figura 40. Árbol familiar de casos portadores de la variante c.290_291delCA en *BRCA1*.

c.835delC

Variante presente en dos familias no relacionadas (2,86% de las familias *BRCA+* y 5,13% de las familias *BRCA1*), situada en el exón 11 de *BRCA1*. Provoca una parada prematura en el codón 297 de la proteína. Al igual que la variante anterior, menos el dominio *RING* todos los demás dominios no se traducirían, creándose una proteína truncada no funcional.

Ha sido descrita en estudios de población española [439]. Se encuentra en la base de datos *BIC* y *HGMD*.

a) Descripción de las familias

- F16 (**fig. 41**): Caso índice (II:4) con carcinoma de mama ductal invasor a los 41 años (T2N0; RE+, RP- y Her2-). Su madre (I:2) fue diagnosticada de cáncer de mama a los 63 años. Tiene dos hermanas portadoras de la mutación (II:2 y II:8) y un hermano es negativo (II:6). La hija de su hermana mayor (III:1) también ha resultado ser portadora.

b) Estudios genotipo-fenotipo:

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
4	1 (25)	41	0	0	-	0

No se han encontrado estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica.

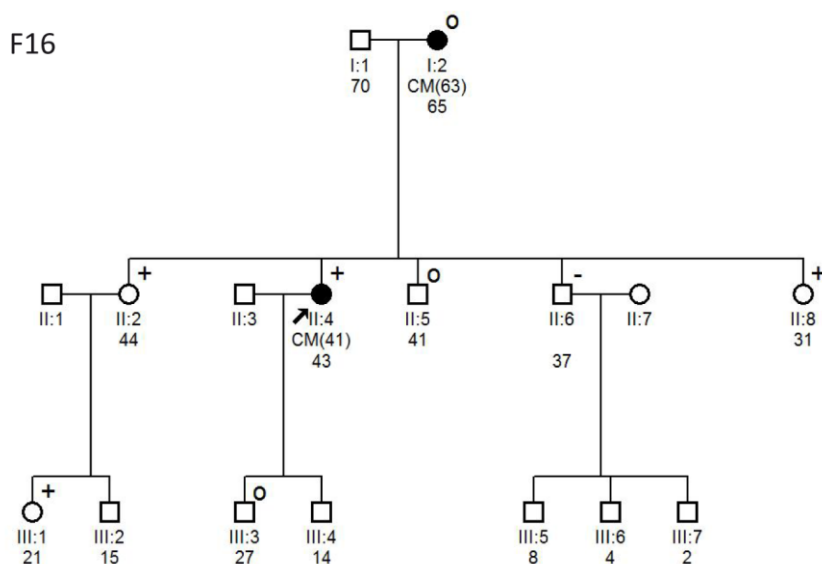


Figura 41. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.835delC en *BRCA1*.

c.1859delT

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 2,56% de las familias *BRCA1*+), situada en el exón 11 de *BRCA1*. Provoca una parada prematura en el codón 625 de la proteína. Esta parada de la traducción se produciría al comienzo de la región de unión al ADN y no se transcribirían los dominios *coiled coil* y ambos *BRCT*.

Esta variante no se ha identificado en ninguna base de datos ni ha sido publicada, por lo que podemos afirmar que es una mutación no descrita. Puesto que da lugar a un codón de parada prematuro y a una proteína no funcional, la consideramos una variante patogénica.

a) Descripción de las familias

- F20 (**fig. 42**): Caso índice (V:1) con carcinoma medular de mama (pT2pN0M0; triple negativo, Ki67 <30%) diagnosticado a los 23 años. Su abuela (III:7) fue diagnosticada de cáncer de ovario a los 60 años. Tiene dos tíos (III:4 y III:5) afectados con cáncer de colon a los 63 años y CM a los 74, respectivamente. Tiene más antecedentes familiares (II:5, III:1, III:2 y III:3) de cáncer de próstata y laringe, cáncer gástrico y dos cánceres de ovario.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
2	1 (50)	23	0	0	-	0

De los dos portadores de la variante patogénica de nueva descripción c.1859delT, uno ha sido diagnosticado de CM a los 23 años.

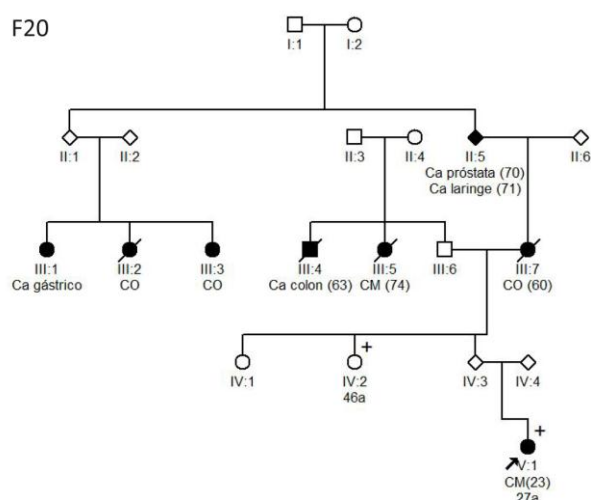


Figura 42. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.1859delT en *BRCA1*.

c.1912_1912delG

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 2,56% de las familias *BRCA1+*), situada en el exón 11 de *BRCA1*. Provoca una parada prematura en el codón 650 de la proteína. Al igual que la variante anterior, se verían afectados la región de unión al ADN y los dominios *coiled coil* y *BRCTs*.

Fue descrita por primera vez en dos familias en el trabajo publicado por Díez y col. (2003) [333] y, posteriormente, se han publicado en otros estudios de familias españolas [335;440]. Por lo que, hasta la fecha, podemos aseverar que se trata de una variante patogénica única en España.

a) Descripción de las familias

- F407 (**fig. 43**): Caso índice (IV:4) diagnosticado de cáncer de mama y ovario a los 40 y 51 años, respectivamente. Tiene una tía (II:5) diagnosticada de CM a los 60 años. Se le ha realizado el estudio a dos hermanos (IV:1 y IV:2), siendo el primero portador y el segundo no portador; y a dos hermanas (IV:3 y IV:5), siendo las dos portadoras de la variante patogénica.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	40	0	1 (100)	51	1 (100)

En el estudio de Díez y col. (2003) [333], de los 8 pacientes portadores y afectados por algún tipo de cáncer: 4 fueron por CM (3 de ellos con una edad de diagnóstico mayor de 50 años) y 4 tuvieron cáncer de ovario.

F407

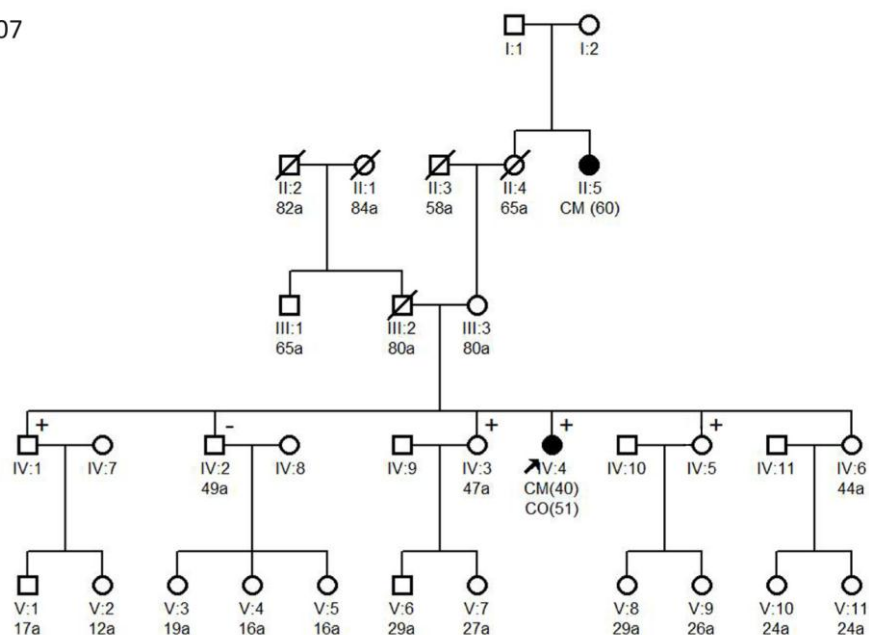


Figura 43. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.1912_1912delG en *BRCA1*.

c.2285_2286delGA

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 2,56% de las familias *BRCA1*+) situada en el exón 11 de *BRCA1*. Provoca una parada prematura en el codón 766 de la proteína. La proteína no sería funcional ya que se verían afectados la región de unión al ADN, el dominio *coiled coil* y los dominios *BRCT*.

Esta variante no se ha identificado en ninguna base de datos ni ha sido publicada, por lo que podemos afirmar que es una mutación no descrita previamente. Puesto que da lugar a un codón de parada prematuro y a una proteína no funcional se ha considerado una variante patogénica.

a) Descripción de las familias

- F176 (**fig. 44**): Caso índice (II:1) carcinoma ductal infiltrante (T1N1; RE+, RP+, Her+) diagnosticado a los 28 años. Únicamente se conoce de esta familia que su madre fue diagnosticada de cáncer de mama a los 42 años.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	28	0	0	-	0

Tan sólo un portador de la variante patogénica de nueva descripción c.2285_2286delGA ha sido detectado, fue diagnosticado de CM a los 28 años.

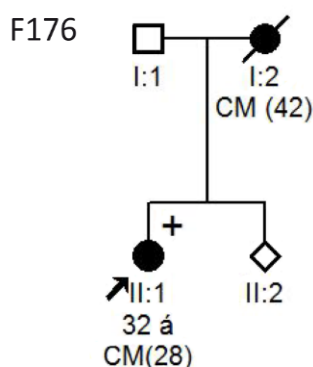


Figura 44. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.2285_2286delGA en *BRCA1*.

c.3331_3334delCAAG

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 2,56% de las familias *BRCA1*+) situada en el exón 11 de *BRCA1*. Provoca una parada prematura en el codón 1115 de la proteína. La proteína se sintetizaría sin los dominios más importantes para la función reparadora: los dominios *BRCT*.

Fue descrita por primera vez en 1996 en una familia canadiense [431] y, posteriormente, en poblaciones de todas partes del mundo. Más recientemente, un análisis de haplotipo realizado en las poblaciones hispanas que viven en Colombia, sugiere que esta mutación ha surgido a partir de un antepasado común y que podría representar un efecto fundador de origen español [441]. En España, se ha encontrado esta variante de una manera recurrente en familias asturianas [442]. También se ha detectado en la Comunidad Valenciana [443;444].

a) Descripción de las familias

- F153 (**fig. 45**): Caso índice (II:7) con cáncer de mama bilateral metacrónico. Inicialmente carcinoma ductal infiltrante (T1N0; RE-, RP-, Cerb2-, Ki67+ 60%, p53+ 100%) en la mama izquierda a los 39 años de edad y otro carcinoma ductal infiltrante (RE+, RP-, Her2-) en la mama derecha a los 48 años de edad. Además fue diagnosticada de carcinoma uterino. Su madre (I:2) falleció por tumor cerebral. Tiene una hermana (II:3) portadora con CM diagnosticada a los 49 años, otra hermana (II:1) fallecida a 54 años por cáncer de páncreas, una hermana (II:5) fallecida por sarcoma óseo a los 42 años, un hermano (II:4) fallecido por EPOC, un hermano (II:8) fallecido a los 46 años por cirrosis hepática y un hermano (II:9) sano pendiente de estudio. Los hijos del caso índice (III:2 y III:3) han sido negativos para la variante.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
2	2 (100)	44 (39-49)	1(50)	0	-	0

Los cinco portadores de esta mutación estudiados en el trabajo de Torres y col. (2007) [441], tuvieron una edad mediana de diagnóstico del CM de 45 (37-55) años. De ellos, un caso fue cáncer bilateral y dos casos fueron cáncer de mama y ovario.

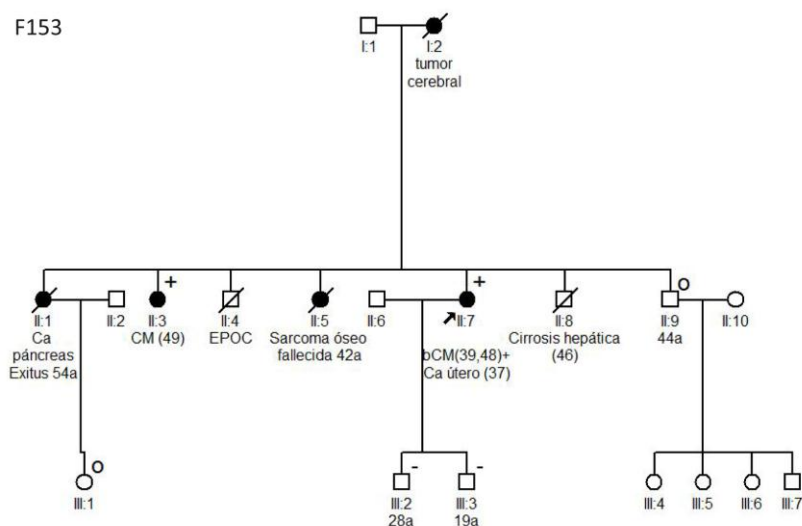


Figura 45. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.3331_3334delCAAG en *BRCA1*.

c.3583delC

Variante presente en dos familias (2,86% de las familias *BRCA+* y 5,13% de las familias *BRCA1+*), situada en el exón 11 de *BRCA1*. Cambio de la pauta de lectura hasta que se provoca una parada prematura en el codón 1209 de la proteína. Dejaría a la proteína sin ningún dominio *BRCT*, afectándose sobre todo la función reparadora de ADN de la proteína.

Variante descrita por primera vez en la Comunidad Valenciana [432]. No hay constancia de más casos descritos con esta variante. Se encuentra registrada en la base de datos *HGMD*.

a) Descripción de las familias

- F63 (**fig. 46A**): Caso índice (I:2) con un carcinoma seroso papilar en el ovario derecho diagnosticado a los 75 años. Se desconocen más familiares afectados. La portadora tiene una hija (II:1) pendiente de estudio.

- F322 (**fig. 46B**): Caso índice (II:10) con carcinoma seroso ovárico en anejo izquierdo (estadio III-B), fue diagnosticado a los 42 años. Tiene hermana (II:6) portadora de la variante patogénica que no está afectada. Se les hizo el estudio a dos hijas (III:14 y III:15), siendo una positiva (con 25 años) y otra negativa (con 19 años) para dicha variante.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
3	0	-	0	2 (66,6)	58,5(42-75)	0

El único caso descrito hasta la fecha portador de esta variante patogénica también fue diagnosticado de cáncer de ovario a una edad de 52 años [432].

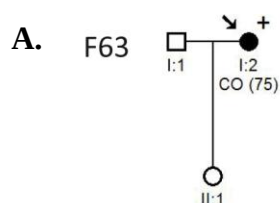
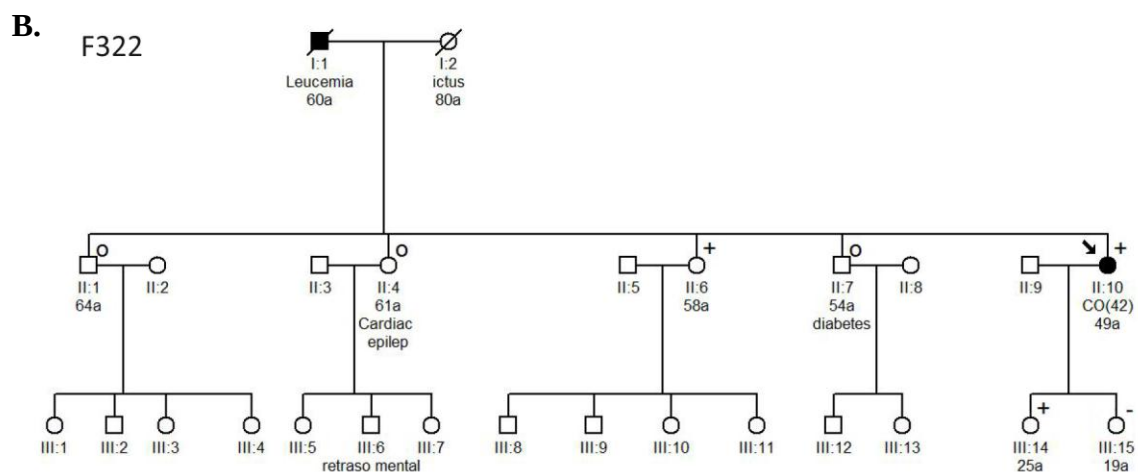


Figura 46. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.3583delC en *BRCA1*. En **A** F63 y en **B** F322.



c.3770_3771delAG

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 2,56% de las familias *BRCA1*+), situada en el exón 11 de *BRCA1*. Provoca una parada prematura en el codón 1265 de la proteína.

Se publicó inicialmente en un estudio de análisis de mutaciones *BRCA1* en pacientes con cáncer de ovario [433]. Variante que se encuentra muy ampliamente distribuida en España, con prevalencias similares en torno a un 5-10%.

a) Descripción de las familias

- F106 (**fig. 47**): Caso índice (II:4) con cáncer de mama y ovario. Tiene una hija (III:3) portadora de la variante sana a los 31 años. Tiene una hermana (II:2) portadora de la variante patogénica afectada con cáncer de mama bilateral sincrónico a los 52 años y dos hijas (III:1, III:2), una de ellas portadora de la variante y sana a los 22 años.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
4	2 (50)	-	1 (25)	1 (25)	-	1 (25)

A pesar de la alta frecuencia de esta variante en otros estudios, no se ha encontrado asociación entre los determinados fenotipos familiares [445;446].

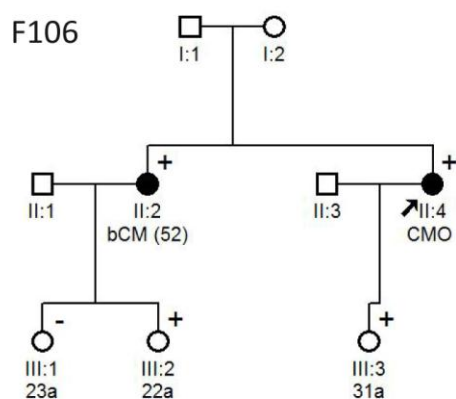


Figura 47. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.3770_3771delAG en *BRCA1*.

c.5263_5264insC

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 2,56% de las familias *BRCA1*+), situada en el exón 20 de *BRCA1*. Provoca una parada prematura en el codón 1829 de la proteína. El truncamiento de la proteína se produciría en el exón 20, donde se encuentra la segunda repetición *BRCT*, eliminando la capacidad funcional en la reparación del ADN y las interacciones con las histona desacetilasas y *BACH1*.

Se trata de la mutación fundadora de la población judía Ashkenazi menos frecuente (0,13% de la población Ashkenazi) [447]. Aunque también se encuentra distribuida ampliamente en diversas poblaciones europeas con incidencias en las mutaciones de *BRCA1* de en torno a un 70-50% en los países de Europa del Este [448]. En España sólo ha sido encontrado un caso en población aragonesa [449]. En nuestro estudio se comprobó el origen de Europa del Este de la paciente que presentó dicha mutación.

a) Descripción de las familias

- F304 (**fig.48**): Caso índice (II:4) con carcinoma ductal infiltrante de la mama izquierda (pT1pN0M0, triple negativo). Tiene una hija (III:6) afectada con cáncer de mama a los 31 años que está pendiente de estudio. Su otra hija (III:8) es portadora de la variante, aunque sana a los 32 años (con fibroadenomas).

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
2	1 (50)	56	0	0	-	0

En un análisis combinado con 69 pacientes portadores de c.5263_5264delC [450], se evaluó el riesgo acumulado de tener CM a los 70 años, obteniéndose un riesgo acumulado del 67% (IC95%, 36-83%), a los 50 años del 46% (IC95%, 29-59%) y un riesgo de cáncer de ovario a los 70 años del 33% (IC95%, 8-50%).

F304

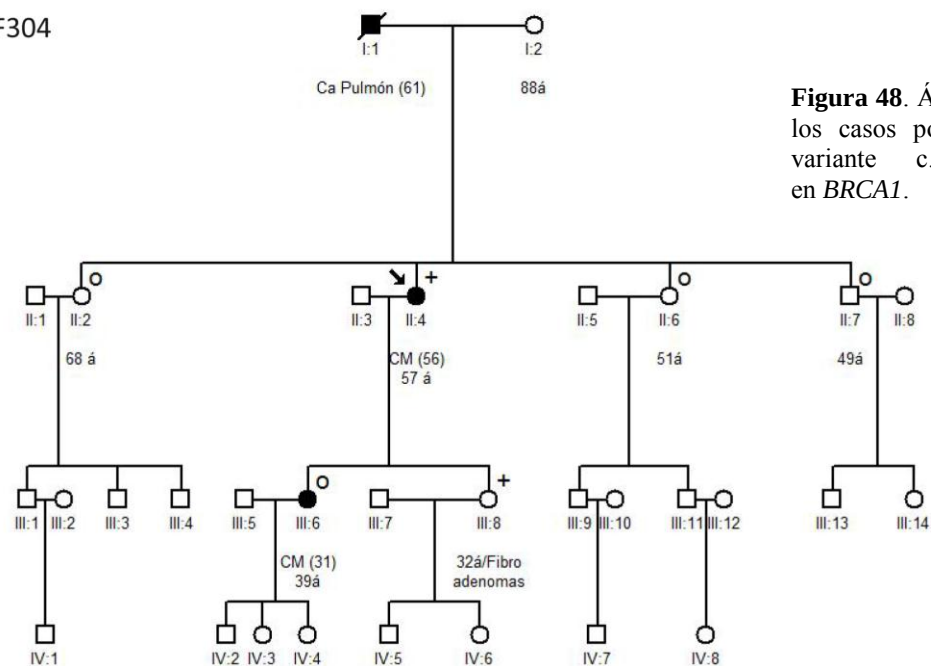


Figura 48. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.5263_5264insC en *BRCA1*.

B. Cambios sin sentido (*nonsense*)

Estas mutaciones son aquellas en que un cambio de base da lugar a un codón de parada prematuro. Se han encontrado 3 tipos diferentes de este tipo de variantes en *BRCA1* (tabla 20).

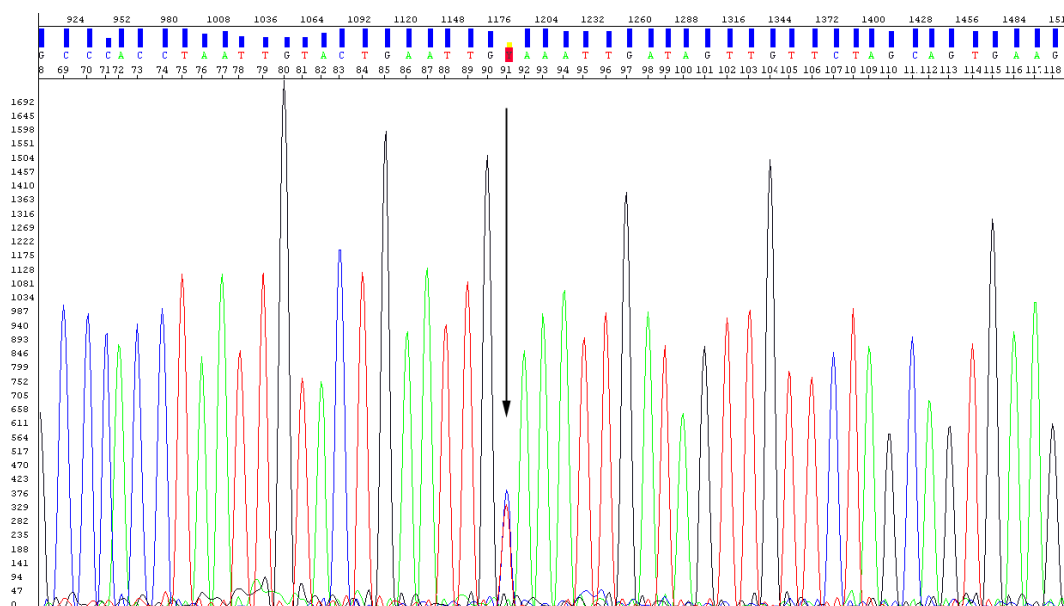


Figura 49. Electroferograma de un cambio sin sentido en *BRCA1* (variante c.1918C>T).

Tabla 20. Variantes patogénicas causadas por cambios sin sentido (*nonsense*), junto con las características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.

Exón/ Intrón	Cambio de ADNc	Cambio de proteína	Nº casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia†	Referencias
11	c.1612C>T	p.Gln538*	1	F268	CM≤40	CM≤40+CO	Eerola (2005) y col. [451] BIC
11	c.1918C>T	p.Gln640*	2	F47 F189	CM≤40 bCMm	CM≤40+ bCM bCM+CM + CO	Gabaldó y col. [452]
11	c.3280A>T	p.Lys1094*	1	F167	CM	CM≤40+ 2CM	No descrita

CM: Cáncer de mama; CM≤40: Cáncer de mama con un diagnóstico menor o igual a 40 años; bCM: Cáncer de mama bilateral; CO: Cáncer de ovario; bCMm: Cáncer de mama bilateral metacrónico.

† En las características del tipo de familia se tuvieron en cuenta el caso índice y sus familiares de primer y segundo grado.

c.1612C>T

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 2,56% de las familias *BRCA1*+), situada en el exón 11 de *BRCA1*. El cambio de citosina por timina en la posición 1612 en la proteína da lugar al cambio de una glutamina por un codón de parada (p.Gln538X). De esta manera, se eliminaría la región carboxi-terminal con sus dominios *BRCT* y el dominio *coiled coil*. Además, el codón 538 forma parte del sitio de interacción de RAD50, proteína que participa en la RH y en la unión de extremos no homólogos (NHEJ).

Descrita por primera vez en un estudio de características histopatológicas en tumores *BRCA* [451]. Poco se conoce acerca de su prevalencia, se tiene constancia de encontrarse otro caso en población iraquí [453]. Se encuentra en la base de datos *BIC* y *HGMD*.

a) Descripción de las familias

- F268 (**fig. 50**): Caso índice (II:3) con carcinoma ductal de mama infiltrante (pT3pN0M0, triple negativo, Ki67 >90%) diagnosticado a los 36 años. Tiene 8 hermanos que todavía no han sido estudiados, uno de ellos con cáncer de ovario diagnosticado a los 36 años.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1(100)	36	0	0	-	0

No se han encontrado estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica.

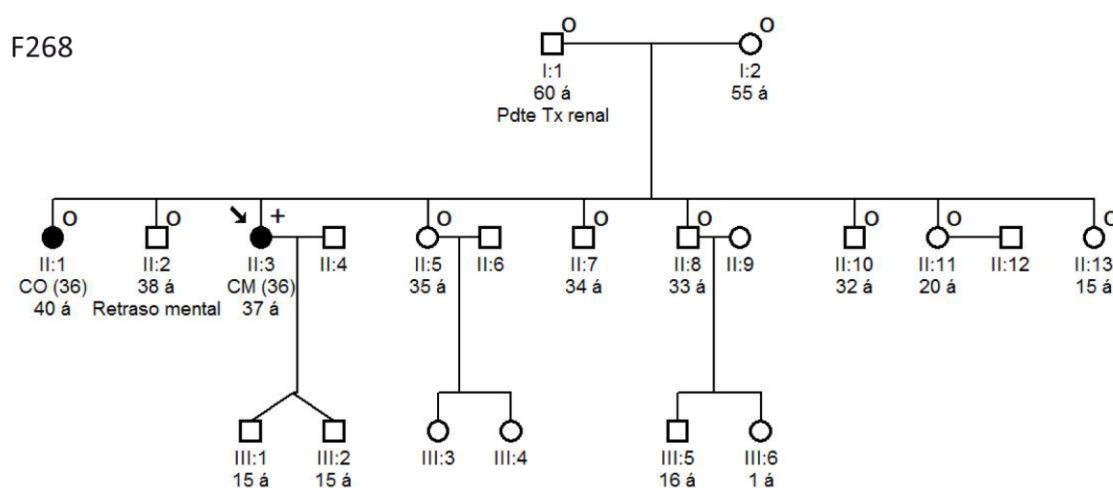


Figura 50. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.1612C>T en *BRCA1*.

c.1918C>T

Variante presente en dos familias (2,86% de las familias *BRCA*+ y 5,13% de las familias *BRCA1*). Esta alteración causa un codón de parada prematuro (CAA → TAA) en la posición 640 de la proteína *BRCA1*. Este truncamiento de la proteína provoca la eliminación de la región carboxi-terminal, sus dominios BRCT, además del dominio *coiled-coil*. Como la variante anterior, también se vería afectada la unión de RAD50, y el complejo MRN en el cual participa esta proteína en la RH y en la unión de extremos no homólogos (NHEJ).

No se había descrito inicialmente en ninguna de las bases de datos consultadas ni en la bibliografía. Sin embargo, fue identificada en nuestra población en dos familias no relacionadas. Se realizaron estudios de haplotipo para comprobar el ancestro común de ambas familias, como se describe en nuestro trabajo publicado recientemente [452], y que profundizaremos posteriormente.

a) Descripción de las familias

- F47 (**fig.51A**): Caso índice (II:3) con carcinoma ductal infiltrante (T1cN2M0, triple negativo) con diagnóstico a los 28 años de edad. Su madre (I:2) también es portadora de la variante patogénica y tuvo un cáncer bilateral sincrónico a los 49 años. Posee dos hermanos (II:1 y II:5), una es portadora sana (con un mioma uterino en estudio) y un hermano de 41 años al que todavía no se le ha hecho el estudio genético.

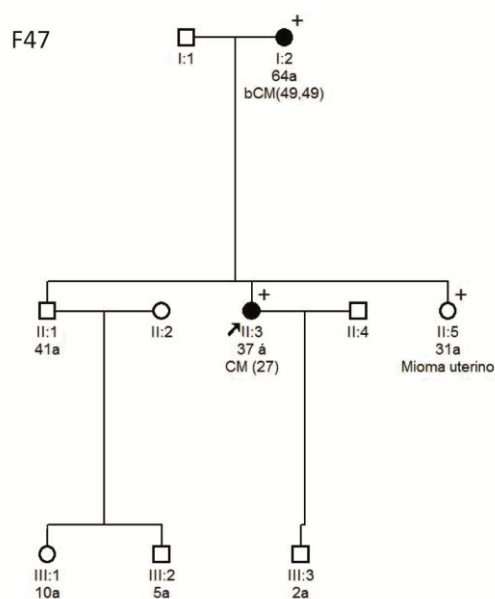
- F189 (**fig.51B**): Caso índice (II:1) con cáncer bilateral metacrónico a los 48 años la mama derecha (carcinoma ductal infiltrante T2N1M0) y a los 63 la mama izquierda (carcinoma ductal infiltrante pT1bpN1M0, triple negativo). Tiene una hermana (II:3) también portadora de la mutación con cáncer de mama a los 53 años y un cáncer colorrectal que se le diagnosticó a una edad de 62 años. Los tres hijos del caso índice (III:1, III:2 y III:3) son portadores de la variante y se encuentran sanos, lo mismo que su sobrina (III:5). Faltan todavía por estudiar los dos hijos restantes de la hermana del probando (III:6 y III:7). La tercera hermana restante del caso índice (II:5) fue negativa para la variante estudiada.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
9	4 (44,4)	48,5 (27-53)	2 (22,2)	0	-	0

Se ha podido comprobar un alto porcentaje de CM bilaterales (22,2%), a pesar que la edad mediana de diagnóstico de CM no ha sido tan alta como en los fenotipos descritos de otras variantes (48,5 años).

A.



B.

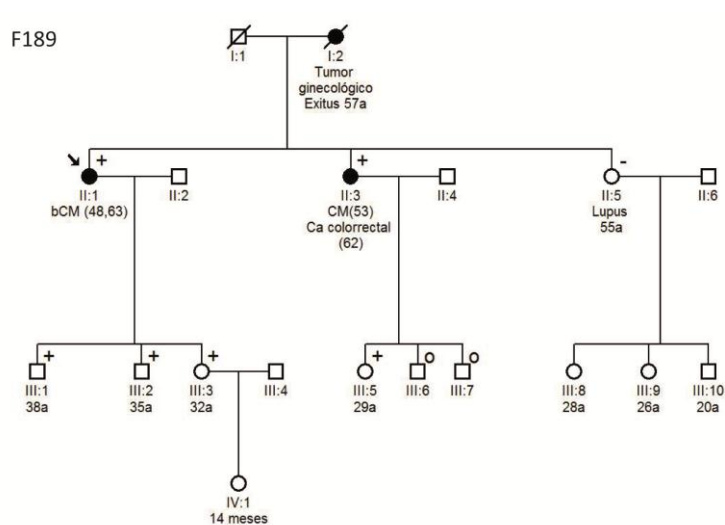


Figura 51. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.1918C>T en *BRCA1*. En **A** F47 y en **B** F189.

c.3280A>T

Se trata de una mutación presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 2,56% de las familias *BRCA1+*). El cambio de adenosina por timina provoca el cambio del triplete AAA correspondiente a lisina al codón de parada TAA. De esta forma, se provoca la eliminación de las repeticiones *BRCT* con sus funciones reparadoras de ADN y el dominio *coiled coil* involucrado en la unión *BRCA1-BRCA2*.

Se trata de una variante no registrada en la base de datos *BIC*, *HGMD* ni en la literatura; por lo que consideramos que se trata de una variante de nueva descripción.

a) Descripción de las familias

- F167 (**fig. 52**): Caso índice (III:7) con carcinoma ductal infiltrante moderadamente diferenciado (pT1bpN0M0; RE+ 93%, RP+ 86%, Ki67 48%, Her2-) diagnosticado a los 42 años. Los demás portadores de la variante son una hermana (III:9) de 40 años sana y una hija (IV:4) de 24 años también sana. La hermana mayor (III:5) falleció a los 38 años por un CM diagnosticado a los 36, no se le pudo realizar el estudio genético. Tiene una prima hermana (III:1) con CM a los 33 años que ha sido negativa para esta variante patogénica estudiada.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
3	1 (33,3)	42	0	0	-	0

De los 3 casos de portadores de la variante génica c.3280A>T, sólo uno, hasta la fecha, está diagnosticado de CM a la edad de 42 años.

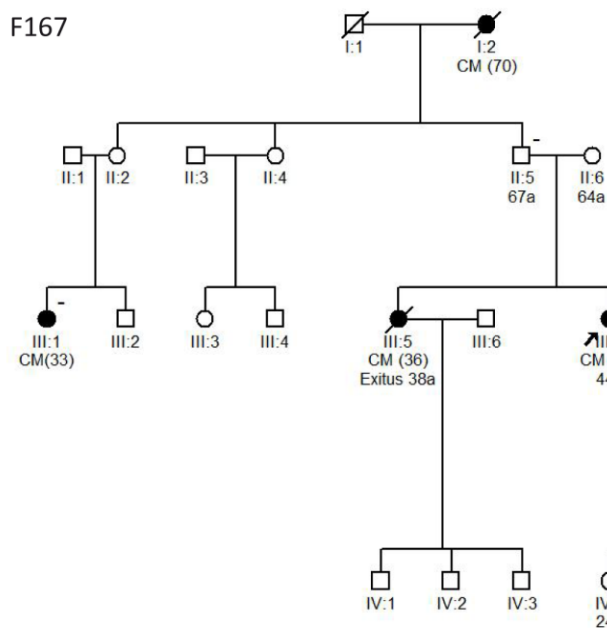


Figura 52. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.3280A>T en *BRCA1*.

C. Mutaciones *missense* patogénicas

Son aquellas variantes que con un simple cambio de aminoácido tienen un efecto patogénico. Su caracterización requiere ensayos que determinen que la funcionalidad de la proteína se vea gravemente afectada por la mutación, así como estudios poblacionales y de segregación. En nuestra población hemos encontrado una variante patogénica de este tipo (**tabla 21**).

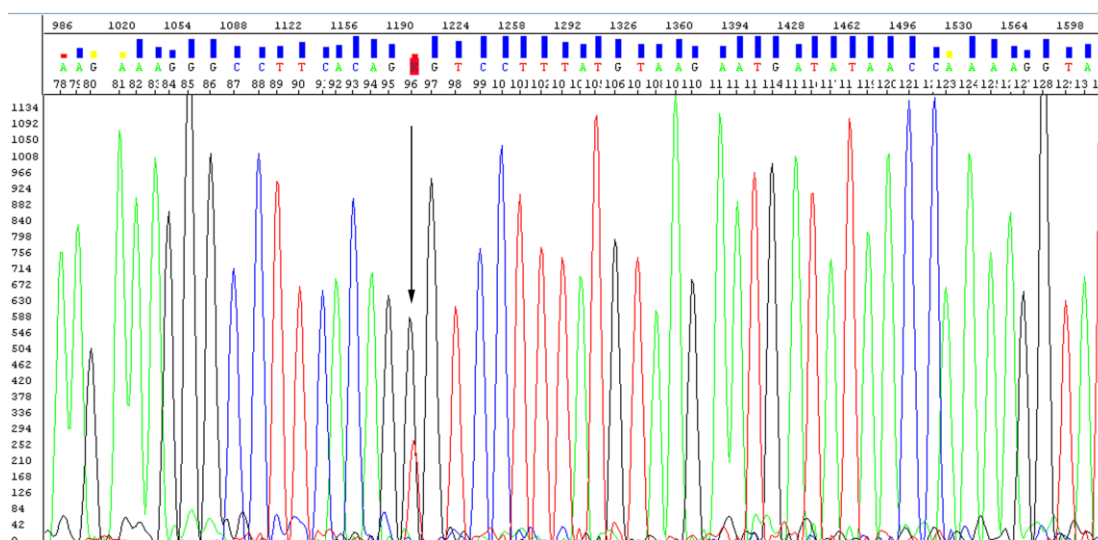


Figura 53. Electroferograma de una mutación *missense* patogénica (c.181T>G).

Tabla 21. Variante patogénica causada por un cambio de aminoácido (*missense*), junto con las características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.

Exón/ Intrón	Cambio de ADNc	Cambio de proteína	Nº casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia*	Referencias
5	c.181T>G	p.Cys61Gly	1	F413	CM<40	CM<40+ CM+CO	Friedman y col. 1994 [454] BIC

CM: Cáncer de mama; CM≤40: Cáncer de mama con un diagnóstico menor o igual a 40 años; CO: Cáncer de ovario.

*En las características del tipo de familia se tuvieron en cuenta el caso índice y sus familiares de primer y segundo grado.

c.181T>G

Se trata de una mutación presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 2,56% de las familias *BRCA1*+). Esta variante *missense* situada en el exón 5, resulta de la conversión de la cisteína a glicina en la posición 61 y se produce en residuos de cisteína altamente conservados del dominio *RING finger*, pudiendo desestabilizar la unión con *BARD1*.

Variante muy distribuida en países de Europa Central, siendo muy frecuente en países como Polonia, Países Bálticos, Austria, Eslovenia, Alemania, República Checa y Hungría con prevalencias de un 48-15% entre los portadores *BRCA1* [455]. Se considera mutación fundadora de Polonia y otros países eslavos [456]. No obstante, no existe constancia de encontrarse en estudios de población española. Recientemente, se han descrito dos familias portadoras de la variante con origen de Algeria [457]. Se ha comprobado el origen norteafricano de la paciente portadora de esta mutación en nuestra población.

a) Descripción de las familias

- F413 (**fig. 54**): Caso índice (II:13) diagnosticado de carcinoma medular en la mama derecha (cT2cN0M0; triple negativo, E-cadherina+, citoqueratina 19+, p53+, Ki67 60%). Su madre (I:2) falleció por un cáncer diagnosticado a los 60 años y tiene un hermana (II:4) también fallecida por cáncer de ovario con diagnóstico a los 49. Los demás hermanos vivos están pendientes de estudio para esta mutación.

b) Estudios genotipo-fenotipo

N° portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1	36	0	0	-	0

Ha habido estudios que relacionan la variante con mayor probabilidad de producir cáncer de ovario [458].

F413

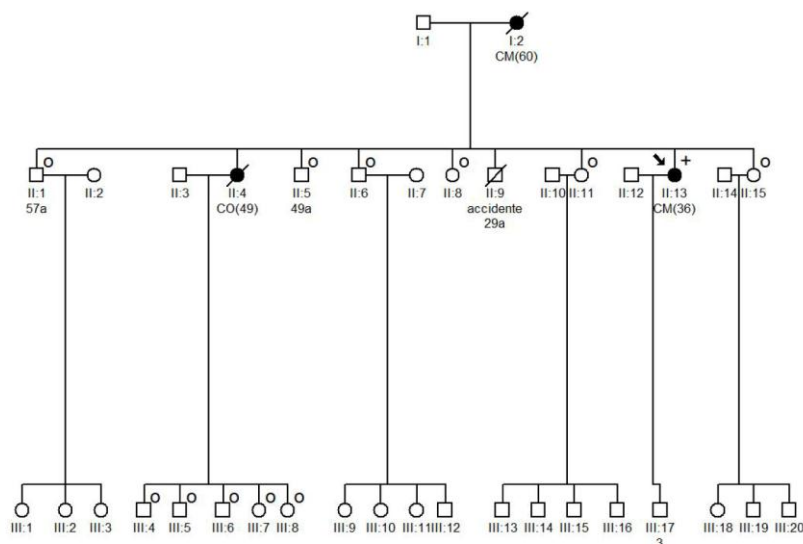


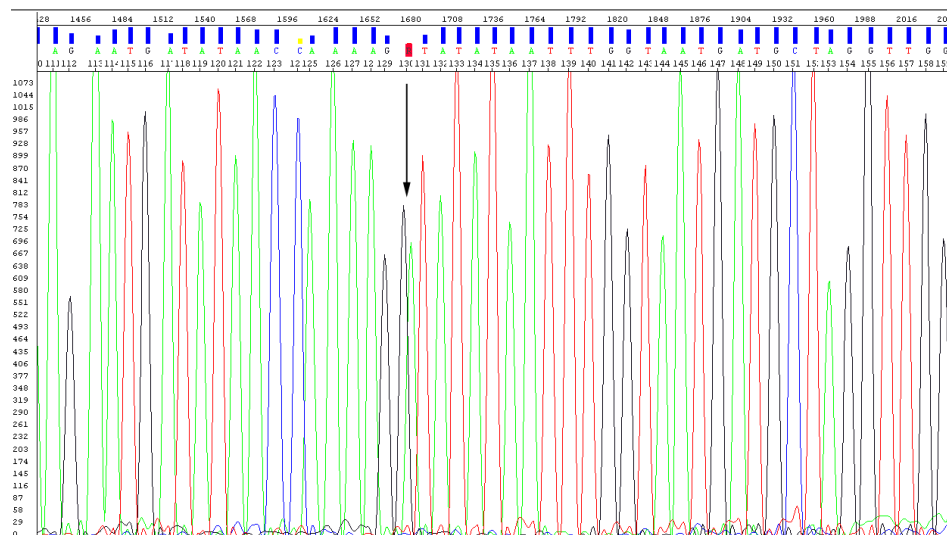
Figura 54. Árbol familiar del caso portador de la variante c.181T>G en *BRCA1*.

D. Variantes patogénicas que afectan al *splicing*

Este tipo de variantes alteran la maduración del ARNm y aparecen tradicionalmente en las fronteras exón-intrón, en el sitio 5' donador (GT) o 3' aceptor (AG). En torno a esos nucleótidos se marcan las fronteras exón-intrón e intrón-exón a la maquinaria de maduración del ARNm para que los intrones sean eliminados correctamente. Cambios en estas secuencias consenso dan lugar a un transcrito alterado que a su vez originará una proteína anómala y no funcional.

Hemos encontrado 5 mutaciones de este tipo en *BRCA1*, todas ya descritas anteriormente en la literatura y/o en bases de datos (**tabla 22**).

A.



B.

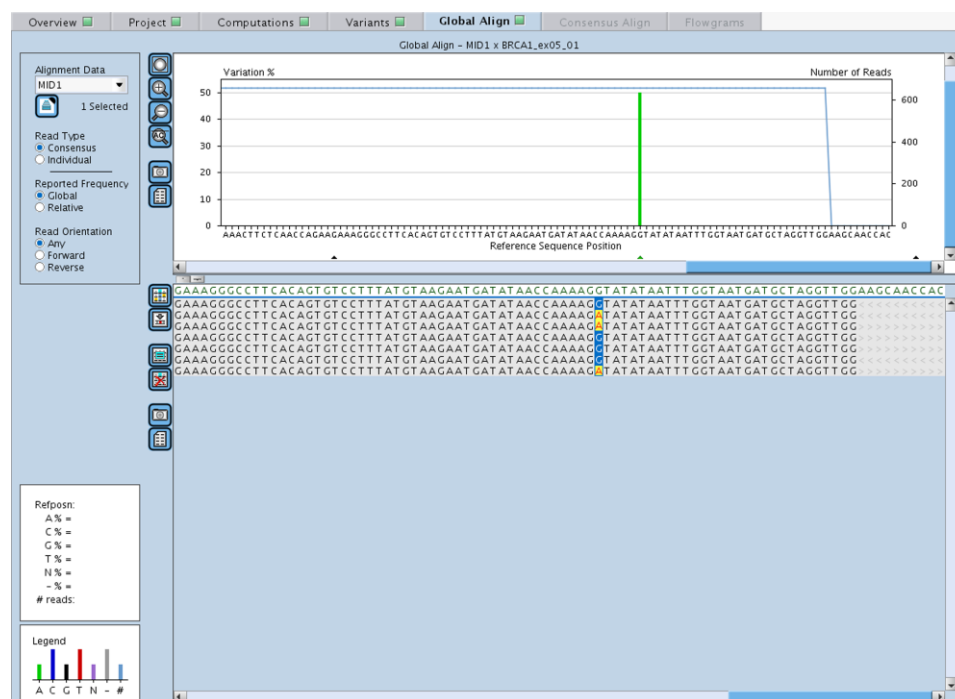


Figura 55. Variante patológica que afecta al *splicing* (c.212+1G>A). **A.** Electroferograma **B.** Alineamiento de lectura con el programa *Amplicon Variant Analyzer*.

Tabla 22. Variantes patogénicas con efecto en el *splicing*, junto con las características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.

Exón/ Intrón	Cambio de ADNc	Cambio de proteína	Nº casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia†	Referencias
5	c.211A>G	p.[Cys64*, Phe46_Arg71del]	2	F323	CM<40	CM<40	Díez y col. 2003 [333]
				F344	CO	2CO	BIC
I-5	c.212+1G>A	p.[Cys64*, Phe46_Arg71del]	5	F27	CMO	CMO + bCM (<40)	Díez y col. 2003 [333] BIC
				F27(2)	NA	2CO	
				F48	NA	CM+CO	
				F56	CM<40	CM<40	
				F417	CMO	CMO	
I-13	c.4357+1delG	p.[Arg1397Tyrfs*2, Ala1453Glnfs*3]	1	F116	bCM	2bCM + CM<40+ CM	Musolino y col. 2007 [459]
18	c.5123C>A	p.[Asp1692Gly, Ala1693_Trp1718del, Ala1708Glu]	6	F12	bCM	bCM + CM<40	Futreal PA y col. 1994 [460] BIC
				F42	CO	CO + CM + Cendom.	
				F74	bCMs	bCM+CM	
				F159	CM<40	CM<40	
				F275	CMO	CMO+CM	
				F415	bCMm	bCMm	
20	c. 5277+1G>A	p.[His1732_ Lys1759del, Lys1759_ Ile1760ins29]	1	F208	CM<40	CM<40	Díez y col. 2003 [333] BIC

CM: Cáncer de mama; CM<40: Cáncer de mama con un diagnóstico menor o igual a 40 años; bCM: Cáncer de mama bilateral; CO: Cáncer de ovario; bCMm: Cáncer de mama bilateral metacrónico; bCMs: Cáncer de mama bilateral sincrónico; CMO: Cáncer de mama y ovario; Cendom: cáncer de endometrio; NA: no afectado.

† En las características del tipo de familia se tuvieron en cuenta el caso índice y sus familiares de primer y segundo grado.

c.211A>G

Se trata de una mutación presente en dos familias (2,86% de las familias *BRCA+* y 5,13% de las familias *BRCA1*). Es una variante localizada en el exón 5, en dos nucleótidos antes de la unión 3' exón-intrón donde se introduce un sitio de empalme críptico aberrante, el cual provoca una delección de 22 nucleótidos en el exón 5 y una terminación de traducción en el codón 64 [461]. Por tanto, podemos aseverar que se trata de una variante patogénica con efecto en el *splicing*. Un estudio predijo que esta variante no inhibía la actividad E2-ligasa y, por tanto, no se desestabilizaba la unión con *BARD1* [462]. No obstante, al terminarse la traducción en el exón 5, se verían afectados todos los dominios fundamentales para la actividad reparadora de ADN.

Los resultados de los estudios de haplotipo han sido congruentes con que c.211A>G sea una mutación en *BRCA1* fundadora de origen gallego [461]. Tal como se ha registrado en la base de datos *BIC*, la mutación se ha observado en familias de probable origen español en diversas ubicaciones geográficas de Europa no españolas (Francia y el Reino Unido), y en familias del Caribe y Sudamérica. En España se encuentra con una alta frecuencia en Galicia [461], obviamente, y en un estudio en población asturiana en el que se comprobó que todos los pacientes portadores de la variante eran de origen gallego [442].

a) Descripción de las familias

- F323 (**fig. 56A**): Caso índice (II:4) diagnosticado de carcinoma ductal infiltrante (cT2cN0M0, triple negativo) a una edad de 31 años. Los demás familiares no están afectados por ningún tipo de cáncer.

- F344 (**fig. 56B**): Caso índice (II:3) diagnosticado de carcinoma seroso de ovario de alto grado (estadío IIIC) a los 58 años. Sus dos hermanos (II:1 y II:2) han fallecido por tumor urotelial y cáncer de ovario, respectivamente. Su padre (I:1) falleció por cáncer de próstata a los 76 años de edad.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
2	1 (50)	31	0	1 (50)	58	0

En un estudio multicéntrico español [311], se comprobó una menor penetrancia y un menor riesgo de CM de esta variante patogénica (riesgo acumulado del 27% a los 70 años, IC 95%: 0-52%) en comparación con las demás mutaciones en *BRCA1*.

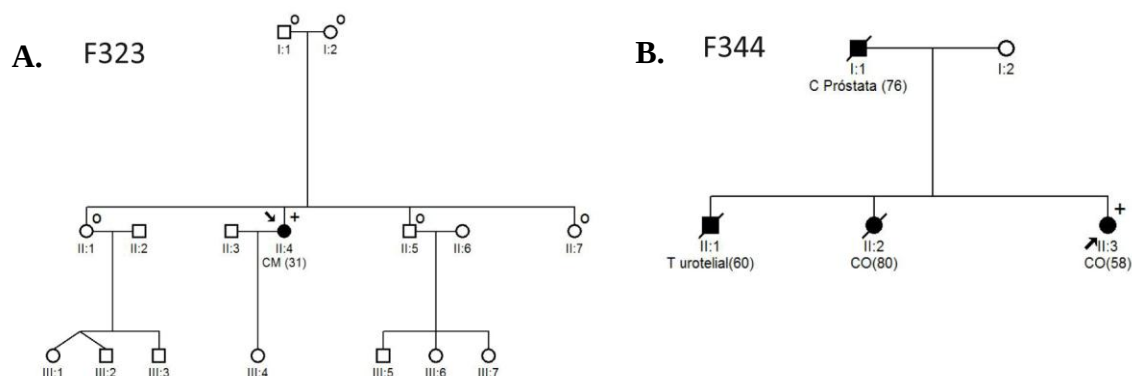


Figura 56. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.211A>G en *BRCA1*. En **A** F323 y en **B** F344.

c.212+1G>A

Se trata de una mutación frecuente presente en cinco familias (7,14% de las familias *BRCA+* y 12,82% de las familias *BRCA1+*). Variante presente en el intrón 5, la cual afecta a la secuencia consenso donadora del empalme (GT → AT). La sustitución de la conservada G a A activa un sitio de empalme críptico, utilizando los próximos dinucleótidos disponibles GT 22 bases aguas arriba en el exón 5. Las resultantes formas aberrantes de unión de *splicing* provocan un codón de parada prematuro en la posición 64. Al igual que la variante anterior, se generaría una proteína

truncada desde el codón 64 con la eliminación de todos los dominios fundamentales para su función.

Fue descrita por primera vez en un estudio californiano [463]. Presente en la base de datos *BIC* y *HGMD*. No existen muchas referencias acerca de su frecuencia en las poblaciones. En España, se encuentra descrita en la región mediterránea con algo más de frecuencia que en otras zonas de la península [446]. Este estudio sería, hasta la fecha, el que encuentra esta variante patogénica con una mayor frecuencia.

a) Descripción de las familias

- F27 (**fig. 57**): Caso índice (II:5) con CM a los 61 años y un cáncer de ovario a los 62. Su hermana (II:3) es portadora y está diagnosticada de cáncer de mama bilateral a los 40 años. Su madre (I:2) fue diagnosticada de cáncer de pulmón y su padre (I:1) de cáncer de próstata. Tiene otro hermano (II:2) portador y sano. Los tres hijos del caso índice (III:11, III:12 y III:14) son portadores de la mutación y no están afectados por ningún tipo de cáncer. Los hijos de la hermana (III:7 y III:9) no son portadores. De los tres hijos del otro hermano (III:1, III:3 y III:5), uno es portador de la mutación (III:5).

- F27(2) (**fig. 58A**): Caso índice (II:7) fallecido de cáncer de ovario diagnosticado a los 73 años. Su hermana (II:4) tuvo un CM a los 50. A tres hijos del caso índice (III:11, III:16 y III:18) se le ha hecho el estudio genético para la mutación, resultando todos portadores. Una hija (III:8) falleció por cáncer de ovario a una edad de 46 años, la cual no se pudo comprobar si era portadora de la variante patogénica. A una nieta del caso índice (IV:3) se le demostró que no era portadora.

- F48 (**fig. 58B**): Caso índice (III:3) diagnosticado de CM a los 33 años y cáncer de ovario a una edad de 60. Su madre (II:4) fue diagnosticada de cáncer de ovario a los 74 años y su abuela (I:4) de CM. Tiene una tía (II:5) con CM bilateral y una prima (III:10) también afectada, además de portadora. Por otro lado, también son portadores de la variante patogénica una hija (IV:5), una hermana (III:8) y 3 sobrinas (IV:8, IV:10 y IV:11); todas ellas sanas en el momento del estudio.

- F56 (**fig. 58C**): Caso índice (III:3) con CM diagnosticado a los 39 años. Su tía falleció por un CM diagnosticado a los 40 años, la hija de ésta (III:1) también tiene CM diagnosticado a una edad de 28 años. El hijo del caso índice (IV:1) es portador de la variante patogénica.

- F417 (**fig. 59**): Caso índice (II:2) con carcinoma seroso de ovario de grado moderado (estadio II-A) a los 52 años de edad y, posteriormente, tuvo un carcinoma ductal infiltrante de mama (pT1pN0M0, triple negativo) a los 64 años de edad. Tiene un sobrino (III:6) con cáncer de testículo. No tiene más familiares afectados ni con estudio genético realizado.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
21	7 (33,3)	40 (33-64)	1 (4,8)	4 (19)	61 (62-73)	3 (14,3)

Cinco portadores de esta variante *splicing*, pertenecientes a tres familias, fueron diagnosticados de 2 CM y 3 cánceres de ovario, según el estudio de Sanz y col. (2010) [464]. Estos datos estarían acorde con nuestro estudio, en donde a pesar de no ser muy elevado el número de casos afectados dentro de los portadores (33,3%), se debería destacar el alto porcentaje de casos de cáncer de ovario (cuatro casos, de ellos a tres se les diagnosticó también CM).

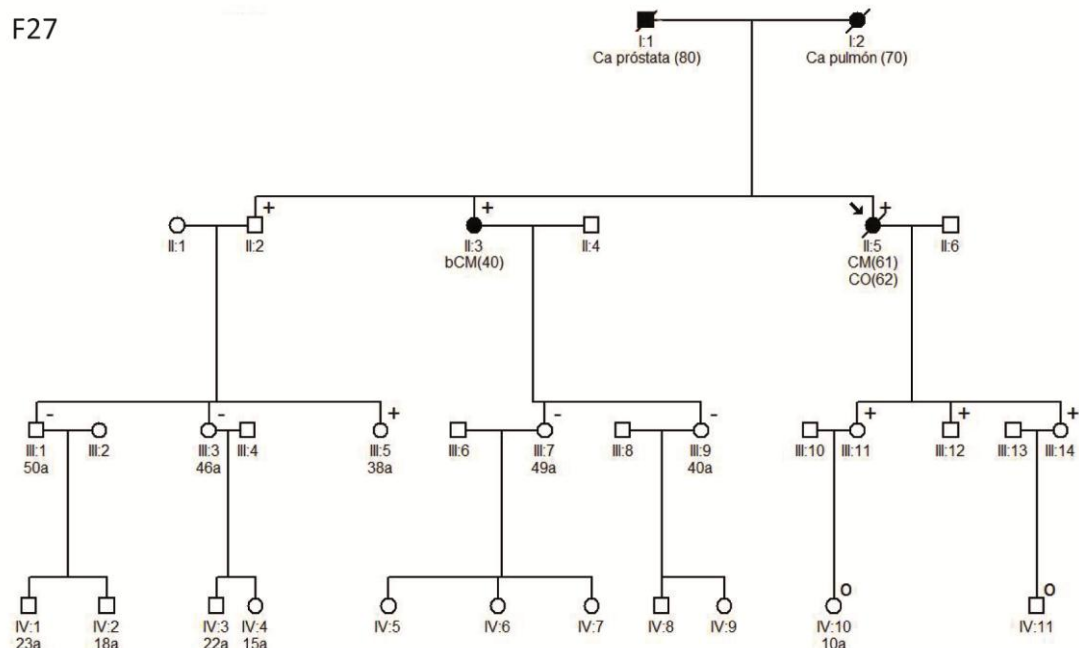


Figura 57. Árbol familiar de casos portadores de la variante c.212+1G>A en *BRCA1*.

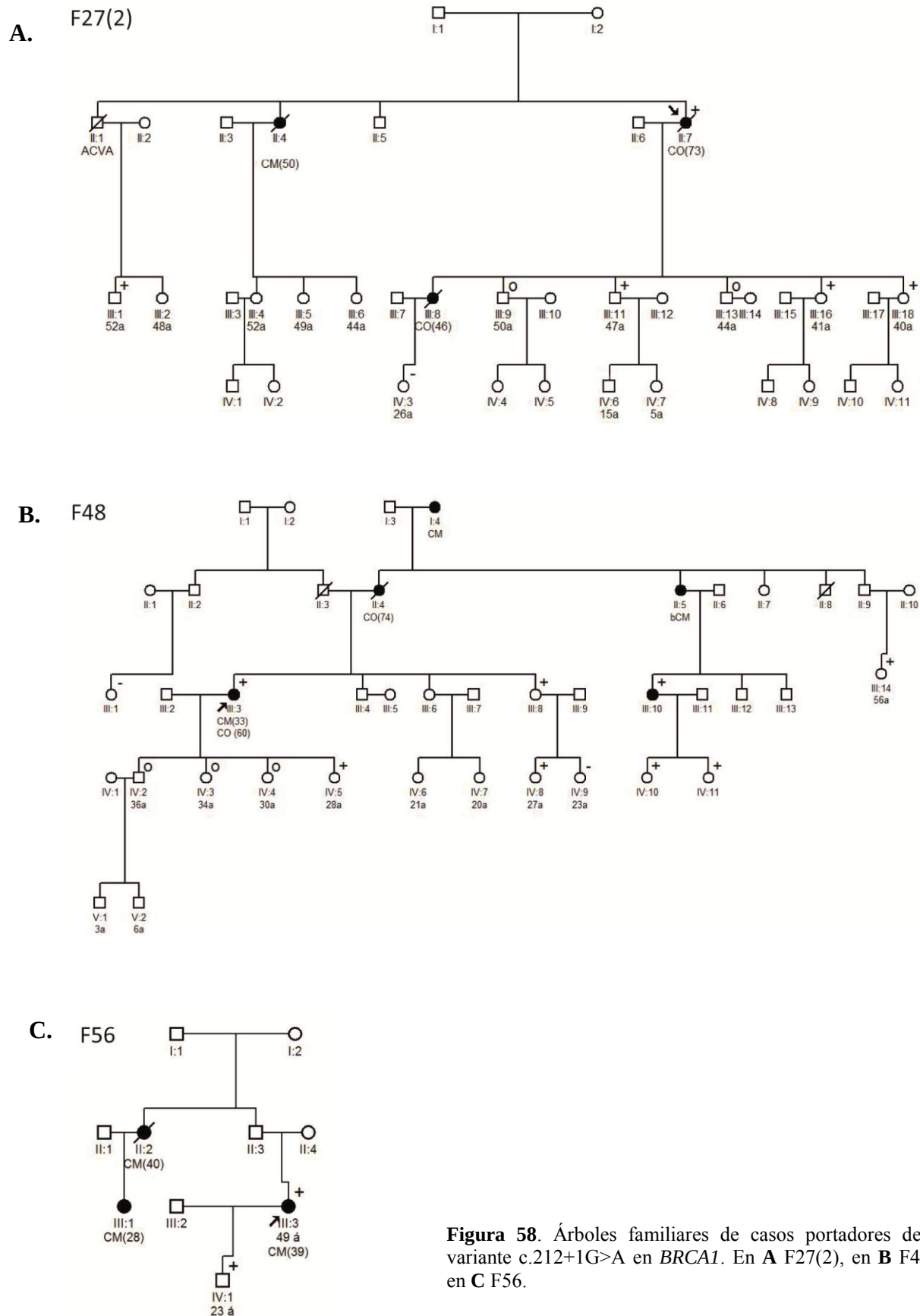


Figura 58. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.212+1G>A en *BRCA1*. En **A** F27(2), en **B** F48 y en **C** F56.

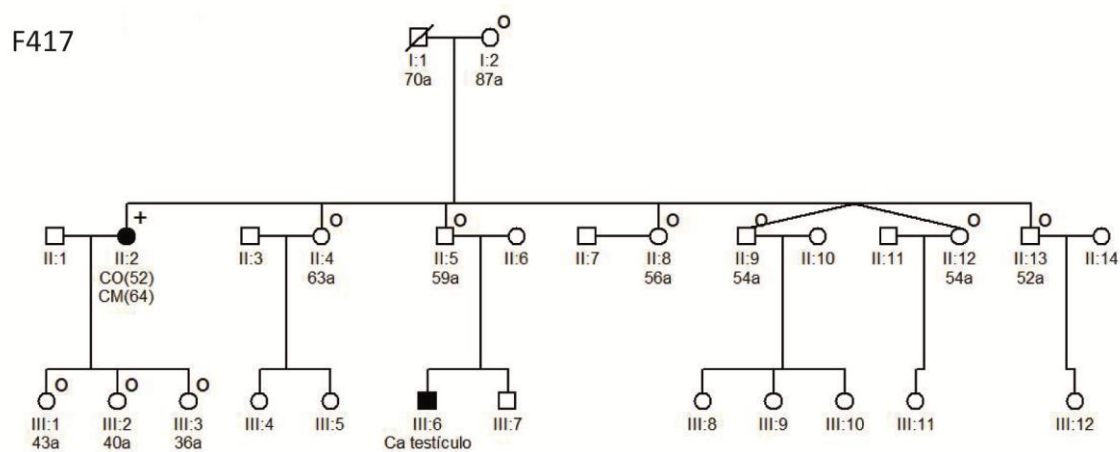


Figura 59. Árbol familiar de un caso portador de la variante c.212+1G>A en *BRCA1*.

c.4357+1delG

Se trata de una mutación presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 2,56% de las familias *BRCA1+*). Variante del intrón 13, en sitio donador del *splicing* del exón 13 de *BRCA1*. Análisis de RT-PCR han demostrado la generación de dos transcritos anormales. El primero consiste en una omisión del exón 13, como consecuencia de un cambio del marco de lectura generando un codón de parada prematuro (p.Arg1397Tyrfs*2). Y el segundo transcrito aberrante consiste en la supresión de una guanina en la última base del exón 13 (r.4357del) debido al uso de un sitio de empalme críptico donador creado por esta variante; esta transcripción también produce una proteína truncada (p.Ala1453Glnfs*3) [465]. En ambos transcritos se eliminarían los dominios *coiled coil* y las repeticiones *BRCT*, inhibiendo la unión *BRCA1-BRCA2* y la actividad reparadora de *BRCA1*, entre otras funciones.

Se publicó por primera vez en un estudio en Italia de correlación entre las variables fenotípicas y el estatus mutacional *BRCA* [459]. Esta variante ha sido seleccionada en un estudio del Instituto Catalán de Oncología (ICO) junto con otras variantes de *splicing* [465]. No existen más publicaciones que la hayan identificado ni está descrita en las bases de datos consultadas.

a) Descripción de las familias

- F116 (**fig.60**): Caso índice (III:11) con un cáncer bilateral sincrónico a los 56 años. Tiene una hermana gemela (III:13) también portadora que ha tenido también un cáncer bilateral sincrónico a la misma edad. La hija del caso índice (IV:11), también portadora, falleció por CM a una edad de 29 años. Además, a la hija de su hermana gemela se le demostró también ser portadora de la variante patogénica y falleció, asimismo, por carcinoma de mama a los 29 años. El caso índice tiene otra hermana (III:3), también portadora con cáncer de endometrio; esta misma paciente ha tenido dos varones y dos mujeres, donde estas últimas (IV:3 y IV:4) son las portadoras de la mutación. En IV:4 se le ha detectado un cáncer de mama a una edad de 46 años. La abuela del caso índice (I:2) tuvo un cáncer de mama a los 94 años, no tiene estudio genético.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
6	4(66,7)	46 (29-57)	2(33,3)	1*(16,7)	67*	0

*Fue un caso de cáncer de endometrio.

No se han encontrado estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica.

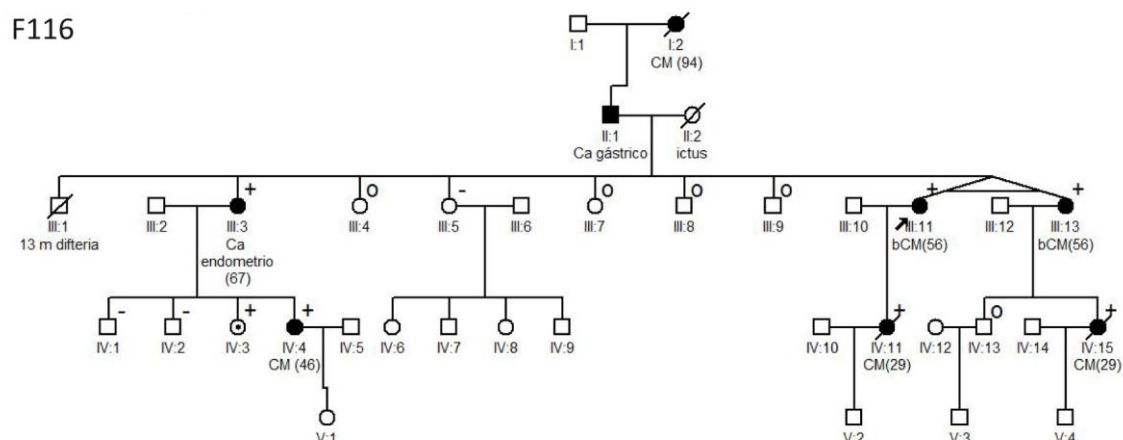


Figura 60. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.4357+1delG en *BRCA1*.

c.5123C>A

Se trata de una mutación recurrente presente en seis familias (8,57% de las familias *BRCA+* y 15,38% de las familias *BRCA1+*). Es una variante localizada en el exón 18 que provoca un efecto en el *splicing*. Se ha demostrado por estudios de RT-PCR, que se produce una delección del exón 18 durante el proceso de empalme, correlacionándose además con un aumento en la unión de los inhibidores de empalme hnRNP A1 y hnRNP H/F al exón mutado 18. Si traduce, se eliminan 26 aminoácidos y cambia el residuo aromático triptófano muy conservado en la posición 1718 a glicina, debido a la unión del exón 17 al exón 19 [466]. Como consecuencia, se produce la interrupción del primer dominio *BRCT*. Dado que la región *BRCT* de *BRCA1* interactúa con las proteínas implicadas en el control transcripcional o la reparación del ADN, se espera que la interrupción de parte de esta región afecte fuertemente a la función de *BRCA1*.

Fue una de las primeras variantes que comenzó a describirse en estudios iniciales [467]. Ampliamente descrita en distintas poblaciones, aunque con una alta predominancia en población española y latina (46 entradas en la base de datos *BIC*). Según los estudios de haplotipo del trabajo de Sagi y col. (2011) [423], se ha considerado como probable mutación con efecto fundador sefardí. Variante muy frecuente y distribuida en España [446], no observándose en otras poblaciones europeas [455].

a) Descripción de las familias

- F12 (**fig. 61A**): Caso índice (IV:2) con cáncer bilateral de mama metacrónico. A los 36 años tuvo en la mama izquierda un carcinoma ductal infiltrante con intensa infiltración linfocitaria intratumoral (T2N0M0; triple negativo, ki67 60%, p53 97%). A los 46 años tuvo en la mama derecha un carcinoma ductal infiltrante pobremente diferenciado con metástasis axilares masivas (T3N2M0, receptores inmunohistoquímicos desconocidos). A los demás familiares no se le ha hecho el estudio genético. Tiene un hija (V:1) con CM a los 32 años, y una tía (II:2) y una prima hermana (III:1) ambas diagnosticadas de CM. Tiene un hermano (IV:1) fallecido por tracom a los 41 años y su padre (II:3) falleció de cáncer de faringe a una edad de 62 años.

- F42 (**fig. 61B**): Caso índice (I:2) que a los 60 años se le diagnosticó un adenocarcinoma seroso papilar pobremente diferenciado en ovario izquierdo y que produce implantes en cara posterior de útero, serosa de recto-sigma, íleon, epiplón mayor, diafragma, ángulo de Treitz e hipocondrio derecho. A su madre (II:2) se le diagnosticó CM y una tía materna (II:3) tuvo cáncer de endometrio. Se les ha hecho el estudio a 4 hijos, siendo positivos los dos varones (VI:1 y VI:3).

- F74 (**fig. 62A**): Caso índice (III:33) con cáncer bilateral sincrónico a los 48 años (en mama izquierda un carcinoma medular, pTxNxM0 y en mama derecha otro carcinoma medular, pT2pN0). Tiene tres primas hermanas (III:11, III:16 y III:21) con cáncer de mama con diagnóstico a los 36, 40 y 58 años; respectivamente. III:11 falleció y no se le pudo hacer el estudio genético, mientras que en III:16 y III:21 se comprobó que eran portadoras de la variante patogénica. La madre del caso índice (II:12) falleció a los 44 años de cáncer de mama. Tres tías por parte materna (II:9, II:12, II:16 y II:18) fallecieron con cáncer de ovario a los 69 años, cáncer de mama con edad desconocido de diagnóstico y cáncer de mama a los 62 años, respectivamente.

-F159 (**fig. 61C**): Caso índice (II:4) con carcinoma ductal infiltrante indiferenciado (pT1pN2; RE-, RP+, HER+) a los 34 años. No se han hecho más estudios genéticos a los familiares. Tiene un hermano (II:6) con plasmocitoma cervical.

-F275 (**fig. 62B**): Caso índice (II:8) con cáncer de mama y ovario. A los 37 se le diagnosticó carcinoma intraductal de alto grado, con zonas de microinvasión (pT1bpN0M0; RE -, RP +débil, HER -, p53 -). Su madre (I:2) tuvo un CM a los 50 años. Tiene un hermano (II:3) fallecido por cáncer de pulmón. Los dos hermanos restantes (II:2 y II:5) son portadores de la variante. Los hijos del probando (III:9 y III:10) no son portadores de dicha variante.

-F415 (**fig. 62C**): Caso índice (II:2) diagnosticado de cáncer bilateral metacrónico a los 40 y 41 años de edad. En mama izquierda se le diagnosticó carcinoma ductal infiltrante (pT1bpN0M0, RE-, RP-) y en mama derecha un carcinoma in situ (grado e inmunohistoquímica desconocidos). No hay más familiares afectados ni con el estudio genético realizado.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
20	10 (50)	40 (34-58)	2 (10)	2 (10)	53,5 (47-60)	1 (5)

En dos estudios con casos índice portadores de esta mutación [441;464], se pudo observar que los CM bilaterales de mama eran frecuentes. En el estudio poblacional de de Juan y col. (2013) de la Comunidad Valenciana, se observó una mediana de diagnóstico de cáncer de los casos índice de 36 (26-68) años, con alto predominio de CM unilaterales [445], más de acuerdo con lo observado en las familias de nuestro estudio.

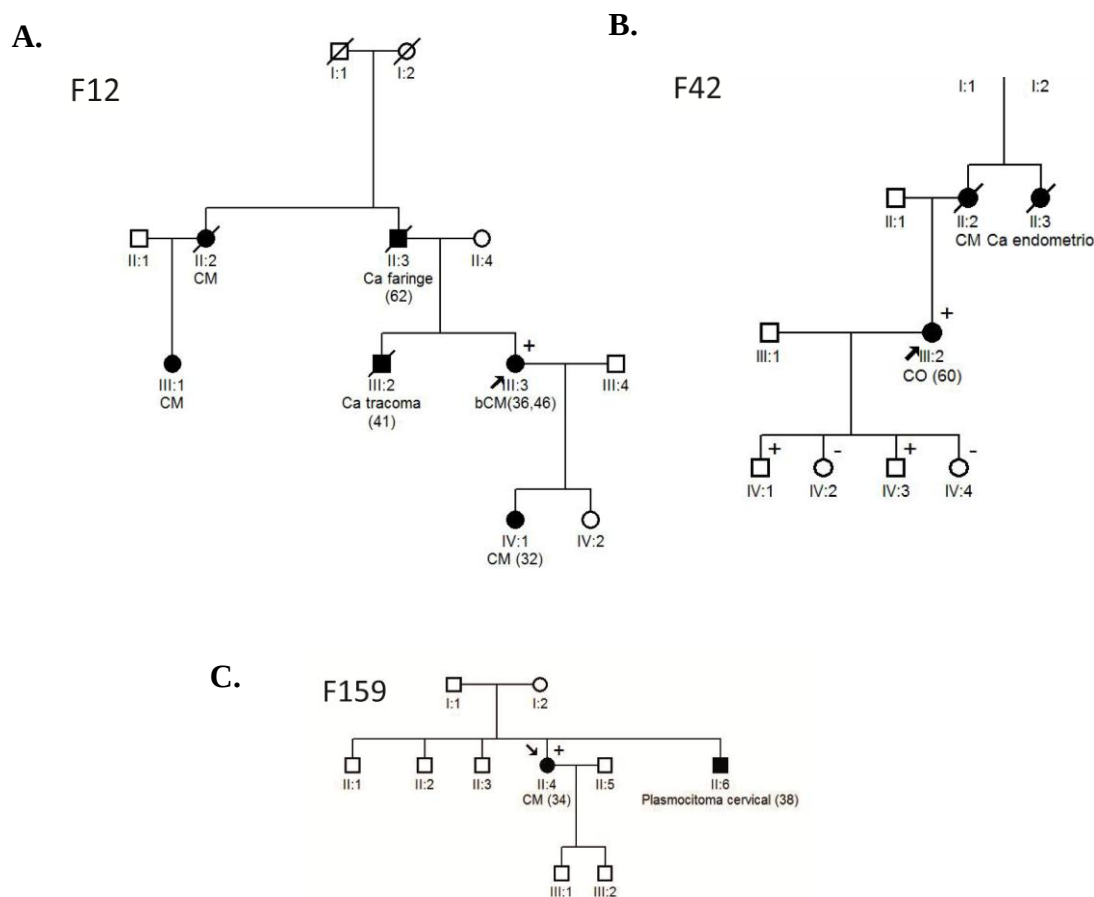
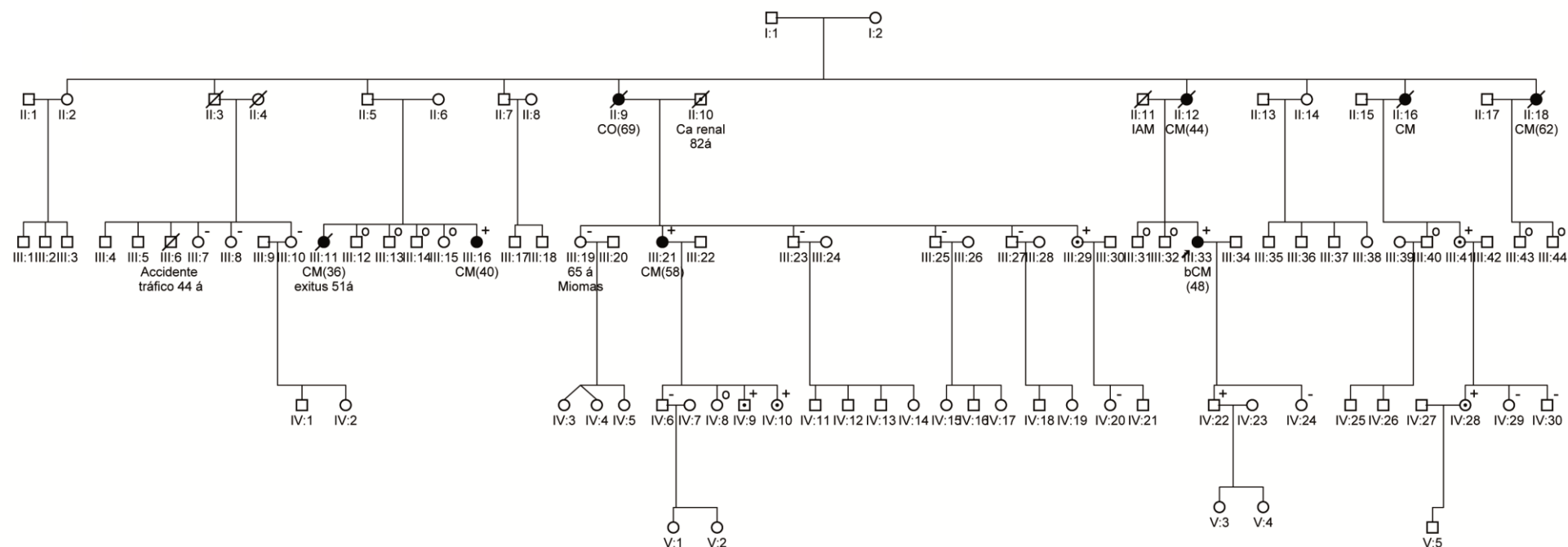
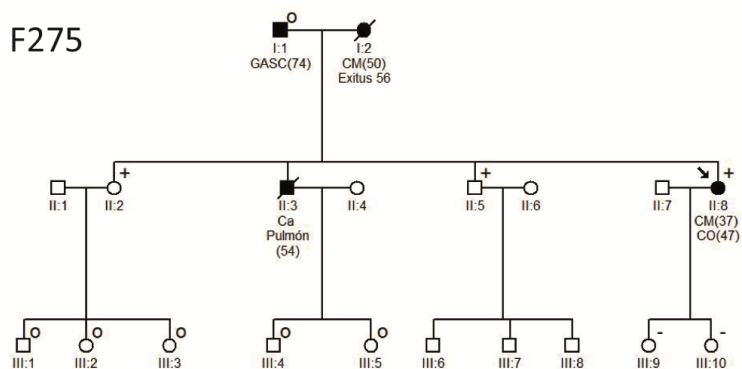


Figura 61. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.5123C>A en *BRCA1*. En **A** F12, en **B** F42 y en **C** F159.

A. F74



B. F275



C. F415

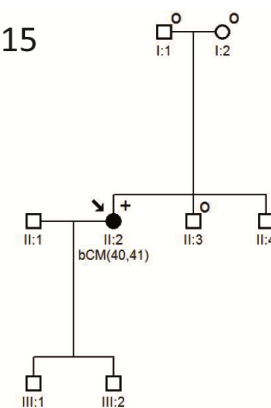


Figura 62. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.5123C>A en *BRCA1*. En **A** F74, en **B** F275 y en **C** F415.

c.5277+1G>A

Se trata de una mutación presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 2,56% de las familias *BRCA1+*). La variante interrumpe el sitio donador del exón 20. Un estudio la analizó por RT-PCR demostrando el *skipping* del exón 20. Esta delección provoca un desplazamiento del marco de lectura que crea un codón de parada prematuro en el codón 1737 de la proteína. También se identificó otro transcrito que demostró la retención de 85 pb del intrón 20 que causa un desplazamiento del marco provocando una parada en el codón 1767 [468]. De esta manera, la última repetición *BRCT* sería eliminada de la proteína, impidiéndose las interacciones con las histona-desacetilasas y *BACH1*, fundamental en la función reparadora de ADN.

Variante muy distribuida en el mundo (36 entradas en la base de datos *BIC*). Descrita en diversas poblaciones españolas [333;335;469].

a) Descripción de las familias

- F208 (**fig. 63**): Caso índice (II:1) con cáncer bilateral metacrónico a los 25 y 35 años de edad. El primer carcinoma fue un medular atípico (sin afectación ganglionar, RE+, HER-) y el segundo fue un carcinoma ductal infiltrante (triple negativo). No hay más familiares afectados. Se ha comprobado que su padre (I:1) es el portador de la variante patogénica.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
2	1 (50)	25	1 (50)	0	-	0

En el estudio de Tesoreiro y col. (2005) [468] se asoció esta variante con alta segregación familiar con cáncer de ovario.

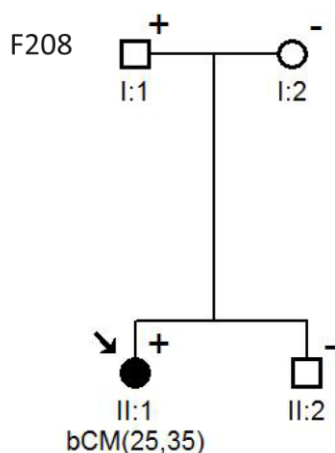


Figura 63. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.5277+1G>A en *BRCA1*.

2.1.1.2 Variantes patogénicas en *BRCA2*

De las 95 variantes génicas encontradas en *BRCA2*, 17 mutaciones puntuales fueron consideradas patogénicas. De ellas, 15 ya estaban descritas en la bibliografía y 2 son de nueva descripción (**fig. 64**). En concreto, de las ya descritas, hay diez mutaciones que cambian el marco de lectura por inserciones o pérdidas, dos mutaciones que alteran el procesamiento del ARN (efecto en el *splicing*) y tres cambios de nucleótido que dan lugar a un codón de parada prematuro. Las dos mutaciones nuevas que describimos son una que cambia el marco de lectura y otra con efecto patogénico en el *splicing* (demostrado por RT-PCR en el laboratorio externo).

Del mismo modo que en *BRCA1*, para cada variante patogénica en *BRCA2* realizaremos un análisis molecular del cambio producido, una pequeña revisión de su distribución en otras regiones geográficas, una descripción de las familias portadoras y un estudio genotipo-fenotipo global de todas ellas. La relación de estas variantes en función del tipo de cambio se encuentra a continuación:

A. Variantes patogénicas tipo *frameshift*

- **c.262_263delCT**
- **c.1597delA**
- **c.1608dupT**
- **c.3264dupT**
- **c.4936_4939 delGAAA**
- **c.5073dupA**
- **c.5669_5673delATGGC**

- **c.6491_6494 delAGTT**
- **c.8201delC**
- **c.9026_9030delATCAT**
- **c.9310_9311 delAA**

B. Variantes tipo *nonsense*

- **c.2095C>T**
- **c.3455T>G**
- **c.3922G>T**

C. Variantes que afectan al *splicing*

- **c.7007G>A**
- **c.7977-1G>A**
- **c.9117G>A**

En la **figura 64** se hallan representadas este tipo de variantes según su localización en el gen *BRCA2*.

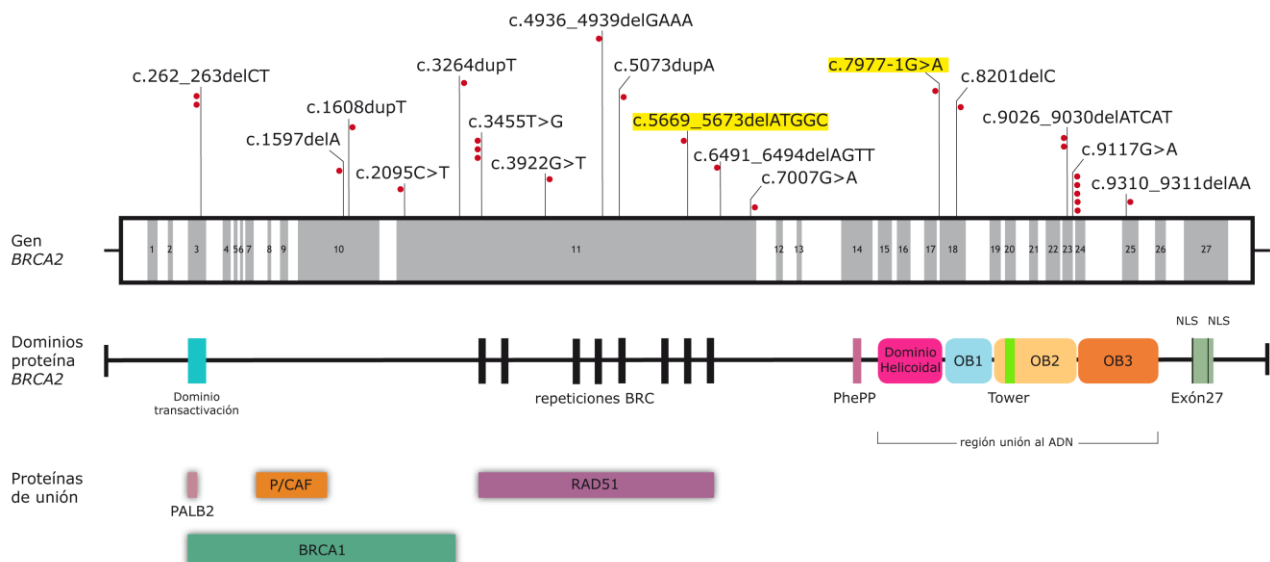


Figura 64. Variantes patogénicas detectadas en el gen *BRCA2*, junto con los dominios y proteínas de unión más importantes para su función. El **círculo rojo** indica cada familia afectada por la variante; en **amarillo** se señalan las variantes patogénicas de nueva descripción en este estudio.

A. Cambios en el marco de lectura (*frameshift*)

Hemos encontrado once alteraciones que provocan un desfase del marco de lectura y dan lugar a un codón de parada prematuro (ocho deleciones y tres inserciones). Por otro lado, todas las variantes de este grupo inducen la aparición de una proteína BRCA2 truncada y no funcional, ya que carece de algunos de los dominios importantes para su actividad (**tabla 23**).

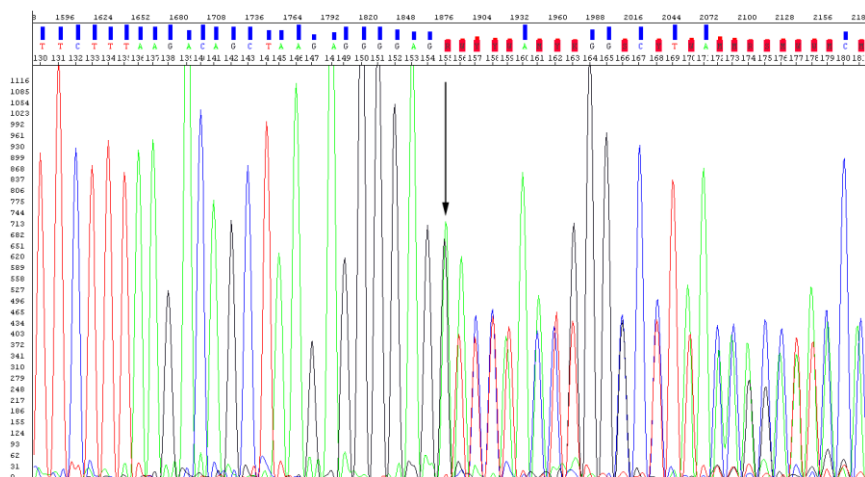


Figura 65. Electroferograma de un cambio en el marco de lectura en *BRCA2* (c.8201delC).

c.262_263delCT

Mutación presente en dos familias (2,85% de las familias *BRCA+* y 6,45% de las familias *BRCA2+*). Esta variante está situada en el exón 3 del gen *BRCA2*. En ella, se produce una deleción de citosina y timina en el codón 88 de la proteína, provocando un cambio de la pauta de lectura y posterior parada en el codón 99 de la misma. Como consecuencia, el resultado es una proteína truncada. Se encuentra en el dominio de activación transcripcional de la proteína *BRCA2*, lo cual conduce a una proteína truncada al interrumpir el dominio de activación del exón 3. No obstante, el truncamiento que se provoca tiene consecuencias biológicas más evidentes, ya que se espera que la proteína *BRCA2* resultante sea de sólo 99 aminoácidos.

Variante descrita por primera vez en un estudio en familias procedentes de Polonia [367]. No obstante, también se ha descrito recientemente en el continente asiático como mutación recurrente, donde estudios de haplotipo han demostrado que la variante se ha originado al menos tres veces de forma independiente [470]. Esta variante ha sido descrita en España en una paciente en Navarra [471] y, posteriormente, en otra familia proveniente de Andalucía [442].

Tabla 23. Variantes patogénicas que cambian el marco de lectura junto con las características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.

Exón/ Intrón	Cambio de ADNc	Cambio de proteína	Nº casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia†	Referencias
3	c.262_263delCT	p. Leu88fs*99	2	F134	CM ≤ 40	CM ≤ 40 + CM	Gorski y col. 2004 [367]
				F173	CM	CM + CM ≤ 40	HGMD
10	c.1597delA	p. Thr533Leufs*557	1	F420	CM ≤ 40	CM ≤ 40 + CM	Díez y col. 2003 [333] BIC
10	c.1608dupT	p. Glu537*	1	F214	CM	2CM + CM ≤ 40	Cardeñosa y col. 2008 [432] BIC
11	c.3264dupT	p. Gln1089Serfs*1098	1	F379	bCMm	bCM	Llort y col. (2002) [472] BIC
11	c.4936_4939 delGAAA	p. Glu1646Glnfs*1668	1	F17	CM	CM + CO + CMO	Wagner JE y col. 2004 [473] BIC
11	c.5073dupA	p. Trp1692Metfs*1694	1	F110	CM ≤ 40	CM ≤ 40	Risch y col. 2001 [474] BIC
11	c.5669_5673 delATGGC	p. Met1890Argfs*1897	1	F285	CM ≤ 40	CM ≤ 40	No descrita
11	c.6491_6494 delAGTT	p. Gln2146fs*2166	1	F127	CO	CO + CM	Lubinski y col. 2004 [475] HGMD
18	c.8201delC	p. Pro2734Leufs*2737	1	F254	CM	CM	UMD
23	c.9026_9030 delATCAT	p. Tyr3009Hisfs*3016	2	F117	bCMm	bCM + CO	Berta Campos y col. 2003 [455] BIC
				F144	bCMs	bCM + 2 CM	
25	c.9310_9311 delAA	p. Lys3104Valfs*3109	1	F195	vCM	vCM + CO + CM	Ramūnas Janavičius 2010 [455] BIC

CM: Cáncer de mama; CM<40: Cáncer de mama con un diagnóstico menor o igual a 40 años; bCM: Cáncer de mama bilateral; bCMm: Cáncer de mama bilateral metacrónico; bCMs: Cáncer de mama bilateral sincrónico; CO: Cáncer de ovario; vCM: Cáncer de mama en varón.

† En las características del tipo de familia se tuvieron en cuenta el caso índice y sus familiares de primer y segundo grado.

a) Descripción de las familias

- F134 (**fig. 66A**): Caso índice (III:1) con un carcinoma ductal invasor de mama pobremente diferenciado (RE y RP negativos, HER+). Su madre (II:2) tuvo un CM y su padre (II:1) cáncer de próstata. Tiene un hermano (III:2) con cáncer de próstata y una prima (III:3) con melanoma.
- F173 (**fig. 66B**): Caso índice (II:8) diagnosticado a los 46 años de carcinoma ductal infiltrante de mama (RE 80%, RP+ 90%, Ki67 + 5%, HER desconocido). Tiene una hermana (II:6) que falleció a los 39 años por CM diagnosticado a los 37. Se le ha realizado el test genético a su hermano (II:4), que resultó ser negativo para dicha variante. No tiene más hermanos vivos. Su madre (I:1) tuvo un tumor glandular salivar y un melanoma, fue *exitus letalis* a los 62 años.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
2	2 (100)	39 (32-46)	0	0	-	0

No se han encontrado estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica.

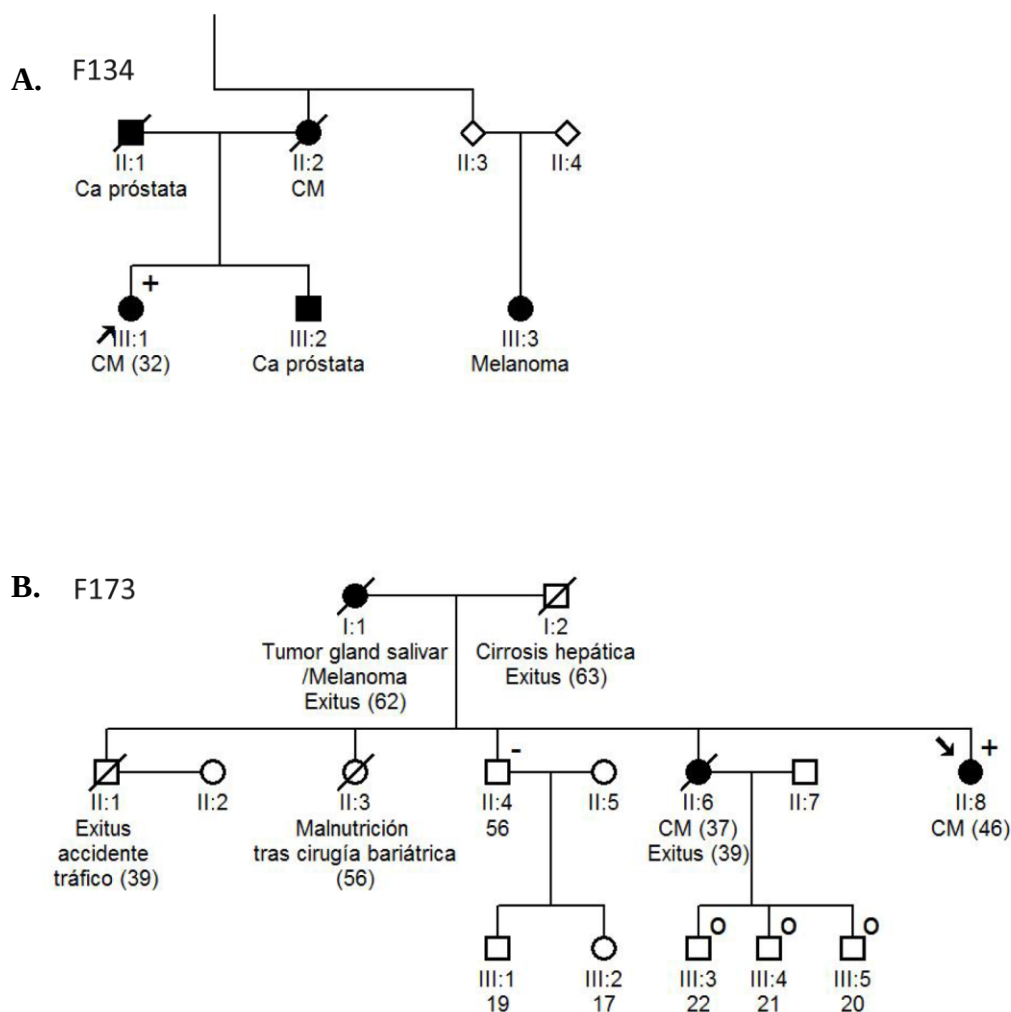


Figura 66. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.262_263delCT en *BRCA2*. En **A** F134 y en **B** F173.

c.1597delA

Variante encontrada en una sola familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 3,23% de las familias *BRCA*2+). Se trata de una delección de la base adenina afectándose el codón 533 de la proteína, la cual provoca un cambio de aminoácido de treonina por leucina y un cambio de la pauta lectura con parada prematura en el codón 557. Este truncamiento de la proteína provoca la eliminación de dominios tan importantes para la función reparadora de *BRCA2* como las repeticiones *BRC*, el dominio helicoidal y los tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*).

Variante descrita en la base de datos BIC y en estudios poblacionales de España [333;335;439;472], por lo que podríamos determinar que se trata de una variante de probable efecto fundador en nuestro país.

a) Descripción de las familias

- F420 (**fig. 67**): Caso índice (II:5) con carcinoma ductal infiltrante de mama (pT2pN+; RE+ 99%, RP+ 99%, ki67+ 58% y HER-) a los 38 años. Su madre (I:2) falleció por CM a los 50 años

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	38	0	0	-	0

En el trabajo de Díez y col. (2003) [333] se ha descrito en 5 pacientes con CM <50 años y dos de ellos fueron bilaterales.

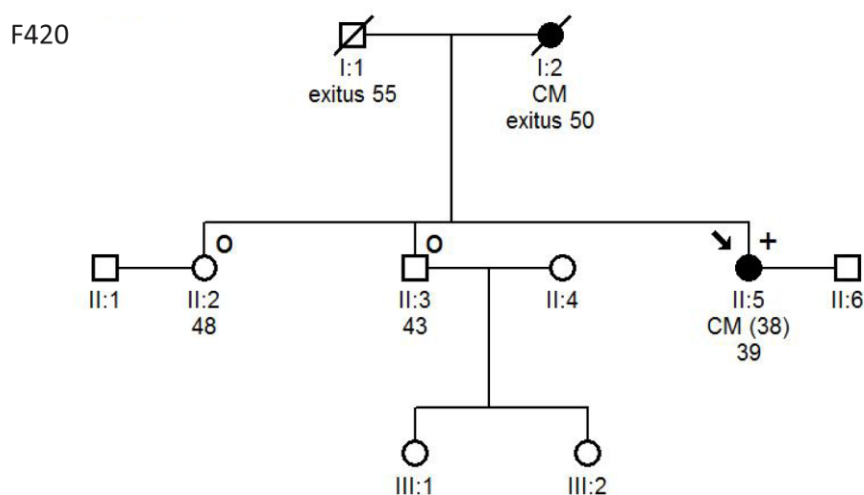


Figura 67. Árbol familiar del caso portador de la variante c.1597delA en *BRCA2*.

c.1608dupT

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 3,23% de las familias *BRCA2+*). Se trata de una duplicación de una timina en la posición 1608 del ARNm, la cual provoca un codón de parada prematura en el codón 536 de la proteína. Este truncamiento de la proteína provoca la eliminación de dominios tan importantes para la función reparadora de *BRCA2* como las repeticiones *BRC*, el dominio helicoidal y los tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*).

Variante descrita por primera vez en la Comunidad Valenciana [432], y posteriormente en otros estudios en la misma región [444;476]. Se encuentra en la base de datos *BIC* y *HGMD*.

a) Descripción de las familias

- F214 (**fig. 68**): Caso índice (III:2) con carcinoma ductal infiltrante de mama (RE+RP+HER-) diagnosticado a los 43 años. Tiene una madre (II:3) fallecida con CM diagnosticado a los 33 años. Su abuela por la rama materna (I:2) tuvo CM a los 80 años, mientras que su abuelo (I:1) tuvo cáncer de pulmón.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	43	0	0	-	0

No se han encontrado estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica.

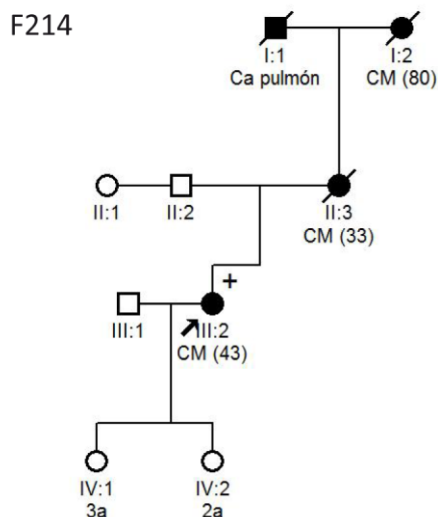


Figura 68. Árbol familiar del caso portador de la variante c.1608dupT en *BRCA2*.

c.3264dupT

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 3,23% de las familias *BRCA2+*). La duplicación de una timina que se produce en la posición 1089 de la proteína provoca un cambio de la pauta lectura con parada prematura de la traducción en la posición 1098. En esta posición se encuentra cercano el dominio de la segunda repetición *BRC* (aminoácidos 1012-1246), por lo que este truncamiento de la proteína provocaría la eliminación de 6 repeticiones *BRC* (con la consecuente afectación de la unión con *RAD51*) y los tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*). Por tanto, la función de la RH de la proteína se vería fuertemente afectada.

Variante descrita por primera vez en España [472]. Se ha encontrado en diferentes regiones como en la Comunidad Valenciana de manera recurrente, en Castilla y León y Aragón [446]. Recientemente, en un estudio en población hispánica en el sudoeste de Estados Unidos, se encontró con una alta frecuencia (15% de las mutaciones en *BRCA2*). Las diez familias que la presentaron tenían origen mexicano [477].

a) Descripción de las familias

- F379 (**fig. 69**): Caso índice (II:2) diagnosticado con cáncer de mama bilateral metacrónico a los 53 y a los 65 años, inicialmente la mama derecha con carcinoma ductal infiltrante escasamente diferenciado (T2N0M0; RE+ 100% RP+ 70%) y, posteriormente, la mama izquierda con carcinoma ductal infiltrante (pT2pN0M0, RE+50%, RP<10%, Ki67+ 40% y HER2-). Tiene

una madre (I:2) fallecida por CM a los 35 años. Su hermano (II:1) tiene carcinoma colorrectal.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	53	1 (100)	0	-	0

Mutación ampliamente descrita en pacientes con afectación bialélica con anemia de Fanconi [478]. El trabajo más extenso de estudios genotipo-fenotipo de portadores con esta variante patogénica fue en la Comunidad Valenciana [445]: se detectaron 16 casos de CM con una edad mediana de diagnóstico de 40 años (29-69), un caso de ellos fue bilateral, uno fue cáncer de mama y ovario y hubieron dos casos con cáncer de ovario.

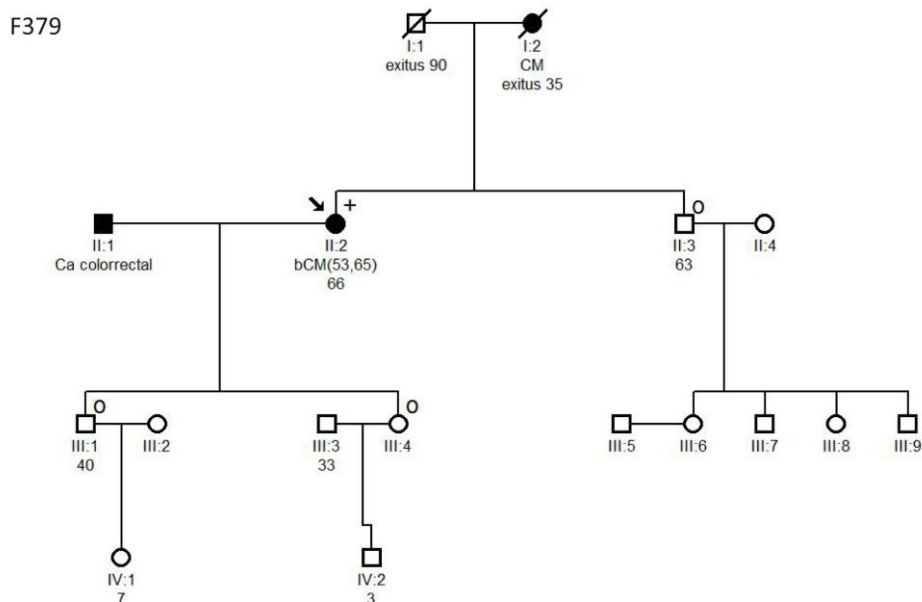


Figura 69. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.3264dupT en *BRCA2*.

c.4936_4939delGAAA

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 3,23% de las familias *BRCA2+*). En esta mutación se produce una delección de 4 pares de bases (GAAA) en el codón 1646 y, como consecuencia, un cambio en la pauta de lectura y un codón de parada prematuro en la posición 1668. De esta manera, se traduciría una proteína con 1668 aminoácidos y sin cuatro repeticiones *BRC* ni los tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*). Por tanto, podemos determinar que la función reparadora de la proteína estaría muy afectada.

Mutación descrita inicialmente en una paciente con anemia de Fanconi, la cual se presentó de forma bialélica [473]. Ampliamente distribuida en diversas poblaciones del mundo (en la base de datos *BIC* se han encontrado 28 entradas). Se ha descartado como población fundadora en población Ashkenazi [479]. En España, se han descrito en poblaciones de Castilla y León [480] y de la Comunidad Valenciana [444;445;476].

a) Descripción de las familias

- F17 (**fig. 70**): Caso índice (III:2) con carcinoma ductal invasor de mama pobremente diferenciado (triple negativo), diagnosticado a los 57 años. Tiene una hermana (III:1) fallecida por cáncer de mama y ovario. Su abuela paterna (I:1) tiene cáncer de ovario.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	57	0	0	-	0

La única referencia con datos fenotípicos encontrada ha sido una paciente portadora de esta variante patogénica con un CM dignosticado a los 38 años [445].

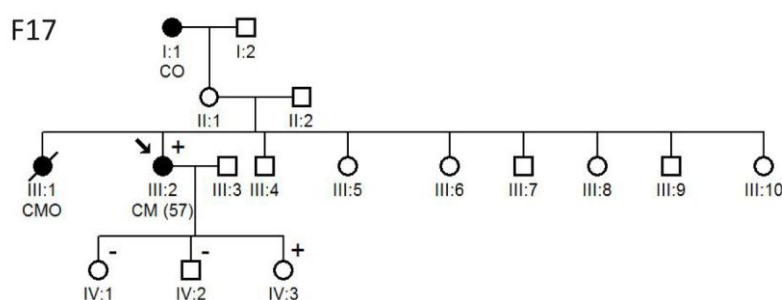


Figura 70. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.4936_4939delGAAA en *BRCA2*.

c.5073dupA

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 3,23% de las familias *BRCA2*+). La mutación presenta una duplicación de adenina en el gen, provocándose un cambio de triptófano a metionina en la posición 1692 de la proteína. Además, se provoca un cambio de la pauta de lectura con codón de parada en la posición 1694. La creación de una proteína truncada en esta posición provoca la eliminación de cuatro repeticiones *BRC* y los tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*), por lo que se perdería la función de la RH de la proteína.

Mutación ampliamente distribuida en diversas poblaciones (31 entradas en la base de datos *BIC*). Trabajos anteriores han indicado que los eventos mutacionales no son al azar y se producen en estructuras fisiológicamente estables de ADN secundarios llamados bucles en horquilla (*hairpin-loops*) [481;482]. Parece ser que esta variante se encontraría en este tipo de estructuras más vulnerables a mutagénesis espontáneas [483]. Se ha descrito como mutación *de novo* [484]. No hay evidencias de haberse encontrado, hasta la fecha, en otras poblaciones de España [333;335;439;444;480].

a) Descripción de las familias

- F110 (**fig. 71**): Caso índice (III:1) con CM diagnosticado a los 28 años (pT2pN1). Tiene dos tíos por la rama materna con cáncer de pulmón (II:3 y II:4) y una tía (II:5) con cáncer de ovario.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	28	0	0	-	0

En la revisión del caso clínico donde se detectó esta mutación *de novo* [484], a la paciente se le diagnosticó un CM a los 35 años.

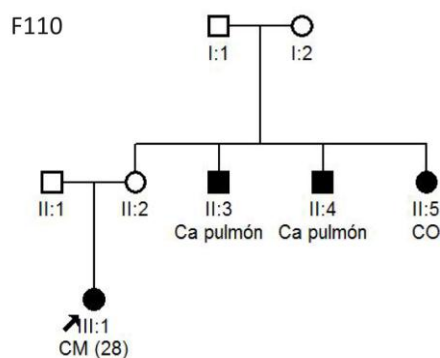


Figura 71. Árbol familiar del caso portador de la variante c.5073dupA en *BRCA2*.

c.5669_5673delATGGC

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 3,23% de las familias *BRCA2+*). Mutación en la cual se produce una delección de 5 pares de bases (ATGGC), provocando un cambio de la pauta de lectura y un codón de parada prematura en la posición 1897 de la proteína. Consecuentemente, se produciría la eliminación de las últimas dos repeticiones *BRC* y los tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*), por lo que la función reparadora de la proteína se vería ampliamente afectada.

Esta variante no se ha encontrado en las bases de datos consultadas ni en la literatura científica, por lo que podemos determinar que se trata de una mutación patogénica en *BRCA2* de nueva descripción.

a) Descripción de las familias

- F285 (**fig. 72**): Caso índice (III:4) diagnosticado de carcinoma ductal infiltrante en la mama izquierda a los 38 años (T2NxM0; RE+10%, RP+10% y Her2-). Su abuelo paterno (I:1) fue diagnosticado de cáncer cerebral, fallecido a los 40 años. A su abuela paterna (I:2) se le diagnosticó cáncer hepático. Tiene una tía (II:3) con CM a los 60 años, a cuyos hijos (III:1 y III:2) se les ha diagnosticado leucemia a los 31 años y cáncer de útero a los 43, respectivamente. Además, tiene una tía por la rama materna (II:6) diagnosticada de cáncer de páncreas a los 41 años.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	38	0	0	-	0

Al único caso portador se le diagnosticó un CM a los 38 años.

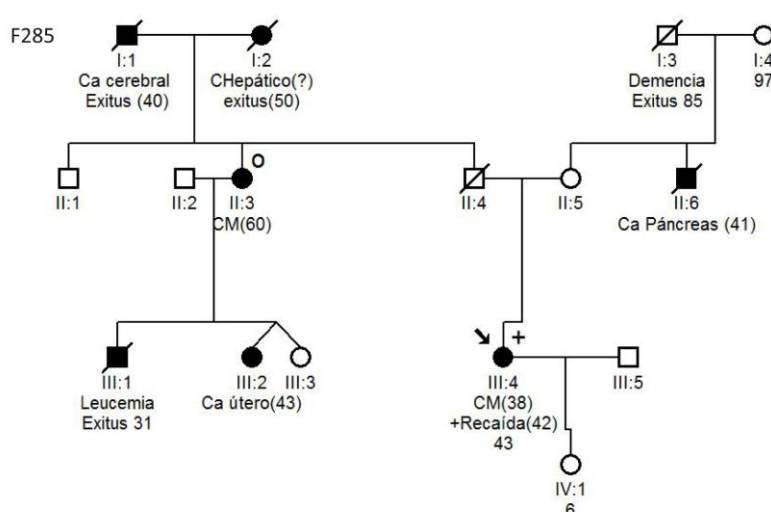


Figura 72. Árbol familiar del caso portador de la variante c.5669_5673delATGGC en *BRCA2*.

c.6491_6494delAGTT

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 3,23% de las familias *BRCA2+*). La delección de 4 pares de bases (AGTT) en la posición 2146 de la proteína provoca un cambio en la pauta de lectura con posterior truncamiento de la proteína, ya que se produce un codón de parada en la posición 2166. Al producirse una proteína con 2166 aminoácidos, se eliminaría el dominio helicoidal, el dominio *OB1* y el dominio *OB2*; dominios relacionados con la estabilización de la proteína *BRCA2*. Además, el dominio *NLS*, el cual se une a *RAD51*, tampoco estaría presente. Todos estos efectos impedirían el normal funcionamiento de la proteína *BRCA2*.

Esta variante ha sido descrita por primera vez en un estudio de cómo afectan las distintas mutaciones en la región del grupo de cáncer de ovario (*ovarian cancer cluster region*, OCCR) (nucleótidos 3035-6629) [475]. También se ha descrito en población eslovena [485]. No hay evidencias de haberse encontrado, hasta la fecha, en otras poblaciones de España [333;335;439;444;480].

a) Descripción de las familias

- F127 (**fig. 73**): Caso índice (III:3) diagnosticado de cáncer de ovario en un estadio IIIc. Su madre (II:2) falleció por un CM diagnosticado a los 42 años y su abuelo por rama materna (I:1) tuvo cáncer de próstata a los 78 años. Tiene una tía, hermana de su madre (II:3) con CM a los 55 años. Tiene un hermano (III:3) con cáncer basocelular. Además, se les ha realizado el test genético a cuatro hermanos (III: 7 negativo, III:11 positivo, III:13 positivo y III:16 negativo) y a dos sobrinos (IV:14 negativo y IV:15 positivo); ninguno de ellos está afecto, hasta la fecha, por ningún tipo de cáncer.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
4	0	-	0	1 (25)	56	0

La variante se encuentra en la región OCCR (nucleótidos 3035-6629) propuesta por Lubinski [475], por lo que podría explicar el caso detectado con cáncer de ovario.

F127

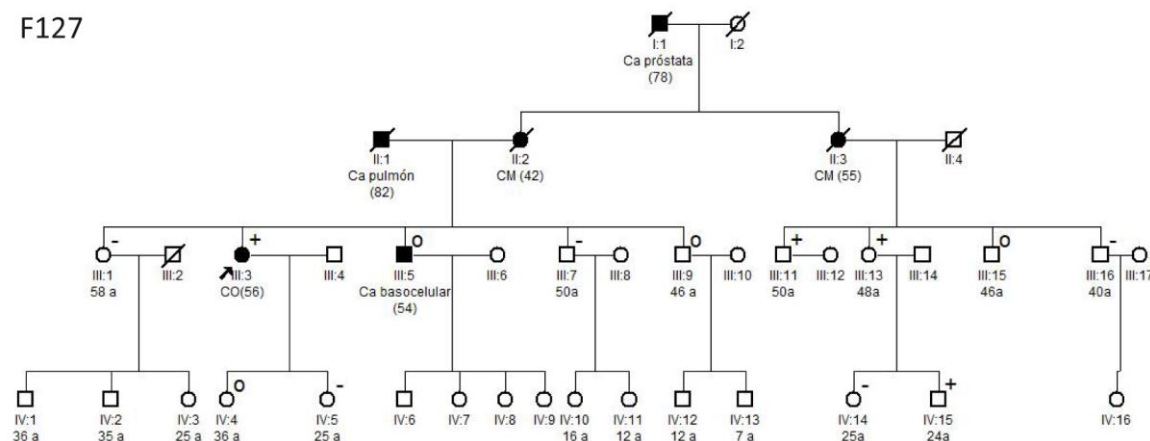


Figura 73. Árbol familiar del caso portador de la variante c.6491_6494delAGTT en *BRCA2*.

c.8201delC

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 3,23% de las familias *BRCA2+*). Existe una delección de una citosina en el codón 2734, lo cual provoca un cambio de aminoácido (leucina por prolina), un cambio de la pauta de lectura y, como consecuencia, un codón de parada en la posición 2737. Se produciría la eliminación de los tres pliegues oligonucleótidos de unión (OB) y del dominio NLS, alterando la función reparadora de la proteína de una manera importante.

Variante únicamente descrita en la base de datos *UMD*. No existen evidencias en la literatura científica ni se ha encontrado en estudios de población española [333;335;439;444;480].

a) Descripción de las familias

- F254 (**fig. 74**): Caso índice (III:7) diagnosticado de carcinoma ductal de mama derecha (pT2pN3; RH+, HER-). Tiene una tía por parte paterna (II:10) portadora de la variante y diagnosticada de CM a los 47 años y un tío paterno (II:3) diagnosticado de proceso linfóide y fallecido a los 60 años. A tres hermanos se le ha realizado el test genético en búsqueda de la mutación, siendo dos negativos (III:1 y III:5) y uno positivo (III:10); todos ellos sanos.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
3	2 (66)	44,5 (42-47)	0	0	-	0

No se han encontrado estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica.

F254

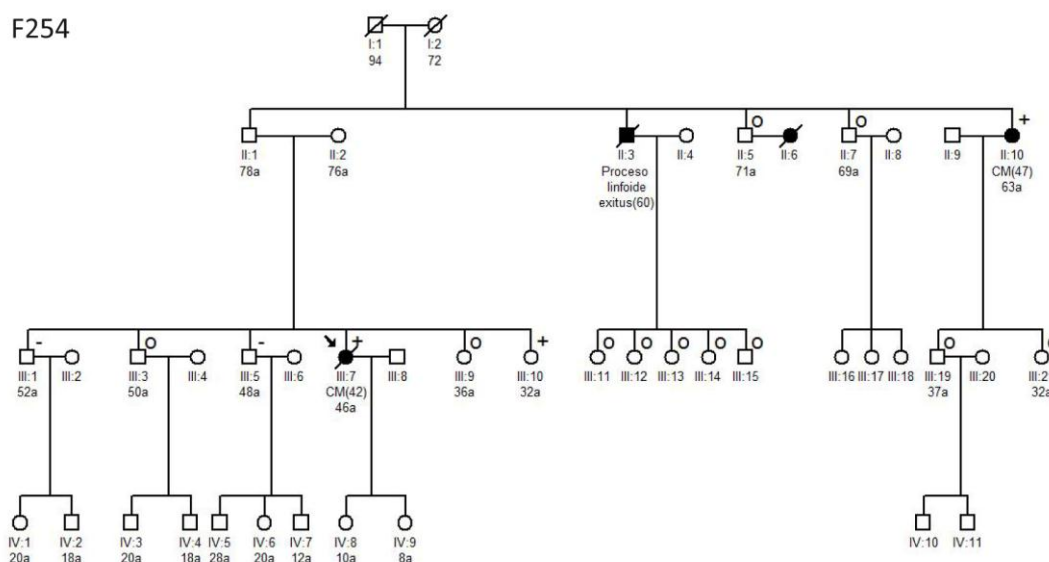


Figura 74. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.8201delC en BRCA2.

c.9026_9030delATCAT

Variante presente en dos familias (2,86% de las familias *BRCA*+ y 6,45% de las familias *BRCA2*+). La delección de 5 pares de bases (ATCAT) provoca un cambio de la pauta de lectura en la posición 3009 de la proteína y, como consecuencia, un codón de parada prematuro en la posición 3016. Al producirse un truncamiento de la proteína en esa posición, se eliminaría el último pliegue oligonucleótido de unión (*OB3*) y el *NLS*, importantes para su función reparadora.

Esta variante está ampliamente distribuida en España. Se trata de una mutación fundadora de origen mediterráneo, que se ha encontrado en un 18,5% (5/27 familias) de las mutaciones *BRCA2* [455]. Estudios de haplotipo y cálculos mediante métodos de máxima verosimilitud han demostrado que se trata de una mutación fundadora con una edad de unas 92 generaciones (IC 95 % 56-141) [486].

a) Descripción de las familias

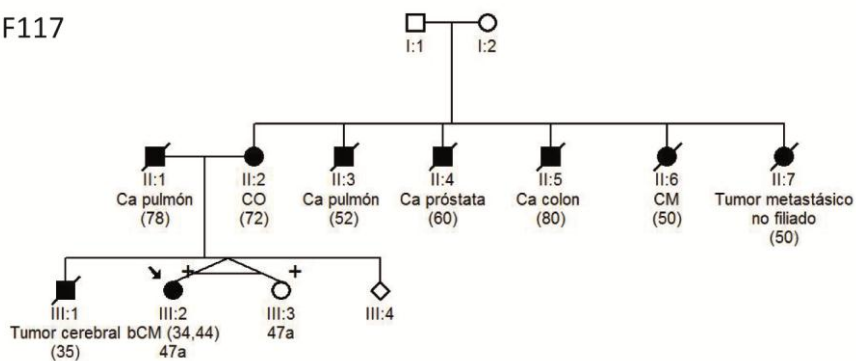
- F117 (**fig. 75A**): Caso índice (III:2) diagnosticado de cáncer de mama bilateral metacrónico a los 34 y 44 años. Inicialmente tuvo un carcinoma ductal infiltrante en la mama izquierda (RE+ 25-50%, Ki67+ <25%, p53 + <25%) y en la mama derecha un carcinoma carcinoma intraductal alto grado (TisN0M0, inmunohistoquímica desconocida). Tiene una hermana gemela (III:3), portadora de mutación pero sana; y un hermano (III:1) fallecido por tumor cerebral a los 35 años. La madre (II:2) tiene un cáncer de ovario diagnosticado a los 72 años. Tiene dos tíos maternos (II:3, II:4 y II:5) fallecidos y diagnosticados de cáncer de pulmón a los 52 años, cáncer de próstata a los 60 años y cáncer de colon a los 80 años, respectivamente. Tiene dos tías más maternas (II:6 y II:7) fallecidas y diagnosticadas de CM a los 50 años y un tumor metastásico no filiado a los 50, respectivamente. Al padre del probando (II:1) se le diagnosticó cáncer de pulmón a los 78 años.
- F144 (**fig. 75B**): Caso índice (II:6) diagnosticado de cáncer bilateral sincrónico a los 58 años, en la mama izquierda con un carcinoma ductal infiltrante (pT1cN1bM0; RE+, RP+, HER+) y en la mama derecha con un carcinoma ductal infiltrante (pT1bN1Mx; RE+, RP+, HER-). Tiene una hermana (II:2) portadora de la misma variante con un CM a los 57 años y otra hermana (II:4) también portadora sana. Tiene una hija (III:8) sana portadora de la variante y dos hermanos (III:9 y III:10) no portadores. Tiene dos sobrinos (III:2 y III:6) negativos para dicha variante.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
6	3 (50)	57 (34-59)	2 (33)	0	-	0

Se ha descrito mayoritariamente en casos de CM. El estudio más extenso genotipo-fenotipo acerca de esta variante revisado [486] fue en 12 familias, en las que se registraron: 37 casos de CM con una edad mediana de 45 años (29-69) y 7 casos de cáncer de ovario con una edad mediana de 52 (40-60).

A. F117



B. F144

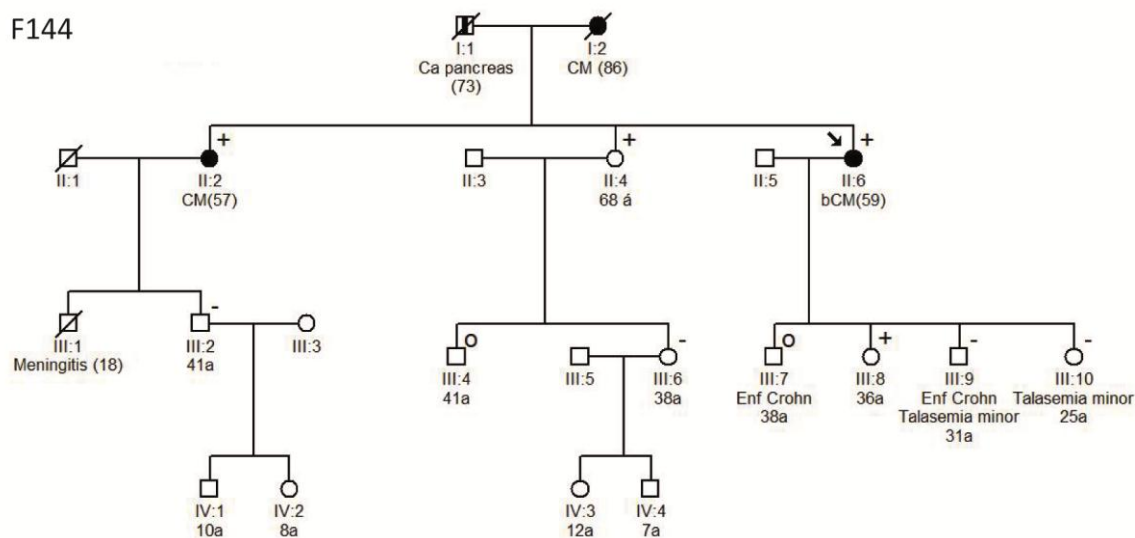


Figura 75. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.9026_9030delATCAT en *BRCA2*. En **A** F117 y en **B** F144.

c.9310_9311delAA

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 3,23% de las familias *BRCA*2+). Al producirse una delección de dos adeninas en la posición 3104, cambio de la pauta de lectura y un codón de parada en la posición 3109 de la proteína. Por tanto, esta variante patogénica provoca una proteína truncada y la eliminación de parte del dominio del pliegue oligonucleótido de unión (*OB3*) y el dominio *NLS*. Ambos dominios participan en la función de RH de la proteína *BRCA*2.

Variante considerada como la tercera más prevalente en España entre las mutaciones en el gen *BRCA*2 [333]. También se ha descrito en un estudio de población hispánica del estado de Texas (EE.UU.) [487]. Según estudios con marcadores de microsatélites, se demostró el ancestro común en Castilla y León con una estimación de la edad de la mutación de en torno a 54,6-37,37 generaciones (1365-934 años) [488]. Edad que habría permitido que la mutación se haya propagado de manera significativa en España [333].

a) Descripción de las familias

- F195 (**fig. 76**): Caso índice (III:1) varón con cáncer renal de células claras, cáncer de próstata y carcinoma ductal infiltrante de mama a los 78 años (T1N1M0; RE + 50%, RP +, p53 negativo, Ki67+ 30-35%). Su hija (IV:1) es también portadora de la mutación, y ha sido afectada con un cáncer de ovario a los 19 años y un cáncer de colon a los 42. Su madre (II:2) fue diagnosticada de CM, lo mismo que sus dos tías (II:3 y II:4).

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
2	1 (50)	-*	0	1 (50)	19	0

*En el cálculo de la mediana de diagnóstico del cáncer de mama no se tuvo en cuenta el cáncer de mama en varón.

En el estudio en población castellano-leonesa donde se demostró su efecto fundador [488], en cuatro familias se observaron 11 cánceres de mama (2 de ellos en varón) y un cáncer de ovario, con una media de diagnóstico en el cáncer de mama femenino de 39,4 (29-60) años. A pesar de que en este estudio y en el nuestro se haya encontrado casos de CM en varón, no existen evidencias de que esta posición de la mutación se correlacione con un mayor riesgo de CM en varón [489].

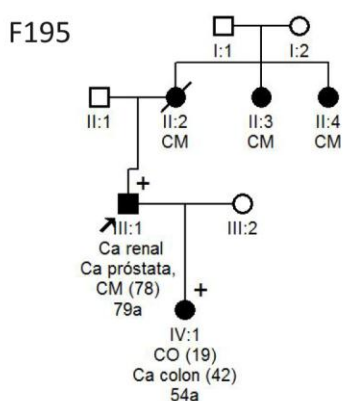


Figura 76. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.9310_9311delAA en *BRCA2*.

B. Cambios sin sentido (*nonsense*)

Estas mutaciones son aquellas en que un cambio de base da lugar a un codón de parada prematuro. Se han encontrado 3 tipos diferentes de este tipo de variantes en *BRCA2* (tabla 24).

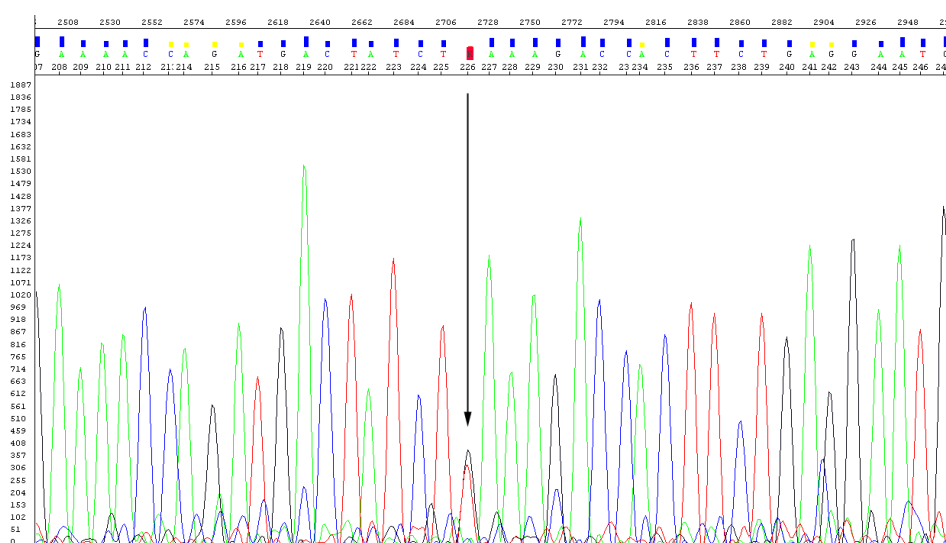


Figura 77. Electroferograma de un cambio sin sentido (*nonsense*) en *BRCA2* (c.3455T>G).

Tabla 24. Variantes patogénicas sin sentido (*nonsense*), junto con las características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.

Exón/ Intrón	Cambio de ADNc	Cambio de proteína	Nº casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia†	Referencias
11	c.2095C>T	p. Gln699*	1	F135	CM≤40	CM≤40	Blay y col. 2013 [442]
11	c.3455T>G	p.Leu1152*	3	F217	CM	CM	Gutiérrez- Enríquez y col. 2009 [490] BIC
				F258	bCMs (≤40)	bCM ≤40	
				F309	CM	CM	
11	c.3922G>T	p.Glu1308*	1	F18	CM	CM≤40+ CM	Díez y col. 2003 [333]

CM: Cáncer de mama; CM≤40: Cáncer de mama con un diagnóstico menor o igual a 40 años; bCM: Cáncer de mama bilateral; bCMs (≤40): Cáncer de mama bilateral sincrónico diagnosticado a una edad menor o igual a 40 años.

† En las características del tipo de familia se tuvieron en cuenta el caso índice y sus familiares de primer y segundo grado.

c.2095C>T

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 3,23% de las familias *BRCA*2+). El cambio de una citosina por una timina afecta a la posición 699 de la proteína, provocando un codón de parada prematuro. Al producirse un truncamiento de la proteína en esta posición se eliminarían los dominios más importantes para su función: las repeticiones *BRC*, el dominio helicoidal y los tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*).

Únicamente existen evidencias de esta variante patogénica en población asturiana, descrita recientemente por primera vez [442].

a) Descripción de las familias

- F135 (**fig. 78**): Caso índice (III:2) diagnosticado de carcinoma ductal infiltrante en la mama izquierda (T2NMx; RE+, RP+, HER-). Tiene una hermana (III:1) no portadora de la variante patogénica y otra (III:3) que sí lo es, ambas están sanas. El padre (II:2) también es portador de la mutación, y la hermana de éste (II:1) falleció por CM a los 50 años.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
3	1 (33,3)	32	0	0	-	0

No se han encontrado estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica.

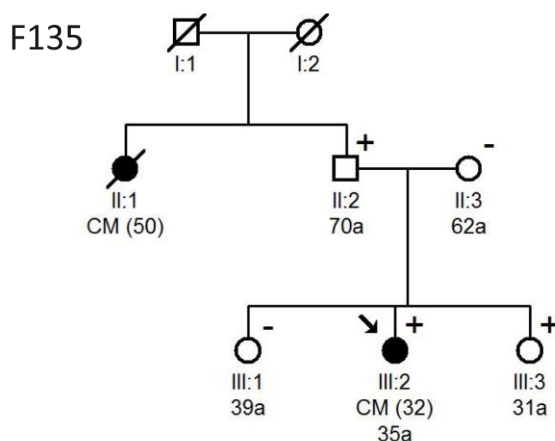


Figura 78. Árbol familiar de los casos portadores de la variante c.2095C>T en *BRCA2*.

c.3455T>G

Variante presente en tres familias (4,29% de las familias *BRCA+* y 9,68% de las familias *BRCA2+*). Se produce un cambio de guanina por timina en el codón 1152, provocando un codón de parada en el mismo codón. El resultado es una proteína truncada con la pérdida de siete repeticiones *BRC*, el dominio helicoidal y los tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*). Como consecuencia, no sería posible el funcionamiento normal de la proteína *BRCA2*.

Variante que se encuentra registrada en la base de datos *BIC* (número de acceso 5224) en población asiática. En la literatura científica se ha visto descrita en estudios con población española [439;490] y en población francesa [491]. No hay constancia que haya sido descrita con tanta frecuencia como en nuestra población estudiada.

a) Descripción de las familias

- F217 (**fig. 79A**): Caso índice (III:2) con carcinoma ductal infiltrante sin afectación ganglionar (triple negativo), diagnosticado a los 49 años. Su madre (II:3) falleció a los 50 años por un carcinoma de cérvix. Tiene tres hermanos, los cuales dos varones son portadores de la mutación (III:6 y III:8) y la mujer (III:4) no es portadora; todos los hermanos se encuentran sanos. Los dos hijos (IV:1 y IV:2) no son portadores y se encuentran sanos. Un sobrino (IV:4) ha tenido sarcoma de Ewing a los 14 años.
- F258 (**fig. 79B**): Caso índice (III:2) con cáncer de mama bilateral sincrónico a los 37 años de edad. Tuvo una infiltración por carcinoma ductal en la mama derecha (RE+ 99%, RP+ 99%, HER-, Ki67+ 23%, RA+ 93%) y una infiltración por carcinoma lobulillar de patrón clásico en la mama izquierda (RE+ 92%, RP+ 94%, HER-, Ki67+ 5% RA+ 84%). Su abuelo paterno (I:1) tuvo cáncer de colon a los 82 años, su tía (II:3) también se encuentra fallecida por la misma causa y tiene una prima (III:3) diagnosticada de CM a los 68 años. Tiene un hermano (III:1) con hemangioma angiomatoso.
- F309 (**fig. 79C**): Caso índice varón (II:6) con carcinoma ductal infiltrante en la mama derecha (pT1cpN0M0; RE+,RP-, Her2-, E-cadherina +, Ki67 20%) y un cáncer de páncreas en estadio IV. Su madre (I:2) falleció por cáncer de páncreas a los 52 años, tiene un hermano (II:3) fallecido por cáncer de páncreas a los 56 años, una hermana con cáncer de ovario a los 65 años y cáncer de páncreas a la edad de 68 y otro hermano (II:8) que falleció por leucemia a los 55. Las dos hijas del caso índice (III:6 y III:7) no son portadoras de la mutación.

a) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
5	3 (60)	43 (37-49)*	1 (20)	0	-	0

*En el cálculo de la mediana de diagnóstico del cáncer de mama no se tuvo en cuenta el cáncer de mama en varón.

No existen estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica. No obstante, debemos destacar a la F309 con 3 casos de páncreas en familiares de primer grado, a los cuales no se les pudo realizar el estudio genético por fallecimiento.

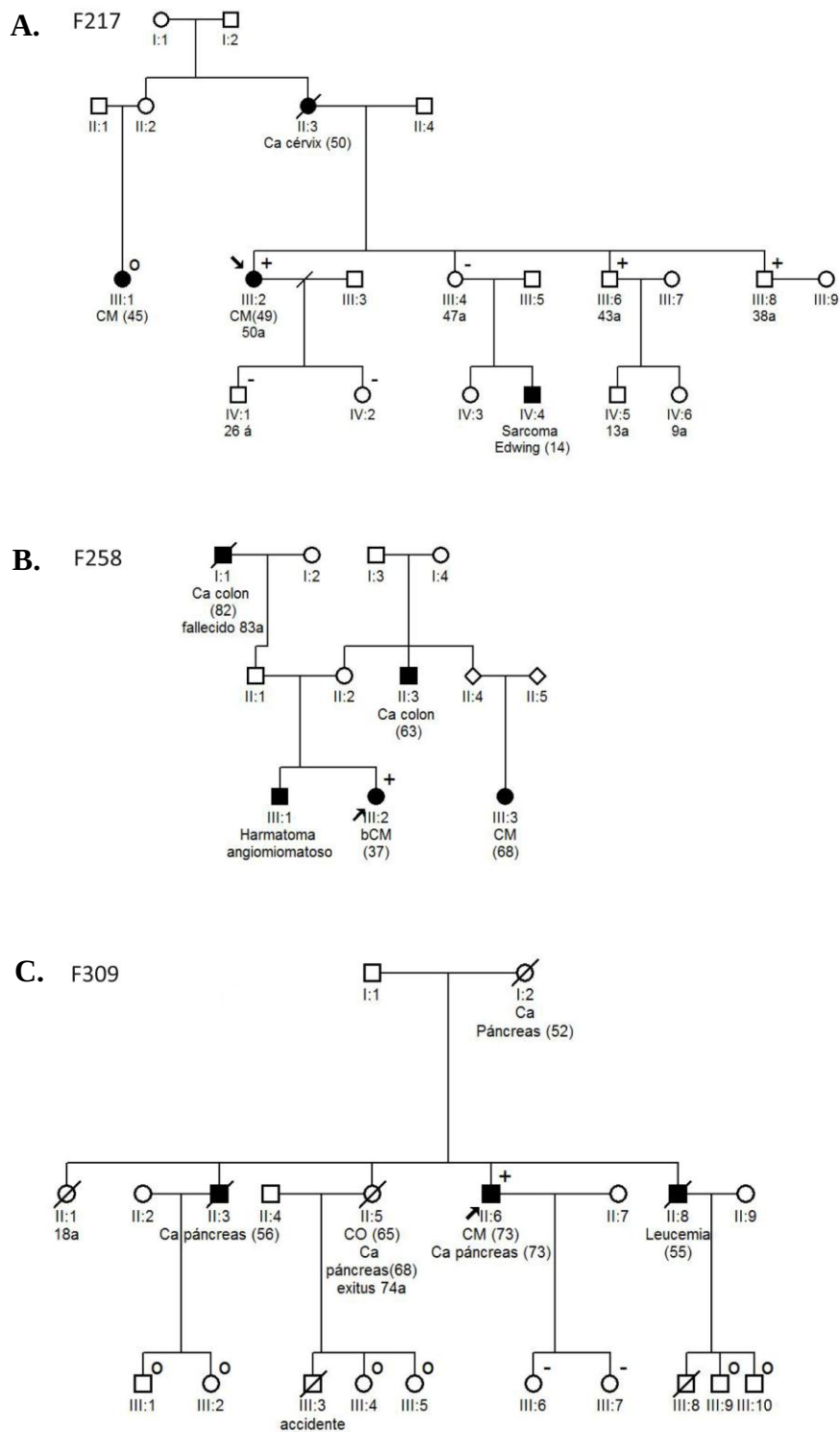


Figura 79. Árboles familiares de los casos portadores de la variante c.3455T>G en *BRCA2*. En **A** F217, en **B** F258 y en **C** F309.

c.3922G>T

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 3,23% de las familias *BRCA*2+). Variante *nonsense* debido al cambio de una timina por una guanina en el codón 1308, provocando un codón de parada prematura (GAA → TAA). Esta variante presente en el exón 11, eliminaría seis repeticiones *BRC*, el dominio helicoidal y los tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*). Por tanto, el resultado sería una proteína no funcional.

Variante descrita por primera vez en una familia de origen castellano-leonés [492]. Posteriormente se ha visto que está ampliamente distribuida en población española y latina [333;444;476;480;493]. Recientemente, en la Comunidad Valenciana se ha descrito con una frecuencia de un 4,51% de las mutaciones presentes en el gen *BRCA*2 [445].

a) Descripción de las familias

- F18 (**fig. 80**): Caso índice (III:2) con cáncer de mama diagnosticado a los 43 años (pT2N3M0; RE+ 11-30%, RP + <10%, HER+). Su madre (II:2) falleció a los 28 años por CM, y una tía (II:1) falleció por el mismo motivo. Se le ha realizado el estudio genético a un hijo (IV:1) que ha resultado ser portador de la variante patogénica; y a su hermana (III:3), que también es portadora.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
3	1 (33,3)	43	0	0	-	0

En el trabajo de de Juan Jiménez y col. [445], se registraron 7 casos con CM con esta variante patogénica a una edad mediana de diagnóstico de 45 (29-56) años y hubo un caso de cáncer bilateral.

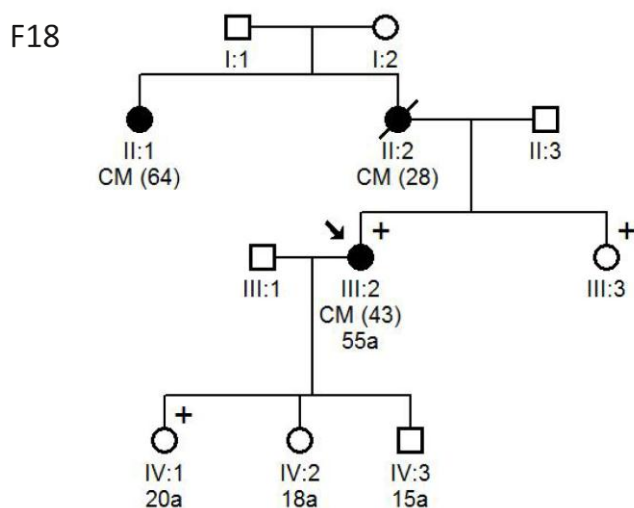


Figura 80. Árbol familiar de los casos portadores de la variante patogénica c.3922G>T (BRCA2).

C. Variantes patogénicas que afectan al *splicing*

Este tipo de variantes alteran la maduración del ARNm y aparecen tradicionalmente en las fronteras exón-intrón, en el sitio 5' donador (GT) o 3' aceptor (AG). En torno a esos nucleótidos se marcan las fronteras exón-intrón e intrón-exón a la maquinaria de maduración del ARNm para que los intrones sean eliminados correctamente. Cambios en estas secuencias consenso dan lugar a un transcrito alterado que a su vez originará una proteína anómala y no funcional. Además, dependiendo del punto de *splicing*, pueden causar un cambio en la fase del marco de lectura.

Se han detectado tres variantes de este tipo, una de ellas no descrita y que se demostró por estudios de RT-PCR que se producía la eliminación de un exón (**tabla 25**).

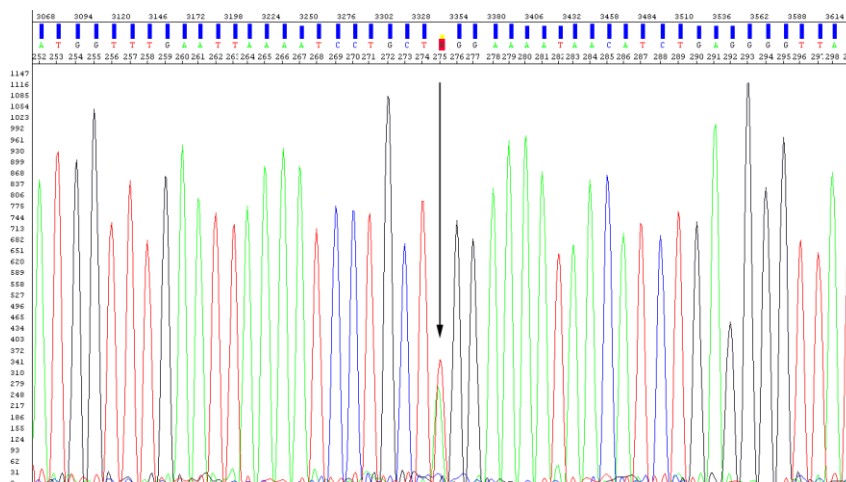


Figura 81. Electroferograma de una variante con efecto en el *splicing* en BRCA2.

Tabla 25. Variantes patogénicas de efecto en el *splicing*, junto con las características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.

Exón/ Intrón	Cambio de ADNc	Cambio de proteína	Nº casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia†	Referencias
13	c.7007G>A	p. [Glu2281_Gly2313del, Gly2280Alafs*2310, Gly2313Alafs*2343]	1	F354	bCMmO	bCMO	Farrugia y col. (2008) BIC
I-17	c.7977-1G>A	p.Arg2659_Lys2777del	1	F10	CM ≤ 40	CM≤40 + CM	No descrita
23	c.9117G>A	p.[Val2985Glyfs*2987, Val2985_Thr3001del, Val2985_Thr3085del]	5	F19	bCMmO	bCMO+ CM	Bonnatti y col. 2006 BIC
				F44	bCMm	bCM+CM	
				F113	bCMmO	bCMO+ CM	
				F294	CM	2CM	
				F303	CM≤40	2CM≤40	

CM: Cáncer de mama; CM≤40: Cáncer de mama con un diagnóstico menor o igual a 40 años; bCMm: cáncer bilateral metacrónico; bCMmO: Cáncer de mama bilateral metacrónico y cáncer de ovario.

†En las características del tipo de familia se tuvieron en cuenta los familiares de primer grado del caso índice

c.7007G>A

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA*+ y 3,23% de las familias *BRCA*2+). Variante que consiste en un cambio de adenina por guanina en el último codón del exón 13. Se demostró por RT-PCR inicialmente que este cambio provocaba un efecto en el *splicing* induciendo el *skipping* del exón 13 [494]. Estudios más amplios han encontrado tres tipos de transcritos: uno sin el exón 13, otro transcrito en el que carecían los exones 12 y 13 y otro transcrito sin el exón 12 [495]. En los dos transcritos donde se producen codones de parada en las posiciones 2310 y 2343 de la proteína, se verían afectados el dominio helicoidal y los tres pliegues oligonucleótidos de unión (*OB*). Por tanto, podemos determinar que la función de la proteína se vería fuertemente afectada.

Variante ampliamente distribuida por el oeste de Europa (8 entradas en la base de datos BIC). Se ha descrito en un estudio multicéntrico español de variantes *splicing* en *BRCA*1 y *BRCA*2 [464]. Se comprobó el origen centroeuropeo de la probando.

a) Descripción de las familias

- F354 (**fig. 82**): Caso índice (IV:1) con un cáncer bilateral diagnosticado a los 36 años. En la mama izquierda se le diagnosticó un carcinoma ductal infiltrante (pT1cpN0M0; RE+ (60%), RP + (45%), HER desconocido). Posteriormente se le diagnosticó un cáncer de ovario (carcinoma tubárico primario seroso de alto grado con afectación ovárica bilateral IIIc pT3cpN0Mx), aunque se desconoce a qué edad. Tiene una tía (III:4) con CM a los 54 años y una tía de tercer grado (III:4) diagnosticada de cáncer bilateral.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	36	1 (100)	1	-	1 (100)

No se han encontrado estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica.

F354

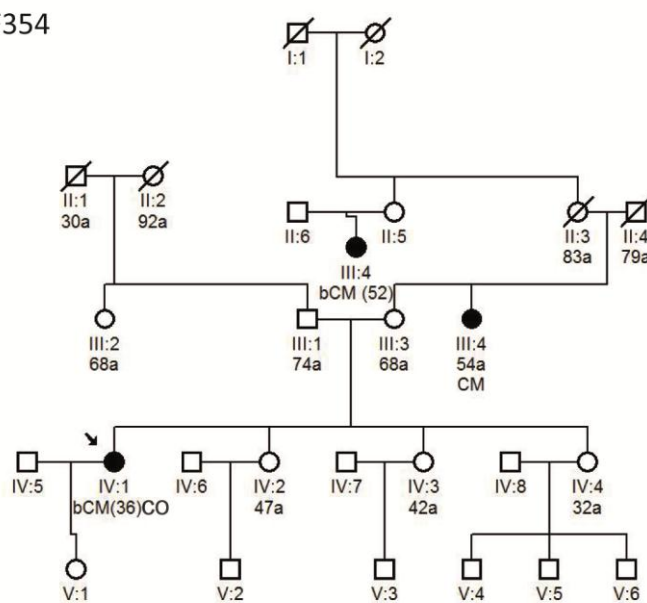


Figura 82. Árbol familiar de los casos portadores de la variante patogénica c.7007G>A (*BRCA2*).

c.7977-1G>A

Variante presente en una familia (1,43% de las familias *BRCA+* y 3,23% de las familias *BRCA2+*). Se trata de una mutación situada en la última base del intrón 17. Se ha demostrado por análisis por RT-PCR en un laboratorio externo que se produce un *skipping* del exón 18. En este exón 18 (aminoácidos 2659-277) se truncarían dominios como el dominio helicoidal y el primer pliegue oligonucleótido de unión (*OBI*), regiones donde se une ssDNA y la proteína *DSS1* (responsable de la estabilización de la proteína *BRCA2*). A la espera de nuevas investigaciones que amplíen esta información, podemos determinar que esta variante es patogénica, al eliminarse el exón 18 junto con dominios importantes para la función de *BRCA2*.

Esta variante no se ha encontrado en las bases de datos consultadas ni en la literatura científica, por lo que podemos determinar que se trata de una mutación patogénica en *BRCA2* de nueva descripción.

a) Descripción de las familias

- F10 (**fig. 83**): Caso índice (III:2) con carcinoma ductal invasor (pT2pN1M0; RE-,RP-, Her no estudiado) a los 28 años. Su abuela (I:2) fue diagnosticada de CM y tiene una hermana (III:1) que se ha comprobado que no es portadora de la mutación.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	28	0	0	-	0

Al único portador de esta variante patogénica se le diagnosticó un CM a los 28 años.

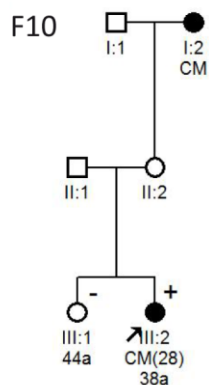


Figura 83. Árbol familiar del caso portador de la variante c.7977-1G>A en *BRCA2*.

c.9117G>A

Variante de las más frecuentes en *BRCA2*, presente en 5 familias (7,14% de las familias *BRCA+* y 16,13% de las familias *BRCA2+*). Variante situada en el sitio de empalme aceptor del exón 23. En esta variante, se ha demostrado por ensayos con minigenes híbridos y posterior RT-PCR la formación de tres transcritos: un transcrito con la eliminación de la práctica totalidad del exón 23, otro transcrito con la eliminación de los exones 23 y 24 y un transcrito con un codón de parada en la posición 2987 de la proteína [496]. De esta manera, se verían afectados dos pliegues de oligonucleótidos de unión (*OB1* y *OB2*), los cuales se unen al ssDNA y al dsDNA (a través del dominio *tower* de *OB2*) y, además, estabilizan la proteína a través de *DMC1*. Por otra parte, se eliminaría el dominio *NLS*, importante en la unión con la recombinasa *RAD51*. Por tanto, podemos aseverar que los dominios afectados son importantes para el funcionamiento de la proteína *BRCA2*.

Mutación descrita por primera vez en un estudio con familias holandesas [497]. Sin embargo, la variante se encuentra muy distribuida en diversas poblaciones (14 entradas en la base de datos *BIC*). No existen evidencias de una frecuencia tan alta en nuestro país, tan sólo ha sido descrita en una familia en Cataluña [472].

a) Descripción de las familias

- F19 (**fig. 84A**): Caso índice (II:2) diagnosticado inicialmente de carcinoma ovárico a los 48 años. Posteriormente tuvo un cáncer bilateral metacrónico: primeramente un carcinoma ductal invasor con afectación ganglionar en la mama derecha (RE+ >90%, HER+) a los 52 años y a la edad de 57, un

carcinoma ductal invasor sin afectación ganglionar (RE+ >60%, RA+ >60%, RP-, p53-, HER-, Ki67 <15%). Su madre (I:2) tuvo un CM y falleció a los 72 años; mientras su padre (I:1), también fallecido, tuvo un cáncer de pulmón. La hermana del caso índice (II:3) y una hija (III:1) no son portadoras de la variante patogénica.

- F44 (**fig. 84B**): Caso índice (III:3) con un cáncer bilateral metacrónico a los 47 y 62 años de edad. El primero fue carcinoma ductal infiltrante en la mama derecha (pT2N0M0; RE+, RP+) y el segundo un carcinoma lobulillar en la mama izquierda (pT1N0M0; RE+98%, HER-). Su madre (II:4) falleció por un CM diagnosticado a los 47 años, su tía (II:2) por un cáncer de ovario a los 44, otra tía (II:5) por CM a una edad de 50 años y su tío (II:1) por un cáncer de próstata. Se le ha hecho el estudio genético a su hermano (III:1), que resultó ser positivo; a su hermana (III:6), negativo; y a sus dos hijos (IV:4 y IV:5), ambos negativos para la mutación.
- F113 (**fig. 85A**): Caso índice (III:1) diagnosticado de un carcinoma seroso papilar de ovario (estadio IV) a los 49 años y un carcinoma lobulillar infiltrante (RE-, RP-) a los 57. Su hermana (III:2), también portadora de la mutación, tuvo un CM diagnosticado a los 50 años. Su padre (II:2) falleció por un cáncer de próstata a los 79 años. Una tía por rama materna (II:5) tuvo un CM diagnosticado a los 54 años, cuyos hijos (III:3 y III:4) no son portadores de la mutación. Otro tío materno (II:6) tuvo un cáncer colorrectal a los 81 años. A un primo hermano (III:7) se le ha comprobado que no porta la variante patogénica.
- F294 (**fig. 85B**): Caso índice (II:4) diagnosticado a los 42 años de carcinoma ductal moderadamente diferenciado (RE+ y RP +). Su madre (I:2) fue diagnosticada de CM a los 47 años y un hermano suyo (II:1) de linfoma no Hodgking. Su padre (I:1) tuvo un cáncer de cabeza y cuello con fallecimiento a una edad de los 58 años. Su hermana (II:3) no es portadora de la mutación.
- F303 (**fig. 85C**): Caso índice (II:4) diagnosticado de carcinoma ductal infiltrante (pT2pN3M0; RE-, RP+, HER2-). Su madre (I:2) tuvo un CM a los 36 años, falleciendo a una edad de 37. Se le ha realizado el estudio genético a una hija (III:3), con resultado negativo.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
7	6 (85,7)	48,5 (35-57)	2 (28,6)	2 (28,6)	47 (46-48)	2 (28,6)

No se han encontrado estudios de penetrancia relevantes en la literatura científica.

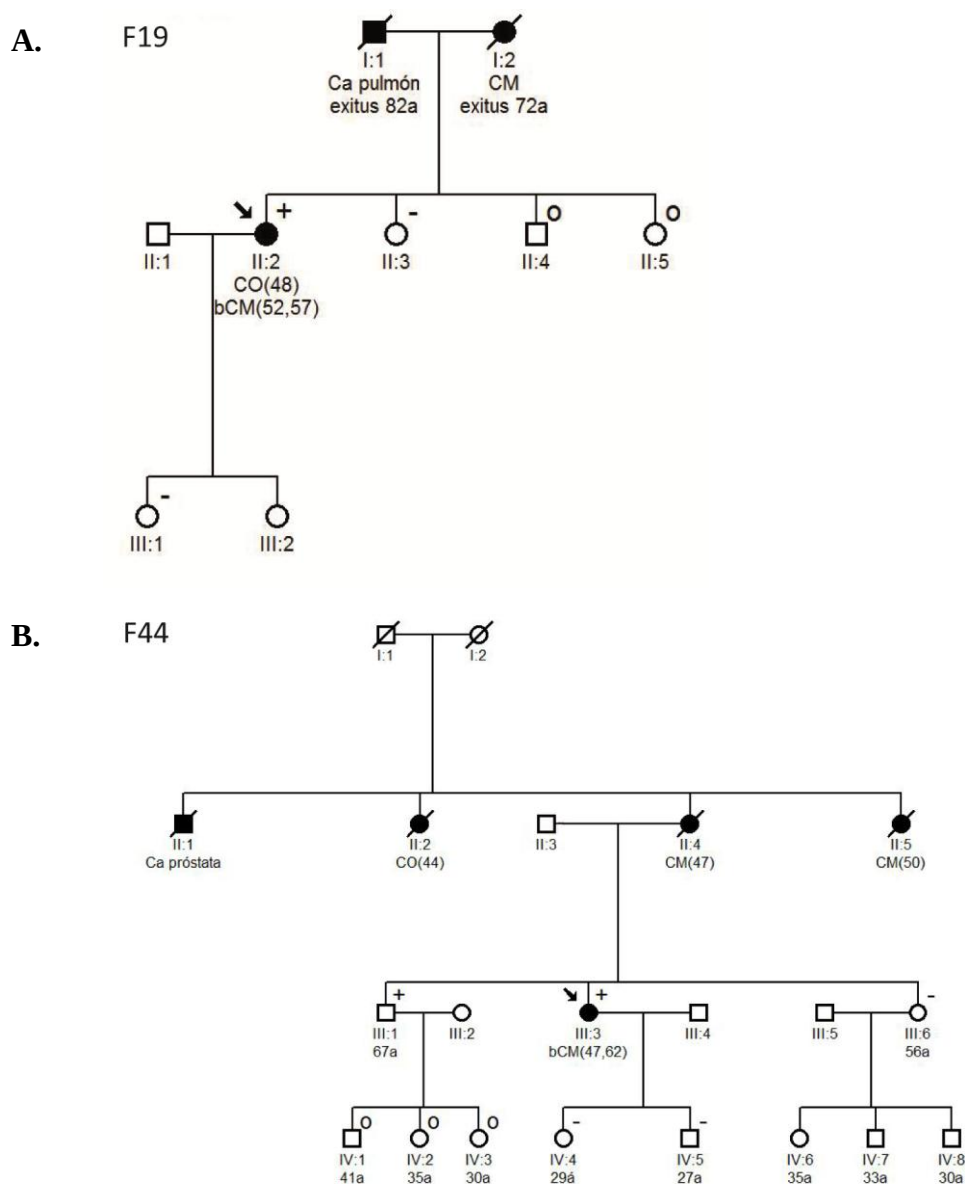
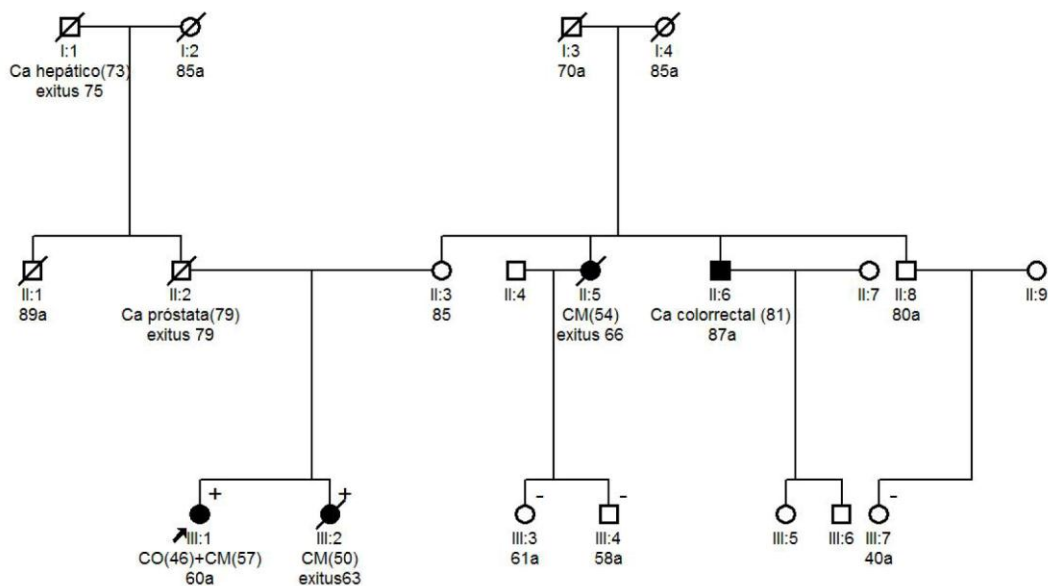


Figura 84. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.9117G>A en *BRCA2*. En **A** F19 y en **B** F44.

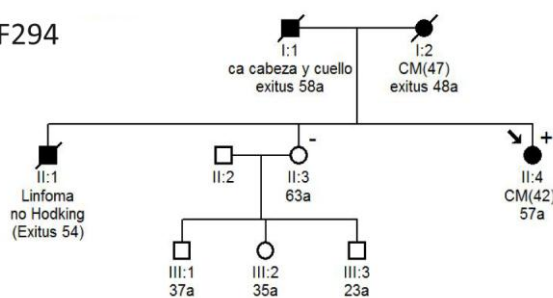
A.

F113



B.

F294



C.

F303

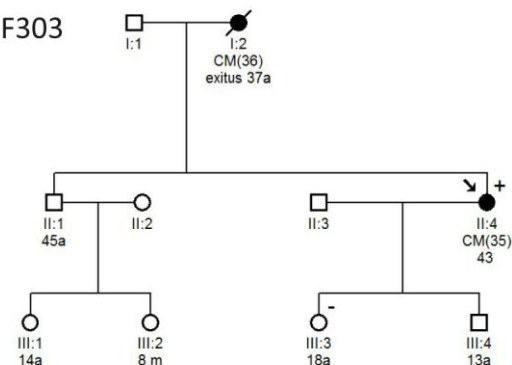


Figura 85. Árboles familiares de casos portadores de la variante c.9117G>A en *BRCA2*. En **A** F113, en **B** F294 y en **C** F303.

2.1.2 Variantes de significado clínico desconocido (UVs)

Se han detectado y clasificado un total de 45 UVs, y de ellas 10 han correspondido al gen *BRCA1*, y 35 lo han sido para *BRCA2*. La mayoría de ellas se trata de cambios de aminoácidos (*missense*) y variantes intrónicas.

Nuestra estrategia de clasificación de todas estas variantes se ha caracterizado por una búsqueda pormenorizada en las bases de datos *LSDBs*, estableciendo como criterio un valor ≥ 3 de la clasificación propuesta por IARC o, bien, el desconocimiento de esta clasificación por falta de estudios que lo corroboren (donde entrarían un número importante de variantes de nueva descripción).

Sin embargo, tras esta búsqueda exhaustiva, no se ha detectado ninguna clasificación IARC en esta sección. Por lo que se necesitarán estudios más en profundidad en un futuro para poder interpretar este tipo de variantes de una forma más concluyente.

2.1.2.1 Variantes de significado clínico desconocido (UVs) en *BRCA1*

De las 10 variantes de significado clínico desconocido detectadas en *BRCA1*, 3 no habrían sido descritas ni en la bibliografía ni en las bases de datos. Refiriéndonos al tipo de cambio, se detectaron: 5 intrónicas, 3 silenciosas, 2 cambios *missense* y una en región no codificante aguas arriba (*nontranslated upstream*, 5'UTR) (**tabla 26**).

Tras esta clasificación, se procedió a un análisis mediante herramientas bioinformáticas *in silico* (**tabla 27**).

Deberíamos destacar la variante c.946A>G, la cual provoca un cambio de aminoácido de serina por glicina en la posición 316 de la proteína. Cuatro herramientas bioinformáticas de las empleadas la predijeron como posible causa de patogenicidad. Sin embargo, en esta posición de la proteína no está implicado ningún dominio importante conocido que pueda afectar al funcionamiento de la proteína. Un trabajo que describe esta variante, no pudo concluir tras su análisis de conservación entre especies que fuera causante de enfermedad [498]. Se encuentra descrita en la base de datos BIC como de significado clínico desconocido. Por tanto, debemos manifestar que son necesarios más estudios que confirmen la futura clasificación de esta variante.

La variante sinónima c.5334T>C nos ha dado un resultado con el soporte informático *Alamut* de probable alteración en el *splicing*. Esta variante se encuentra localizada en el inicio del exón 22, por lo que podría ser una variante candidata para estudios de expresión génica. Sin embargo, un estudio reciente de ensayos de transfección de minigenes y posterior RT-PCR [499], han confirmado la no alteración del ARNm. Debemos esperar a futuras investigaciones de segregación familiar, fundamentalmente, para poder clasificar esta variante de una manera más definitiva.

Se detectaron dos variantes de significado clínico incierto (c.981A>G y c.2733A>G) en el caso índice de la familia F294. A esta paciente se le detectó, asimismo, una variante patogénica el gen *BRCA2* (**tabla 26**).

Por último, deberíamos destacar la variante no descrita c.3928A>G por el fenotipo familiar en el que se presentó. Esta variante se localizó en un caso índice varón con carcinoma de mama (pT1cpN0M0) con familiares de primer grado con CM y cáncer de ovario. Dos estudios *in silico* han pronosticado su posible patogenicidad (*Grantham* y *Polyphen-2*), debido a las diferencias de características biofísicas entre los aminoácidos sustituidos (cambio de una treonina por una alanina).

Tabla 26. Variantes de significado clínico incierto (UVs) de *BRCA1* detectadas y clasificadas. Se añaden características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.

Exón/ Intrón	Variante	Tipo	Nº Casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia*	Referencia
I-2	c.-19-21_-19-20insAT	5', UTR	1	F393	CMO	CMO	BIC
I-2	c.81-55T>C	I	1	F393	CMO	CMO	Borg A. y col. (2010) [500]
I-5	c. 213-116T>C	I	1	F319	CM	3CM	No descrita
I-6	c.302-87T>C	I	1	F421	CM	CM	BIC
11	c.946A>G (p.Ser316Gly)	M	1	F160	CM	2CM	Burk-Herrick A y col. (2006) [498] BIC
11	c.981A>G (p.Thr327Thr)	Si	1	F294†	CM	2CM	Borg A. y col. (2010) [500] BIC
11	c.2733A>G (p.Gly911Gly)	Si	1	F294†	CM	2CM	Riahi y col. (2014) [501]
11	c.3928A>G (p.Thr1310Ala)	M	1	F93	vCM	vCM+CM+ CO	No descrita
I-21	c.5332+32C>T	I	1	F187	NA	2CM	No descrita
I-21	c.5333-47A>T	I	1	F136	CM	CM	No descrita
22	c.5334T>C (p.Asp1778Asp)	Si	1	F297	CM≤40	CM≤40	Houdayer y col. (2012) [502]

CM: Cáncer de mama; CM≤40: Cáncer de mama con un diagnóstico menor o igual a 40 años; CO: Cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario; vCM: Cáncer de mama en varón.

I: variante intrónica; M: variante *missense*; Si: variante silenciosa

*En las características del tipo de familia se tuvieron en cuenta los familiares de primer grado del caso índice.

†Casos índice con mutación deletérea en el gen *BRCA2*.

Tabla 27. Predicciones *in silico* sobre las variantes de origen desconocido en *BRCA1*.

Exón/Intrón	Descripción mutación	Mut.	Bases de Datos	Grantham	Align-GVGD	SIFT	Pmut	Polyphen-2	Mutation Taster	Alamut Software
I-2	c.-19-21_-19-20insAT	5,, UTR	<i>BIC (2218)</i>	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-2	c.81-55T>C	I	<i>UMD</i>	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-5	c. 213-116T>C	I	<i>No descrita</i>	-	ND	ND	ND	ND	Causante de enfermedad	NR
I-6	c.302-87T>C	I		-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
11	c.946A>G (p.Ser316Gly)	M	<i>LOVD, UMD, BIC (8936)</i>	56	GV=220,50 GD=0,00 Clase C0	0,00* (Patógeno)	0,8532 (Patóg.)	1,000 (Probabl. Patógeno)	Causante de enfermedad	NR
11	c.981A>G (p.Thr327Thr)	Si	<i>UMD, BIC (1510)</i>	0	ND	ND	ND	ND	Causante de enfermedad	NR
11	c.2733A>G (p.Gly911Gly)	Si	<i>BIC (20584)</i>	0	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
11	c.3928A>G (p.Thr1310Ala)	M	<i>No descrita</i>	69	GV=229,24 GD=0,00 Clase C0	0,37 (Tolerada)	0,2307 (Neutral)	0,817 (Posibl. Patógeno)	Polimorfismo	NR
I-21	c.5332+32C>T	I	<i>No descrita</i>	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-21	c.5333-47A>T	I	<i>No descrita</i>	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
22	c.5334T>C (p.Asp1778Asp)	Si	<i>UMD</i>	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	SA: MaxEnt: (-13,2%) NNSPLICE: (-32,5%)

La puntuación *Grantham* examina la diferencia en la naturaleza fisicoquímica de las sustituciones de aminoácidos y su puntuación oscila entre 0 y 215. Mediante *ALIGN-GVGD* se ha añadido la clasificación de la variante en clase C0 (no conservado), C25, C35, C45, C55 ó C65 (muy conservado). *SIFT* considera variantes patógenas a puntuaciones $\leq 0,05$. *Pmut* predice las variantes como patológicas con puntuaciones $> 0,5$, de la otra manera las clasifica como neutras. Los resultados de Polyphen-2 se clasifican como posiblemente patológico (0,957-1,000), probablemente patológico (0,453-0,956) y benigno ($< 0,452$). *MutationTaster* diferencia las variantes como polimorfismo o causante de enfermedad. En los resultados del software de Alamut (versión 2.3), tuvimos en cuenta los resultados de Splice Site Finder, NNSplice y MaxEntScan, cuando al menos dos de ellos calcularon resultados similares.

ND: No determinado porque el algoritmo sólo predice el impacto en variantes *missense*.

NR: No relevante

*Predicción SIFT de baja confianza, se aplicó la versión SIFT Sequence para reducir la alta probabilidad de predecciones falsas positivas.

2.1.2.2 Variantes de significado clínico desconocido (UVs) en *BRCA2*

En el gen *BRCA2* se han encontrado un mayor número de variantes en comparación con *BRCA1*. Se han detectado 34 variantes de significado clínico desconocido, de las cuales 12 no han sido descritas ni en la bibliografía ni en las bases de datos. Refiriéndonos al tipo de cambio, se detectaron: 13 intrónicas, 13 cambios *missense*, 5 silenciosas, una en región no codificante aguas arriba (5'-*nontranslated upstream*), una eliminación del marco de lectura (*inframe deletion*) y un cambio de la pauta de la lectura (*frameshift*) (**tabla 28**).

Se consideró, como excepción, la variante *frameshift* no descrita c.10043insA, la cual provoca un codón de parada en la posición 3368. Esta variante eliminaría tan sólo el 1,5% de los aminoácidos de la proteína y no se vería afectado ningún dominio conocido importante. Además, se tomó como referencia la variante *nonsense* no patogénica c.9976A>T (p.Lys3326*), en la que se ha comprobado de manera contrastada que no segrega con la enfermedad [503;504]. No obstante, hemos considerado clasificarla como variante de origen clínico desconocido, hasta que probables estudios futuros la consideren como no patogénica.

Tras esta clasificación, se procedió a un análisis mediante herramientas bioinformáticas *in silico* (**tabla 29**).

El análisis de las variantes c.3032C>G y c.9875C>T han pronosticado una probable patogenicidad en 5 estudios *in silico* (**tabla 29**). Se encuentran descritas en las bases de datos *LSDB*, pero hay poco descrito en la literatura científica acerca de sus posibles efectos [218;505]. Por lo que se refiere al cambio c.9875C>T (p.Pro3292Leu), resulta interesante que se ha detectado asociado a cuatro familias no relacionadas con la misma variante patogénica en *BRCA2* c.9117G>A. Por tanto, podemos determinar que la variante de significado clínico desconocido c.9875C>T cosegrega con la mutación deletérea c.9117G>A, aunque esto no nos ayude a descartarla como patogénica; ya que, esta observación, nos demuestra que esta variante se encuentra en *cis* en el mismo gen *BRCA2* con una mutación patogénica (es decir, no hay co-ocurrencia en *trans*).

La variante c.7559G>T (p.Arg2520Leu), además de pronosticar todas las herramientas *in silico* un probable efecto patógeno, se ha visto que el cambio de aminoácido se produce en una posición muy conservada (nivel C65 de *Align-GVGD*)

(**tabla 29**). Esta variante sólo se encuentra descrita en la base de datos *UMD*. A la paciente en la cual se detectó esta variante, se le diagnosticó un adenocarcinoma de tipo endometroide de alto grado a los 26 años de edad. No obstante, será necesario esperar a futuros estudios multifactoriales para una correcta clasificación de esta variante.

La variante c.10103 C>T (p.Ser3368Phe), la pronosticaron tres estudios *in silico* (**tabla 29**), debido seguramente a las diferencias de las características biofísicas de los aminoácidos intercambiados (fenilalanina por treonina). Aún así, *Align-GVGD* predijo que se trata de una posición poco conservada en la proteína y, además, al encontrarse en la parte final del exón 27, no deberíamos esperar que afecte a ningún dominio importante de la proteína.

Tres variantes han pronosticado un probable efecto en el *splicing*: c.68-7T>A, c.7008-15_7008-14del y c.9501+3A>T (**tabla 29**). Con la variante c.68-7T>A se ha demostrado que afecta al tracto de polipirimidinas (entre el punto de ramificación y el sitio 3' del empalme) del sitio aceptor del intrón 2 de *BRCA2*; además, estudios con minigenes y en fibroblastos han demostrado un *skipping* parcial del exón 3, aunque no se ha podido demostrar que implique una mayor susceptibilidad al síndrome del CMOH [429;464]. El cambio c.7008-15_7008-14del, se trata de una variante de nueva descripción, por lo que no hay estudios funcionales que demuestren su implicación patógena. Y por lo que se refiere a c.9501+3A>T, ensayos con minigenes [506] han demostrado efectos parciales en el *splicing*, ya que induce el *skipping* del exón 25 en el 50% de los transcritos; no obstante, la evidencia para la patogenicidad de esta variante no ha resultado concluyente, debido a que afecta a sólo una fracción de los transcritos (penetrancia incompleta).

En las variantes de origen desconocido c.3516G>A y c.4146_4148delAGA se detectaron en los mismos pacientes una mutación patogénica en *BRCA2*. De todas maneras, al observarse sólo una vez en cada una de ellas, no podemos determinar si co-ocurrieron en *cis* o en *trans* (lo que permitiría descartarlas como patógenas).

Tabla 28. Variantes de significado clínico incierto (UVs) de *BRCA2* detectadas y clasificadas. Se añaden características del caso índice y sus familiares. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.

Exón/ Intrón	Variante	Tipo	Nº Casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia†	Referencia
I-1	c.-75C>G	5' UTR	1	F162	CO	CO	Díez y col. 2006 [335]
I-2	c.68-7T>A	I	1	F247	bCMm	bCM	Houdayer y col. 2012 [502]
I-5	c.475+14C>T	I	1	F121	CM	CM	No descrita
I-6	c.516+14C>T	I	1	F207	CM<40	CM<40+CM	Houdayer y col. 2012 [502]
I-7	c.631+25C>T	I	1	F353	CO	2CO	Houdayer y col. 2012 [502]
I-8	c.682-54T>C	I	1	F164	CM	4CM	No descrita
10	c.1240G>C (Ala338Thr)	M	1	F126	CM<40	CM<40	No descrita
10	c.1803A>G (p.Lys601Lys)	Si	1	F156	CM	CM	No descrita
11	c.2464T>C (p.Cys822Arg)	M	1	F60	CM<40	CM<40	Han y col. 2006 [507] BIC
11	c.2803G>A (p.Asp935Asn)	M	1	F118	CM	2CM	Vogel y col. 2007 [487] BIC
11	c.2883G>A (p.Gln961Gln)	Si	1	F239	CM	2CM	Wagner y col. 1999 [508] BIC
11	c.3032C>G (p.Thr1011Arg)	M	1	F30	bCM	bCM + CM	Balia y col. 2011 [505] BIC
11	c.3225T>C (p.Ser1075Ser)	Si	1	F269	bCM	bCM	HGMD
11	c.3516G>A (p.Ser1172Ser)	Si	1	F285 [‡]	CM<40	CM<40	Borg A. y col. (2010) [500] BIC
11	c.4146_4148delAGA (p.Glu1382del)	IFD	1	F379 [‡]	bCM	bCM + CM	Wu y col. 2005 [504] BIC
11	c.5027G>A (p.Ser1676Asn)	M	1	F149	CO	CO	No descrita
11	c.6293C>T (p.Ser2098Phe)	M	1	F182	CM	3CM	BIC
11	c.6322C>T (p.Arg2108Cys)	M	1	F202	NA	3CM	Balia y col. (2011) [505] BIC
I-12	c.6938-21T>C	I	1	F347	CM<40	CM<40	No descrita

Tabla 28 (continuación).

Exón/ Intrón	Variante	Tipo	Nº Casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia [†]	Referencia
I-13	c.7008-14delT	I	1	F346**	CM≤40	CM≤40	No descrita
15	c.7469T>C (p.Ile2490Thr)	M	2	F229	CM≤40	CM≤40	Pettigrew CA. y col. 2008 [509]
				F349	CM≤40	CM≤40	BIC
15	c.7559G>T (p.Arg2520Leu)	M	1	F279	CO	CO	UMD
I-16	c.7806-40A>G	I	1	F346**	CM≤40	CM≤40	Borg y col. 2010 [500] BIC
I-19	C.8331+133G>A	I	1	F191**	CM	CM	No descrita
20	c.8503T>C (p.Ser2835Pro)	M	1	F92	NA	bCM	Johnson y col. 2007 [510] BIC
20	c.8632+47dup12	I	1	F55	NA	?	No descrita
22	C.8854A>G (p.Met2952Val)	M	1	F152	CM≤40	CM≤40 + CM	HGMD
23	C.9065G>A (p.Arg3022Lys)	Si	2	F70	CM≤40	CM≤40	No descrita
				F100	CMO	CMO	
I-24	c.9256+61A>T	I	1	F191**	CM	CM	No descrita
I-25	c.9501+3A>T	I	1	F344 [¶]	CO	2CO	Houdayer y col. 2012 [510] BIC
27	c.9875C>T (p.Pro3292Leu)	M	4	F19 [‡]	bCM	bCM + CM	Esashi F. y col. 2005 [218] BIC
				F44 [‡]	bCM	Bcm+CM+CO	
				F113 [‡]	bCMmO	bCMO+CM +2Cút	
				F294 [‡]	CM	2CM	
27	c.10043insA (p.Asn3348fs*3368)	F	1	F26 [‡]	CM	3CM	No descrita
27	c.10103C>T (p.Ser3368Leu)	M	1	F44 [‡]	bCMm	bCM + CM	No descrita

5'UTR: variante en región no codificante aguas arriba (5'-untranslated region); I: variante intrónica; M: variante *missense*; Si: variante silenciosa.

CM: Cáncer de mama; CM≤40: Cáncer de mama con un diagnóstico menor o igual a 40 años; CO: Cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario; bCMm: Cáncer bilateral metacrónico; bCMmO: Cáncer bilateral metacrónico y ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario; NA: Paciente no afectado; ?: No se dispone de la información.

[†]En las características del tipo de familia se tuvieron en cuenta los familiares de primer grado del caso índice.

[‡]Casos índice con mutación deletérea en el gen *BRCA2*.

[¶]Casos índice con mutación deletérea en el gen *BRCA1*.

**Casos índice con dos variantes de origen clínico desconocido en *BRCA2*.

Tabla 29. Predicciones *in silico* sobre las variantes de origen desconocido en *BRCA2*.

Exón/Intrón	Descripción mutación	Tipo	Bases de Datos	Grantham	Align-GVGD	SIFT	Pmut	Polyphen-2	Mutation Taster	Alamut Software
I-1	c.-75C>G	I	No en base de datos	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-2	c.68-7T>A	I	LOVD, BIC (16209), HGMD (CS033491)	-	ND	ND	ND	ND	Causante de enfermedad	SA: MaxEnt: -23,9% NNSPLICE: -27,3%
I-5	c.475+14C>T	I	No descrita	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-6	c.516+14C>T	I	LOVD, UMD	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-7	c.631+25C>T	I	UMD	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-8	c.682-54T>C	I	No descrita	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
10	c.1240G>C (Ala338Pro)	M	No descrita	27	GV=154,10 GD=1,62 Clase C0	0,03 (Patógeno)	0,1078 (Neutral)	0,956 (Posibl. Patógeno)	Polimorfismo	NR
10	c.1803A>G (p.Lys601Lys)	Si	No descrita	0	ND	ND	ND	ND	Causante de enfermedad	NR
11	c.2464T>C (p.Cys822Arg)	M	LOVD, UMD, BIC (7464)	180	GV=353,86 GD=0,00 Clase C0	0,35 (Tolerada)	0,9088 (Patógeno)	0,064 (Benigno)	Polimorfismo	NR
11	c.2803G>A (p.Asp935Asn)	M	LOVD, UMD, BIC (7499), HGMD (CM994285)	23	GV=353,86 GD=0,00 Clase C0	0,08 (Tolerada)	0,0813 (Neutral)	0,055 (Benigno)	Polimorfismo	NR
11	c.2883G>A (p.Gln961Gln)	Si	LOVD, UMD, BIC (15163)	0	ND	ND	ND	ND	Causante de enfermedad	NR
11	c.3032C>G (p.Thr1011Arg)	M	LOVD, UMD, BIC (3908), HGMD (CM035690)	71	GV=215,31 GD=67,21 Clase C0	0,00 (Patógeno)	0,6743 (Patógeno)	1,000 Probabl. patógeno	Causante de enfermedad	NR

Tabla 29 (continuación).

Exón/Intrón	Descripción mutación	Tipo	Bases de Datos	Grantham	Align-GVGD	SIFT	Pmut	Polyphen-2	Mutation Taster	Alamut Software
11	c.3225T>C (p.Ser1075Ser)	Si	HGMD (CD044117)	0	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
11	c.3516G>A (p.Ser1172Ser)	Si	UMD, BIC (13612)	0	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
11	c.4146_4148 delAGA (p.1382delGlu)	IFD	UMD, LOVD, BIC (7876)	-	ND	ND	ND	ND	Causante de enfermedad	NR
11	c.5027G>A (p.Ser1676Asn)	M	No descrita	46	GV=55,27 GD=45,82 Clase C0	0,00 (Patógeno)	0,0782 (Neutral)	0,302 (Benigno)	Polimorfismo	NR
11	c.6293C>T (p.Ser2098Phe)	M	BIC (13611)	155	GV=231,18 GD=47,87 Clase C0	0,07 (Tolerada)	0,7592 (Patógeno)	0,117 (Benigno)	Polimorfismo	NR
11	c.6322C>T (p.Arg2108Cys)	M	LOVD,UMD, BIC (8771), HGMD (CM114781)	180	GV=353,86 GD=0,00 Clase C0	0,09 (Tolerada)	0,8782 (Patógeno)	0,000 (Benigno)	Polimorfismo	NR
I-12	c.6938-21T>C	I	No descrita	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-13	c.7008-14delT	I	No descrita	-	ND	ND	ND	ND	Causante de enfermedad	SA: MaxEnt: -4,2% NNSPLICE: -8,3%
15	c.7469T>C (p.Ile2490Thr)	M	LOVD,UMD, BIC (6045), HGMD (CM065019)	89	GV=96,19 GD=49,42 Clase C0	0,20 (Tolerada)	0,4846 (Neutral)	0,010 (Benigno)	Polimorfismo	NR
15	c.7559G>T (p.Arg2520Leu)	M	UMD	102	GV=0 GD=101,88 Clase C65	0,00 (patógeno)	0,8615 (Patógeno)	1,000 Probabl. patógeno	Causante de enfermedad	NR
I-16	c.7806-40A>G	I	UMD, BIC (13632)	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-19	C.8331+133G>A	I	No descrita	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
20	c.8503T>C (p.Ser2835Pro)	M	LOVD,UMD, BIC (3221, HGMD (CM004191)	74	GV=144,64 GD=0,00 Clase C0	0,26 (Tolerada)	0,3705 (Neutral)	0,012 (Benigno)	Polimorfismo	NR

Tabla 29 (continuación).

Exón/Intrón	Descripción mutación	Tipo	Bases de Datos	Grantham	Align-GVGD	SIFT	Pmut	Polyphen-2	Mutation Taster	Alamut Software
20	c.8632+47dup12	I	No descrita	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
22	C.8854A>G (p.Met2952Val)	M	HGMD (CM035692)	21	GV=30,92 GD=0,00 Clase C0	1,00 (Tolerada)	0,3322 (Neutral)	0,000 Benigno	Polimorfismo	NR
23	C.9065G>A (p.Arg3022Lys)	Si	No descrita	0	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-24	c.9256+61A>T	I	No descrita	-	ND	ND	ND	ND	Polimorfismo	NR
I-25	c.9501+3A>T	I	LOVD, UMD, BIC (6145), HGMD (CS083876)	-	ND	ND	ND	ND	Causante de enfermedad	SD: MaxEnt: -57,6% NNSPLICE: -58,3%
27	c.9875C>T (p.Pro3292Leu)	M	UMD, BIC (6162)	98	GV=75,14 GD=62,68 Clase C0	0,00 (patógeno)	0,9010 (Patógeno)	0,999 (Probabl. patógeno)	Causante de enfermedad	NR
27	c.10043insA p.Asn3348fs*3368	F	No descrita	-	ND	ND	ND	ND	Causante de enfermedad	NR
27	c.10103 C>T (p.Ser3368Phe)	M	No descrita	155	GV=353,86 GD=0,00 Clase C0	0,04 (Patógeno)	0,8172 (Patógeno)	0,004 (Benigno)	Polimorfismo	NR

La puntuación Grantham examina la diferencia en la naturaleza fisicoquímica de las sustituciones de aminoácidos y su puntuación oscila entre 0 y 215. Mediante ALIGN-GVGD se ha añadido la clasificación de la variante en clase C0 (no conservado), C25, C35, C45, C55 ó C65 (muy conservado). SIFT considera variantes patógenas a puntuaciones $\leq 0,05$. Pmut predice las variantes como patológicas con puntuaciones $> 0,5$, de la otra manera las clasifica como neutras. Los resultados de Polyphen-2 se clasifican como posiblemente patológico (0,957-1,000), probablemente patológico (0,453-0,956) y benigno ($< 0,452$). Mutation Taster diferencia las variantes como polimorfismo o causante de enfermedad. En los resultados del software de Alamut (versión 2.3), tuvimos en cuenta los resultados de Splice Site Finder, NNSplice y MaxEntScan, cuando al menos dos de ellos calcularon resultados similares.

5'UTR: variante en región no codificante aguas arriba (5'-*untranslated region*); I: variante intrónica; M: variante *missense*; Si: variante silenciosa.

ND: No determinado porque el algoritmo sólo predice el impacto en variantes *missense*.

NR: No relevante

2.1.3 Variantes probablemente no patogénicas y variantes no patogénicas

En este apartado hemos clasificado las variantes que con más probabilidad no tienen efecto sobre las proteínas *BRCA1* y *BRCA2* y/o se ha demostrado que no están relacionadas con una mayor susceptibilidad en el síndrome de CMOH.

Por tanto, hemos clasificado como variantes probablemente no patogénicas aquellas variantes clasificadas con valores de 2 en los niveles IARC o, en su defecto, que cumplan los siguientes criterios:

- Variantes descritas en Deffenbaugh (2002) [425], o Tavtigian (2005) [408] o descritas en *trans* con alguna mutación deletérea en el mismo gen del mismo individuo.
- Variantes consideradas neutras empleando métodos de probabilidad multifactoriales, utilizando el punto de corte recomendado de 100:1 a favor de neutralidad (Goldgar 2004 [426] y Chevenix-Trench 2006 [348]).

Además, hemos considerado como variantes no patogénicas, aquellas que se ha comprobado que tienen un nivel 1 IARC o, bien, se ha detectado con una frecuencia alélica $\geq 1\%$, que consideramos como polimorfismos. La gran mayoría se refieren a los datos obtenidos en nuestra selección de pacientes; aún así, también hemos considerado las variantes descritas anteriormente como polimórficas en población española (Díez y col. [333]) y en otras poblaciones (*HapMap*, a través de la consulta de las bases de datos *dbSNP* y *Ensembl*).

2.1.3.1 Variantes probablemente no patogénicas y no patogénicas en *BRCA1*

Se ha clasificado una variante como probable no patogénica (**tabla 30**) y 35 variantes definitivamente no patogénicas: de ellas 9 con nivel IARC = 1 (**tabla 31**) y 26 polimorfismos (**tabla 32**) en el gen *BRCA1*. Todas ellas se han caracterizado por ser mayoritariamente de tipo *missense* o estar situadas en zonas intrónicas profundas.

Tabla 30. Variantes probablemente no patogénicas detectadas en *BRCA1* según criterios de probabilidad.

Exón/ Intrón	Variante	Tipo	Base de datos*	Familias	Frecuencia Alélica (%)	Observaciones†	IARC
I-3	c.81-14C>T	I	dbSNP: rs80358006	F360	0,13	Co-ocurrencia en trans (Judkins y col. [511])	-

*Numeración identificativa de la variante en la base de datos *dbSNP*.

†En esta columna se citan algunos estudios o bases de datos que corroboran esta clasificación

I: variante intrónica.

Tabla 31. Variantes no patogénicas detectadas en *BRCA1* según criterios de IARC.

Exón/ Intrón	Variante	Tipo	Base de datos*	Familias	Frecuencia		Observaciones†	IARC
					Alélica (%)			
5	c.199G>T (p.Asp67Tyr)	M	dbSNP: rs80357102	F108	0,13		OR a favor de neutralidad $1,06 \cdot 10^4$ (Easton y col. [512])	1
11	c.736 T>G (Leu246Val)	M	dbSNP: rs28897675	F94	0,13		Co-ocurrencia en trans. LR=2,6 · 10 ⁻⁵ (Tavtigian y col. [408])	1
11	c.2315T>C (p.Val772Ala)	M	dbSNP: rs80357467	F188	0,14		Co-ocurrencia en trans (Judkins y col. [511])	1
11	2428A>T (Asn810Tyr)	M	dbSNP: rs28897682	F262	0,14		OR a favor de neutralidad $8,77 \cdot 10^{10}$ (Easton y col. [512])	1
11	c.2521C>T (p.Arg841Trp)	M	dbSNP: rs180079	F369	0,14		Co-ocurrencia en trans. LR=3,9 · 10 ⁻⁹ (Tavtigian y col. [408])	1
11	c.3640G>A (p.Glu1214Lys)	M	dbSNP: rs80356923	F126	0,14		OR a favor de neutralidad $2,96 \cdot 10^7$ (Easton y col. [512])	1
11	c.3823A>G (Ile1275Val)	M	dbSNP: rs80357280	F36	0,14		OR a favor de neutralidad $26,16 \cdot 10^4$ (Easton y col. [512])	1
15	c.4535G>T (p.Ser1512Ile)	M	dbSNP: rs1800744	F162 F191 F203 F204 F206 F271	0,78		Co-ocurrencia en trans (Tavtigian y col. [408])	1
19	c.5158A>G (p.Thr1720Ala)	M	dbSNP: rs56195342	F104 F227	0,26		OR a favor de neutralidad $9 \cdot 10^{10}$ (Easton y col. [512])	1

*Numeración identificativa de la variante en la base de datos *dbSNP*.

†En esta columna se citan algunos estudios o bases de datos que corroboran esta clasificación

I: variante intrónica; M: variante *missense*.

Tabla 32. Relación de polimorfismos detectados en *BRCA1* en nuestra población.

Cambio detectado			Base de datos*	FH† (%)	Frecuencia alélica	
Exón/ Intrón	Variante	Tipo			PE‡ (%)	NP (%)
I-1	c.-19-115T>C	I	dbSNP: rs3765640	43,8	-	16,97
I-7	c.441-34C>T	I	dbSNP: rs799923	-	27	18,13
I-7	c.441+36C>T	I	dbSNP: rs45569832	-	-	2,85
I-7	c.441+38T>C	I	dbSNP: rs45456891	-	-	4,66
I-7	c.441+41C>T	I	dbSNP: rs45489593	-	-	2,85
I-8	c.548-58delT	I	dbSNP: rs8176144	31,4	30	10,36
9	c.591C>T (p.Cys197Cys)	Si	dbSNP: rs1799965	-	3	0,65
11	c.943A>G (p.Arg315Gly)	M	dbSNP: rs80357050	-	-	1,3
11	c.1067A>G (p.Gln356Arg)	M	dbSNP: rs1799950	3,1	7	4,02
11	c.2077G>A (p.Asp693Asn)	M	dbSNP: rs4986850	15,9	8	8,29
11	c.2082C>T (p.Ser694Ser)	Si	dbSNP: rs1799949	39,9	40	33,81
11	c.2311T>C (p.Leu771Leu)	Si	dbSNP: rs16940	43,3	40	35,23
11	c.2612C>T (p.Pro871Leu)	M	dbSNP: rs799917	45	40	37,31
11	c.3112A>G (p.Glu1038Gly)	M	dbSNP: rs16941	45	35	34,97
11	c.3119G>A (Ser1040Asn)	M	dbSNP: rs4986852	-	5	1,3
11	c.3548A>G (p.Lys1183Arg)	M	dbSNP: rs16942	41,10	40	35,88
	c.4097-141A>C	I	dbSNP: rs799916	45,8	-	15,28

Tabla 32 (continuación).

Cambio detectado			Frecuencia alélica			
Exón/ Intrón	Variante	Tipo	Base de datos*	FH† (%)	PE‡ (%)	NP (%)
13	c.4308T>C (p.Ser1436Ser)	Si	dbSNP: rs1060915	39,6	30	35,62
I-14	c.4485-63G>C	I	dbSNP: rs8176212	-	25	24,87
16	c.4837A>G (p.Ser1613Gly)	M	dbSNP: rs1799966	43,3	22	34,72
16	c.4956G>A (p.Met1652Ile)	M	dbSNP: rs1799967	1,6	2	1,17
I-16	c.4987-92A>G	I	dbSNP: rs8176233	-	23	17,23
I-16	c.4987-68A>G	I	dbSNP: rs8176234	-	23	15,41
I-17	c.5075-53C>T	I	dbSNP: rs8176258	6,9	-	1,3
I-17	c.5074+65G>A	I	dbSNP: rs8176235	36,6	-	0,78
I-18	c.5152+66G>A	I	dbSNP: rs3092994	-	32	23,19

En **negrita** el dato seguido como criterio para clasificación como polimorfismo (frecuencia alélica $\geq 1\%$).

Si: variante silenciosa; I: variante intrónica; M: variante *missense*.

FH: frecuencia en las poblaciones; PE: frecuencia alélica en población española; NP: frecuencia alélica en nuestra población.

*Numeración identificativa de la variante en la base de datos *dbSNP*.

†Datos obtenidos de las poblaciones *HapMap* de la base *dbSNP*, prioritariamente de población europea.

‡Datos obtenidos de la relación de polimorfismos clasificados por Díez y col. (2003) [336]

2.1.3.2 Variantes probablemente no patológicas y variantes no patológicas en *BRCA2*

Se han clasificado 5 variantes como probables no patológicas (IARC = 2 o según criterios de probabilidad *a priori*) (**tabla 33**) y 38 variantes no patológicas: de ellas 5 con un nivel IARC=1 (**tabla 34**) y 33 polimorfismos (**tabla 35**) en el gen *BRCA2*. Del mismo modo al gen *BRCA1*, todas ellas se han caracterizado por ser mayoritariamente de tipo *missense* o estar situadas en zonas intrónicas profundas, aunque se ha visto una distribución mayor de silenciosas.

La variante c.7435+6G>A se ha clasificado recientemente como nivel IARC=2. Los estudios la predecían como una variante sin efecto en el *splicing*. Pero además, recientemente, el trabajo de Thomassen y col. [513] ha permitido clasificarla en este nivel debido a los estudios de RT-PCR y modelos multifactoriales de segregación.

Curiosamente, la variante c.6853A>G (p.Val2908Gly) se ha clasificado como IARC=1, también con un efecto en el *splicing*. Se ha comprobado por estudios funcionales que existe un *skipping* del exón 12, pero se vio que este exón es totalmente dispensable para el correcto funcionamiento de la proteína, puesto que se eliminan tan sólo 32 aminoácidos y, en ellos, no existe ningún dominio conocido importante para la funcionalidad proteica de *BRCA2* [514]; además, otros estudios de modelos multifactoriales ya la habían pronosticado como no patógena [349;512].

La variante *nonsense* no patogénica c.9976A>T (p.Lys3326*), antes citada, se ha encontrado en nuestra población con una frecuencia alélica de un 1,04% (**tabla 35**).

Tabla 33. Variantes probablemente no patogénicas detectadas en *BRCA2* según criterios de probabilidad.

Exón/ Intrón	Variante	Tipo	Base de datos*	Familias	Frecuencia Alélica (%)	Observaciones†	IARC
10	c.1792A>G (p.Thr598Ala)	M	dbSNP: rs28897710	F151 F317	0,26	Sin significado clínico (Deffenbaugh y col.[425])	-
I-13	c.7435+6G>A	I	dbSNP: rs81002852	F310	0,13	Estudio multifactorial y de RT-PCR (Thomassen y col. [513])	2
21	c.8723T>G (p.Val2908Gly)	M	dbSNP: rs28897753	F156	0,13	OR a favor de neutralidad 256 (Easton y col. [512])	2
22	c.8850G>T (p.Lys2950Asn)	M	dbSNP: rs28897754	F86 F345	0,26	OR a favor de neutralidad $7,15 \cdot 10^{10}$ (Easton y col. [512])	2
22	c.8551G>A (p.Ala2951Thr)	M	dbSNP: rs11571769	F29 F38 F200 F230	0,52	Polimorfismo (Deffenbaugh y col. [425])	-

*Numeración identificativa de la variante en la base de datos *dbSNP*.

†En esta columna se citan algunos estudios o bases de datos que corroboran esta clasificación

I: variante intrónica; M: variante *missense*.

Tabla 34. Variantes no patogénicas definitivas detectadas en *BRCA2* según criterios de probabilidad.

Exón/ Intrón	Variante	Tipo	Base de datos*	Familias	Frecuencia Alélica (%)	Observaciones†	IARC
3	c.223G>C (p.Ala75Pro)	M	dbSNP: rs28897701	F231	0,13	OR a favor de neutralidad $2,2 \cdot 10^6$ (Easton y col. [512])	1
10	c.1151C>T (p.Ser384Phe)	M	dbSNP: rs41293475	F108 F112	0,26	OR a favor de causalidad $2,08 \cdot 10^{-2}$ (Chevenix-Trench y col. [348])	1
11	c.4061C>T (p.Thr1354Met)	M	dbSNP: rs80358656	F358	0,13	OR a favor de neutralidad 254 (Easton y col. [512])	1
12	c.6853A>G (p.Ile2285Val)	M	dbSNP: rs56272235	F140	0,13	OR a favor de neutralidad $7,86 \cdot 10^7$ (Easton y col. [512])	1
25	c.9292T>C (p.Tyr3098His)	M	dbSNP: rs41293521	F191 F341	0,26	OR a favor de causalidad $3,46 \cdot 10^{-4}$ (Easton y col.)	1

*Numeración identificativa de la variante en la base de datos *dbSNP*.

†En esta columna se citan algunos estudios o bases de datos que corroboran esta clasificación

I: variante intrónica; M: variante *missense*.

Tabla 35. Relación de polimorfismos detectados en *BRCA2* en nuestra población.

Cambio detectado			Base de datos†	FH [‡] (%)	Frecuencia alélica	
Exón/ Intrón	Variante	Tipo			PE [¶] (%)	NP (%)
I-1	c.-26G>A	5'- UTR	dbSNP: rs1799943	34,5	28	11,53
I-4	c.426-89T>C	I	dbSNP: rs3783265	6,2	-	2,36
I-4	c.425+67A>C	I	dbSNP: rs11571610	6,2	-	1,39
I-7	c.631+183T>A	I	dbSNP: rs3752451	33	-	11,92
I-8	c.681+56C>T	I	dbSNP: rs2126042	20	7	12,31
I-8	c.682-107G>T	I	dbSNP: rs77863879	-	-	1,39
I-10	c.1910-74T>C	I	dbSNP: rs2320236	22,1	-	0,65
I-10	c.1910-51G>T	I	dbSNP: rs11571651	-	14	0,14
10	c.865A>C (p.Asn289His)	M	dbSNP: rs766173	6,2	4	3,24
10	c.1114A>C (p.Asn372His)	M	dbSNP: rs144848	48,7	20	28,89
10	c.1365A>G (p.Ser455Ser)	Si	dbSNP: rs1801439	6,2	-	3,37
11	c.2229T>C (p.His743His)	Si	dbSNP: rs1801499	6,2	-	3,24
11	c.2971A>G (p.Asp991Asn)	M	dbSNP: rs1799944	6,2	4	2,98
11	c.3396A>G (p.Lys1132Lys)	Si	dbSNP: rs1801406	39,3	37	27,85
11	c.3807T>C (p.Val1269Val)	Si	dbSNP: rs543304	36,3	31	22,41
11	c.4068G>A (p.Leu1356Leu)	Si	dbSNP: rs28897724	3,4**	-	0,52
11	c.4584C>T (p.Ser1528Ser)	Si	dbSNP: rs80359788	-	4	0,14
11	c.4791A>G (p.Leu1521Leu)	Si	dbSNP: rs206075	0,9	-	54,15
11	c.5744C>T (p.Thr1915Met)	M	dbSNP: rs4987117	6,4	5	1,04
11	c.6100C>T (p.Arg2034Cys)	M	dbSNP: rs1799954	3,6	-	1,68
11	c.6513G>C (p.Val2171Val)	Si	dbSNP: rs206076	-	-	54,53
I-11	c.6841+78delAinsAATT	I	dbSNP: rs5802644	-	-	5,31
I-11	c.6841+79_6841+82delTTAA	I	dbSNP: rs11571661	-	-	8,94

Tabla 35 (continuación).

Cambio detectado				FH [‡] (%)	Frecuencia alélica	
Exón/ Intrón	Variante	Tipo	Base de datos [†]		PE [¶] (%)	NP (%)
I-12	c.6938-120C>T	I	dbSNP: rs206080	-	-	2,2
I-13	c.7008-62A>G	I	dbSNP: rs76584943	-	-	5,96
14	c.7242A>G (p.Ser2414Ser)	Si	dbSNP: rs1799955	31	25	20,98
I-14	c.7435+53C>T	I	dbSNP: rs11147489	-	-	1,94
I-16	c.7806-14T>C	I	dbSNP: rs9534262	39,8	35	34,2
I-21	c.8755-66T>C	I	dbSNP: rs4942486	40,7	-	21,24
I-24	c.9257-16T>C	I	dbSNP: rs11571818	-	6	0,65
27	c.9976A>T (p.Lys3326*)	N	dbSNP: rs11571833	1,7	-	1,04
27	c.10234A>G (p.Ile3412Val)	M	dbSNP: rs1801426	4	-	0,52
27	c.*105A>C	3'- UTR	dbSNP: rs15869	35,4	-	7,38

En **negrita** el dato seguido como criterio para clasificación como polimorfismo (frecuencia alélica $\geq 1\%$).

5'UTR: variante en región no codificante aguas arriba (5'-*untranslated region*); Si: variante silenciosa; I: variante intrónica; M: variante *missense*; N: *nonsense*; 3'UTR: variante en región no codificante aguas abajo (3'-*untranslated region*).

FH: frecuencia en las poblaciones; PE: frecuencia alélica en población española; NP: frecuencia alélica en nuestra población.

[†]Numeración identificativa de la variante en la base de datos *dbSNP*.

[‡]Datos obtenidos de las poblaciones *HapMap* de la base *dbSNP*, prioritariamente de población europea.

[¶]Datos obtenidos de la relación de polimorfismos clasificados por Díez y col. (2003) [336].

******Datos obtenidos de un estudio poblacional de 86 casos de población algeriana [457].

2.2 Grandes reordenamientos génicos detectados en *BRCA1* y *BRCA2*

Se analizó la presencia de grandes reordenamientos génicos en *BRCA1* y *BRCA2* en aquellos casos índice en los que no se encontró ninguna mutación puntual patogénica (n=326). Este análisis se realizó a través de la técnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

2.2.1 Grandes reordenamientos génicos en *BRCA1*

No se detectaron grandes reestructuraciones génicas en *BRCA1*.

2.2.2 Grandes reordenamientos génicos en *BRCA2*

Tras el análisis, se detectaron 2 tipos de reordenamientos génicos en *BRCA2*. Tratándose de una delección del exón 2 y una duplicación del exón 21 (**tabla 36**). La frecuencia ha sido de un 1,53% (5/326) entre los casos de riesgo del síndrome de CMOH negativos para mutaciones puntuales patogénicas en *BRCA1/2*.

Tabla 36. Grandes reordenamientos génicos detectados en *BRCA2*. Se indica referencia bibliográfica y base de datos consultada.

Exón/ Intrón	Reordenamiento	Nº casos	Familia	Caso índice	Tipo de familia*	Referencias
2	Delección	4	F14	bCMO	CMO + bCM	Gutiérrez-Enríquez (2007) [515]
			F175	CM	2CM + CM _{≤40}	
			F233	CM ≤ 40	CM ≤ 40 + CM	
			F334	CM	CM+bCM	
21	Amplificación	1	F331	CM	CM+CMO+ bCMO	No descrita

CM: Cáncer de mama; CM_{≤40}: Cáncer de mama con un diagnóstico menor o igual a 40 años; bCM: Cáncer de mama bilateral; CO: Cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario. bCMO: Cáncer de mama bilateral y ovario.

*En las características del tipo de familia se tuvieron en cuenta el caso índice y sus familiares de primer y segundo grado.

2.2.2.1 Deleción del exón 2

Deleción presente en cuatro familias, se trata de la más prevalente de los reordenamientos génicos detectados (**fig. 86**). Tiene una prevalencia de un 7,14% entre los casos *BRCA*+ y un 16,13% de las familias *BRCA*2+.

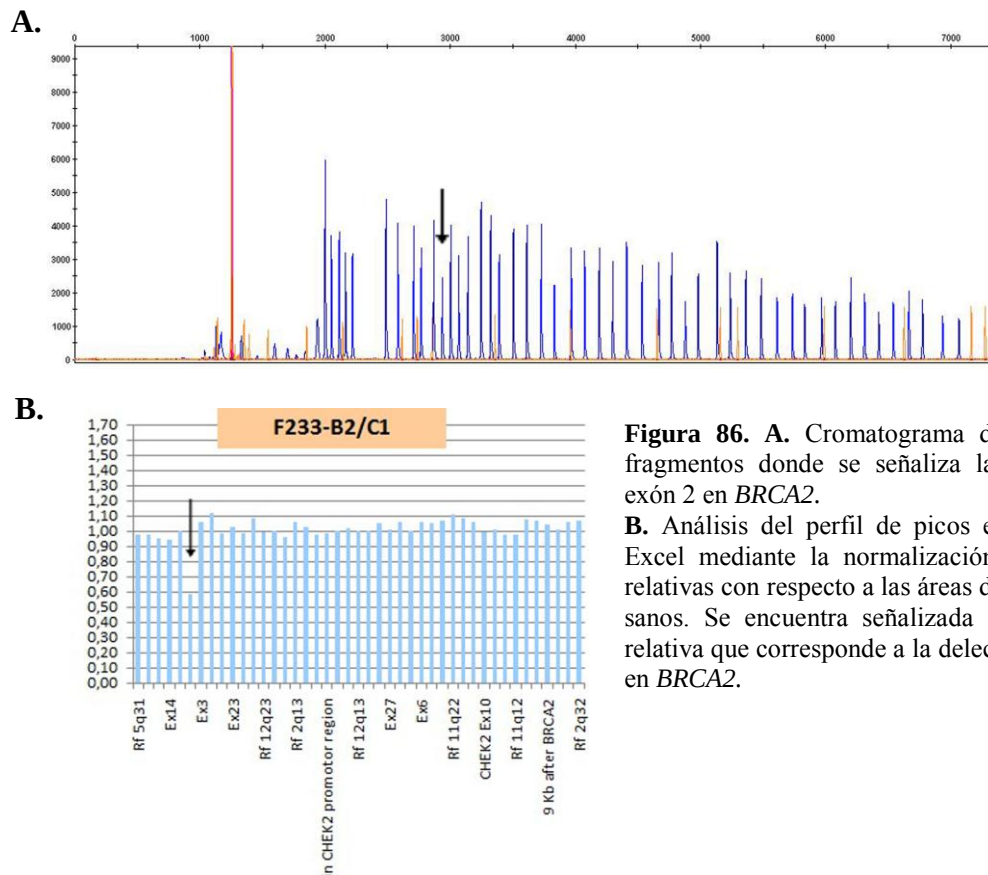


Figura 86. A. Cromatograma del análisis de fragmentos donde se señala la deleción del exón 2 en *BRCA*2.

B. Análisis del perfil de picos en un plantilla Excel mediante la normalización de las áreas relativas con respecto a las áreas de los controles sanos. Se encuentra señalizada la menor área relativa que corresponde a la deleción del exón 2 en *BRCA*2.

Puesto que esta deleción se encontró también en 4 familias no relacionadas en un estudio descrito del Instituto Catalán de Oncología [516], y en el que se ha podido corroborar que tenemos una familia común en ambos centros, consideramos que los análisis de expresión génica realizados, se pueden trasladar a nuestra deleción detectada.

El análisis de esta deleción por PCR *long-range* han demostrado la deleción de 500 pb en un alelo. Por otro lado, la secuenciación directa de este fragmento reveló una deleción genómica de 486 pb, junto con una inserción de 3 pb (ATA) en el lugar de la deleción. Además, el análisis a nivel de ADN complementario (ADNc) demostraron que la deleción era heterocigota y que el alelo defectuoso era capaz, no obstante, de producir un ARNm estable [516]. El exón 2 de *BRCA*2 corresponde al primer exón de

codificación y, puesto que el alelo mutado es capaz de expresar una transcripción estable a niveles similares que el alelo *wildtype*, puede indicar que la región suprimida no contenga elementos promotores críticos para la expresión de *BRCA2*. No obstante, probablemente la traducción de este transcrito sea completamente abolida debido a la falta del codón de inicio canónico situado 39 pb aguas arriba de la región 5' UTR. Sin embargo, según lo descrito no se puede descartar la posibilidad de que se forme otro producto de traducción, mediante un codón de inicio alternativo [516]. El primer ATG en marco de lectura que se encuentra es en el exón 4 (codón 124). Y, en el supuesto de que este ATG sirva como un codón de iniciación de la traducción, la traducción del ARNm mutante produciría una proteína *BRCA2* carente de los primeros 123 aminoácidos (p.Met1_Lys123del).

Este reordenamiento se describió por primera vez en un estudio de grandes reordenamientos en *BRCA2* en familias españolas [515]. Posteriormente, el estudio de Ruiz de Garibay y col. (2012) [516], antes mencionado, demostró que se producía la misma alteración en todos los portadores según los análisis de expresión génica y, junto con los análisis de haplotipo, demostraron de manera definitiva que se trataba de un gran reordenamiento con efecto fundador en nuestro país.

a) Descripción de las familias

- F14 (**fig.87A**): Caso índice (II:3) con un cáncer de ovario y un cáncer bilateral de mama. A los 67 años se le diagnosticó de ovario y, posteriormente, a los 71 años tuvo un carcinoma ductal infiltrante en la mama derecha (pT1bpN1M0; RE-, RP-, HER+ y p53 +). Recientemente, ha sido diagnosticada de otro CM en la mama izquierda a los 82 años. Tiene una hermana (II:5) que falleció por cáncer de mama bilateral diagnosticado a los 35 años de edad. La hija de esta hermana (III:8) ha fallecido a los 59 años por un cáncer bilateral con diagnóstico a los 35 y 48 años de edad; se le pudo realizar el estudio genético y se demostró que era portadora de la delección. Una sobrina del caso índice (III:16) fue diagnosticada de CM a los 35 años, falleció a los 37. Hasta la fecha, se ha demostrado que son portadores sanos tres sobrinos del caso índice (III:7, III:15 y IV:9); otros tres sobrinos (III:10, III:12 y IV:4) han resultado ser no portadores de la delección.

- F175 (**fig. 87B**): Caso índice (II:6) varón con CM diagnosticado a los 62 años (RE+, RP+ y HER-). Tiene una hermana con cáncer de mama bilateral diagnosticado a los 47 y 63 años de edad (II:2) y un hermano fallecido (II:4) con cáncer de próstata a los 60, cáncer de pulmón a los 65 y cáncer de vejiga a los 70. Tiene una sobrina (III:1) con CM. Tienen el estudio genético realizado sus dos hijos (III:10, portador y III:11, no portador), tres sobrinos (III:4, portador; III:6, no portador y III:8, no portador) y una sobrina nieta (IV:2, no portadora). Todos ellos, hasta la fecha, se encuentran sanos.
- F233 (**fig. 88A**): Caso índice (IV:4) con cáncer de mama bilateral diagnosticado a los 27 y 28 años (en la mama izquierda: pT2pN2; RE+; RP+ y HER-). A su abuela (II:8) se le diagnosticó CM a los 55 años, su tía abuela (II:1) también tuvo CM a los 44, otra tía abuela (II:4) con CM a los 67 y su otro tío abuelo (II:6) cáncer de pulmón diagnosticado a los 67. La hermana de su padre (III:6) falleció con CM a los 38 años y otra tía (III:10) tuvo un linfoma a los 50 años. Una prima (IV:5) tuvo una intervención por teratoma de ovario a los 22 años. Se ha demostrado que su padre (III:8) es portador de la delección.
- F334 (**fig. 88B**): Caso índice (II:2) con carcinoma ductal infiltrante sólido a los 43 años (RE+, RP+, Bcl2 90%, p53+, Ki 67 15% y HER-). Su madre (I:2) fue diagnosticada de cáncer bilateral a los 45 y 48 años de edad. Su padre (I:1) tuvo cáncer de páncreas a una edad de 60 años.

a) Estudios genotipo-fenotipo

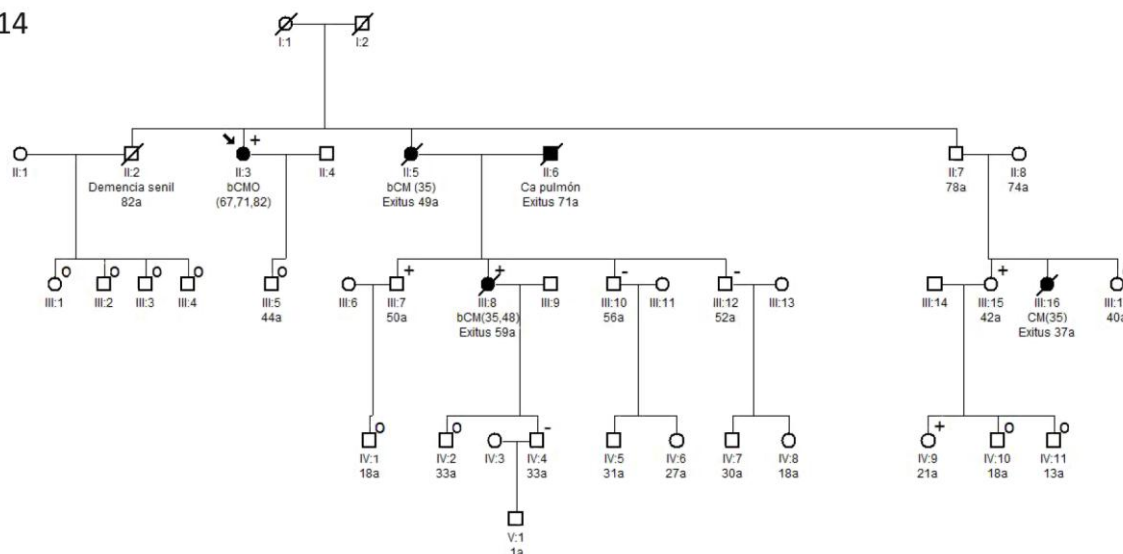
Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico*	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
11	5 (45,5)	39 (27-71)	3 (27,3)	1 (9,1)	67	1 (9,1)

*Se descartó el caso de CM en varón para el cálculo de la edad mediana de diagnóstico.

Entre los dos estudios españoles donde se haya descrita esta delección, se ha podido detectar en 5 familias con 7 CM en total (uno en varón, dos bilaterales y uno junto un cáncer de ovario) con una mediana de diagnóstico en CM femenino de 43,5 (27-73) años. Estas características estarían acorde con el fenotipo de las familias observadas en nuestro estudio.

A.

F14



B.

F175

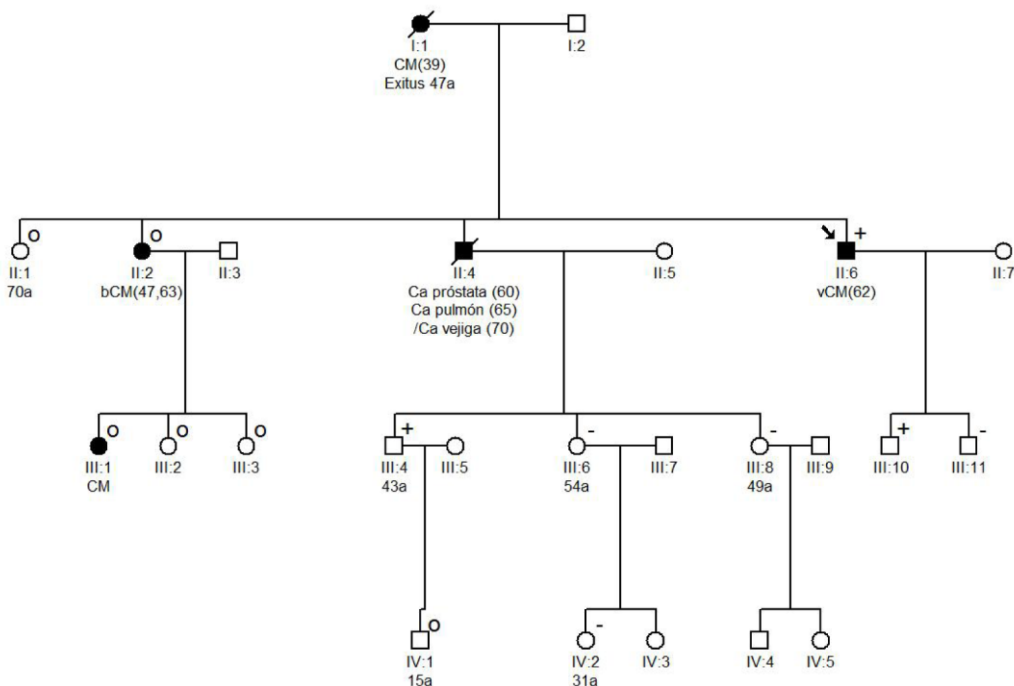
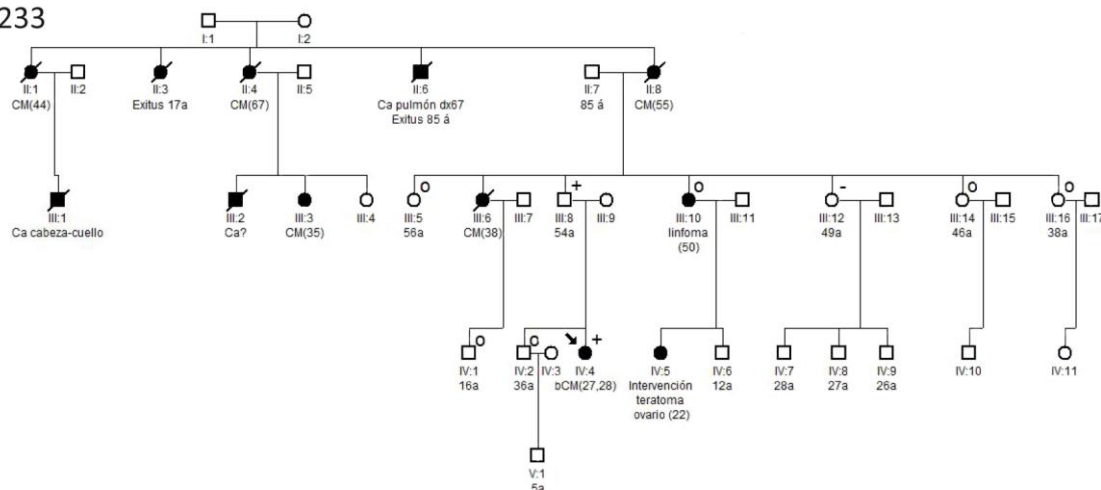


Figura 87. Árboles familiares de casos portadores de la delección del exón 2 en *BRCA2*. En A F14 y en B F175.

A.

F233



B.

F334

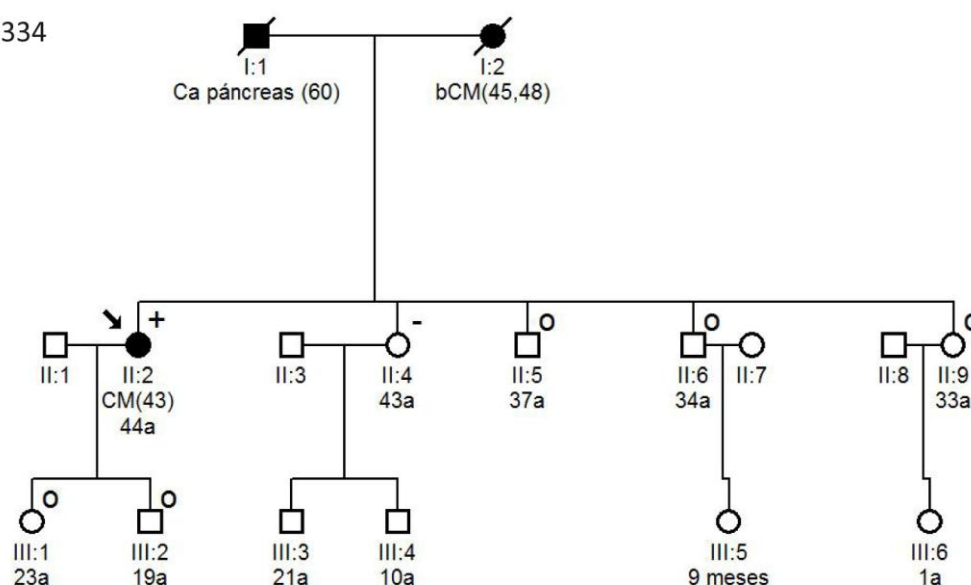


Figura 88. Árboles familiares de casos portadores de la delección del exón 2 en *BRCA2*. En **A** F233 y en **B** F334.

2.2.2.2 Amplificación del exón 21

Amplificación detectada en una sola familia, por tanto, con una prevalencia de un 1,43% entre las familias *BRCA*+ y un 3,23% entre las familias *BRCA2*+ (**fig. 89**). No tenemos conocimiento que se haya descrito anteriormente y, por la misma razón, no sabemos qué mecanismo lleva a que se preoduzca este gran reordenamiento. No obstante, en el exón 21 se encuentran dominios importantes que conforman una región de unión al ADN durante el proceso de la RH: como el dominio OB2, que une al ADN

de una sola hebra y a la proteína *DSS1*, la cual se ha relacionado con la estabilización de la proteína *BRCA2*.

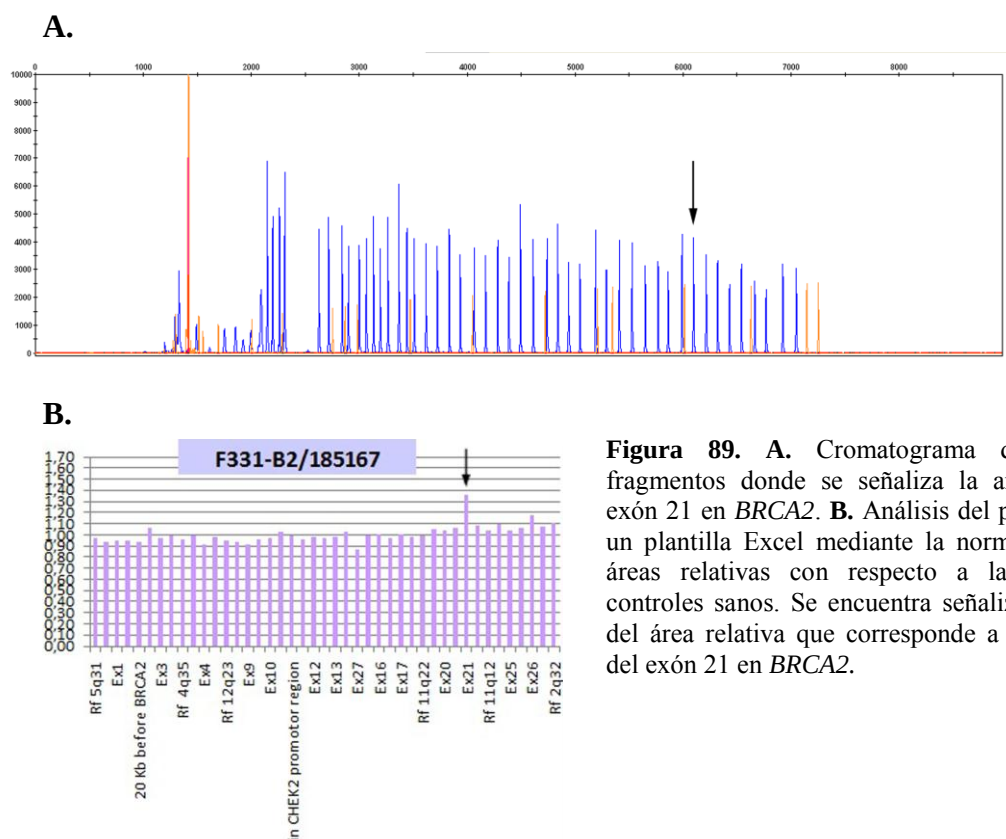


Figura 89. **A.** Cromatograma del análisis de fragmentos donde se señala la amplificación del exón 21 en *BRCA2*. **B.** Análisis del perfil de picos en un plantilla Excel mediante la normalización de las áreas relativas con respecto a las áreas de los controles sanos. Se encuentra señalado el aumento del área relativa que corresponde a la amplificación del exón 21 en *BRCA2*.

a) Fenotipo de la familia

- F331 (**fig. 90**): Caso índice (II:5) diagnosticado de CM a los 48 años. Su hermana (II:3) falleció con un cáncer bilateral metacrónico a los 48 y 54 años y un cáncer de ovario a los 57. Su madre (I:2) tuvo un cáncer de mama a los 55 años y un cáncer de ovario a los 82. Su padre (I:1) tuvo un cáncer de vejiga. Tres hermanos (II:1, II:2 y II:6) no son portadores de la amplificación y una hermana (II:6) sí que se ha confirmado que es portadora. También se le ha realizado estudio genético a un hijo de su hermana afectada (III:1), la cual ha resultado ser no portadora de este reordenamiento génico.

b) Estudios genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
2	1 (50)	48	0	0	-	0

F331

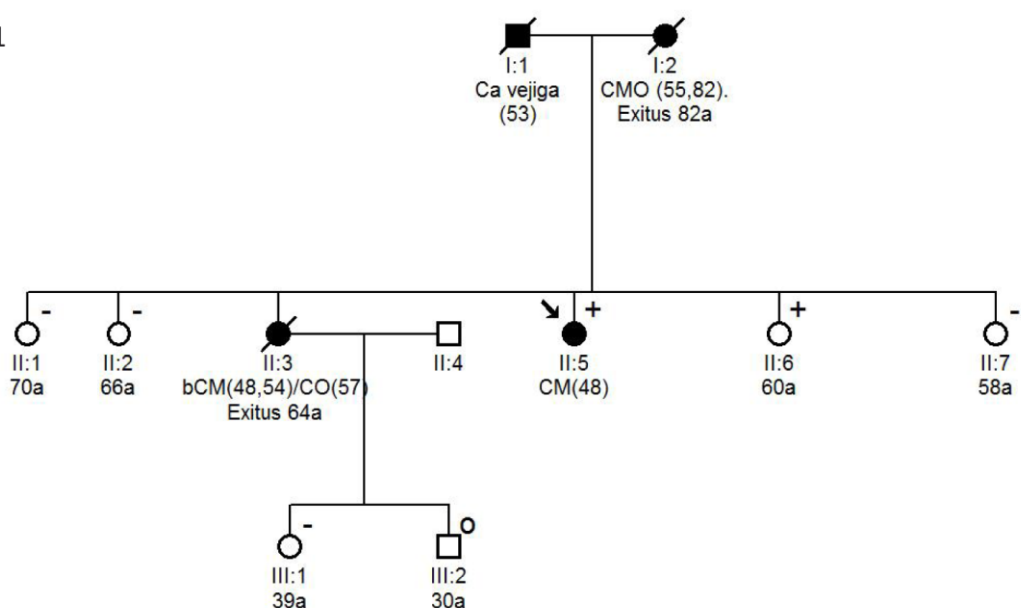


Figura 90. Árbol familiar de los casos portadores de la amplificación del exón 21 en *BRCA2*.

3 COMPROBACIÓN POR *qPCR* DE LOS GRANDES REORDENAMIENTOS GÉNICOS DETECTADOS

El uso de MLPA para la detección de grandes reordenamientos se ha generalizado recientemente, ya que proporciona un método robusto y relativamente simple para buscar la dosificación del gen simultáneamente en hasta 45 dianas, como ocurre con *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, mientras que la detección de MLPA de deleciones de exones múltiples secuenciales es ampliamente aceptado (ya que esta confirmación se proporcionaría por los resultados de los exones vecinos, debido a que la sonda MLPA establecida para cada exón se une de forma independiente el uno del otro),

sí que existe preocupación por la fiabilidad de los resultados de MLPA que muestran la delección de un solo exón [517;518].

La secuenciación del exón en cuestión puede llevarse a cabo para verificar la ausencia de variantes que puedan dificultar la unión de las sondas de MLPA y causar un resultado falso positivo. Sin embargo, este método no proporciona la confirmación de un resultado positivo verdadero. Por lo tanto, para las delecciones de exones individuales, es importante emplear una técnica alternativa para la confirmación de los resultados.

De esta manera, hemos comprobado en el Laboratorio de Diagnóstico Genético la detección de la delección del exón 2 en *BRCA2* por MLPA mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_p}$ empleando la técnica de *qPCR*.

Por otro lado, no consideramos realizar la comprobación de la amplificación del exón 21, ya que fue confirmada previamente por el laboratorio externo mediante estudios en el ARNm (RT-PCR).

3.1 Comprobación de la delección del exón 2 (*BRCA2*)

Las diluciones seriadas de la muestra control y de la muestra con la delección del exón 2 se utilizaron para calcular las eficiencias de la PCR. De tal manera, que tras la amplificación por *qPCR* de cada muestra (**figura 91**), obtuvimos un *crossing point* (Cp) para cada una de las diluciones, calculado por el software *LightCycler* usando el máximo de la segunda derivada (**tabla 37**).

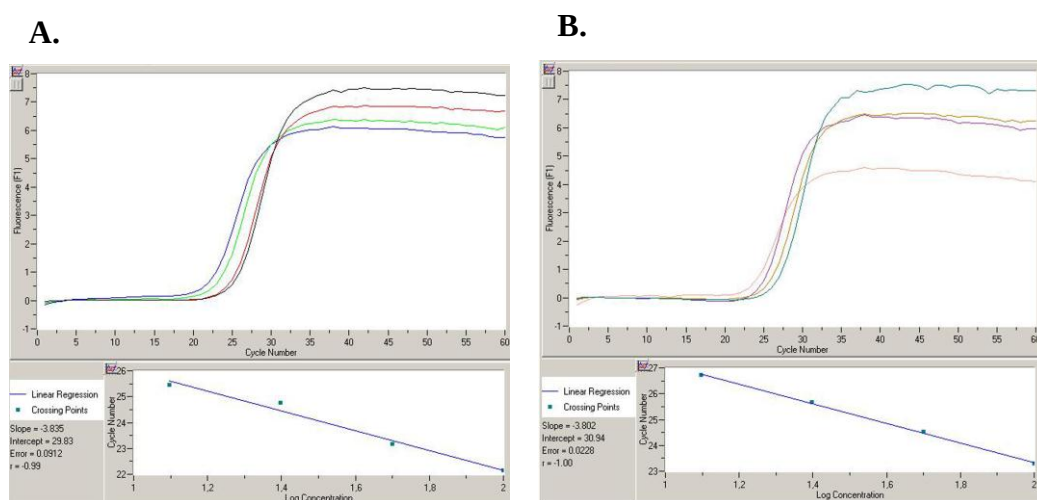


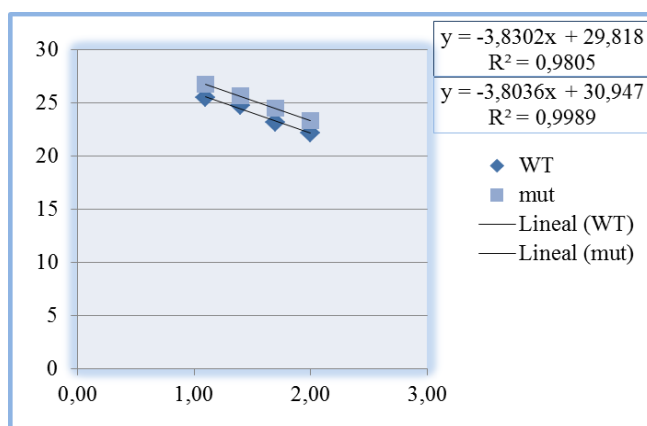
Figura 91. Curvas de amplificación por *qPCR* (*LightCycler*), en la parte inferior se muestra el cálculo del *crossing point* (Cp). En **A** se encuentran las diluciones *wildtype*; en **B** las diluciones de la muestra con la delección del exón 2.

Tabla 37. Resultados de *crossing point* (Cp) de cada dilución en las muestras *wildtype* y deleción del exón 2.

Muestra control (<i>wildtype</i>)		Muestra con deleción exon 2	
Concentración (ng)	Cp	Concentración (ng)	Cp
12,5	25,47	12,5	26,73
25	24,76	25	25,68
50	23,16	50	24,52
100	22,16	100	23,30

Posteriormente, realizamos una recta de regresión con estos valores Cp según las diluciones (**figura 92**) y, así, pudimos calcular las eficiencias de la PCR de cada muestra ($E=10^{-1/\text{pendiente}}$): 1,82 para la muestra control y 1,83 para la muestra de la deleción del exón 2.

Puesto que las eficiencias de ambas muestras eran prácticamente idénticas, pudimos asumir que tenían un valor de 2 cada una de ellas y así proceder al cálculo del ratio de la dosis génica (RD) para cada concentración, utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_p}$ (**tabla 38**).

**Figura 92.** Recta de regresión con los valores Cp de la muestra control (WT) y la muestra con la deleción (mut).**Tabla 38.** Ratio de dosis génica (RD) de cada dilución calculado a partir del método $2^{-\Delta\Delta C_p}$.

Ratio de la dosis génica	
Concentración (ng)	RD
12,5	0,42
25	0,53
50	0,39
100	0,45

Al observar una media de ratio de dosis génica de $0,45 \pm 0,06$, pudimos concluir que las cantidades de ADN amplificado de cada muestra eran diferentes en las mismas condiciones de PCR y, por tanto, demostrar la deleción del exón 2 con una técnica alternativa al MLPA.

4 ESTUDIO DE MICROSATÉLITES DE LA VARIANTE PATOGENICA c.1918C>T (*BRCA1*)

La variante patogénica *nonsense* c.1918C>T (p.Gln640*) detectada en *BRCA1* (anteriormente explicada), se ha visto que es de nueva descripción y se ha detectado en dos familias distintas no relacionadas. Por este motivo, procedimos a realizar estudios de haplotipo con marcadores de microsatélites en regiones colindantes a la mutación y al gen *BRCA1* para, así, poder demostrar que tenían un ancestro común y de que se trataba de una variante patogénica no descrita de probable efecto fundador en nuestra región. Estudio publicado recientemente por nuestro grupo [452;517].

Se procedió al estudio de genotipado con marcadores microsatélites en 9 pacientes (8 portadores y uno no portador) de las dos familias y en 24 controles sanos pertenecientes de diferentes zonas de la Región de Murcia. Se pudo comprobar que todos los portadores de la variante tenían el mismo haplotipo común (139pb-89pb-122pb-308pb) y, en cambio, no se encontró en el caso no portador ni en ninguno de los casos controles. En la **figura 93** se muestra el análisis de fragmentos del marcador 17-3858, mientras que en la **figura 94** se puede observar los dos árboles genealógicos de las familias junto con el análisis de haplotipo.

Por tanto, pudimos detectar la presencia de un alelo común en los cuatro individuos afectados y cuatro portadores sanos, demostrando la presencia de un ancestro común. En base a nuestro conocimiento, esta mutación sólo se ha descrito en la población de la Región de Murcia, lo cual confirma la hipótesis de que esta mutación podría tener origen murciano.

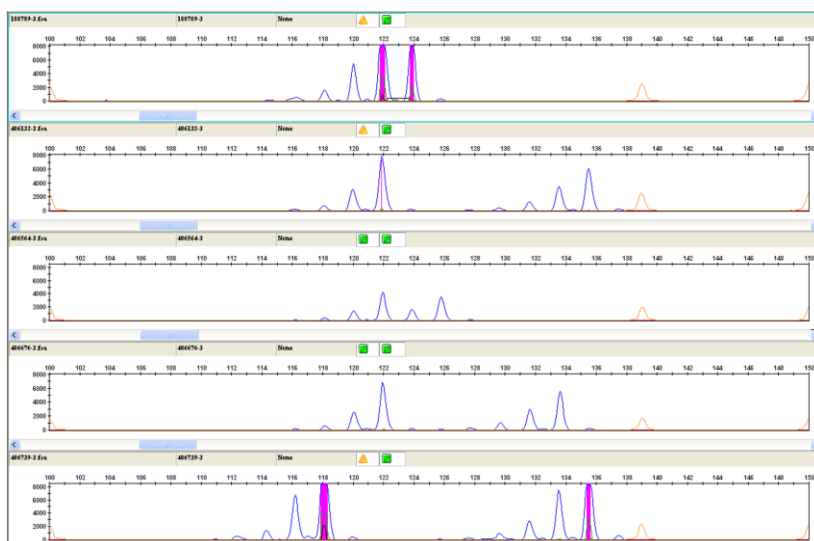


Figura 93. Análisis de fragmentos de cinco pacientes del marcador 17-3858 mediante el soporte informático Seqscape v. 2.5. Puede observarse el tamaño del alelo correspondiente a 122 pb común en los primeros cuatro pacientes a excepción del último, que resultó no ser portador de la variante.

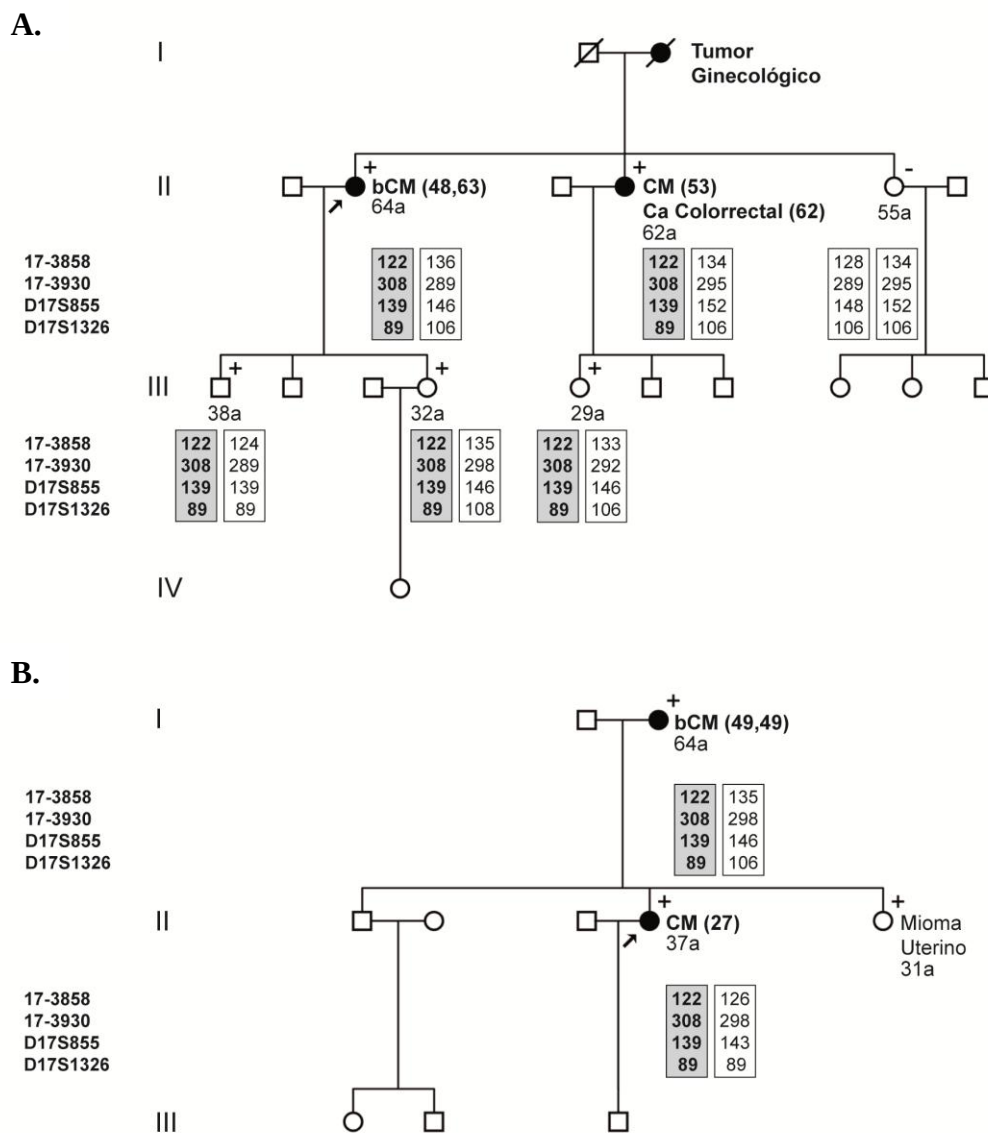


Figura 94. Árboles genealógicos con los haplotipos tras su análisis con marcadores de microsatélites en *BRCA1*. En **A** se encuentra la familia F189 y en **B** la familia F47. En el margen derecho se encuentran los distintos marcadores empleados. En *negrita* se señala el haplotipo común presente en los portadores de de la mutación.

CM: Cáncer de mama; bCM: Cáncer de mama bilateral; Ca: cáncer; a: años.

5 ESTUDIOS DE CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Hemos realizado una clasificación de los casos según el resultado del test genético y los criterios de riesgo familiares recomendados por la SEOM. De tal manera, que hemos obtenido 70/396 (17,7%) casos índices portadores de alguna variante patogénica y 326/396 (82,3%) casos no portadores de ninguna variante patogénica, de los cuales 240 (60,8%) los hemos clasificado como *BRCA*X (casos con test negativo pero con criterios de alto o moderado riesgo), 68 (17,2%) casos sin riesgo (aquellos con test negativo y sin criterio de riesgo familiar) y 18 (4,5%) casos con test negativo que no pudimos clasificar por falta de información en las fuentes consultadas. En la **tabla 39** hemos representado el número de casos según esta clasificación, en función del tipo de cáncer del caso índice.

Tabla 39. Casos según el test del estudio genético y el tipo de cáncer del caso índice.

	Portadores (n=70)		No portadores (n=326)			Total
	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCA</i> X	Sin riesgo	Riesgo no conocido*	
	39 (100%)	31 (100%)	240 (100%)	68 (100%)	18 (100%)	396 (100%)
Cáncer de mama	16 (41%)	17 (54,8%)	196 (81,7%)	34 (50%)	6 (33,3%)	269 (67,9%)
Cáncer bilateral de mama	10(25,6%)	6 (19,4%)	7 (2,9%)	10 (14,7%)	4 (22,2%)	37 (9,3%)
Cáncer de mama en varón	0 (0%)	3 (9,7%)	1 (0,4%)	5 (7,4%)	1 (5,6%)	10 (2,5%)
Cáncer de ovario	6 (15,4%)	1 (3,2%)	11 (4,6%)	6 (8,8%)	1 (5,6%)	25 (6,3%)
Cáncer de mama y ovario	6 (15,4%)	2 (6,5%)	7 (2,9%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (3,8%)
Cáncer de mama bilateral y ovario	1 (2,6%)	2 (6,5%)	1 (0,4%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (1%)
Cáncer de mama y endometrio	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (4,4%)	0 (0%)	3 (0,8%)
No afectado	0 (0%)	0 (0%)	15 (6,3%)	7 (10,3%)	3 (16,7%)	25 (6,3%)
Desconocido†	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,8%)	3 (4,4%)	3 (16,7%)	8 (2%)

*casos donde no se pudo clasificar el riesgo según los criterios de la SEOM por falta de información de los antecedentes de cáncer de los familiares.

† Casos donde no obtuvimos información del tipo de cáncer del caso índice

Si enfocamos el estudio en cuanto a la prevalencia de los tipos de cáncer según el resultado del estudio genético, se ha podido observar una mayor frecuencia de los casos de cáncer de ovario y los casos con cáncer de mama y ovario cuando el resultado del test *BRCA* ha sido positivo (**figura 95**).

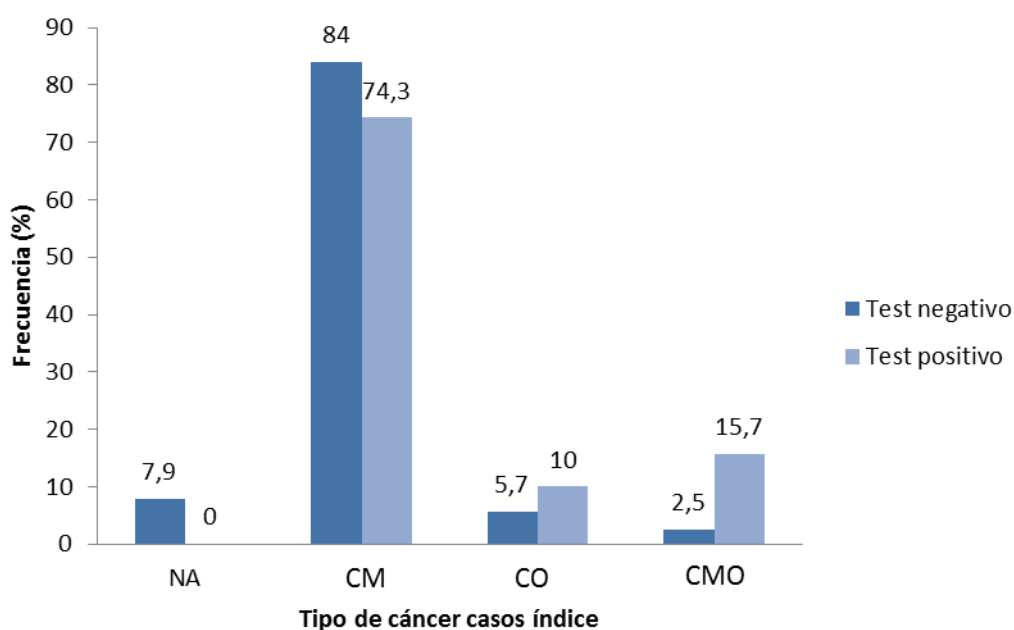


Figura 95. Diagrama de barras que representa la frecuencia de los tipos de cáncer de los casos índice en función del resultado del estudio genético.

NA: Caso índice no afectado; CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario

A continuación, vamos a realizar un estudio más completo de los cánceres de mama, ovario y la historia oncológica de los familiares de primer y segundo grado centrándonos en las características fenotípicas de los grupos *BRCA1*, *BRCA2* y *BRCAX*.

5.1 Cáncer de mama

Hemos estudiado las características clínicas de 275 pacientes con CM (**tabla 40**). La mediana de edad al diagnóstico en el grupo de *BRCA1* fue de 38 (23-65) años, 43 (27-78) años para *BRCA2* y de 39,5 (25-80) años para *BRCAX*, no habiéndose encontrado una diferencia significativa entre estos grupos.

5.1.1 Cáncer bilateral

Se ha encontrado una fuerte asociación entre la alta frecuencia de los casos de cáncer bilateral del grupo con los tests genéticos *BRCA+* y el grupo *BRCAX* ($p < 0,001$), estimándose un riesgo de 3,87 veces (IC95%: 2,74-5,50) mayor de tener un diagnóstico de cáncer bilateral en el grupo *BRCA+*. No obstante, una vez desarrollado el cáncer contralateral, no se han podido observar más diferencias en cuanto al tipo, edad mediana de diagnóstico y los años de intervalo con el primer cáncer (**tabla 40**).

5.1.2 Cáncer de mama en varón

De los cuatro casos de cáncer en varón que han entrado en el estudio, tres han sido en *BRCA2* y el otro restante en *BRCAX*. Aunque se tratan de pocos casos, sí que muestran una tendencia a una relación de los cánceres de mama en varón con el grupo de *BRCA2* ($p = 0,039$ entre el estudio genético positivo y el grupo de *BRCAX*) (**tabla 40**).

5.1.3 Características histológicas e inmunohistoquímicas

El estudio de las características histológicas e inmunohistoquímicas lo ampliamos a 300 CM (además de los 275 pacientes con CM, hemos incluido los 27 cánceres contralaterales de los 27 pacientes con cáncer bilateral).

Si comparamos las características morfológicas de los tumores, la mayoría de los carcinomas son del tipo ductal en todos los grupos, pudiéndose observar más carcinomas medulares en *BRCA1* y más carcinomas lobulillares en *BRCA2*. Podríamos diferenciar el grupo de *BRCA2* con *BRCAX* en que en el primero, no ha habido ningún caso de carcinoma medular frente al 3,7% de casos en *BRCAX*, aunque son pocos los casos estudiados (**tabla 41**). No se han visto diferencias significativas entre el tamaño del tumor primario, el número de ganglios linfáticos afectados y el estadio clínico en los tres grupos (**tabla 41**).

En cuanto a los receptores inmunohistoquímicos, se ha comprobado una fuerte asociación entre los RE negativos y *BRCA1* ($p = 0,001$, de diferencia estadística entre *BRCA1* y *BRCA2*). Se ha podido ver una mayor proporción de RE positivos en el grupo de *BRCA2* y *BRCAX* de manera similar. Los receptores HER2 positivos, en cambio, son raros en todos los grupos (**tabla 41**).

Esta alta proporción de RE negativos, explica que sea poco común el subtipo molecular luminal A en el grupo de *BRCA1* (21,4% frente a un 66,7% y 60% de *BRCA2* y *BRCAX*, repectivamente). Y, por otro lado, hemos de destacar la fuerte asociación entre el grupo de los cánceres triple negativos entre *BRCA1* y los demás grupos ($p < 0,001$), incluso pudiéndose observar esta asociación entre *BRCA+* y *BRCAX* ($p = 0,001$). Se ha estimado que un cáncer triple negativo tiene 2,57 veces (IC95%: 1,54-4,28) más riesgo de ser *BRCA+* (tabla 41).

Tabla 40. Características clínicas de los cánceres de mama según los grupos *BRCA1*, *BRCA2* y *BRCAX**.

Variable	Categoría	N (%) / Mediana (rango)					
		<i>BRCA1</i> N = 33	<i>BRCA2</i> N = 30	<i>BRCAX</i> N = 212	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>RR2</i> [†] (IC 95%)
Mediana de edad de diagnóstico (rango)		38 (23-65)	43 (27-78)	39,5 (25-80)	0,084	0,849	
Grupos de edad de diagnóstico	< 30	5 (15,6)	3 (10,3)	15 (7,2)	0,140	0,420	
	30-40	17 (53,1)	9 (31)	100 (48,1)			
	41-50	4 (12,5)	10 (34,5)	56 (26,9)			
	> 50	6 (18,8)	7 (24,1)	37 (17,8)			
Historia familiar de CM/CO	Sí	21 (63,6)	19 (65,5)	111 (55,2)	1,000	0,240	
	No	12 (36,4)	10 (34,5)	90 (44,8)			
bCM	Sí	11 (33,3)	8 (26,7)	8 (3,8)	0,595	<0,001	3,87
	No	22 (66,7)	22 (73,3)	204 (96,2)			(2,74-5,50)
Tipo CC	Metacrónico	9 (81,8)	5 (71,4)	5 (62,5)	1,000	0,635	
	Sincrónico	2 (18,2)	2 (28,6)	3 (37,5)			
Edad mediana de diagnóstico CC (rango)		46 (34-63)	57 (28-64)	49,5 (36-57)	0,441	0,889	
Años de intervalo CC		9 (0-15)	5 (0-15)	3,5 (0-18)	0,749	0,500	
vCM	Sí	0 (0)	3 (10)	1 (0,5)	0,102	0,039	3,40
	No	33 (100)	27 (90)	211 (99,5)			(1,86-6,23)

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; bCM: Cáncer de mama bilateral; CC: Cáncer contralateral; vCM: Cáncer de mama en varón.

P1: Grupo *BRCA1* versus grupo *BRCA2*; *P2*: grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*; *RR*: Riesgo relativo

*Algunos datos no están disponibles por falta de información en la fuente consultada.

†Se estimaron los riesgos relativos entre las variables categóricas que fueron significativas ($p < 0,05$).

Tabla 41. Características clínicas de los cánceres de mama según los grupos *BRCA1*, *BRCA2* y *BRCAX*.*

Variable	Categoría		N (%) / Mediana (rango)				
Características	Todos CM N (%)	<i>BRCA1</i> N (%)	<i>BRCA2</i> N (%)	<i>BRCAX</i> N (%)	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>RR2</i> [‡] (IC 95%)
Histología					0,011	0,226	
Carcinoma ductal	224 (87,2)	29 (82,9)	30 (90,9)	165 (87,3)			
Carcinoma medular	13 (5,1)	6 (17,1)	0 (0)	7 (3,7)			
Carcinoma lobulillar	17 (6,6)	0 (0)	3 (9,1)	14 (7,4)			
Otros†	3 (1,2)	0 (0)	0 (0)	3 (1,6)			
Tumor primario (pT)					0,109	0,805	
pT0- pT1	108 (50,5)	16 (53,3)	13 (50)	79 (50)			
pT2	86 (40,2)	10 (33,3)	13 (50)	63 (39,9)			
pT3-pT4	20 (9,3)	4 (13,3)	0 (0)	16 (10,1)			
Ganglios linfáticos regionales (pN)					0,722	0,534	
pN0	99 (44,6)	17 (54,8)	11 (44)	71 (42,8)			
pN1	85 (38,3)	9 (29)	9 (36)	67 (40,4)			
pN2-pN3	38 (17,1)	5 (16,1)	5 (20)	28 (16,9)			
Estadío clínico					0,918	0,487	
0-I	60 (31,4)	8 (28,6)	6 (31,6)	46 (31,9)			
II	64 (33,5)	12 (42,9)	7 (36,8)	45 (31,3)			
III-IV	67 (35,1)	8 (28,6)	6 (31,6)	53 (36,8)			
RE					0,001	0,003	1,91 (1,28-2,85)
Negativos	67 (26,9)	20 (62,5)	7 (21,2)	40 (21,7)			
Positivos	182 (73,1)	12 (37,5)	26 (78,8)	144 (78,3)			
HER2					0,690	0,231	
Negativos	168 (80)	25 (89,3)	20 (83,3)	123 (77,8)			
Positivos	42 (20)	3 (10,7)	4 (16,7)	35 (22,2)			
Luminal A					0,002	0,036	1,44 (1,07-1,95)
Sí	115 (55,6)	6 (21,4)	16 (66,7)	93 (60)			
No	92 (44,4)	22 (78,6)	8 (33,3)	62 (40)			
Luminal B					0,652	0,265	
Sí	31 (15)	2 (7,1)	3 (12,5)	26 (16,8)			
No	176 (85)	26 (92,9)	21 (87,5)	129 (83,2)			
HER2+					1,000	1,000	
Sí	16 (7,7)	2 (7,1)	2 (8,3)	12 (7,7)			
No	191 (92,3)	26 (92,9)	22 (91,7)	143 (92,3)			
Triple negativo					<0,001	0,001	2,57 (1,54-4,28)
Sí	45 (18,4)	18 (58,1)	3 (9,7)	24 (13,2)			
No	199 (81,6)	13 (41,9)	28 (90,3)	158 (86,8)			

P1: Grupo *BRCA1* versus grupo *BRCA2*; *P2*: grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*; *RR2*: riesgo relativo entre grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*.

*Algunos datos no están disponibles por falta de información en la fuente consultada.

†Los 3 casos fueron: uno del tipo filoides, otro del tipo coloide y otro del tipo papilar.

‡Se estimó el riesgo relativo entre las variables categóricas de tablas 2x2 que mostraron significancia estadística ($p < 0,05$).

5.2 Cáncer de ovario

Hemos realizado un estudio más exhaustivo de los 37 casos con cáncer de ovario clasificados en los grupos *BRCA1*, *BRCA2* y *BRCAX*. La edad mediana a la que fueron diagnosticados en cada grupo fue de 58 (40-75) años para los pacientes *BRCA1+*, 55 (36-67) años para los pacientes *BRCA2+* y 47 (19-73) años, con significancia estadística entre el grupo *BRCA1/BRCA2* y el grupo *BRCAX* ($p=0,039$) (**tabla 42**).

5.2.1 Cáncer de mama y ovario

La prevalencia del cáncer de ovario sin coafectación con cáncer de mama ha sido mayor en el grupo de *BRCA1* con respecto al de *BRCA2* (15,4% en *BRCA1* frente a un 3,2% de los casos en *BRCA2*) (**figura 96**). Aunque si valoramos los individuos diagnosticados con cáncer de mama y ovario, la frecuencia de casos es más similar en ambos grupos (17,9% en *BRCA1* frente a 12,9% en *BRCA2*) (**figura 96**).

De los 5 pacientes *BRCA2* con cáncer de ovario, 4 han tenido también un cáncer de mama; el grupo de *BRCA1*, en cambio, ha tenido una frecuencia similar al de los *BRCAX* (53,8% frente a 42,1%, respectivamente). Además, los años de intervalo entre el segundo cáncer de los individuos *BRCA2+* con cáncer de mama y ovario ha sido menor con respecto a los demás grupos (4 años, con un rango de 0-11 años), aunque se trata de pocos casos y no se observa diferencia estadística. También deberíamos añadir que dentro de los cuatro casos *BRCA2+* con cáncer de mama y ovario, 3 han tenido como cáncer inicial el cáncer de ovario (**tabla 42**).

5.2.2 Características histológicas y clínicas

Se ha visto de forma evidente que los casos *BRCA+* suelen tener predominantemente un carcinoma del tipo seroso (77,8% para *BRCA1*, 66,7% para *BRCA2* y 27,3% para los *BRCAX*). No se detectó ningún tipo histológico mucinoso que fuera *BRCA+* entre los casos estudiados (**tabla 43**).

Finalmente, no se observó diferencia en cuanto al estadio clínico FIGO con el que se diagnosticó el cáncer en todos los grupos estudiados (**tabla 43**).

Tabla 42. Características clínicas de los cánceres de ovario según los grupos *BRCA1*, *BRCA2* y *BRCAX**.

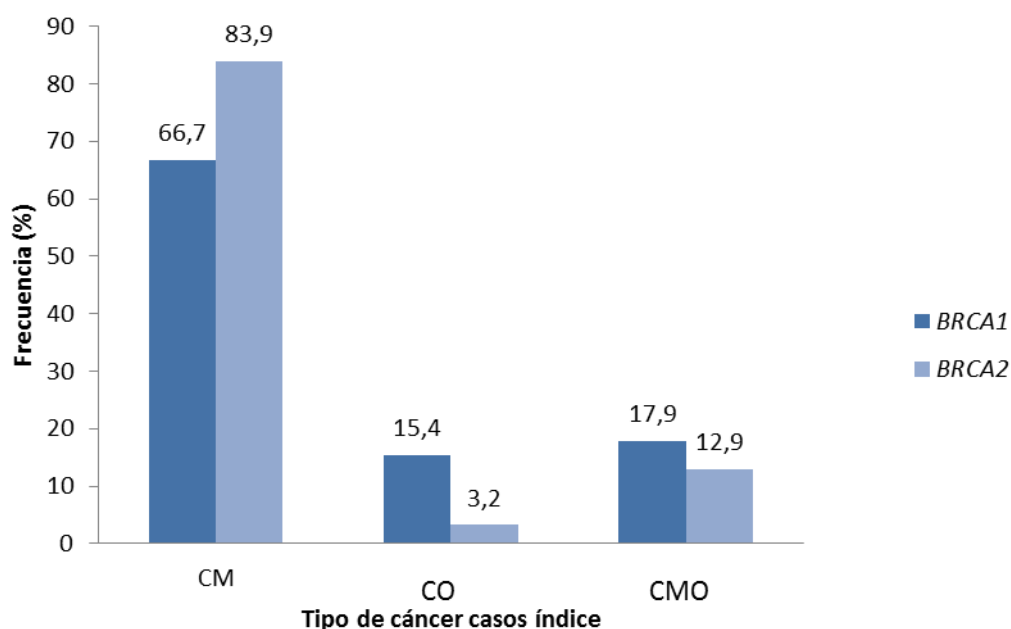
Variable	Categoría	N (%) / Mediana (rango)				
		<i>BRCA1</i> N = 13	<i>BRCA2</i> N = 5	<i>BRCAX</i> N = 19	<i>P1</i>	<i>P2</i>
Mediana de edad de diagnóstico (rango)		58 (40-75)	55 (36-67)	47 (19-73)	0,460	0,039
Historia familiar de CM/CO	Si	10 (76,9)	3 (60)	8 (47,1)	0,583	0,176
	No	3 (23,1)	2 (40)	9 (52,9)		
CMO	Si	7 (53,8)	4 (80)	8 (42,1)	0,596	0,330
	No	6 (46,2)	1 (20)	11 (57,9)		
Años intervalo segundo cáncer†		11 (0-30)	4 (0-11)	10 (6-28)	0,334	0,355
Primer caso CO	Si	2 (33,3)	3 (75)	2 (33,3)	0,524	0,633
	No	4 (66,7)	1 (25)	4 (66,7)		

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario;

P1: Grupo *BRCA1* versus grupo *BRCA2*; *P2*: grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*.

*Algunos datos no están disponibles por falta de información en la fuente consultada.

†Los casos de diagnóstico de cáncer de mama y ovario al mismo tiempo se contabilizaron como 0 años.

**Figura 96.** Diagrama de barras que representa la frecuencia de los tipos de cáncer de los casos índice en función de la población *BRCA1* y la población *BRCA2*.

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario.

Tabla 43. Características según el tipo histológico y el estadio clínico (FIGO) de los cánceres de ovario según los grupos *BRCA1*, *BRCA2* y *BRCAX**.

Variable	Categoría	N (%) / Mediana (rango)				
Características	Todos CO N (%)	<i>BRCA1</i> N (%)	<i>BRCA2</i> N (%)	<i>BRCAX</i> N (%)	<i>P1</i>	<i>P2</i>
Histología					0,157	0,025
Seroso	12 (52,2)	7 (77,8)	2 (66,7)	3 (27,3)		
Mucinoso	6 (26,1)	0 (0)	0 (0)	6 (54,5)		
Endometroide	2 (8,7)	0 (0)	1 (33,3)	1 (9,1)		
Otros†	3 (13)	2 (22,2)	0 (0)	1 (9,1)		
Estadio clínico (FIGO)‡					1,000	0,167
I-II	8 (36,4)	1 (20)	3 (75)	2 (33,3)		
III-IV	14 (63,6)	4 (80)	1 (25)	4 (66,7)		

CO: Cáncer de ovario.

P1: Grupo *BRCA1* versus grupo *BRCA2*; *P2*: grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*.

*Algunos datos no están disponibles por falta de información en la fuente consultada.

†Los 2 casos de *BRCA1* fueron un cáncer de ovario transicional y uno de origen mulleriano, mientras que en *BRCAX* hubo un caso de carcinoma de células claras.

‡Debido a los pocos casos, se agruparon los estadios de la siguiente manera: estadios I (Ia, Ib y Ic) y II (IIa, IIb y IIc) como I-II; y III (IIIa, IIIb y IIIc) y IV como III-IV.

5.3 Tipo de cáncer de los antecedentes familiares de los casos índice

Se han analizado los diferentes tipos de cánceres (distintos al CM) de los familiares de primer y segundo grado con respecto al caso índice estudiado en los grupos *BRCA+* y *BRCAX*. Se ha podido observar una mayor frecuencia de casos de cáncer de ovario en los casos *BRCA+* (37,3% frente a un 13,1%) y, de manera menos acusada, en cáncer gástrico y de páncreas (10,4% de casos *BRCA+* frente a 6,6% casos *BRCAX* en cáncer gástrico y 7,5% de casos *BRCA+* frente 2,2% casos *BRCAX* en el cáncer de páncreas) (**tabla 44**).

Tabla 44. Frecuencias de tipos de cánceres distintos al cáncer de mama observados en las familias de los casos índice pertenecientes, según el grupo de los casos *BRCA1/BRCA2* positivos y *BRCAX*.

Otros tipos de cáncer familiares	Casos índice con historia familiar n = 296 N (%)	Nº de casos índice <i>BRCA</i> + n = 67 N (%)	Nº de casos índice <i>BRCAX</i> n = 229 N (%)
Cáncer de ovario	55 (18,6)	25 (37,3) <i>BRCA1</i> : 18 <i>BRCA2</i> : 7	30 (13,1)
Cáncer de próstata	31 (10,5)	7 (10,4) <i>BRCA1</i> : 4 <i>BRCA2</i> : 3	24 (10,5)
Cáncer de páncreas	10 (3,4)	5 (7,5) <i>BRCA1</i> : 2 <i>BRCA2</i> : 3	5 (2,2)
Cáncer gástrico	22 (7,4)	7 (10,4) <i>BRCA1</i> : 5 <i>BRCA2</i> : 2	15 (6,6)
Cáncer de pulmón	28 (9,5)	6 (9) <i>BRCA1</i> : 2 <i>BRCA2</i> : 4	22 (9,6)
Cáncer colorrectal	32 (10,8)	5 (7,5) <i>BRCA1</i> : 3 <i>BRCA2</i> : 2	27 (11,8)
Cáncer hepático	6 (2)	1 (1,5) <i>BRCA1</i> : 1 <i>BRCA2</i> : 0	5 (2,2)
Cáncer de cabeza y cuello	17 (5,7)	3 (4,5) <i>BRCA1</i> : 1 <i>BRCA2</i> : 2	14 (6,1)
Cáncer cerebral	10 (3,4)	2 (3) <i>BRCA1</i> : 1 <i>BRCA2</i> : 1	8 (3,5)
Otros	43 (14,5)	10 (14,9) <i>BRCA1</i> : 5 <i>BRCA2</i> : 5	33 (14,4)



Discusión

1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Entre un 5-10% de los casos de cáncer de mama se consideran de tipo hereditario y atribuibles a mutaciones heredadas en varios genes de susceptibilidad. Los dos principales genes conocidos de susceptibilidad y de alta penetrancia en el Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (CMOH) son el *BRCA1* y el *BRCA2*, aunque sólo explican alrededor de un 20-25% de este tipo de cánceres [83;114;115].

Nuestra tasa de detección de una variante patogénica de *BRCA* fue de un 17,7% (70/296). Sin embargo, esta tasa menor en comparación con otros estudios poblacionales, podría explicarse por los 71 pacientes (17,9%) que no cumplían las recomendaciones de alto o moderado riesgo según la SEOM. El largo período en el que se empezó el estudio (prácticamente 7 años), y que ha implicado cambios en los criterios clínicos de selección, o bien, los criterios estrictos de clasificación empleados en nuestro estudio (donde pueden haber intervenido otros factores no controlados), quizá hayan influido en este hallazgo. Además, hemos de añadir la limitación que ha supuesto no poder clasificar 19 casos (4,8%) por tener una información incompleta de los casos índice o de sus familiares.

Sin embargo, si consideramos las tasas de *BRCA*+ seleccionando los pacientes en función de las recomendaciones, sí que puede observarse resultados más acordes con lo que existe en la bibliografía. Si hubiésemos seleccionado tan sólo pacientes con un alto riesgo, nuestro rendimiento del test diagnóstico se situaría en un 23,8%, aunque de esta manera 7 casos positivos no habrían sido detectados (**fig. 97**).

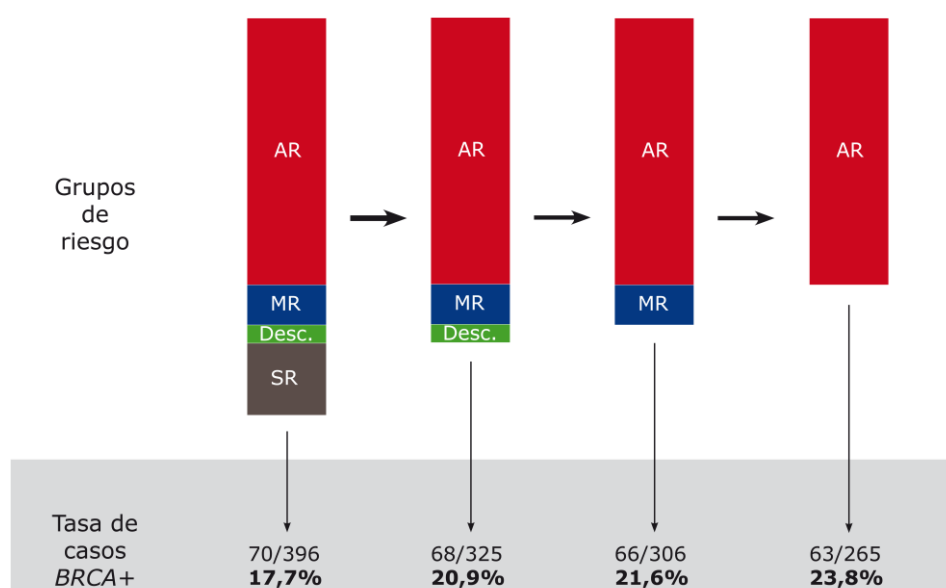


Figura 97. Tasas de casos *BRCA*+ de nuestro estudio según los criterios clínicos de la SEOM. AR: Alto riesgo; MR: Moderado riesgo; Desc. Riesgo desconocido; SR: Sin riesgo.

La **figura 97** nos muestra que 2 casos *BRCA+*, a pesar de haber sido sometidos al test, no cumplían las recomendaciones clínicas. Estos dos casos (F309 y F322) se trataron del caso de CM en varón con tres familiares de primer grado con cáncer de páncreas y un segundo caso con un diagnóstico de cáncer de ovario a una edad joven (42 años). Digamos que dos casos con criterios clínicos de sospecha de cáncer hereditario, pero que no cumplían estrictamente las recomendaciones de la SEOM.

Dentro de los casos índice estudiados, la media de edad de diagnóstico del cáncer de mama ha sido cercana a los 40 años ($43,32 \pm 10,87$ años), donde uno de los criterios clínicos de selección de pacientes se trata precisamente de esa edad precoz de diagnóstico. En cambio, no se encuentran criterios de edad de diagnóstico para el cáncer de ovario en las recomendaciones (media de edad en nuestro estudio de $49,42 \pm 14,58$ años).

2 ESPECTRO MUTACIONAL DE NUESTRA POBLACIÓN

El uso apropiado de las pruebas genéticas en la práctica clínica diaria requiere información clara por parte de los laboratorios, para una buena interpretación por los médicos y una comunicación clara de las consecuencias para los pacientes. Sin embargo, el desarrollo actual de las tecnologías de secuenciación en laboratorios de diagnóstico genético está dando lugar a la detección de un mayor número de variantes. Por lo que, un sistema de clasificación de éstas asociado a una serie de recomendaciones, podría ayudar a facilitar este objetivo.

En la **tabla 45** hemos enfocado la prevalencia de este tipo de variantes en los casos índice estudiados y las pruebas clínicas y recomendaciones de vigilancia sugeridas por el trabajo de Plon y col. en función del nivel IARC [351]. Hemos de recordar que en nuestra clasificación no hemos seguido completamente la clasificación IARC, puesto que muchas variantes no lo tienen asignado, sino que hemos aplicado una serie de criterios bibliográficos, de probabilidad y de frecuencia alélica (**fig. 32**, pág. 114 del capítulo de *material y métodos*).

En los 396 casos índice incluidos en nuestro estudio, hemos detectado 162 variantes distintas: 39 variantes patogénicas (24,07%), 44 UVs (27,16%) y 79 entre las variantes probablemente no patogénicas y las variantes no patogénicas (48,07%).

El 9,8% de los casos índice han tenido una variante patogénica en *BRCA1*, mientras que en *BRCA2* la prevalencia ha sido del 7,8% (**tabla 45**). Estudios similares en población española muestran resultados dispares: desde una prevalencia en *BRCA1* y *BRCA2* de 4,5% y 8,08%, respectivamente, en Castilla y León [480] hasta proporciones del orden de un 15,2% y un 7,8% en *BRCA1* y *BRCA2*, respectivamente, en Asturias [442]. Sin embargo, un estudio reciente en la Comunidad Valenciana con un alto número de pacientes (n=1763) [445], ha mostrado resultados similares a los nuestros: 8,79% de prevalencia en ambos genes. No obstante, aunque la contribución de las mutaciones *BRCA1* y *BRCA2* en el riesgo de cáncer es claramente diferente en distintas poblaciones, la verdadera magnitud de estas diferencias es difícil de medir debido a la amplia variedad de criterios de inclusión de pacientes y los distintos métodos de determinación de variantes utilizados en los diferentes estudios. Quizá en un futuro más próximo, las comparaciones podrán ser más exactas con la nueva irrupción de las metodologías de secuenciación masiva en los diversos centros y con una mejora integral en el reclutamiento de pacientes para el estudio genético.

Por otra parte, se ha encontrado en un 11,49% de los casos índice al menos una variante de significado clínico desconocido (UV) (**tabla 45**). Esta prevalencia sería algo menor de la observada en población europea (de un 15% según Plon y col. [355]) y significativamente menor que en la población afroamericana e hispanica (mayor de un 20% [339;519]), aunque mayor de la población estadounidense (6-7% [512;520]).

Y por lo que se refiere a las variantes no patogénicas, se han detectado en todos los casos índices de nuestro estudio (**tabla 45**). Lo cual significa, que en todos los pacientes analizados se ha encontrado algún tipo de variante polimórfica en *BRCA1* y/o en *BRCA2*.

Tabla 45. Prevalencia de las variantes según su efecto fisiopatológico de nuestro estudio junto con las recomendaciones de vigilancia sugeridas por el trabajo de Plon y col. [4] en función del nivel IARC.

Clase de variante	Prevalencia	Porcentaje	Pruebas clínicas	Recomendaciones de vigilancia
Definitivamente patogénica	70/396	17,07%	Pruebas de riesgo en familiares para la variante	Vigilancia completa de alto riesgo
	<i>BRCA1</i> : 39/296	9,8%		
	<i>BRCA2</i> : 31/296	7,8%		
Probablemente patogénica	0/396	0%	Pruebas de riesgo en familiares para la variante	Vigilancia completa de alto riesgo
Incierta	44/396	11,49%	No utilizar como pruebas de predicción en los familiares en riesgo	Asesoramiento en base a los antecedentes familiares y a otros factores de riesgo
Probablemente no patogénica	11/396	2,78%	No utilizar como pruebas de predicción en los familiares en riesgo	Asesoramiento como mutación no detectada
No patogénica	396/396	100%	No utilizar como pruebas de predicción en los familiares en riesgo	Asesoramiento como mutación no detectada

2.1 Mutaciones puntuales en *BRCA1* y en *BRCA2*

2.1.1 Variantes patogénicas

Hemos realizado un estudio detallado de todas las variantes patogénicas detectadas en *BRCA1* y en *BRCA2*. De todas ellas, la mayoría han sido provocadas por un cambio de pauta de lectura, mientras que sólo se ha detectado una variante *missense* en *BRCA1* (c.181T>G) (**tabla 46**). Según la base de datos *BIC* (consulta realizada el 8 de mayo de 2014), tan sólo 20 variantes de las 905 variantes con efecto clínico importante son del tipo *missense*, lo cual demuestra lo poco común de este tipo de cambios dentro de las variantes patogénicas. Estas 20 variantes afectan a sólo 13 codones distintos, lo cuales se encuentran principalmente en las regiones que codifican el dominio *RING* y dominios *BRCT* de *BRCA1*, involucrados funcionalmente en importantes interacciones proteína-proteína. De hecho, con el cambio c.181T>G (p.Cys61Gly) ya hemos comentado que se produce en residuos de cisteína altamente conservados del dominio *RING finger*, pudiendo desestabilizar la unión con *BARD1*.

Por otra parte, de las ocho variantes patogénicas encontradas que afectan en el *splicing* (**tabla 45**), cuatro se localizaban en la región exónica del gen (c.211A>G y c.5123C>A en *BRCA1*; c.7007G>A y c.9117G>A en *BRCA2*).

Tabla 46. Tipos de variantes patogénicas detectadas en *BRCA1* y *BRCA2*.

Tipo de variante patogénica	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	Total (%)
Cambio de pauta de lectura	11	11	22 (59,46)
deleciones	9	8	
inserciones	2	3	
Nonsense	3	3	6 (16,23)
Missense	1	0	1 (2,70)
Splicing	5	3	8 (21,62)
Total	20	17	37 (100)

2.1.1.1 Variantes patogénicas recurrentes

En lo relativo a las variantes patogénicas recurrentes, hemos podido observar que los cambios c.68_69delAG, c.212+1G>A y c.5123C>A han correspondido al 43,59% de la población portadora de alguna variante *BRCA1*, mientras que los cambios c.3455T>G y c.9117G>A se han encontrado en el 25,8% de población portadora de alguna mutación puntual patogénica en *BRCA2* (**tabla 47**).

Tabla 47. Variantes patogénicas recurrentes de los genes *BRCA1* y *BRCA2* de nuestro estudio.

<i>BRCA1</i>		<i>BRCA2</i>	
Cambio	N (% <i>BRCA1</i> +)	Cambio	N (% <i>BRCA2</i> +)
c.68_69delAG	6 (15,38)	c.9117G>A	5 (16,13)
c.5123C>A	6 (15,38)	c.3455T>G	3 (9,68)
c.212+1G>A	5 (12,82)	c.262_263delC	2 (6,45)
c.70_73dup	2 (5,13)	c.9026_9030del ATCAT	2 (6,45)
c.211A>G	2 (5,13)		
c.1918C>T	2 (5,13)		
c.3583delC	2 (5,13)		

De todas estas variantes con mayor recurrencia en nuestro estudio, c.68_69delAG (*BRCA1*) se trata de la única variante reconocida como fundadora, concretamente dentro de la población Ashkenazi [317]; mientras que la variante recurrente c.5123C>A, según un estudio de haplotipo, la ha considerado como probable mutación fundadora sefardí [423]. Por otro lado, el cambio c.9117G>A (*BRCA2*) está ampliamente distribuido a nivel mundial según la base de datos *BIC*, por lo que resulta lógico pensar que se trata de una variante en un punto caliente de mutación (*hot spot*).

La variante c.68_69delAG (*BRCA1*), según lo descrito hasta ahora, se trata de una variante recurrente en la región mediterránea y la variante c.5123C>A (*BRCA1*) se encuentra descrita con alta recurrencia en Castilla y León y Aragón (**figura 98**). No hay constancia que las variantes c.212+1G>A (*BRCA1*) y c.9117G>A (*BRCA2*) se hayan descrito con tanta frecuencia como la encontrada en la Región de Murcia (12,82% en la población *BRCA1*+ y 16,13% en la población *BRCA2*+, respectivamente) (**tabla 47** y **figura 98**).

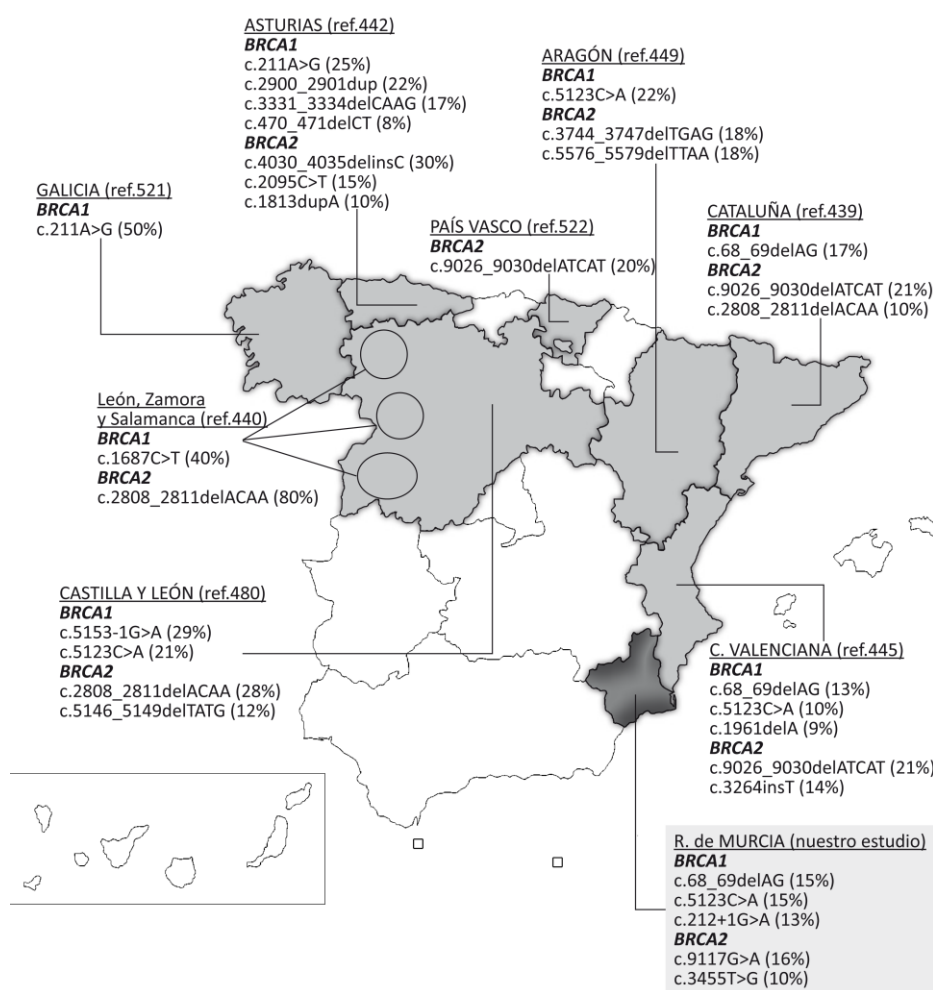


Figura 98. Mapa de España en el cual se indica el área poblacional de estudio y las variantes patogénicas recurrentes más importantes de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Se indican porcentajes superiores a un 8% de la población portadora *BRCA1* y de la población portadora de *BRCA2*.

2.1.1.2 Variantes patogénicas de nueva descripción

Se han detectado cuatro variantes patogénicas de nueva descripción en *BRCA1* (20% de las variantes puntuales patogénicas en *BRCA1*) y dos variantes patogénicas de nueva descripción en *BRCA2* (11,76% de las variantes puntuales patogénicas puntuales en *BRCA2*).

De las cuatro variantes patogénicas en *BRCA1*, dos cambios fueron del tipo *frameshift*: c.1859delT y c.2285_2286delGA; y dos cambios *nonsense*: c.1918C>T y c.3280A>T. Mientras que de las dos variantes en *BRCA2*, una se trató de un cambio *frameshift* y la otra de un cambio que afectaba al *splicing*.

La variante c.1918C>T se detectó, además, en dos familias no relacionadas. Procedimos a realizar estudios de haplotipo con marcadores microsatélites en el gen *BRCA1* en los que se demostró que la mutación tenía un ancestro común [452]. Se trataría, por tanto, de la primera variante patogénica fundadora descrita en nuestra Región.

Por otro lado, la variante c.7977-1G>A (*BRCA2*) ha sido la excepción de las variantes no descritas que provocan una proteína truncada como consecuencia de un codón de parada. En esta variante se demostró, por análisis por RT-PCR en un laboratorio externo, que se produce un *skipping* del exón 18. En este exón 18, se truncarían dominios como el dominio helicoidal y el primer pliegue oligonucleótido de unión (*OB1*), regiones donde se une ssDNA y la proteína *DSS1* (responsable de la estabilización de la proteína *BRCA2*).

2.1.1.3 Estudios genotipo-fenotipo de las variantes patogénicas de *BRCA1* y *BRCA2*

Para cada variante patogénica hemos realizado un estudio de todos los portadores, el porcentaje de ellos que estaban afectados y de qué tipo de cáncer. Sin embargo, algunos estudios muestran la limitación del poco número de casos que se han presentado. Por tanto, no sería valorable este tipo de análisis para un conveniente estudio de penetrancia (riesgo acumulado de desarrollar cáncer a lo largo de la vida) observado en nuestro grupo de casos índice y familiares portadores.

Un análisis más viable sería un cálculo de la prevalencia del CM en función de la edad de su diagnóstico entre los portadores *BRCA1* y *BRCA2*. Si estudiamos los casos índice y familiares portadores de una mutación *BRCA1* y portadores *BRCA2*, y a pesar

de no ser significativa la diferencia de edad de diagnóstico de CM entre las portadoras de cada gen, el estudio de prevalencia de CM nos indica que en el caso de los portadores de *BRCA1*, existe una proporción mayor de casos de CM diagnosticados a una edad de ≤ 30 y ≤ 40 años (tabla 48 y figura 99).

Por lo que se refiere al cáncer de ovario, debido al menor número de casos, se ha analizado la prevalencia de este tipo de cáncer sin tener en cuenta la edad de los portadores y a cualquier edad de diagnóstico: 18,3% (13/71 casos) para *BRCA1* y 10% (5/50 casos) para *BRCA2*. La edad mediana de diagnóstico fue de 58 (42-75) años para los casos con cáncer de ovario en *BRCA1* y de 51 (19-82) años para los casos en *BRCA2*.

Tabla 48. Prevalencia del CM en función de la edad de diagnóstico en los casos índice y familiares portadores de variante patogénica en *BRCA1* y *BRCA2*.

Edad diagnóstico (años)	Casos CM (n)	No afectados a esa edad* (n)	Prevalencia (%)
BRCA1			
≤ 30	7	59	10,61
≤ 40	26	32	44,83
≤ 50	34	17	66,67
BRCA2			
≤ 30	3	43	6,5
≤ 40	12	30	28,57
≤ 50	23	12	65,7

*se consideraron no afectados a pacientes no afectados mayores de la edad de corte (30, 40 ó 50, según el grupo estudiado) y pacientes que tuvieron un cm a una edad mayor a dicha edad de corte.

Se excluyeron los casos en que se desconocía la edad de la paciente y los casos de cm en varón. la edad media de diagnóstico para los portadores de *brca1* fue de $41,33 \pm 10,51$ años y para los portadores *brca2* de $44,52 \pm 11,83$ años ($p=0,273$).

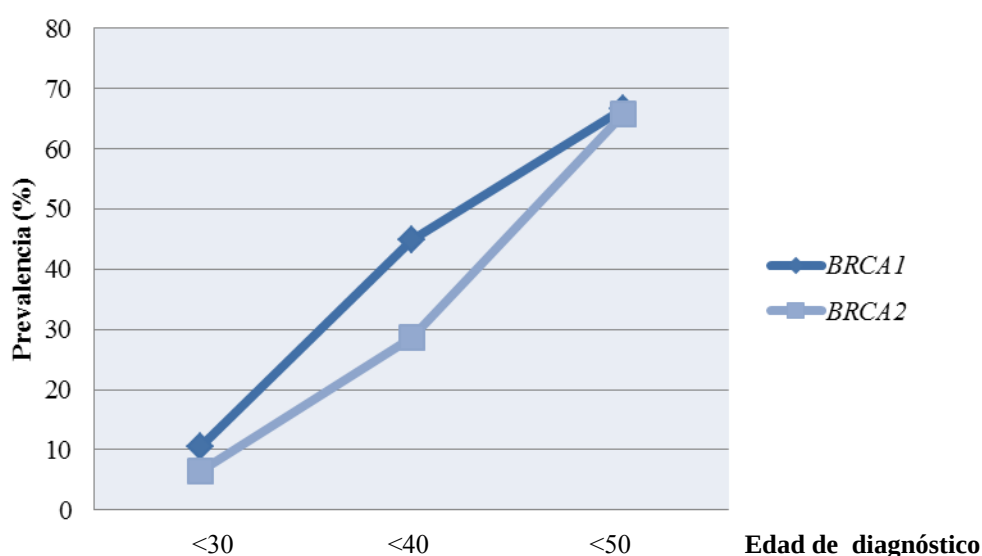


Figura 99. Prevalencia del cáncer de mama de casos índice y familiares portadores de variante patogénica en *BRCA1* y en *BRCA2* a la edad de ≤ 30 años, ≤ 40 años y ≤ 50 años.

Como ya hemos comentado, estos análisis no se tratarían de estudios de penetrancia en sentido estricto, sino de prevalencia. La consideración de no realizar una estimación de penetrancia fue debido en parte al menor número de casos en comparación con otros estudios multicéntricos, a la complejidad metodológica en su cálculo (actualmente se está aceptando el método de *máxima verosimilitud por análisis de segregación* para la estimación del riesgo acumulado de cáncer en diferentes grupos de edades) y/o a la necesidad de un seguimiento de la supervivencia de los pacientes durante un período de tiempo más largo. No obstante, podríamos considerar como aproximación los cálculos de prevalencia de CM en función de la edad de diagnóstico antes indicados.

Las primeras estimaciones de penetrancia en portadoras de mutación germinal en *BRCA1* y *BRCA2* sugerían un riesgo de desarrollar cáncer muy elevado (superior al 80% según Easton y col. en 1995 [114]). Aunque pronto se hizo evidente que se estaba sobreestimando el riesgo, ya que el estudio se dirigía a aquellas familias que presentaban una carga de cáncer de mama y ovario muy elevada y ese sesgo en la selección de familias era la causa de la sobrestimación del riesgo. Más recientemente, se han realizado estudios en pacientes no seleccionados con CM que acuden al consejo genético [90;311;313;523;524], incluyendo uno español [311], cuyas estimaciones han sido entre el 40% al 60%. En el caso de riesgo de cáncer de ovario se observan diferencias claras entre ambos genes (en *BRCA1* el riesgo se sitúa en torno al 35%-40% y se reduce a la mitad en el caso de *BRCA2*).

Sin embargo, conviene destacar que las diferencias en las estimaciones de penetrancia entre estudios, más allá de los problemas metodológicos, responden en parte a una realidad biológica. Incluso, en nuestro estudio se ha observado variabilidad dentro de mujeres de una misma familia portadoras de la misma mutación en *BRCA1/2*, lo cual sugiere que no hay un riesgo exacto aplicable a todos los individuos portadores de mutación, y que este riesgo puede estar influenciado por heterogeneidad alélica, genes modificadores y cofactores ambientales y hormonales [314;525].

Por otro lado, se han descrito correlaciones genotipo-fenotipo en *BRCA1* y *BRCA2* en función de la localización de la variante patogénica en el gen [475;526-528]. Existe una correlación genotipo-fenotipo más clara para las variantes *BRCA2*, donde en la parte central del gen (nucelótidos 3035-6629, en el exón 11) se la ha denominado

región del grupo de cáncer de ovario (*ovarian cancer cluster region* ó OCCR), ya que hay un aumento de la relación cáncer de ovario *versus* CM [475]. Un estudio posterior [527], definió dos regiones más concretas OCCR: OCCR1 (nucleótidos 2831-3847) y OCCR2 (nucleótidos 6275-6401). Estudios similares acerca de las variantes patogénicas en *BRCA1* son menos concluyentes, pero sugieren que las variantes en la parte central del gen (nucleótidos 2401-4190) se asocian con un riesgo menor de cáncer de mama [528], y que el riesgo de CM va aumentando desde las regiones 5'' hasta las regiones 3'' del gen [474;529].

Si representamos los fenotipos de los portadores afectados de nuestro estudio en función de la localización de la variante patogénica en el gen (**figuras 100 y 101**), hemos podido observar una proporción importante de casos de cáncer de ovario y de cáncer de mama y ovario, además de una proporción menor de casos de CM, en la región central del gen *BRCA1* propuesta por Thompson y col. [528] (**figura 100**). De los dos únicos casos de cáncer de ovario en *BRCA2*, uno de ellos se encontraba en OCCR2 (**figura 101**).

No obstante, además del número de casos menor si lo comparamos con estos estudios, quizá una limitación añadida sería las mutaciones recurrentes detectadas en nuestra población, lo cual podría desvirtuar las proporciones de casos observadas en ambos genes.

Finalmente, sería conveniente destacar los estudios genotipo-fenotipo de las mutaciones puntuales patogénicas recurrentes con más portadores detectados (**tabla 49**).

Se ha podido observar que las portadoras de c.5123C>A (*BRCA1*) y c.212+1G>A (*BRCA1*) tienen una edad menor de diagnóstico de CM (edad mediana de 40 años), mientras que la edad menor de diagnóstico de cáncer de ovario (47 años) se observó en portadoras de la variante c.9117G>A (*BRCA2*). La mayor proporción de número de casos de cáncer de ovario se detectó en la variante c.212+1G>A (*BRCA1*) (**tabla 48**).

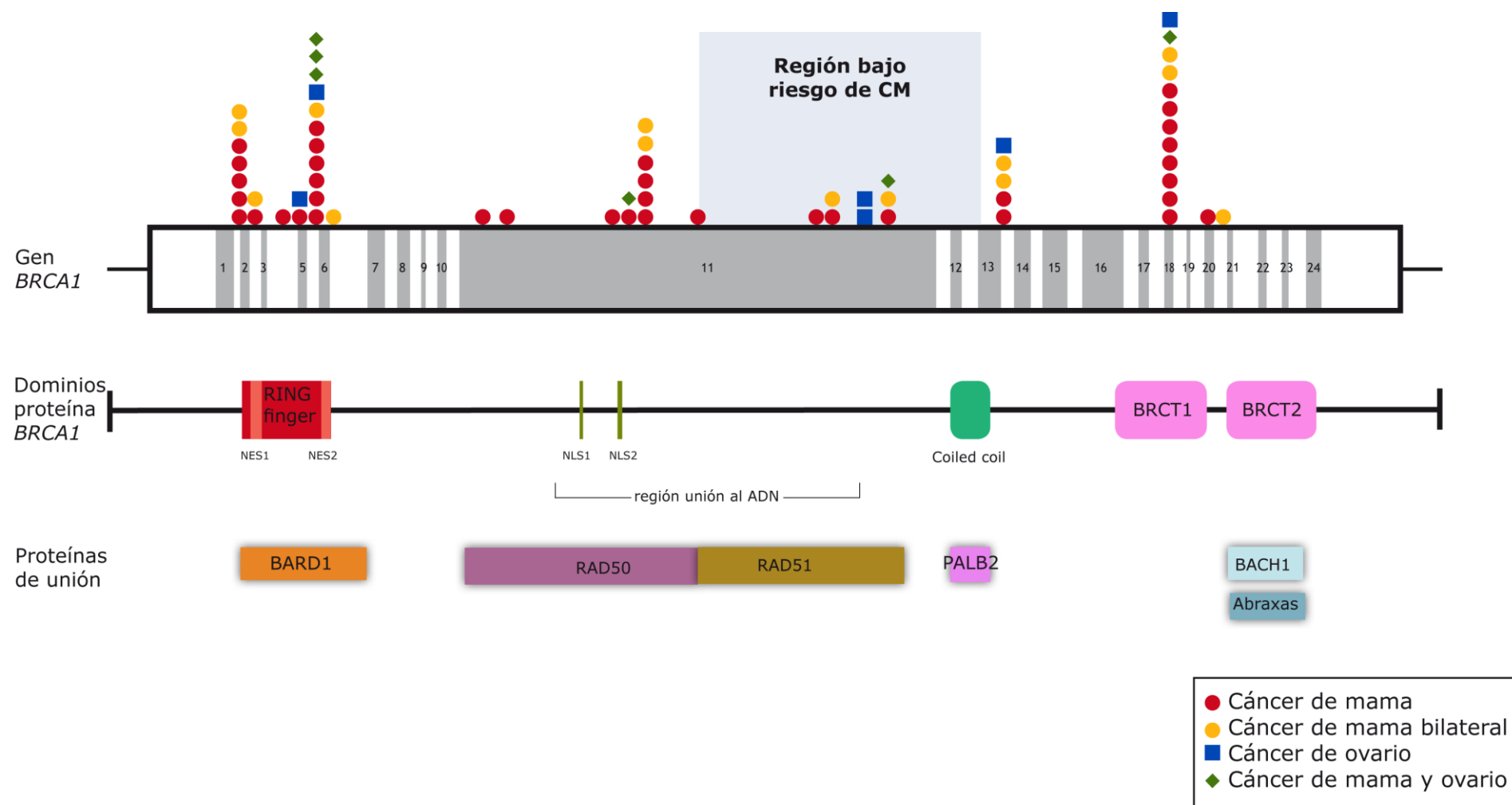


Figura 100. Tipos de cáncer de los casos índice y familiares portadores de variante patogénica en *BRCA1* según la localización en el gen. La región de bajo riesgo de cáncer de mama corresponde a la región central del gen (nucleótidos 2401-4190) descrita por Thompson y col. [528].

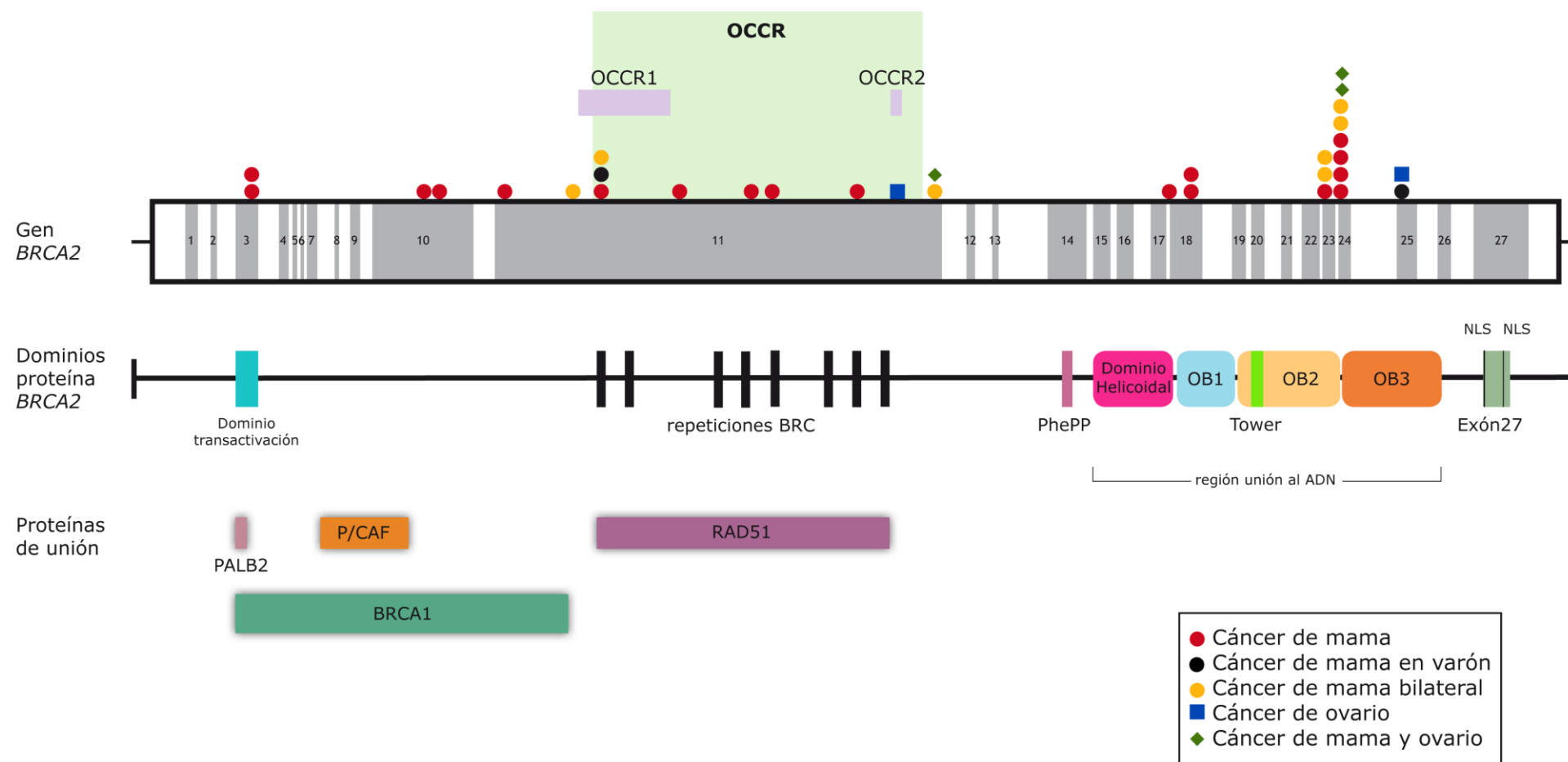


Figura 101. Tipos de cáncer de los casos índice y familiares portadores de variante patogénica en *BRCA2* según la localización en el gen. OCCR corresponde a la región de mayor probabilidad de cáncer de ovario descrita por Lubinski y col. [475], OCCR1 y OCCR2 son dos regiones de alta probabilidad de cáncer de ovario descritas por Thompson y col. [527].

Tabla 49. Variantes patogénicas puntuales en *BRCA1* y *BRCA2* con mayor número de casos portadores detectados.

	Variante	Casos afectados/ portadores (%)	Casos CM (bCM)	Edad diagnóstico (rango)	Casos CO (CMO)	Edad diagnóstico (rango)
BRCA1	c.68_69delAG	7/17 (47,2)	7 (2)	41 (23-61)	0 (0)	-
	c.1918C>T	4/9 (44,4)	4 (2)	48,5 (27-53)	0 (0)	-
	c.5123C>A	12/20 (60)	10 (2)	40 (34-58)	2 (1)	53,5 (47-60)
	c.212+1G>A	11/21 (52,4)	7 (1)	40 (33-64)	4 (3)	61 (62-73)
BRCA2	c.9117G>A	6/7 (85,7)	6 (2)	48,5 (35-57)	2 (2)	47 (46-48)

CM: Cáncer de mama; bCM: Cáncer de mama bilateral; CO: Cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario.

2.1.2 Variantes de significado clínico desconocido (UVs)

La interpretación de las UVs con respecto a la predicción de su efecto en la proteína, y por tanto, sobre el riesgo de cáncer estimado en las familias, se ha convertido en un reto importante a la hora de adaptar las estrategias de asesoramiento genético y la prevención de enfermedades.

Una variedad de métodos han sido desarrollados para determinar si una variante dada es probablemente patógena o de poco significado clínico [350;426;530], y entre ellas se encuentran las herramientas *in silico*. Estas herramientas pueden predecir las consecuencias de los cambios de una manera indirecta sobre la base evolutiva y conservación de los aminoácidos, el posible efecto de las sustituciones de aminoácidos en la estructura de proteínas o el efecto predictor en el empalme del ARNm.

Sin embargo, la clasificación generada a partir de las herramientas *in silico* no debe ser considerada definitiva y como muchas aproximaciones analíticas, debe de considerarse una investigación más amplia. De hecho, una serie de estudios llevados a cabo para validar y comparar el valor predictivo de una serie de herramientas *in silico* han puesto de relieve el hecho de que no hay ninguna herramienta que pueda ser considerada superior ni que logre una total exactitud [344]. Además, se ha visto que la sensibilidad y la especificidad de todas ellas varía según la posición en el gen [530].

Hemos de destacar la gran cantidad de variantes UVs detectadas en nuestro estudio en *BRCA1* y en *BRCA2* que eran de nueva descripción (17 variantes nuevas de

las 44: 38,64%), por lo que no hemos podido indagar en cuanto a características de su posible patogenicidad en otros estudios. Y, por otra parte, ninguna variante de las que hemos clasificado como UV se le había clasificado como nivel 3 IARC (ver criterios en **fig. 32**, página 114 del capítulo de *material y métodos*). Todo ello indica el gran número de variantes no descritas o que no se le han podido aplicar cálculos multifactoriales para aproximarse de una manera más certera en su grado de implicación en la susceptibilidad al CMOH, lo cual complica su *traducción clínica* a los médicos y una comunicación clara a los pacientes.

A pesar de ello, hemos intentado aplicar una serie de herramientas *in silico* que abarcaran parámetros como las propiedades biofísicas de los aminoácidos sustituidos (*Grantham*), análisis de conservación (*Align-GVGD* y *SIFT*), clasificadores Naïve Bayes (*Polyphen-2* y *MutationTaster*), redes neuronales artificiales (*pMut*) o el efecto en el *splicing* (*SSF*, *MES* y *NNSPLICE*).

En la **tabla 50** se ha resumido las variantes *missense* de mayor probabilidad patógena según el resultado global de las herramientas *in silico*. De todas ellas, deberíamos destacar la variante c.7559G>T (*BRCA2*), donde el cambio se produce en una posición altamente conservada (C65 en *Align-GVGD*). Valores a partir de C35 en *Align-GVGD*, lo han considerado muchos estudios como una alta probabilidad *a priori* de patogenicidad [354;512]. Además, esta variante se encuentra localizada en el dominio helicoidal de *BRCA2*, relacionado con la estabilización de la proteína [148;206-208].

Por el contrario, a pesar que tres herramientas *in silico* han pronosticado como variante probable patogénica a c.10103C>T, debemos recordar que se encuentra en la parte final del último exón de *BRCA2* (exón 27) y sin ningún dominio conocido que pueda afectar a la funcionalidad proteica. Motivo por el cual, deberíamos decantarnos más hacia una variante probablemente no patogénica.

En la **tabla 51** se hallan las variantes en las que dos o más estudios *in silico* de *splicing* las han pronosticado como probable efecto en el ensamblaje del ARNm. Las variantes que dan lugar a alteraciones en el *splicing* son una clase particular de variantes, puesto que las consecuencias funcionales y clínicas se pueden evaluar más fácilmente. Ya que además del uso de los programas *in silico*, dada la disponibilidad de material biológico adecuado a partir de un portador de la variante, las predicciones

pueden ser relativamente asequibles *in vitro* mediante el análisis de ARNm en tejido normal. Además, si hay pruebas convincentes de que las transcripciones de estas variantes llevan a un codón de parada prematuro, o una delección que altere el marco de lectura, dicha variante debe ser considerada patógena sin necesidad de datos adicionales para un análisis de probabilidad multifactorial.

Recientemente, muchos estudios están analizando este tipo de variantes. Entre ellos, el estudio con mayor número de variantes *splicing* hasta la fecha [502], ha realizado un análisis *in silico* y de transcripción de este tipo de variantes, aportando un resultado final de distintos niveles: 1S (variante *splicing* probablemente no patógena), 2S (existe un *splicing* alternativo o el efecto es parcial) y 3S (efecto en el *splicing* considerado patógeno). Hemos indicado estos niveles en algunas variantes *splicing* de nuestro estudio (**tabla 51**).

De tal manera, los mismos autores de este estudio [502], lo sugieren como base para una clasificación más completa de cinco niveles (IARC), integrando otras fuentes de datos disponibles mediante el uso de análisis de probabilidad multifactoriales. Recientemente, un proyecto inicial de los miembros de *ENIGMA Consortium* enfocado a las variantes *splicing* (*ENIGMA Splicing Working Group*), ha publicado un trabajo en las que se evalúa 25 variantes y, de las cuales, 18 han sido clasificadas según niveles IARC [513]. No obstante, ninguna de estas variantes que se hayan clasificado como nivel IARC = 3, han sido detectadas en nuestro estudio.

Por tanto, tras este último análisis, podemos afirmar que serán necesarios posteriores estudios de probabilidad multifactoriales (para poder determinar su posible patogenicidad) para las variantes c.68-7T>A (*BRCA2*), c.7008-14delT (*BRCA2*) y c.9501+3A>T (*BRCA2*). Además, a la variante c.7008-14delT no se le han realizado hasta la fecha estudios *in vitro*, puesto que se trata de una variante de nueva descripción (**tabla 51**).

Tabla 50. Variantes *missense* en los genes *BRCA1* y *BRCA2* con mayor probabilidad patógena según el resultado global de las herramientas *in silico*.

	Variante UV	Estudios <i>in silico</i> con predicción patógena	Localización en dominio funcional	Tipo cambio de aminoácido	Tipo de Familia
BRCA1	c.946A>G	<i>SIFT</i> <i>Pmut</i> <i>Polyphen-2</i> <i>MutationTaster</i>	No	De aa. sin carga y polar (Ser) a aa. sin carga e hidrofóbico (Gly)	2CM
	c.3032C>G	<i>Grantham</i> <i>SIFT</i> <i>Pmut</i> <i>Polyphen-2</i> <i>MutationTaster</i>	Repetición <i>BRC1</i>	De aa. sin carga y polar (Thr) a aa. de carga positiva (Arg)	bCM + CM
BRCA2	c.7559G>T	<i>Grantham</i> <i>Align-GVGD</i> <i>SIFT</i> <i>Pmut</i> <i>Polyphen-2</i> <i>MutationTaster</i>	Dominio helicoidal	De aa. con carga positiva y polar (Arg) a aa. sin carga e hidrofóbico (Leu)	CO
	c.9875C>T	<i>Grantham</i> <i>SIFT</i> <i>Pmut</i> <i>Polyphen-2</i> <i>MutationTaster</i>	Exón 27 (<i>TR2</i>)	De aminoácido sin carga e hidrofóbico (Pro) a otro aminoácido sin carga e hidrofóbico (Leu)	bCM+ CM
					bCM +CM+ CO
					bCMO +CM +2Cút
					2CM
	c.10103C>T	<i>Grantham</i> <i>SIFT</i> <i>Pmut</i>	No	De aa. polar y sin carga (Ser) a aa. sin carga e hidrofóbico (Leu)	bCM + CM

CM: Cáncer de mama; bCM: Cáncer de mama bilateral; CO: Cáncer de ovario; Cút: cáncer de útero.

Tabla 51. Variantes *splicing* en los genes *BRCA1* y *BRCA2* con mayor probabilidad patógena según el resultado global de las herramientas *in silico*.

	Variante UV	Estudios <i>in silico</i> con predicción patógena en el <i>splicing</i>	Estudios de expresión génica	Houdayer y col. (2012) [502]	Tipo de Familia
BRCA1	c.5334T>C	<i>MaxEnt</i> <i>NNSplice</i>	Estudiode transfección de minigenes y posterior RT-PCR: Sin alteración del ARNm [499]	1S	CM _{≤40}
	c.68-7T>A	<i>MutationTaster</i> <i>MaxEnt</i> <i>NNSplice</i>	Estudios con minigenes y en fibroblastos: <i>skipping</i> parcial del exón 3 [429;464]	2S	bCM
BRCA2	c.7008-14delT	<i>MutationTaster</i> <i>MaxEnt</i> <i>NNSplice</i>	No hay estudios	No descrita	CM _{≤40}
	c.9051+3A>T	<i>MutationTaster</i> <i>MaxEnt</i> <i>NNSplice</i>	Ensayos con minigenes: efectos parciales en el <i>splicing</i> , ya que induce el <i>skipping</i> del exón 25 en el 50% de los transcritos [506]	No descrita	2CO

CM: Cáncer de mama; bCM: Cáncer de mama bilateral; CM_{≤40}: Cáncer de mama diagnosticado a una edad de 40 años o menor; CO: Cáncer de ovario.

Finalmente, debemos concluir que aunque nuestro estudio no aborda directamente la cuestión de si cada UV específica se asocia con el riesgo de cáncer de mama, nuestros resultados sugieren que estos métodos podrían ser útiles en la comprensión de la importancia de una UV, especialmente cuando otra información clínica o genética no está disponible. Además, la aplicación de estos métodos puede ayudar a priorizar las UVs para su posterior estudio funcional o familiar.

2.1.3 Variantes probablemente no patogénicas y variantes no patogénicas

Se han detectado en un total de 11 pacientes (2,78% de la población de nuestro estudio) una variante probablemente no patogénica (tabla). Han sido 6 variantes distintas y, de las cuales, 3 han sido ya clasificadas con un nivel 2 de IARC: c.7435+6G>A (*BRCA2*), c.8723T>G (*BRCA2*) y c.8850G>T (*BRCA2*). Las variantes de clase IARC 2 (0,1-5% de probabilidad de patogenicidad) podrían cambiar a la clase

IARC 3 (UV) si se encuentran más datos que favorecen la patogenicidad. Sin embargo, es poco probable que puedan convertirse en clase 4 o 5. A partir de una probabilidad *a priori* de 0,05, los nuevos datos tendrían que tener una razón de probabilidad >1900:1 con el fin de convertir una variante de la clase 2 a clase 4 o 5 (probabilidad *a posteriori* $\geq 0,95$) [351]. Por tanto, dada la improbabilidad que una variante clase 2 se convierta en patógena, este tipo de variantes pueden considerarse de insignificante relevancia clínica, aunque deberían buscarse más datos para poderlas clasificar definitivamente como clase 1 o como clase 3.

A las tres variantes restantes no clasificadas con nivel IARC=2, se les consideró como probablemente no patogénicas según los criterios de probabilidad planteados (ver *material y métodos*). En este tipo de variantes (c.81-14C>T en *BRCA1*; c.17952A>G y c.8851G>A en *BRCA2*) existe una alta probabilidad que se consideren de un nivel IARC 1 ó 2; sin embargo, deberemos esperar a posteriores estudios con análisis multifactoriales para su correcta clasificación.

Por otro lado, en todos los pacientes de nuestro estudio hemos detectado una variante no patogénica en *BRCA1* y/o en *BRCA2* (ver **tabla 45**). De las 73 variantes no patogénicas distintas, 14 han sido clasificadas con un nivel IARC =1 y 59 variantes han sido polimorfismos (variantes detectadas con un $\geq 1\%$ de frecuencia alélica en nuestra población o en estudios de población española o europea). Los polimorfismos que han aparecido con una frecuencia muy alta en nuestro grupo de pacientes en estudio, podemos asumir que, por extensión, son variantes propias de nuestra población general.

Un total de 29 polimorfismos en *BRCA1* y *BRCA2* se encuentran en zonas intrónicas profundas. Lo cual explica que, aunque la mayoría estén en zonas alejadas de los sitios clásicos de procesamiento y sea difícil inferir sus consecuencias, la gran frecuencia encontrada en nuestra población nos ha ayudado a desestimar este tipo de variantes como patogénicas. Este es un tema controvertido, ya que en los intrones existe otra secuencia consenso: el punto de ramificación (*branchpoint*) en la zona central del intrón; además, también existen secuencias que promueven (*intronic splicing enhancers* o ISEs) o inhiben (*intronic splicing silencers* o ISSs) el proceso de maduración. A estas regiones se unen las proteínas encargadas de llevar a cabo el procesamiento del pre-ARNm. Sin embargo, en nuestro estudio, una proporción importante de la variantes intrónicas profundas se ha clasificado como polimorfismos.

Otro aspecto controvertido es la posible asociación de los polimorfismos con una mayor susceptibilidad al cáncer. Se ha demostrado que un gran número de SNPs puede influir en la expresión de proteínas o de la función de los genes, ya sea a través del cambio de aminoácidos y la modificación de la función proteica o a través de cambios epigenéticos indirectos [531]. En el cáncer de mama familiar, se ha demostrado que esta influencia es particular en los genes implicados en la reparación de las DSBs [532]. Aunque los resultados de estudios de variantes polimórficas en *BRCA1* y *BRCA2* como posibles factores de riesgo para el cáncer de mama han sido en gran medida no concluyentes [533-536]. Además, varios estudios han examinado polimorfismos *missense* en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en relación con el riesgo de cáncer de mama con evidencias contradictorias: c.1067A>G (p.Gln356Arg) en *BRCA1* [510;534;537] y c.1114A>C (p.Asn372His) en *BRCA2* [538-542].

2.2 Grandes reordenamientos génicos detectados en *BRCA1* y *BRCA2*

Una proporción menor de variantes patogénicas en los genes *BRCA1/2* son los grandes reordenamientos de segmentos de ADN que alteran la función de estos genes. Estos grandes reordenamientos consisten principalmente en deleciones y amplificaciones de uno o varios exones. En su mayoría son refractarios a la detección por secuenciación por electroforesis capilar, por lo que requiere métodos alternativos como la transferencia Southern, el MLPA, PCR cuantitativa o la hibridación genómica comparada [543]. Recientemente, se ha demostrado que tecnologías de secuenciación masiva (*Illumina*) tienen la capacidad para detectar grandes reordenamientos junto con las mutaciones puntuales, sin necesidad de otros métodos adicionales [544-546]. Sin embargo, la adaptación de estas plataformas de secuenciación masiva para optimizar la detección de estos grandes reordenamientos, todavía requiere de laboratorios y recursos informáticos muy especializados. Además, las normas y directrices sobre el análisis de este tipo de variantes utilizando plataformas de *next generation sequencing* todavía no se han establecido en el ámbito clínico [547]. El método MLPA [403] se ha convertido en los últimos años como el método más utilizado para buscar grandes reordenamientos en estos genes y, en comparación con otros métodos, la técnica no tiene un coste elevado, es sensible, y muy adecuada en el análisis de rutina. De hecho, la gran mayoría

de los grandes reordenamientos en *BRCA1* y *BRCA2* publicados hasta el momento se han detectado con esta metodología.

En nuestro estudio, mediante la técnica de MLPA, hemos detectado un total de 2 reordenamientos génicos en *BRCA2* en cinco familias (una delección del exón 2 en cuatro familias y una amplificación del exón 21 en una), mientras que en *BRCA1* no se detectó ningún reordenamiento. Estos resultados contrastan con la frecuencia de grandes reordenamientos entre las mutaciones patogénicas en *BRCA1* en otras cohortes como la población estadounidense (22%) [548], australiana (14,9%) [549], danesa (12,5%) [550], checa (12,3%) [551] o italiana (10,5%) [552]. En población española se ha encontrado una frecuencia algo menor (8,2%) [553]. No haber detectado ningún reordenamiento en *BRCA1* resulta incoherente con la abundancia de repeticiones *Alu* en *BRCA1* en comparación con *BRCA2*. Según lo descrito, crearían *hotspots* para una recombinación homóloga desigual que podrían conducir a grandes reordenamientos génicos en este gen [554]. En cambio, la prevalencia encontrada en *BRCA2*, ha supuesto el 1,53% del total de los casos analizados, estaría acorde con la prevalencia de grandes reordenamientos génicos en *BRCA2* encontrada en otros estudios de población española (5/335, 1,5%) [515], en Italia (3/121, 2,4%) [552] o en Australia (3/149, 2%) [549].

Uno de los grandes reordenamientos detectados ha sido la recurrente delección del exón 2. Curiosamente, ya hemos señalado en el capítulo de *resultados* que este mismo reordenamiento ha sido detectado en 4 familias no relacionadas en Cataluña [516], de las cuales una la compartimos en nuestro estudio. Por tanto, a pesar de no haber realizado estudios de haplotipo para corroborarlo, sí que podemos afirmar con alta probabilidad que todas estas familias comparten un ancestro común. Este posible efecto fundador, se trataría realmente del motivo que explique la alta prevalencia de reordenamientos génicos en *BRCA2* en comparación con *BRCA1*. Estos efectos fundadores son sumamente amplios en reordenamientos génicos en *BRCA1*, y han evidenciado la alta prevalencia en los grupos poblacionales más estrechamente definidos [547;555]. No obstante, tan sólo se ha descrito hasta la fecha otro gran reordenamiento de efecto fundador en *BRCA2*: la inserción de un elemento *Alu*, con al menos 32 familias portuguesas afectadas [556;557].

El otro reordenamiento detectado en *BRCA2* fue una amplificación del exón 21. Se ha comprobado que esta reestructuración es de nueva descripción. Junto con la

delección del exón 2, se han caracterizado hasta la fecha 19 grandes reordenamientos génicos en *BRCA2*, claramente menores si los comparamos con los 81 grandes reordenamientos caracterizados en *BRCA1* [558].

Los estudios genotipo-fenotipo de los pacientes afectados y portadores de la delección del exón 2 han resultado interesantes. Si analizáramos a nivel fenotípico los estudios que han descrito este reordenamiento [515;516], junto con lo encontrado en las cuatro familias de nuestro estudio, se ha podido observar una alta proporción de casos de cáncer de mama bilateral y cáncer de mama y ovario si lo comparamos con lo detectado en el resto de portadores de mutaciones puntuales patogénicas en *BRCA2* de nuestro estudio (**tabla 51**). Algunos autores han descrito que una proporción importante de pacientes con cáncer de mama masculino albergan grandes reordenamientos genéticos en *BRCA2* [549;550;559], lo que sugiere una fuerte asociación con este tipo de cáncer. No obstante, en el análisis de esta delección encontramos un solo caso de cáncer de mama en varón, con una proporción similar a lo encontrado en portadores de mutaciones puntuales en *BRCA2* (**tabla 52**). La mediana de edad de diagnóstico del CM en las mujeres portadoras de esta delección en nuestra población ha sido de 39 (27-71) años, lo cual resulta haber sido la menor de lo encontrado en todas las variantes patogénicas recurrentes de nuestro estudio (ver **tabla 49**). Todos estos datos nos permite concluir que este tipo de reordenamiento génico, además de recurrente en nuestra población, tiene una alta penetrancia con predominio de CM bilateral.

Tanto la delección del exón como la amplificación del exón 21 fueron confirmados por técnicas alternativas. Por un lado, la amplificación del exón 21 ya fue demostrada por un laboratorio externo (por RT-PCR). Pero, por otro lado, se nos presentó la necesidad de demostrar que la delección del exón 2 no se trataba de un falso positivo del método MLPA. Existen otras técnicas para demostrar este tipo de reordenamientos, como las transferencias Southern, las técnicas de RT-PCR o la propia MLPA con sondas alternativas dirigidas a los mismos exones. Todas ellas, en general, son más caras, más complejas de realizar y se requiere más tiempo para llevarlas a cabo si las comparamos con el método $2^{-\Delta\Delta C_p}$ a través de *qPCR*. Todas estas características conforman que esta técnica sea particularmente ideal para pruebas de confirmación en un entorno clínico como el nuestro.

Tabla 52. Comparación de los tipos de cáncer encontrados en los casos índice y familiares entre los afectados portadores de la delección del exón 2 (*BRCA2*) y el resto de mutaciones puntuales patogénicas en *BRCA2*.

Tipos de cáncer	Delección exón 2*	Resto de mutaciones puntuales patogénicas en <i>BRCA2</i> (nuestro estudio)
Cáncer de mama	4 (33,3%)	18 (56,3%)
Cáncer de mama bilateral	5 (41,7%)	7 (21,9%)
Cáncer de mama en varón	1 (8,3%)	2 (6,3%)
Cáncer de ovario	0 (0%)	2 (6,3%)
Cáncer de mama y ovario	2 (16,7%)	3 (9,4%)
Total casos	12 (100%)	32 (100%)

*Se han tenido en cuenta todos los casos índice y familiares afectados y portadores de la delección del exón 2 pertenecientes a las cuatro familias de nuestro estudio, a una familia del estudio de Gutiérrez-Enríquez y col. (2007) [70] y a tres familias del estudio de Ruiz de Garibay y col. (2012) [71].

3 ESTUDIOS DE CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

En los estudios de asociación entre las características fenotípicas y el resultado del estudio genético, lo hemos enfocado entre los casos índice (n= 310) que tenían un riesgo alto/moderado (es decir, *BRCA1/2+* y *BRCAX*). El grupo *BRCAX* podría explicarse por un modelo poligénico, o que puedan portar variantes patogénicas en otro gen o genes que confieren un aumento moderado del riesgo de CM [560-562].

No obstante, previamente, hemos clasificado también los grupos sin riesgo o de riesgo no conocido según el tipo de cáncer (total casos n=396). En estos grupos, sí que deberíamos destacar la prevalencia de casos de cáncer de mama en varón sin riesgo familiar que han tenido un test *BRCA* negativo (5/10, 7,4%), frente a la prevalencia en los casos positivos (3/10, 9,7%) (**fig. 102**). Ello nos llevaría a pensar, aunque son pocos casos, que los cánceres de mama masculinos serían susceptibles de realizarse el estudio genético sólo en aquellos pacientes que tengan algún antecedente familiar de cáncer (tal y como indican los criterios de la SEOM).

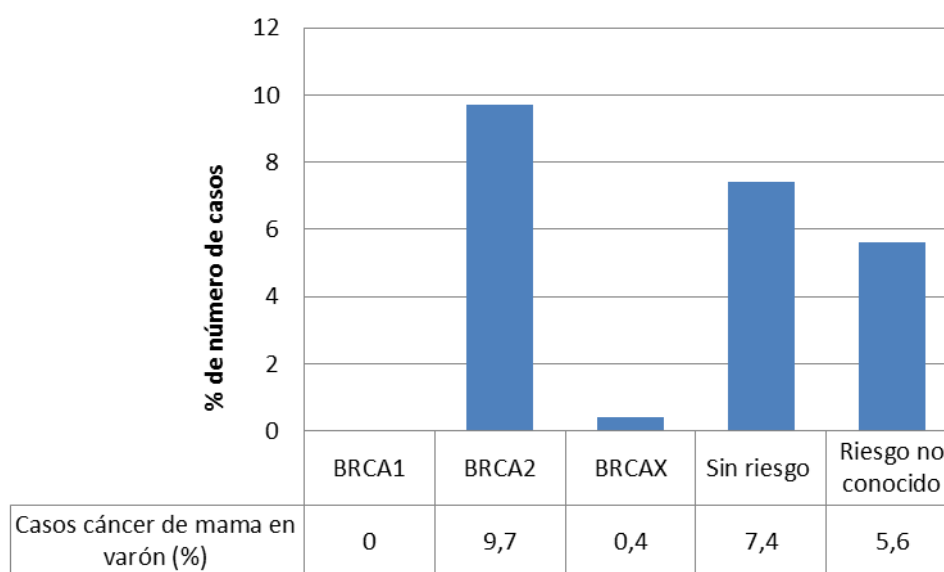


Figura 102. Frecuencia de casos índice con cáncer de mama masculino según los grupos *BRCA1*, *BRCA2*, *BRCAX*, sin riesgo y riesgo no conocido.

Otro aspecto importante, ha sido la cantidad de pacientes con test positivo que han tenido un cáncer de mama y un cáncer de ovario en comparación con los casos negativos (15,7% frente a 2,7%, respectivamente). Esta observación podría explicarse porque el CM en portadoras de mutación en *BRCA1* o *BRCA2* se diagnostica a edades más jóvenes que el cáncer de ovario, por lo que tras el diagnóstico de una neoplasia de mama en una paciente portadora de mutación, la paciente tiene un riesgo significativo de desarrollar una neoplasia de ovario. Esta observación se encuentra incluida como criterio de alto riesgo según la SEOM, también la podemos encontrar en otras guías clínicas [563].

3.1 Cáncer de mama

En algunos estudios se ha visto que los CM asociados a una variante patogénica en *BRCA1* ocurren a una edad de diagnóstico menor [564;565], aunque otros no han detectado diferencias [566;567], al igual que en nuestro estudio de 275 casos de CM.

Además, la mayoría de estudios retrospectivos [568-572] han demostrado un mayor riesgo de cáncer bilateral en los casos *BRCA1/2+* con respecto a CM esporádicos. También ha habido estudios comparativos entre casos *BRCA1/2+* y *BRCAX* [573-575], con un riesgo acumulado a los 10 años del orden de 37-49% y 6-18%, respectivamente. Estos últimos estudios estarían de acuerdo con lo observado, ya

que hemos estimado un riesgo relativo 3,87 veces (IC95%: 2,74-5,50) mayor de tener un diagnóstico de cáncer bilateral en el grupo *BRCA+*. No obstante, este hallazgo estaría limitado por los pocos casos estudiados (27 cánceres bilaterales en total).

Por lo que se refiere a los casos de cáncer de mama en varón, se ha observado una mayor prevalencia en los portadores *BRCA2* (9,7%), que en los demás grupos (*BRCA1*, 0%; *BRCAx*, 0,4%). Sí que se ha demostrado que los hombres que tienen una mutación *BRCA2* tienen un riesgo mayor de cáncer de mama y también pueden tener un mayor riesgo de cáncer de próstata [357;576-578]. Los hombres que tienen una variante patogénica en *BRCA1* también pueden tener un mayor riesgo de CM, pero esta relación parece menos clara [579]. Mientras que entre el 5-10% de los CM en mujeres se considera que es debido a mutaciones de estos genes, hasta el 40% de los CM en hombres puede estar relacionado con mutaciones *BRCA2* [580]. Ello significa que los hombres que desarrollan CM tienen más probabilidad de tener una mutación genética heredada que las mujeres que desarrollan CM. Sin embargo, hemos de recordar que esta evidencia no la hemos tenido en los casos de cáncer de mama masculino esporádicos (**figura 102**).

Por otra parte, se ha podido evidenciar que los tumores *BRCA1* presentan diferencias con el resto de tumores desde un punto de vista morfológico y molecular. Aunque la mayoría de estos tumores son carcinomas ductales infiltrantes, los carcinomas medulares están sobrerrepresentados en pacientes portadoras de variantes patogénicas en *BRCA1*, evidencia ya contrastada en otros estudios con mayor número de casos [581]. Además, se ha demostrado la alta proporción de casos triple negativo en este grupo en comparación con el resto, con una prevalencia del 58,1% de todos los pacientes portadores de una variante patogénica en *BRCA1*. De hecho, otros estudios han profundizado en esta observación indicando que los casos *BRCA1+* están relacionados con un fenotipo basal definido por perfiles de expresión génica [285;309;582] y por análisis inmunohistoquímico, incluyendo citoqueratinas 5/6, 14 y 17, receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), ckit, p53 y e-cadherina [283]. Características que no han formado parte de los objetivos de nuestro estudio.

Los grupos *BRCA2+* y *BRCAx* se han caracterizado por ser un grupo más heterogéneo. Los casos *BRCA2+* se caracterizan por una mayor proporción de CM tipo

RE+/HER- [293]. Mientras que *BRCA*X, según lo descrito, se caracteriza por una proporción todavía más heterogénea en cuanto a los receptores inmunohistoquímicos se refiere [292;307]. Sin embargo, en nuestro estudio, los fenotipos de ambos grupos han sido muy similares con una predominancia de los casos RE+/HER- (clasificados como luminal tipo A). Además, se han observado proporciones análogas del subtipo histológico lobulillar (7,4-9,1%), tal y como se ha apuntado en algunos estudios [299;306;309].

Conviene mencionar que no se han encontrado diferencias en cuanto al estadio clínico en el momento del diagnóstico entre *BRCA*1, *BRCA*2 y *BRCA*X. A pesar que, en general, los CM asociados a *BRCA*1 se caracterizan por un mayor grado histológico [583].

Una de las limitaciones importantes de nuestro trabajo ha sido clasificar los CM en los subtipos moleculares luminal A, luminal B, HER2 positivo y triple negativo, según los receptores inmunohistoquímicos RE, RP y HER2. Aunque se ha seguido la clasificación propuesta por Carey y col. [417], algunos estudios han propuesto una clasificación más compleja considerando el tipo de citoqueratinas de expresión o la tasa de proliferación del tumor [584]. Estos estudios muestran mayor controversia acerca de la clasificación de los subtipos luminal A y luminal B; no obstante, hemos decidido aplicar la clasificación propuesta, ya que el pronóstico y las decisiones de tratamiento todavía se guían por el estado de los receptores hormonales y el estado de HER2/neu (además del estadio tumoral).

En la **tabla 53**, se resumen las características histológicas e inmunohistoquímicas más importantes encontradas en cada grupo de estudio.

Tabla 53. Características histológicas e inmunohistoquímicas de los cáncer de mama de los casos índice *BRCA1*+, *BRCA2*+ y *BRCAX*.

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRCAX</i>
Histología	Predominancia tipo ductal con proporción importante del tipo medular (17%)	Predominancia tipo ductal con algunos casos de tipo lobulillar (9%)	Predominancia tipo ductal con algunos casos de tipo lobulillar (7%)
Estadío clínico	Heterogéneo	Heterogéneo	Heterogéneo
Subtipo molecular	Predominancia tipo triple negativo (58%)	Predominancia tipo RE+/HER- (luminal A) (67%)	Predominancia tipo RE+/HER- (luminal A) (60%)

3.2 Cáncer de ovario

Según lo descrito acerca del riesgo acumulativo promedio de cáncer de ovario a los 70 años en ambos genes [90], se ha determinado un 39% para *BRCA1* y un 11% para *BRCA2*. Ésta es una de las razones fundamentales de una mayor prevalencia de cáncer de ovario en *BRCA1* con respecto a *BRCA2* en nuestro estudio (13/39, 33%, en *BRCA1*; frente a 5/30, 16,7%, en *BRCA2*). También puede explicarse por la misma causa el mayor número de casos de cáncer de ovario sin coafectación de CM en *BRCA1*.

Curiosamente, se ha observado una menor edad mediana de diagnóstico en *BRCAX* con respecto a los casos *BRCA1/2*+: 47 (19-73) años para el grupo *BRCAX*, 58 (40-75) años para *BRCA1* y 55 (36-67) años para *BRCA2*. Estudios con cánceres de ovario asociados a *BRCA* han determinado una edad media de diagnóstico de en torno a 50-55 años [585;586], mientras que para los cánceres de ovario esporádicos se ha estimado una edad de 60-65 años [587-589]. Por otro lado, los cánceres de ovario derivados del síndrome de Lynch se diagnostican a una edad de 41-49 años [587-589]. Ello podría explicar la edad mediana de 47 años detectada en nuestro grupo *BRCAX*, esto es, que una proporción importante de estos casos fueran en realidad cánceres asociados a variantes patogénicas de los genes asociados al cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis o Síndrome de Lynch, aunque esta posible evidencia no ha sido comprobada.

Desde el punto de vista histológico, se ha visto una alta proporción de carcinomas de ovario de tipo seroso *BRCA1/2*+ con respecto a los *BRCAX*, observación

ya descrita en otros estudios [590-593]. El estudio histopatológico minucioso de las trompas de Falopio resecadas durante la ooforectomía profiláctica ha permitido identificar la fimbria como el origen potencial del carcinoma de trompa y del carcinoma intraepitelial tubárico [594]. Estos hallazgos sugieren que la fimbria podría representar el origen de algunos carcinomas de ovario seroso [595].

3.3 Tipo de cáncer de los antecedentes familiares de los casos índice

Además del cáncer de ovario, se ha podido observar una mayor frecuencia de casos de los casos de cáncer gástrico y páncreas en el grupo *BRCA1/2+* que en el grupo *BRCA1/2-*, tal y como lo describen algunos trabajos previos. Según lo descrito con respecto a la población general, se ha relacionado el cáncer gástrico con un RR de alrededor a 2,6 en familiares de portadores de una variante patogénica en *BRCA2* [596] y, en cuanto al cáncer de páncreas, un RR de 2,3 en el gen *BRCA1* [597] y de un 3,5 en el gen *BRCA2* [596]. De hecho, la presencia de cáncer de páncreas en una familia con CM puede ser un factor predictivo de la presencia de mutación en *BRCA2* [598].

Por otro lado, no se ha observado un mayor número de casos con cáncer de próstata de familiares de portadores de variante patogénica en *BRCA1* ó *BRCA2*, en contra de lo publicado en diversos estudios, con un riesgo mayor en *BRCA2* (RR de 4,6 con respecto a la población general) [596;597;599]. No obstante, se debe añadir que estos estudios cuentan con cohortes de mayor tamaño muestral.

4 RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL TEST GENÉTICO SEGÚN CRITERIOS CLÍNICOS

En el comienzo de este capítulo, hemos analizado cómo ha cambiado el rendimiento del test genético desde la totalidad de las familias analizadas en nuestro estudio (17,7%) hasta el análisis de tan sólo el grupo de alto riesgo (23,8%). Sin embargo, en este apartado hemos considerado analizar los criterios clínicos de alto riesgo considerados por la SEOM de manera independiente, es decir, hemos planteado el análisis en los casos que se cumplía un único criterio, con tal de valorar el rendimiento del test genético *BRCA* de dicho criterio en concreto. Además, también hemos determinado la prevalencia de otros criterios no incluidos pero que pueden resultar interesantes analizar, tales como la edad de diagnóstico a ≤ 35 años y ≤ 30 años,

y los casos de cáncer de mama triple negativos a una edad de diagnóstico ≤ 40 años (**tabla 53**).

Los criterios de selección de familias para estudio de los genes *BRCA1/2* adoptados por los diferentes grupos de trabajo a nivel nacional e internacional suelen ser bastante similares, y por lo general la mayoría de ellos comparten unas tasas de detección de mutaciones, que suelen ser como mínimo superiores al 10%. Como se ha podido observar en nuestro estudio, todos los criterios indicados en la **tabla 54** superan este porcentaje, destacando un 60% de rendimiento diagnóstico en los casos de CM diagnosticado a edad ≤ 50 años o bilateral, y un cáncer de ovario en un familiar de primer o segundo grado (bCM ó CM ≤ 50 + CO) y en casos de CM en varón, y otro caso de CM (varón o mujer) u ovario en un familiar de primer o segundo grado (vCM + CM ó CO).

Por lo que se refiere a la edad de diagnóstico en los casos de CM esporádicos, no se ha visto una gran diferencia de rendimiento diagnóstico en los grupos de edad de diagnóstico ≤ 40 , ≤ 35 y ≤ 30 años (en porcentajes de 19,8-22,2%, tabla). Además, hemos estimado los casos de CM con receptores inmunohistoquímicos RE-, RP- y HER- (triple negativo) sin historia familiar y diagnosticados a una edad menor o igual a 40 años, resultando una prevalencia de casos positivos del 42,9%. Estudios similares con casos CM triple negativos diagnosticados a una edad ≤ 40 años, aunque sin tener en cuenta la historia familiar, han estimado la prevalencia en un 47% [600]. Mientras que otros trabajos recientes [601], ya consideran incluir los CM triple negativos diagnosticados a una edad menor de 50 años entre los criterios de selección para el estudio genético del gen *BRCA1*.

Tabla 54. Rendimiento diagnóstico en nuestro estudio de algunos criterios clínicos recomendados por la SEOM y otros criterios clínicos propuestos*.

	Criterio clínico†	Prevalencia test positivo	Porcentaje (%)
Criterios recomendados por la SEOM	bCM ó CM $\leq$ 50 + CO	9/15	60
	3CM	5/25	20
	2CO	5/9	55,55
	vCM + CM ó CO	3/5	60
	CMO	6/14	42,86
	CM $\leq$ 40	17/69	22,2
Otros criterios clínicos	CM $\leq$ 35	10/38	20,8
	CM $\leq$ 30	4/18	19,8
	CM triple negativo $\leq$ 40	6/14	42,9

*Se han descartado los casos que cumplían más de un criterio.

†Se consideran familiares aquellos de parentesco de primer y segundo grado.

bCM: Cáncer de mama bilateral; CM $\leq$ 50: Cáncer de mama diagnosticado a una edad de 50 años o menor; CO: Cáncer de ovario; vCM: Cáncer de mama en varón; CMO: Cáncer de mama y ovario en la misma paciente a cualquier edad; CM $\leq$ 40: Cáncer de mama diagnosticado a una edad de 50 años o menor; CM $\leq$ 35: Cáncer de mama diagnosticado a una edad de 35 años o menor; CM $\leq$ 30: Cáncer de mama diagnosticado a una edad de 30 años o menor; CM triple negativo $\leq$ 40: Cáncer de mama triple negativo diagnosticado a una edad igual o menor a 40 años.



Conclusiones

CONCLUSIÓN 1

El 17,7% de la población de nuestro estudio es portadora de alguna variante patogénica en *BRCA1/2*. Un 9,8% de las familias resultó ser portadora de una variante patogénica en *BRCA1* y un 7,8% de las familias en *BRCA2*. Estos resultados justifican el desarrollo del Programa de Consejo Genético en Cáncer de Mama y Ovario Hereditario.

CONCLUSIÓN 2

Siete variantes patogénicas han sido de nueva descripción en este estudio. Cuatro en *BRCA1* (c.1859delT, c.1918C>T, c.2285_2286delGA y c.3280A>T), dos en *BRCA2* (c.5669_5673delATGGC y c.7977-1G>A) y un gran reordenamiento génico en *BRCA2* (amplificación del exón 21).

CONCLUSIÓN 3

Hemos detectado y clasificado variantes de significado clínico desconocido en un 11,49% de los pacientes, en un 2,78% eran variantes probablemente no patogénicas y el 100% de los pacientes portaban alguna variante no patogénica, la mayoría de ellas consideradas variantes polimórficas.

CONCLUSIÓN 4

La variante de nueva descripción c.1918C>T (*BRCA1*), presente en 2 familias no relacionadas, proviene de un ancestro común en nuestra Región. Han sido recurrentes las variantes c.68_69delAG, c.5123C>A y c.212+1G>A en *BRCA1*, y las variantes c.9117G>A, c.2455T>G y el gran reordenamiento de la delección del exón 2 en *BRCA2*.

CONCLUSIÓN 5

Se han considerado variantes *missense* de mayor probabilidad patógena las alteraciones c.946A>G (*BRCA1*), c.3032C>G (*BRCA2*), c.7559G>T (*BRCA2*) y c.9875C>T (*BRCA2*); mientras que las variantes *splicing* consideradas de mayor probabilidad patógena han sido c.68-7T>A (*BRCA2*), c.7008-14delT (*BRCA2*) y c.4501+3A>T (*BRCA2*). En un futuro, serán necesarios estudios de probabilidad multifactoriales y de expresión génica, para poder confirmar su patogenicidad.

CONCLUSIÓN 6

Los pacientes portadores de una variante patogénica en *BRCA1/2* tienen mayor riesgo de tener un cáncer bilateral de mama y cáncer de mama en varón que el resto de pacientes *BRCAX*. Existe una asociación significativa entre los pacientes *BRCA1+* y los cánceres de mama del tipo inmunohistoquímico triple negativo, con una sobrerrepresentación del tipo histológico medular.

CONCLUSIÓN 7

A los pacientes *BRCA1/2+* se les diagnostica a una edad mayor el cáncer de ovario y con predominancia del tipo histológico seroso que a los pacientes *BRCAX*. Existe una mayor prevalencia de cáncer de ovario en *BRCA1* con respecto a *BRCA2* en nuestro estudio (13/39, 33%, en *BRCA1*; frente a 5/30, 16,7%, en *BRCA2*).



Anexos

ANEXO A

Espacio reservado para la etiqueta identificativa

Consentimiento informado para la realización de pruebas genéticas de cáncer hereditario

UNIDAD DE CONSEJO GENÉTICO DE CÁNCER HEREDITARIO

SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA

Introducción

Este formulario describe los beneficios, riesgos y limitaciones de las pruebas genéticas de susceptibilidad heredada al cáncer. Ésta es una prueba voluntaria y es posible que usted desee obtener asesoramiento genético antes de firmar este formulario.

El propósito de esta información no es preocuparle ni liberar de responsabilidad al médico. Simplemente representa un esfuerzo para que usted conozca mejor los hechos y pueda tomar la decisión libre y voluntaria, de autorizar o rechazar dicho procedimiento.

Debe saber usted que es una norma de obligado cumplimiento para el/la médico que le atiende, informarle y solicitar su autorización o rechazo siempre que la urgencia lo permita.

¿Para qué se hace?

Esta prueba analiza un gen o genes específicos para detectar cambios genéticos denominados mutaciones. El gen o los genes analizados se asocian a un síndrome específico de cáncer hereditario. Esta prueba ayudará a determinar si una persona tiene un riesgo significativamente mayor de desarrollar ciertos tumores debidos a una mutación (o mutaciones) del gen de predisposición al cáncer. Las pruebas genéticas permiten calcular el riesgo de cáncer hereditario de manera más precisa que el que se logra considerando sólo los antecedentes personales y familiares de la persona.

¿Qué le vamos a hacer?

Para este estudio se le extraerá sangre para llenar un tubo de ensayo que se analizará en un laboratorio de este centro. En algunas ocasiones es posible que sea necesario que esta muestra sea enviada a otro laboratorio de referencia para completar el estudio.

¿Qué beneficios se esperan obtener de este procedimiento?

Los resultados de esta prueba podrían ayudarle a usted y a su médico a tomar decisiones informadas sobre su atención médica, tales como pruebas de detección, cirugías para reducir el riesgo y estrategias de tratamiento con fármacos con finalidad preventiva.

La identificación de una mutación (o mutaciones) en un gen en una familia permite que otros familiares consanguíneos determinen si comparten o no el mismo riesgo de cáncer hereditario. Si obtiene un resultado positivo, se le proporcionará la información de cómo se hereda este tumor y de la probabilidad de que sus hijos y parientes consanguíneos puedan haber heredado la misma mutación (o mutaciones) en el gen o genes analizados.

Si obtiene un resultado negativo para una mutación que se sabe que existe en su familia, no puede transmitir esta mutación a sus hijos y por lo general, se considera que usted tiene el mismo riesgo de cáncer que la población general.

¿Qué riesgos tiene?

Las pruebas genéticas por lo general requieren que el ADN se extraiga de una muestra de sangre. Los efectos secundarios de una extracción de sangre son poco comunes pero podrían incluir: mareos, desmayos, dolor, hemorragia, formación de hematomas, y en raras ocasiones, infección.

Los resultados de esta prueba serán comunicados exclusivamente a usted y serán custodiados por el Hospital para evitar cuestiones relativas a una posible discriminación por parte de sistemas de seguro médico.

Limitaciones

Esta prueba analiza sólo algunos genes asociados a un síndrome o síndromes específicos de cáncer hereditario. Las pruebas genéticas determinan el riesgo de cáncer sólo para aquellos tipos de cáncer asociados a los genes que se analizan.

Resultados de la prueba e interpretación

Los resultados de su prueba deben evaluarse teniendo en cuenta los antecedentes clínicos personales y familiares, los resultados del examen físico y las pruebas de laboratorio y diagnósticas pertinentes. Los resultados posibles son:

- **Positivo:** se identificó una mutación asociada a un mayor riesgo de cáncer hereditario. Conocer esta información podría ayudarle a usted y a su médico a tomar decisiones sobre su atención médica, tales como pruebas de detección, cirugías para reducir el riesgo y estrategias de tratamiento con fármacos con finalidad preventiva.
- **Negativo:** no se identificó ninguna mutación.
 - Si usted es la primera persona de su familia en someterse a la prueba, corre al menos el mismo riesgo que la población general. Aún así, su riesgo de cáncer hereditario podría ser mayor al promedio debido a una predisposición genética no detectable mediante esta prueba, ya sea en el gen o genes analizados o en cualquier otro gen asociado con el cáncer hereditario.
 - Si obtiene un resultado negativo para una mutación que se sabe existe en su familia, se considera que usted tiene el mismo riesgo que la población general.
- **Incierto:** se detectó un cambio genético pero no se sabe si este cambio está asociado al riesgo de cáncer. Su riesgo de cáncer es al menos igual al de la población general. Además, su riesgo podría ser todavía más elevado que el promedio debido a este cambio o a una predisposición genética no detectable por esta prueba, ya sea en el gen o los genes analizados o en otro gen asociado al cáncer hereditario.

Los resultados de las pruebas genéticas tienen consecuencias para los parientes consanguíneos. Con el respaldo de esta Unidad de Consejo Genético, usted podría evaluar la posibilidad de compartir sus resultados con algunos de sus parientes consanguíneos que podrían también estar en riesgo. Si decide hacerlo debería evaluar la mejor forma de dar a conocer esta información, para lo cual también le ofrecemos nuestro apoyo profesional.

La no realización de este procedimiento supone tener que basarnos en los antecedentes personales o familiares para intentar hacer una aproximación al riesgo personal de padecer un cáncer aparentemente hereditario. Estas aproximaciones son menos precisas que las basadas en estudios genéticos y dificultan la toma de decisiones posterior para el seguimiento u otras medidas preventivas.

¿Qué alternativas hay?

La alternativa a la realización de estudios genéticos es la aproximación al riesgo basada en el estudio de los antecedentes personales y familiares, aunque los resultados son menos precisos que los proporcionados por estos estudios genéticos cuando están indicados.

Puede usted ampliar la información todo lo que desee, así como consultar cuantas dudas tenga, y además puede revocar el consentimiento en el momento que usted lo considere oportuno.

Yo _____ como paciente.

Yo _____ como representante legal del
paciente _____

AUTORIZO a la Unidad de Consejo Genético del Cáncer Hereditario del Servicio de Oncología Médica a realizar el ESTUDIO GENÉTICO DE CÁNCER HEREDITARIO previamente descrito. He sido informado/a verbalmente y por escrito de su naturaleza, riesgos y posibles alternativas, y he recibido las aclaraciones a mis dudas por parte de mi médico.

El Paciente:

DNI:

El Representante Legal:

DNI:

El Médico:

Nº Colegiado:

Murcia, a de de

ANEXO B

Tabla B1. Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de cada exón de *BRCA1* y tamaño del fragmento que generan.

<i>BRCA1</i>			
Exón	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Tamaño amplicón
2	5'-TATATATGTTTTCTAAATGTGTT-3'	5'-TAATACACTCTTGTGCTGAC-3'	148 pb
3	5'-GAACTTATTCCTAAGAATAGC-3'	5'-GCTTCTATAAAGTTAGGTGTTTC-3'	224 pb
5	5'-GGCTATTTGCCTTTTGAGTA-3'	5'-TTTTCCTACTGTGGTTGCTT-3'	204 pb
6	5'-GAGGTTTTCTACTGTTGCTG-3'	5'-TGAGTTTTCTATGGACAGCACT-3'	262 pb
7	5'-GCATACATAGGGTTTCTCTTGG-3'	5'-CAGGAGGACTGCTTCTAGCC-3'	340 pb
8	5'-TCAGGAGGAAAAGCACAGAA-3'	5'-AGATAAGGAATCCAGCAATT-3'	221 pb
9	5'-TTTAACCTTTTAATTAAGAAAAC-3'	5'-AAAAAGAGAGAAACATCAATCC-3'	187 pb
10	5'-TGGTCAGCTTTCTGTAATCG-3'	5'-TCTACCCACTCTCTTTTCAG-3'	238 pb
11.01	5'-TGTATTTTTTAATGACAATTCAG-3'	5'-CTCCACATGCAAGTTTGAAAC-3'	205 pb
11.02	5'-GGCATCCAGAAAAGTATCAGG-3'	5'-TTTTTTCTGTGCTGGGAGTC-3'	250 pb
11.03	5'-GGGCTGGAAGTAAGGAAACAT-3'	5'-CTACTTTGGCATTGTGATTCAGAC-3'	267 pb
11.04	5'-ACTGTTAGGTTCTGATGACTC-3'	5'-ACGCTCTTGTATTATCTGTGG-3'	316 pb
11.05	5'-AGGAGCATTGTGTTACTGAG-3'	5'-AGACTTCCTCCTCAGCCTATT-3'	397 pb
11.06	5'-ATCCACAATTCAAAAGCACC-3'	5'-TCTTCTTTTCTCTCTTGGA-3'	401 pb
11.07	5'-CTAAGTGTTCAAATACCAGT-3'	5'-ATTCTATGCTTGTTCCTCCG-3'	413 pb
11.08A	5'-ATCCATTGGGACATGAAGTTA-3'	5'-CTTGATTTTCTTCCTTTTGT-3'	241 pb
11.08B	5'-AAACAAAGTCCAAAAGTCAC-3'	5'-GATGGGAAAAAGTGGTGGTAT-3'	279 pb
11.09A	5'-GACTTTTACAAAACCCATATC-3'	5'-ATTGCTTGAGCTGGCTTCTTT-3'	215 pb
11.09B	5'-GAGAACATTCCAAGTACAGTG-3'	5'-TTTATTTTCAGGATGCTTAC-3'	279 pb
11.10	5'-ACAGAGGGCCAAAATTGAAT-3'	5'-TTTCTGGACGCTTTTGCTAA-3'	326 pb
11.11	5'-GACATTAAGGAAAGTTCTGCTG-3'	5'-TTCCTGAGATGCCTTTGCCA-3'	342 pb
11.12	5'-CTAGAACACAGAGGAGAATTT-3'	5'-TCCCCAAAAGCATAAACATTT-3'	411 pb
12	5'-GTCCTGCCAATGAGAAGAAA-3'	5'-CATACTACTGAATGCAAAGGA-3'	238 pb
13	5'-TTTAATGGAAAGCTTCTCAA-3'	5'-GATAAAGGGGAAGGAAAGAAT-3'	290 pb
14	5'-CCTGAATTATCACTATCAGAAC-3'	5'-AAGGGACATATCTATCTAACCGCAC-3'	414 pb
15	5'-TGGCGATGGTTTTCTCCTTCC-3'	5'-TCCAATACAGCAGATGAAATA-3'	251 pb
16	5'-CAGAGACCAGAACTTTGTAAT-3'	5'-TAGTCATTAGGGAGATACATA-3'	411 pb
17	5'-TAACTCATGATAATGGAATAT-3'	5'-TCGCCTCATGTGGTTTTA-3'	183 pb
18	5'-GAGGCTCTTTAGCTTCTTAGGACAGC-3'	5'-GAGACCCATTTCCAGCATCACCAGC-3'	354 pb
19	5'-TTCTTCTGCTGTATGTAACCT-3'	5'-TGATGGAAGGAAGCAAATACA-3'	163 pb
20	5'-GCTTCTCTTCTCTTATCC-3'	5'-CAAAGGGGAGTGAATAC-3'	195 pb
21	5'-AAGCTCTTCCTTTTGAAGTC-3'	5'-GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT-3'	298 pb
22	5'-AGAGTGATGGGTAGAGGGC-3'	5'-GCCAGTCTTGCTCACAGGA-3'	212 pb
23	5'-AATGCTCTTTCCTTCTGG-3'	5'-ACTCAAGCACCAGGTAATG-3'	169 pb
24	5'-ATGAATTGACACTAATCTCTGC-3'	5'-GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA-3'	280 pb

Tabla B2. Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de cada exón de *BRCA2* (excepto el exón 11) y tamaño del fragmento que generan.

<i>BRCA2</i>			
Exón	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Tamaño amplicón
2	5'-GCATCCCTGTGTAAGTGCAT-3'	5'-GACGTACTGGGTTTTAGCAAGC-3'	228 pb
3	5'-TCTTTAACTGTTCTGGGTCACAAA-3'	5'-AACACAGGTTTGCCTAAATTCC-3'	385 pb
4	5'-CATTCTCATTCCCAGTATAGAGG-3'	5'-AGATCTTCTACCAGGCTCTTAGC-3'	340 pb
5 y 6	5'-GATAAACTAGTTTTGCCAG-3'	5'-TGTAATCTCAGGGCAAAGG-3'	327 pb
7	5'- CCTTAATGATCAGGGCATT-3'	5'-AACAGAAAGTATTAGAGATGAC-3'	241 pb
8	5'-GATTGACCTTTCTAATTACTATAC-3'	5'-AAATAATTTAACAAGGCATTCC-3'	282 pb
9	5'-GGACCTAGGTTGATTGCAGATAAC-3'	5'-CGGTAAACTGAGATCACGGGTGACA-3'	340 pb
10A	5'-GTGAGAATAATAAATTATATGGC-3'	5'-CCTAGTCTTGCTAGTTCTTAC-3'	259 pb
10B	5'-AAACAGTTGTAGATACCTCTGAAG-3'	5'-TCCATTTAGACCTGAAAGGGTTAG-3'	326 pb
10C	5'-AGTGGAAGTGACAAAATCTCCAAG-3'	5'-AGATATTGCCTGCTTTACTGCAAG-3'	336 pb
10D	5'-CCATTAAATGAGGAAACAGTGGTA-3'	5'-AGCTACAGAATTCTGTGTGGTGGT-3'	348 pb
10E	5'-GCCTCTGAAAGTGGACTGGA-3'	5'-AAAAACACAGAAGGAATCGTCA-3'	389 pb
12	5'-GGTCTATAGACTTTTGAGAA-3'	5'-GTCAGAATATTATATACCCATACC-3'	233 pb
13	5'-CAGTAACATGGATATTCTCTTAG-3'	5'-AGTGTCAATTATTTTAGAAATGTTC-3'	221 pb
14A	5'-ATATGTGTACTAGTCAATAAAC-3'	5'-GTTTTAAAAGGTGGAACAAAGAC-3'	274 pb
14B	5'-AATGAGACACTTGATTACTAC-3'	5'-AAAGGCAAAAATTCATCACAC-3'	298 pb
15	5'-GTGCCTGGCCAGGGGTTGTGC-3'	5'-CATAAAAGCCATCAGTATTG-3'	285 pb
16	5'-GTGTGATACATGTTTACTTTAAATTG-3'	5'-GTTTCGAGAGACAGTTAAGAGAAG-3'	342 pb
17	5'-GTTGAATTCAGTATCATCCTA-3'	5'-CCGTATATGATTACGTAATGT-3'	268 pb
18A	5'-CAGTGGAATTCTAGAGTCACA-3'	5'-ATACCACCCATCTGTAAGTTC-3'	258 pb
18B	5'-TAGTGCAGATACCCAAAAAGT-3'	5'-GAATTTAACTGAATCAATGACTG-3'	258 pb
19	5'-GATATCTGTAATAGAATTGAATA-3'	5'-AAGAAATATATGGTAAGTTTCAA-3'	257 pb
20	5'-AACTGAATGTTATATATGTGAC-3'	5'-TCTAAGACTTTGTTCTCATATTA-3'	255 pb
21	5'-GGGTGTTTTATGCTTGGTTCTTT-3'	5'-ATGGCCAGAGAGTTAAACAGC-3'	279 pb
22	5'-GTTCTGATTGCTTTTTATTCC-3'	5'-TAATCATTTTGTTAGTAAGGTC-3'	311 pb
23	5'-CACTTCTTCCATTGCATCTT-3'	5'-AACAAGCACTTATCAAACTG-3'	250 pb
24	5'-CAGTTTTGATAAGTGCTTGTT-3'	5'-CTGGTAGCTCCAATAATCATAAG-3'	295 pb
25	5'-CTTGCATCTTAAAATTCATCTAAC-3'	5'-GATACTGGACTGTCAAAATAG-3'	372 pb
26	5'-GGTCCCAAACCTTTTCATTTCTGC-3'	5'-GTATACAACAGAATATACGATGG-3'	314 pb
27A	5'-CTACATAATTATGATAGGCTACG-3'	5'-CCAGACAAAAGAGCTTGGG-3'	457 pb
27B	5'-AAGGCATTTTCAGCCACCAAGGAGT-3'	5'-GTGGTTTGAAATTATATCCAGTCTT-3'	449 pb

Tabla B3. Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación del exón 11 de *BRCA2* y tamaño del fragmento que generan.

<i>BRCA2</i>			
Exón	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Tamaño amplicón
11.00	5'-CACTACCTTTTAACTTAG-3'	5'-CATGACAGAGAATCAGCTTCTGG-3'	308 pb
11.01	5'-ATCTCTCAGGATCTTGATTA-3'	5'-CATAATTGTTACCTTTGAGCTT-3'	367 pb
11.02	5'-GATGTTCTGTCAAACCTAGT-3'	5'-AGTCTGTTTCATGAAGTTCC-3'	412 pb
11.03	5'-ACTTTTCTCAGACAATGAGA-3'	5'-CTAAGAGTCCTGCCCATTTG-3'	350 pb
11.04	5'-AATCGGACATCTCCTTGAAT-3'	5'-CCTGCTTGAAAAATAACATC-3'	372 pb
11.05	5'-TCTGCACATTTACAGAGTAG-3'	5'-AGGCCAGCAAACCTCCGTTT-3'	380 pb
11.06	5'-ATGTCATAATGAATGCCCCA-3'	5'-GAAGATAAACTTATGGATG-3'	292 pb
11.07	5'-GCTGTGAAACTGTTTAGTGA-3'	5'-GCAAGTCCGTTTCATCTTTA-3'	361 pb
11.08	5'-ACTTAGAATTTGATGGCAGT-3'	5'-CTTCTGGTTTCTGATCAAAG-3'	368 pb
11.09	5'-CGGAGCAAAATATAAAAGAT-3'	5'-TTGTCCAAAGATTCCTTTGC-3'	382 pb
11.10	5'-CAACCCGAACGTGATGAAAA-3'	5'-CTTAGGTGGCACCACAGTCT-3'	318 pb
11.11	5'-TCACAGCTGCCCCAAAGTGT-3'	5'-ATTCTTTCTGGTTGACCATC-3'	361 pb
11.12	5'-ACTTCTGTGAGTCAGACTTC-3'	5'-ACTTCTGTGAGTCAGACTTC-3'	372 pb
11.13	5'-GCCATGATTGAAGAATGTTG-3'	5'-TCGTAACAACCTGCCATAAT-3'	366 pb
11.14	5'-ATATTTACAGACAGTTTCAG-3'	5'-AGCATCTGATACCTGGACAG-3'	382 pb
11.15	5'-AGGGAAGCTTCATAAGTCAG-3'	5'-AAATCCAGAGAAAGCAGATG-3'	289 pb
11.16	5'-GACCAGCTCACAAGAGAAGA-3'	5'-TCTGAAGAACCACCTTCAAC-3'	365 pb
11.17	5'-GAAACCCAGAGCACTGTGTA-3'	5'-CTACTGCTTCTGTTTCAAAG-3'	351 pb
11.18	5'-CTGAAACTTTTTCTGATGTTCTG-3'	5'-AACACTCTTAATTGTTAGCATACC-3'	342 pb

ANEXO C

PROTOCOLO GS JUNIOR (*Roche Diagnostics*)

Preparación librería ADN

Comenzaremos diluyendo la muestra a una concentración de 7 ng/μl (para la primera PCR, PCR1) y a 30 ng/μl (para la segunda PCR, PCR2).

PCR1 (PCR multiplex)

Se trata de una PCR múltiple, una PCR que consigue amplificar simultáneamente y en único tubo diferentes secuencias diana de los genes en estudio (*BRCA1* y *BRCA2*). Por lo que definiremos plex, como el conjunto de las diferentes secuencias diana a amplificar. En nuestro caso se amplifican 93 amplicones en 5 reacciones PCR multiplex, o lo que es lo mismo, se amplifican 5 plexes por paciente para poder amplificar todas las regiones codificantes de *BRCA1* y *BRCA2*.

Utilizaremos el kit *BRCA MAST Assay v2.1 (Cat. MR-0012.040)* de la siguiente forma:

-Vórtex y centrifugación de los viales (12.000g, 10s) antes de usarlos.
Centrifugación de la Taq polimerasa.

-Preparación de la mix de la PCR1 hasta un volumen final de 15 μl por cada paciente añadiendo unas concentraciones de PCR mix y Taq polimerasa según la tabla, además de 35 ng/μl de cada paciente de estudio (**tabla C1**).

Tabla C1. PCR multiplex (PCR1).

Reactivo	Volumen
PCR mix	10 μL
Taq polimerasa	0,075 μL
ADN (~35 ng/mL)	5 μL
Total	15 μL

-Posteriormente, se siguió el siguiente esquema en el termociclador *Verity (Applied Biosystems)* (**tabla C2**):

Tabla C2. Condiciones en el termociclador *Verity (Applied Biosystems)* en la PCR1.

Temp.	Tiempo	ciclos
98°C	10"	
95°C	45"	x20 ciclos
60°C	45"	
68°C	2"	
72°C	10"	
Nota: La rampa de temperatura en el Termociclador se colocará a 1,25°C/s.		

PCR2. Incorporación de los MIDs a cada muestra

Un MID (*Multiplex Identifier*) se trata de una secuencia específica que permitirá la identificación de las muestras de cada paciente en el software automatizado después del proceso de la pirosecuenciación.

La siguiente PCR (PCR2) consistirá en la amplificación e incorporación de estas secuencias MIDs, además de las secuencias específicas de los adaptadores A y B que nos aporta el kit 454 MID kit1-8 (Cat. ML-0008.192) y el *Amplification Reagent* del MASTRDx kit (**figura C1**).

Para cada reacción será necesario diluir en 1:1000 los productos de la PCR1 y proceder a la amplificación de PCR2 para un volumen final de 25 µl (**tabla C3**) y según el esquema de temperaturas representado en la **tabla C4**.

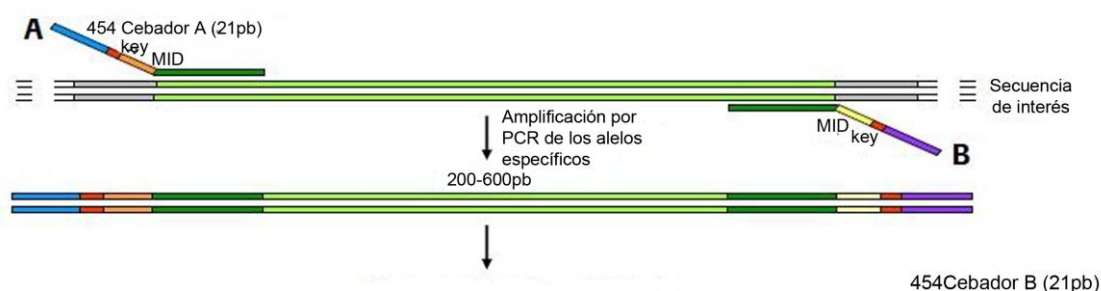


Figura C1. Esquema explicativo de la PCR2. En ella se incorporan los adaptadores A y B, las secuencias de 4 pb Key y la secuencia MID que identifica a cada paciente. El adaptador A pertenece a cebador *forward*, mientras que el B al cebador *reverse*. En color *morado* se encuentra la secuencia molde de 20-25 nucleótidos, para así permitir la identificación de las muestras tras la puesta en común de las PCRs y su secuenciación.

Tabla C3. PCR2 (Incorporación de las MIDs).

PCR2	
Reactivo	V (μL)
Univ. Mater Mix	10
Amplification Reag.	10
Taq DNA polimerasa	0,125
MID	4
Producto PCR1 (1/1000)	1
Vol. Total	25

Tabla C4. Condiciones PCR2.

Temp.	Tiempo	ciclos
98°C	10"	
95°C	45"	x20 ciclos
64°C	45"	
68°C	2"	
72°C	10"	
Nota: La rampa de temperatura en el Termociclador se colocará a 1,25°C/s.		

Posteriormente, verificaremos la correcta amplificación de los fragmentos mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 2% con tampón TBE 1X según el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.2 de *material y métodos*.

Juntar todos los plexes de mismo MID-paciente en un mismo tubo

Durante esta fase procederemos a añadir en un mismo tubo los productos de la PCR multiplex PCR2 para un volumen final de 40 μl con los siguientes volúmenes de cada plex recomendadas por el fabricante (**tabla C5**):

Tabla C5. Volúmenes de los plexes del mismo MID.

Plex	V (μL)
Plex 1	8
Plex 2	11
Plex 3	13
Plex 4	8
Plex 5	10
Vol. Total	40

Purificación de las librerías de amplicones de cada paciente

En esta fase proseguiremos según los siguientes pasos (**tabla C6**):

Tabla C6. Purificación de los amplicones.

Purificación de los amplicones
1. Ponemos el termobloque a 37°C. 2. Preparamos la solución en el momento, con 7 ml de etanol 100% + 3 ml de H₂O, dando vórtex. 3. Preparamos para cada paciente un tubo con 22,5µl de agua + 22,5µl de producto de PCR. 4. Resuspendemos las partículas de la botella <i>Agencourt AMPure</i> mediante vórtex. 5. Añadimos 72 µl de <i>AMPure</i> a cada tubo y vórtex 5". 6. Incubamos 10 minutos a temperatura ambiente. 7. Ponemos los tubos en el separador magnético (MPC) durante 5 min para separar las bolitas magnéticas. 8. Aspiramos la solución clara y eliminamos el sobrenadante. 9. Dispensamos 200 µl de etanol 70% a cada tubo y realizar un vórtex durante 5". 10. Ponemos los tubos en el MPC e incubamos 1 minuto. 11. Aspiramos el etanol y eliminamos. 12. Repetimos una vez más estos tres últimos pasos. 13. Ponemos los tubos abiertos en un termobloque a 37°C-5 min. 14. Fuera del MPC, añadimos 10 µl de agua cada tubo, vórtex hasta la resuspensión total del pellet, y centrifugación. 15. Colocamos los tubos en el MPC durante 2 min para separar las bolas (<i>beads</i>) de la solución. 16. Transferimos 8 µl de la solución obtenida a un tubo nuevo.

Cuantificación de las moléculas/μl en cada paciente

Para la cuantificación de la librería de amplicones utilizaremos el kit *Quant-it PicoGreen dsDNA Assay Kit*. Realizaremos una curva patrón a partir de diluciones seriadas con el tampón TE del kit según la siguiente tabla (**tabla C7**):

Tabla C7. Diluciones seriadas con tampón TE para la cuantificación de la librería de amplicones.

Diluciones seriadas con tampón TE								
Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
TE (μl)	594	300	300	300	300	300	300	300
ADN estándar (6 μl)	6	300	300	300	300	300	300	-

Tabla C8. Pasos a seguir en la purificación de amplicones.

Purificación de los amplicones

1. Transferimos 6 μl al tubo 1 y vórtex 10 segundos. Iremos transfiriendo 300 μl del tubo 1 al 2 y vórtex, y así sucesivamente.
2. Preparamos las muestras y patrones que se medirán añadiendo 99 μl de TE y 1 μl de la MID purificada.
3. Preparamos el reactivo *picoGreen*, según las recomendaciones del kit.
4. Añadimos 100 μl del PicoGreen 1:200 a cada uno de los tubos preparados de estandar y muestras.
5. Realizamos vórtex y dejamos incubar en oscuridad 10 min.
6. Realizamos las mediciones en el fluorímetro *Quantiflor*.
7. Si el ajuste de la recta de calibración es bueno ($r=0,9$) realizaremos los cálculos de las moléculas/ μl según la siguiente fórmula:

$$\text{Moléculas/}\mu\text{l} = \frac{\text{Conc. Muestra (ng/ }\mu\text{l)} \times 6,022 \cdot 10^{23}}{6,56 \cdot 10^9 \times \text{longitud del amplicón (pb)}}$$

8. Incluiremos en un nuevo tubo 10 μl de cada una de las muestras para realizar el *pool* de 10^9 moléculas/μl mediante dilución con TE.
9. Diluimos hasta un *pool* de 10^7 moléculas/μl con H₂O.

EmPCR

Tabla C9. Preparación de los reactivos, aceite de emulsión, *Mock-Mix* y pre-emulsión (*EmPCR*).

Preparación de los reactivos y aceite de emulsión

1. Descongelaremos los reactivos del kit *emPCR Reagents* (Ref. 05996538001) (figura C2).

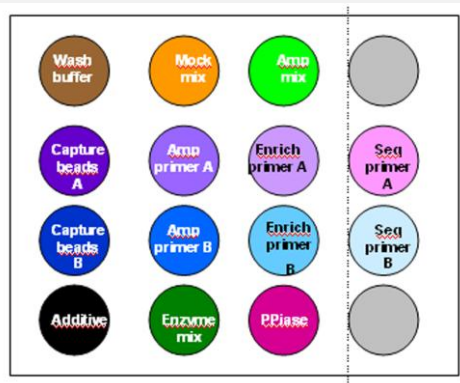


Figura C2. Esquema de los reactivos del Kit *emPCR Reagents*.

2. Ponemos el termobloque a 55°C.
3. Cuando los reactivos se hayan descongelado, realizaremos un vórtex de 5 sg y centrifugación 10 segundos.
4. Vórtex y calentamos el tubo de *Additive* a 55°C durante 5 min. Tras esto, los disolvemos (si persiste un precipitado, centrifugaremos el tubo y usaremos el sobrenadante).

Preparación de la *Mock Mix* y la pre-emulsión

1. Se prepara la *Mock mix* añadiendo 430µl de *Mock Mix* a 1,72 ml de agua y vórtex.
2. Vórtex vigorosamente el tubo de la emulsión de aceite (*kit emPCR oil and breaking kit Ref 02996511001*) durante 10'' a máxima velocidad y disposición en el tubo de agitación *Turrax*.
3. Se añaden 2 ml de 1x *Mock Mix* al tubo *Turrax* conteniendo el aceite de la emulsión.
4. Se centrifuga mediante el dispositivo UTDD (*Ultra Turrax Tube Drive*) a 4000 rpm durante 5 minutos (figura C3).
5. Se prepara la muestra de DNA (10^7 moléculas/µl).

Figura C3. Dispositivo UTDD.



Tabla C10. Preparación de las *Mix Live Amp* y la librería de ADN (*emPCR*).**Preparación de las *Mix Live Amp* (A y B) y ajuste de las copias/*bead***

1. Se preparan las mixes A y B en los tubos eppendorf proporcionados (*kit emPCR oil and breaking kit*) según se indica:

Reactivo	V (μL)	Reactivo	V (μL)
H ₂ O (Biol. Molecular)	205	H ₂ O (Biol. Molecular)	205
Additive	206	Additive	206
Amp. mix	136	Amp. mix	136
Amp. Primer A	40	Amp. Primer B	40
Enzyme mix	35	Enzyme mix	35
Ppiase	1	Ppiase	1
Total	676	Total	676

2. Vórtex de ambas mixes durante 5'' y centrifugación.
3. Posteriormente deberemos calcular la cantidad de ADN que agregaremos al tubo de emulsión para alcanzar 0,5 moléculas ADN/*bead*, según la fórmula:

$$5 \mu\text{L de librería de ADN} = \frac{\text{Moléculas deseadas por bead} \times 5 \cdot 10^6 \text{ beads}}{\text{Moléculas}/\mu\text{L}}$$

Preparación de la librería de ADN

1. Se prepara el tampón de lavado a 1X, mezclando el *Wash Buffer* 0,5 ml con 4,5 ml de H₂O.
2. Se añade 1 ml del tampón de lavado preparado en el paso 1 a cada uno de los tubos de *Capture Beads* y vórtex.
3. En ambos tubos se realizará un centrifugación-rotación-centrifugación (centrifugación 5000 rpm durante 30'' y rotación de 180°C para tener un pellet recto).
4. Se eliminan los sobrenadantes cuidadosamente para no llevarse el pellet.
5. Se repiten los pasos anteriores una vez más.
6. Se añaden 5 μl de la librería de amplicones al tubo de *beads* A, y el mismo volumen al tubo de *beads* B.
7. Vórtex durante 5''.

Tabla C11. Emulsión y amplificación (*emPCR*).

Emulsión
1. Se añaden 600 µl de <i>Live Amp Mix B</i> al tubo de <i>captured library B</i> . Vórtex, y transferir el volumen total al tubo <i>Turrax</i> , echándolo siempre por el centro del tubo.
2. Se coloca el UTTD a 2000 rpm durante 5 min.
3. Se pone el tubo <i>stirring</i> en el UTTD haciéndolo funcionar.
4. Se añaden 600 µl de <i>Live Amp Mix A</i> al tubo de <i>captured library A</i> . Vórtex, y transferimos el volumen total al mismo tubo <i>Turrax</i> .
5. Se pone el tubo <i>stirring</i> en el UTTD haciéndolo funcionar.
6. Cuando finalice, se quita el tubo <i>stirring</i> del UTTD
Amplificación
1. Con una <i>Combitip</i> , se alicuotan 100µl de la emulsión en cada uno de los pocillos de una placa de 96 marca eppendorf.
2. Se sella la placa con el adhesivo correspondiente.
3. Se pone la placa en el termociclador eppendorf (con calentamiento de la placa) en el programa <i>emPCR</i> .

Recuperación de las beads, lavado y enriquecimiento

Durante este proceso romperemos los microrreactores formados en emulsión con los amplicones unidos a las *beads* en su interior. Posteriormente, procederemos a su lavado y enriquecimiento. El enriquecimiento consistirá en la adición de *Melt Solution* (para formar productos de PCR monocatenarios), *Biotinylated Enrich Primer* (que se hibrida con los fragmentos de las *beads*) y *Enrichment beads* (partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina que se unen a la biotina de las *beads*). Aprovechando estas propiedades magnéticas, seleccionaremos las *beads* con producto de ADN mediante un imán y las recuperaremos a través de la recolección de las *beads* no magnéticas.

Pasos a seguir (tabla C12, C13 y C14):

Tabla C12. Recuperación de las *beads*.

Recuperación de las *beads* (rotura de la emulsión)

1. En la campana de gases el kit *emPCR oil and breaking kit* (Ref 05996511001) montaremos los materiales necesarios como describe la **figura C4** y atemperaremos el *Enhancing Buffer*.

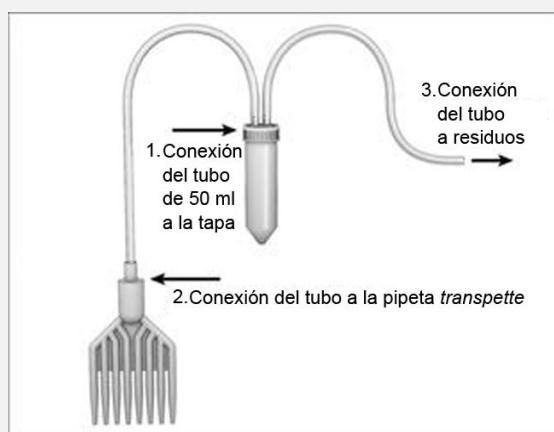


Figura C4. Montaje de la pipeta *transpette* para la recuperación de las *beads*.

2. Encenderemos la bomba de vacío y se va aspirando cada uno de los pocillos de la placa, levantando la pipeta multicanal cada 2 columnas de la placa, comprobando que los pocillos están vacíos.
3. Cuando finalice la aspiración de los pocillos se pondrá la pipeta multicanal hacia arriba para que se deposite todo el material en el tubo.
4. Se lavarán los pocillos 2 veces con 100 μ l de isopropanol/pocillo.
5. Marcar el tubo Falcon y aspirar isopropanol con la pipeta multicanal, vórtex, enrasar a 35 ml y vórtex.
6. Apagaremos la bomba de vacío y quitaremos el tubo y la tapa, que contiene las *beads* con ADN amplificado.

Tabla C13. Recuperación de las *beads*.**Lavado de las beads**

1. Vórtex del tubo de 50 ml.
2. Equilibraremos el tubo de 50 ml con otro tubo (utilizando la balanza) y centrifugaremos a 950g durante 7 min a 23°C. Prepararemos una duquesita con isopropanol y otra con etanol.
3. Descartaremos el sobrenadante con la pipeta serológica, quitando el máximo posible y añadiremos 10 ml de *enhancing buffer*.
4. Vórtex del tubo hasta 5" para que se resuspenda bien el pellet.
5. Añadiremos isopropanol hasta un volumen final de 40 ml y lo mezclaremos invirtiendo.
6. Centrifugaremos la muestra a 950g durante 7 min y quitaremos el sobrenadante.
7. Añadiremos isopropanol hasta un volumen final de 35 ml y vórtex.
8. Centrifugaremos la muestra a 950g durante 7 min y quitaremos el sobrenadante.
9. Añadiremos etanol hasta un volumen final de 35 ml y vórtex.
10. Centrifugaremos la muestra a 950g durante 7 min y quitaremos el sobrenadante.
11. Añadiremos el *Enhancing Buffer* hasta un volumen final de 35 ml y vórtex.
12. Centrifugaremos la muestra a 950g durante 7 min y quitaremos cuidadosamente el sobrenadante, dejando aproximadamente 2 ml de *Enhancing Buffer*.
13. Pondremos el termobloque a 65°C.
14. Prepararemos la *Melt Solution*, mezclando 125 µl de NaOH (10N) y 9,875 ml de H₂O de Biología Molecular y vórtex.
15. Transferiremos la suspensión de *beads* de ADN, resuspendiendo con pipeta de 1000µl, a un tubo microfuga *lowbinding* de 1,7 ml proporcionado en el kit (tomar 1 ó 1,2 ml). Vórtex.

Lavado de las beads (continuación)

16. Centrifugación-rotación-centrifugación y descartaremos el sobrenadante.
17. Lavaremos el tubo de 50 ml con 1 ml de *Enhancing Buffer*, y añadiremos al tubo de 1,7 ml. Vórtex.
18. Centrifugación-rotación-centrifugación y descartaremos el sobrenadante.
19. Lavaremos el pellet de *beads* con 1 ml de *Enhancing Buffer*. Centrifugación-rotación-centrifugación. Descartaremos el sobrenadante.
20. Centrifugación-rotación-centrifugación y descartaremos nuevamente el sobrenadante.

Tabla C14. Enriquecimiento de las *beads*.**Enriquecimiento de las beads de la librería de ADN**

1. Añadiremos 1 ml de *Melt Solution* al tubo de 1,7 ml con las *beads*, y vórtex. Incubaremos 2" a temperatura ambiente. Centrifugación-rotación-centrifugación. Y guardaremos el sobrenadante para comprobar si hay ADN (de esta forma, nos aseguramos que la *emPCR* fue bien).
2. Mientras, descongelamos el *Enrich Primer A* y *B*, vórtex y centrifugación.
3. Añadiremos 1 ml de *Annealing Buffer* al tubo de 1,7 ml con las *beads*, y vórtex. Centrifugación-rotación-centrifugación y descartaremos el sobrenadante. Repetiremos este paso dos veces.
4. El contacto con NaOH no debe exceder de 10 min, para evitar degradación de ADN.
5. Añadiremos 45 µl de *Annealing Buffer*, 15 µl de *Enrich Primer A* y 15µl de *Enrich Primer B* al tubo de 1.7ml y vórtex.
6. Pondremos el tubo en el termobloque a 65°C durante 5" (para que se produzca el *annealing* con los cebadores marcados con biotina). Mientras, lavaremos las *enrichment beads*.
7. Pondremos el tubo de 1,7 ml rápidamente en hielo, dejándolo durante 2 min.

Enriquecimiento de las beads de la librería de ADN (continuación)

8. Añadiremos 1 ml de *Enhancing Buffer* al tubo y vórtex. Centrifugación-rotación-centrifugación y se descarta el sobrenadante. Repetiremos este paso dos veces más.
9. Añadiremos 1 ml de *Enhancing Buffer* al tubo y vórtex.
10. Realizaremos un vórtex del tubo con las *Enrichment Beads* con estreptavidina durante 1" hasta la completa resuspensión (lo transferiremos a tubo *low binding*). Centrifugación y pondremos el tubo en el MPC y esperaremos 3" hasta ver el pellet vertical de las *beads*.
11. Descartaremos el sobrenadante.
12. Añadiremos 500 µl de *Enhancing Buffer* y vórtex.
13. Volveremos a poner el tubo en el MPC y descartaremos el sobrenadante.
14. Estos dos últimos pasos los repetiremos una vez más.
15. Tras descartar el sobrenadante, añadiremos 80 µl de *Enhancing Buffer* y vórtex.
16. Añadiremos 80 µl de las *Enrichment Beads* lavadas al tubo de 1,7 ml y vórtex hasta mezclarlos completamente.
17. Pondremos el eppendorf en el aparato de balanceo, durante 5 minutos a temperatura ambiente.
18. Pondremos el tubo en el MPC (dándole la vuelta en cuanto se forme el pellet vertical) y esperaremos 3-5 minutos.
19. Invertiremos el MPC 5-6 veces y esperaremos 2 min para ver el pellet. Descartaremos cuidadosamente el sobrenadante.
20. Lavaremos las *beads* con *Enhancing Buffer* hasta que no se vean *beads* blancas en el sobrenadante.
21. Añadiremos 1 ml de *Enhancing Buffer* al tubo.
22. Quitaremos el tubo del MPC y vórtex.

Enriquecimiento de las beads de la librería de ADN (continuación)

23. Pondremos el tubo en el MPC para que se forme el pellet (1 min), lo invertiremos y descartaremos el sobrenadante. Repetiremos estos pasos anteriores hasta que las *beads* blancas no se aspiren.
24. Quitaremos del MPC el tubo con las *beads* enriquecidas y resuspenderemos el pellet con 500 µl de *Melt Solution*.
25. Vórtex durante 5" y pondremos el tubo en el MPC hasta conseguir el pellet (el sobrenadante se ve blanco).
26. Transferiremos el sobrenadante (conteniendo las *beads* enriquecidas) a un nuevo tubo de 1,7 ml.
27. Se añade, una vez más, 500 µl de *Melt Solution* al tubo con las *beads* enriquecidas.
28. Vórtex durante 5" y pondremos el tubo en el MPC hasta conseguir el pellet.
29. Transferiremos el sobrenadante (el cual contiene las *beads* enriquecidas) al mismo tubo de 1,7 ml y descartaremos el *enrichment tube*.
30. Centrifugación-rotación-centrifugación en el tubo de 1,7 ml, descartando el sobrenadante.
31. Añadiremos 1 ml de *Annealing Buffer* y vórtex durante 5".
32. Centrifugación-rotación-centrifugación en el tubo de 1,7 ml, descartando el sobrenadante. Repetiremos estos dos últimos pasos cuatro veces más.
33. Añadiremos 100 µl de *Annealing Buffer* y vórtex para resuspender las *beads*.
34. Añadiremos 15 µl de *Seq Primer A* y 15 µl de *Seq Primer B*, y vórtex.
35. Pondremos el tubo de 1,7 ml en un termobloque a 65°C durante 5 min y, rápidamente, lo pondremos en hielo 2".
36. Añadiremos 1ml de *Annealing Buffer* y vórtex durante 5 sg. Centrifugación-rotación-centrifugación, y descartaremos el sobrenadante. Repetiremos este paso 3 veces más.

Enriquecimiento de las beads de la librería de ADN (continuación)

37. Añadiremos 1 ml de *Annealing Buffer*. Centrifugación-rotación-centrifugación.
38. Evaluaremos la cantidad de beads enriquecidas usando el *GS Junior Bead Counter* (se recomienda trabajar con 500.000 beads enriquecidas).

SecuenciaciónCargado de placa

Para ello, deberemos ensamblar el dispositivo *Bead Deposition Device* con la placa *PicoTiterPlate device*, la cual contiene las *beads*. La cámara se llena con las *beads* de ADN (las *beads* de las muestras junto con otras *beads* control incluidas en el kit, las cuales sirven como un control interno para la reacción de secuenciación), *beads* de las enzimas (sulfurilasa y luciferasa), las *beads* PPIasa (para reducir así la interferencia durante cada flujo de nucleótidos, así como el ruido de fondo residual) y las *packing beads* (que estabilizan y mantienen todos los componentes inmovilizados dentro de los pocillos del dispositivo PTP). Todas estas *beads* se separarán en cuatro capas de centrifugación.

Procesos y pasos a seguir (tabla C15, C16):

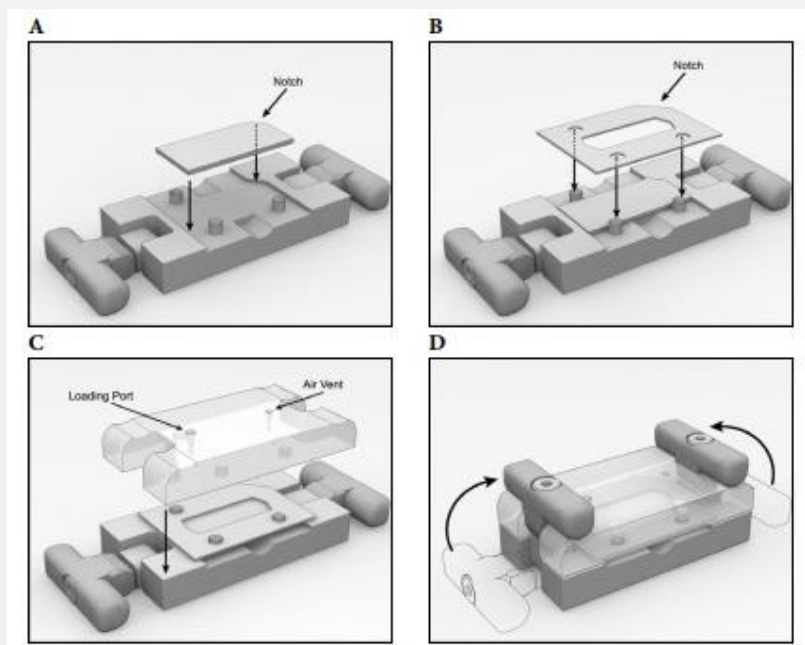
Tabla C15. Preparación del *Bead Buffer 2*.

Preparación del *Bead Buffer 2* (BB2)

1. Añadiremos 6,6 ml de suplemento de CB a la botella del Buffer CB. Mezclaremos bien el contenido.
2. Transferiremos 40 ml del Buffer CB en un tubo cónico de 50 ml limpio y lo colocaremos en hielo.
3. Centrifugaremos el tubo *Apyrase* en una microcentrífuga durante 5 segundos a 9300g. Añadiremos 6,5 µl de apirasa al tubo de 50 ml. Mezclaremos el contenido.

Tabla C16. Montaje de la *Bead Deposition Device*.**Ensamblaje de la *Bead Deposition Device* (BDD)**

Se seguirá el proceso de montaje como indica la **figura C5**:

**Figura C5.** Pasos en el montaje de la *Bead Deposition Device*.

Posteriormente, se pipetea lentamente 350 μ l de BB2 en el dispositivo BDD a través del puerto de carga se centrifuga el dispositivo en una centrífuga durante 5 minutos a 1620 g (**figura C6**).

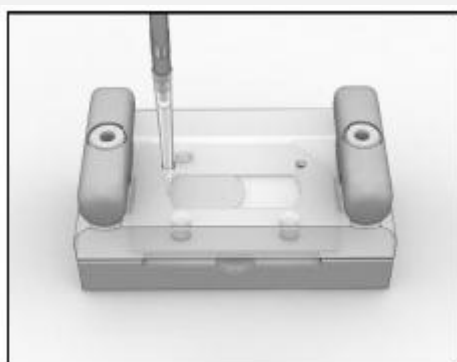
**Figura C6.** Puerto de carga del dispositivo BDD.

Tabla C17. Preparación de las *beads* de ADN, *packing beads*, *beads* de PPIasa y enzimáticas.

Preparación de las <i>beads</i> de ADN
1. Se obtiene una alícuota de <i>beads</i> de ADN enriquecido en una cantidad adecuada para una secuenciación. 2. Se centrifugan las <i>beads</i> de control XLTF en una microcentrífuga durante 5 segundos a 9300 g para recoger las <i>beads</i>. Pipetearemos hacia arriba y hacia abajo 5 veces para resuspender las microesferas. 3. Añadiremos 6 µl de <i>beads</i> de control XLTF a las <i>beads</i> de ADN enriquecidos. 4. Si el volumen de <i>beads</i> de ADN de la muestra es mayor que 100 µl, centrifugaremos las <i>beads</i> de ADN en una microcentrífuga durante 10 segundos a 9300 g para sedimentar las <i>beads</i>. Eliminaremos suficiente sobrenadante para dejar 100 µl en el tubo. 5. Añadiremos 500 µl de BB2 a las <i>beads</i> de ADN, vórtex suavemente e incubaremos durante 20 minutos a temperatura ambiente en un agitador.
Preparación de las <i>packing beads</i>
1. Añadiremos 1 ml de BB2 al tubo de <i>packing beads</i> y vórtex a alta velocidad. 2. Lavaremos las <i>packing beads</i> tres veces con 1 ml de BB2 y centrifugaremos a 9300 g durante 5 minutos para cada lavado. Lavaremos a fondo las <i>beads</i>, por agitación para romper los agregados, hasta que se consiga una suspensión uniforme. Después, se ha de eliminar el sobrenadante. 3. Después del tercer lavado, añadiremos 200 µl de BB2, volveremos a suspender las <i>beads</i> por agitación a alta velocidad, y mantendremos el tubo en hielo.
Preparación de las <i>beads</i> de la PPIasa y de las enzimas
Estos dos tipos de <i>beads</i> se pueden lavar en paralelo: 1. Añadiremos 1 ml de BB2 a cada tubo y mezclar mediante agitación a velocidad media. Se precipitan los <i>beads</i> de enzima y los <i>beads</i> PPIasa usando un concentrador de partículas magnéticas (MPC), esperaremos 30 segundos para las para que sedimenten las <i>beads</i>. Invertiremos el MPC varias veces y esperaremos 30^{seg} de nuevo. Retiraremos el sobrenadante y se extraerán los tubos de la MPC. 2. Lavaremos ambos tipos de <i>beads</i> tres veces con 1 ml de BB2. Vórtex y recogeremos las <i>beads</i> usando el MPC, como anteriormente.

Preparación de las *beads* de la PPIasa y de las enzimas (continuación)

3. Después del tercer lavado, añadiremos 400 µl de BB2 a las *beads* de enzima y 410 µl de BB2 a las *beads* PPIasa, y vórtex a velocidad media para resuspender las *beads*. Mantendremos los tubos en hielo.
4. Prepararemos dos nuevos tubos de *beads* de enzima pre-capa (*prelayer*) y post-capa (*postlayer*) según la siguiente tabla:

Reactivos	BB2	<i>Beads</i> de enzimas	Total
Enzima <i>prelayer</i>	300 µl	100 µl	410 µl
Enzima <i>postlayer</i>	180 µl	230 µl	410 µl

Preparación de las *beads* de ADN y las *packing beads*

1. Centrifugaremos los *beads* de ADN en una microcentrífuga durante 10 segundos a 9300 g para sedimentar las *beads*.
2. Eliminaremos suficiente BB2 para dejar 50 µl en el tubo (se debe calcular el volumen de sobrenadante a eliminar a partir del volumen conocido de *beads* de ADN enriquecidos, más 6 µl de *beads* control XLTF, además de 500 µl de BB2).
3. Centrifugaremos los tubos de la *polymerase* y la *polymerase cofactor* en una microcentrífuga durante 5 segundos a 9300 g.
4. Añadiremos los siguientes reactivos a las *beads* de ADN: 40 µl de la *polymerase*, 20 µl *polymerase cofactor* y 65 µl de BB2.
5. Vórtex la mix a baja velocidad durante 5 segundos e incubaremos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, vórtex del tubo de *packing beads* a alta velocidad.
6. Añadiremos 175 µl de *packing beads* a la mix de ADN, vórtex a baja velocidad e incubaremos a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Las *beads* se depositan sobre el dispositivo PTP mediante la inyección de la suspensión de microesferas a través del puerto de carga del BDD, y luego mediante el uso de sedimentación centrífuga, las *beads* se depositan en la parte inferior de los pocillos *PicoTiterPlate* (PTP). Este proceso se repite para cada uno de cuatro capas:

- a) Capa de *beads* 1: *beads* enzimáticas *prelayer*.
- b) Capa de *beads* 2: *beads* de ADN y *packing beads*.
- c) Capa de *beads* 3: *Beads* enzimáticas *postlayer*.
- d) Capa de *beads* 4: *Beads* PPiasa.

Tabla C18. Depósito de las capas de cada tipo de *bead*.

Depósito de la capa <i>bead</i> 1
- Vórtex el tubo de las <i>beads</i> enzimáticas <i>prelayer</i> (capa 1) a baja velocidad durante 5 segundos para obtener una suspensión homogénea. - Cargaremos rápidamente 350 μl de la suspensión de <i>beads</i> en el dispositivo PTP, a través del orificio de puerto en la parte superior de BDD. - Centrifugaremos el BDD durante 5 minutos a 1620 g.
Preparación del <i>buffer</i> CB
- Agitaremos el tubo DTT a alta velocidad durante 5 segundos. Añadiremos 1 ml de la DTT a la botella de Buffer CB. Invertiremos el tubo de sustrato TW 10 veces para mezclar. - Con una pipeta serológica, transferiremos 44 ml de sustrato TW en la botella de CB. Invertiremos la botella 10 veces para mezclar bien.
Depósito de la capa <i>bead</i> 2
- Retiraremos la BDD de la centrífuga. - Con una pipeta, eliminaremos suavemente tanto sobrenadante como sea posible a través del orificio de la parte superior de la BDD. - Retiraremos el tubo de las <i>beads</i> de ADN y de los <i>packing beads</i>. Mezclaremos la suspensión. - Centrifugar el tubo en una microcentrífuga durante 5 segundos a 9300 g.

Depósito de la capa *bead* 2 (continuación)

5. Resuspenderemos.
6. Cargaremos 350 μ l de esta suspensión en el dispositivo PTP.
7. Centrifugaremos el BDD durante 10 minutos a 1620 g.

Depósito de la capa *bead* 3

1. Retiraremos la BDD de la centrífuga.
2. Con una pipeta, extraeremos suavemente todo el sobrenadante de capa de *beads* 2 a través del puerto de la parte superior de la BDD.
3. Vórtex con de los *beads* enzimáticos *postlayer* durante 5 segundos a velocidad media para obtener una suspensión uniforme.
4. Cargaremos rápidamente 350 μ l de la suspensión de *beads* en el dispositivo PTP, a través del puerto de carga en la parte superior de BDD.
5. Centrifugaremos el BDD durante 10 minutos a 1620 g.

Depósito de la capa *bead* 4

1. Retiraremos nuevamente la BDD de la centrífuga.
2. Con una pipeta, extraeremos con cuidado y desecharemos todo el sobrenadante de lo centrifugado de la capa *bead* 3, a través del puerto en la parte superior de BDD.
3. Agitaremos el tubo *beads* de PPIasa durante 5 segundos a velocidad media hasta obtener una suspensión uniforme.
4. Cargaremos rápidamente 350 μ l de la suspensión de *beads* en el dispositivo PTP, a través del puerto de la parte superior de BDD.
5. Centrifugaremos el dispositivo PTP cargado en la BDD durante 5 minutos a 1620 g.

En la **figura C7** se muestra un esquema de todo este proceso metodológico.

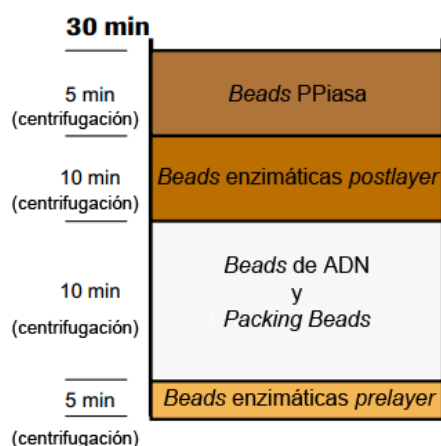


Figura C7. Esquema metodológico del depósito de capas según el tipo de *bead*.

Mantenimiento Gs Junior (*wash* y cebado)

El equipo de Gs Junior ha de tener una serie de procesos de lavado y cebado para poder proceder a la secuenciación. Pasos a seguir (**tabla C18 y figura C8**):

Tabla C19. *Wash* y cebado del Gs Junior (Roche Diagnostics).

Wash y cebado
1. Levantaremos la tapa del instrumento y el colector <i>sipper</i>. 2. Retiraremos y desecharemos la cinta <i>pre-wash</i> y botella <i>pre-wash</i>. 3. Vaciamos la botella de residuos de la derecha. 4. Mezclaremos el cassette de reactivos. 5. Retiraremos con cuidado todas las tapas de los tubos, asegurándose de que las tapas no contacten con los tubos para reducir el riesgo de contaminación. 6. Montaremos el cassette de reactivos en el instrumento. 7. Colocaremos la botella de Buffer CB a la izquierda. 8. Bajaremos lentamente el colector de <i>sipper</i>, comprobando que se sumerge en los tubos de reactivos y botella CB Buffer. 9. Cerraremos la tapa del instrumento. 10. Haremos clic en <i>Continue</i> para comenzar a cebar el instrumento. Durará aproximadamente 5 minutos. 11. Una vez que se ha completado, introduciremos ID y códigos de barras.

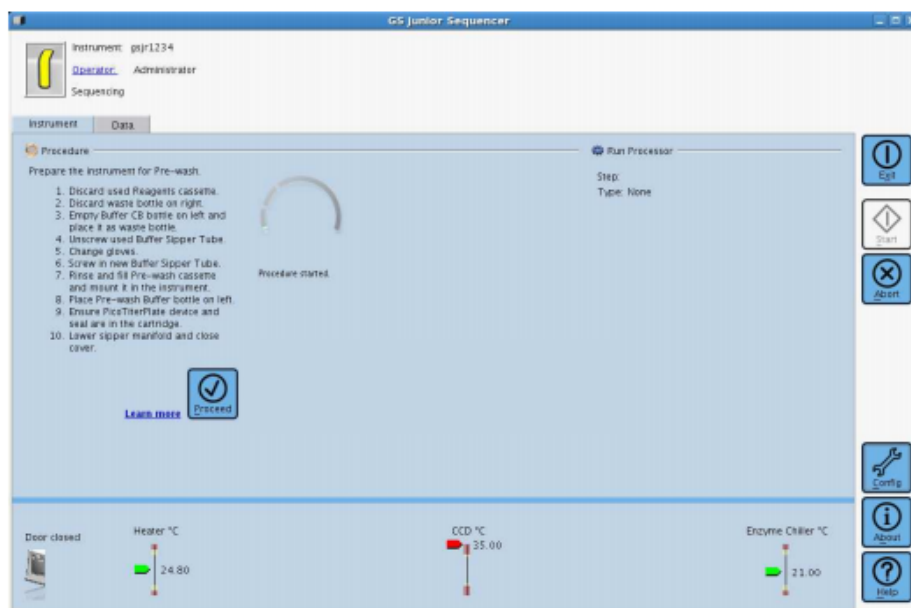


Figura C8. Procesos de lavado y cebado del *Gs Junior* a seguir antes de la secuenciación.

Introducción de la placa en el equipo

Una vez que el cebado del equipo se haya completado, introduciremos la placa PTP según indica la **figura C9**.

Proceso de secuenciación (*sequencing run*)

Tras colocarlo en el equipo procederemos a la secuenciación mediante el programa informático *Gs Junior Sequencer*. Identificaremos el proceso y eligiremos las condiciones de secuenciación de 200 ciclos (aproximadamente 500 bases). Se puede controlar el proceso del *sequencing run* visualizando el estado del instrumento y las imágenes de los datos a medida que son capturados por la cámara. El curso de la pirosecuenciación tardará alrededor de 9 horas.

Evaluación de los datos

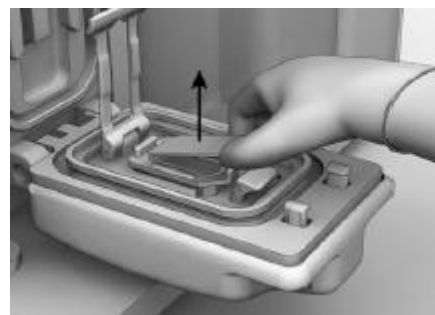
Para ello, emplearemos el soporte informático *GS Run Browser*. Este programa nos permite ver de forma interactiva los resultados de la secuenciación, para evaluar la calidad general de una carrera o para solucionar problemas cuando los resultados no son óptimos.



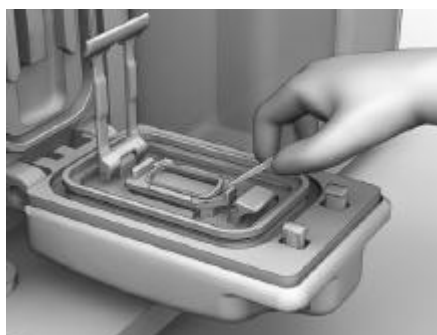
Levantaremos la tapa del instrumento y abriremos la puerta de la cámara pulsando en los dos cierres laterales y tirando de la puerta en un movimiento hacia abajo.



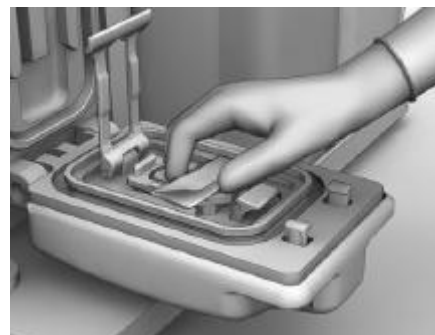
Retiraremos el dispositivo PTP de la secuenciación anterior del cartucho presionando primero el pestillo del resorte del PTP para levantar el bastidor del cartucho.



Levantaremos el dispositivo PTP usado.



Abriremos el sello de cartucho.



Limpiaremos con etanol al 50% de la superficie del cartucho para eliminar cualquier residuo de *bead* y/o reactivo.



Insertaremos el sello de cartucho lavado en su ranura.

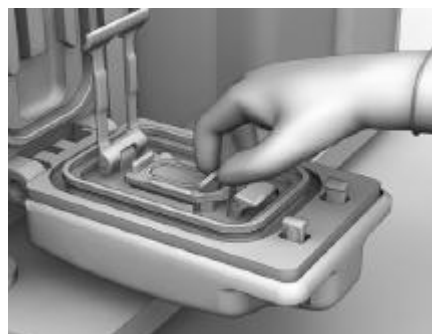


Figura C9. Procesos de lavado y cebado del *Gs Junior* a seguir antes de la secuenciación.

Evalúa los siguientes parámetros:

- a) **Visión del conjunto (*overview*):** Dispone de información acerca del número de pocillos leídos (ha de ser <250.000) y el número de pocillos controles y pocillos con la muestra a analizar que se han registrado correctamente (es decir, que se han registrado las secuencias *key*), han de ser el 98% del total.
- b) **Lecturas (*reads*):** proporciona estadísticas sobre la duración de lectura y la calidad observada durante la pirosecuenciación, ya sea para librería de ADN de la muestra o el ADN de control. Se muestra un gráfico de la longitud de lectura o datos de calidad, ya sea para una región seleccionada del PTP o en todo el dispositivo PTP. Nos interesa el número de pocillos que han pasado los filtros correctamente (*pass filter wells*), que han de ser >70.000; y el número de fragmentos cortos (*short fragments*).
- c) **Filtros (*filters*):** proporciona estadísticas sobre los filtros de calidad de lectura de y se utilizan para procesar los datos de la secuenciación (**figura C10**). Nos da información de:

- **%Dot:** porcentaje de pocillos en los cuales no ha habido incorporación de nucleótidos
- **%Mix:** porcentaje de pocillos con demasiadas incorporaciones de nucleótidos.

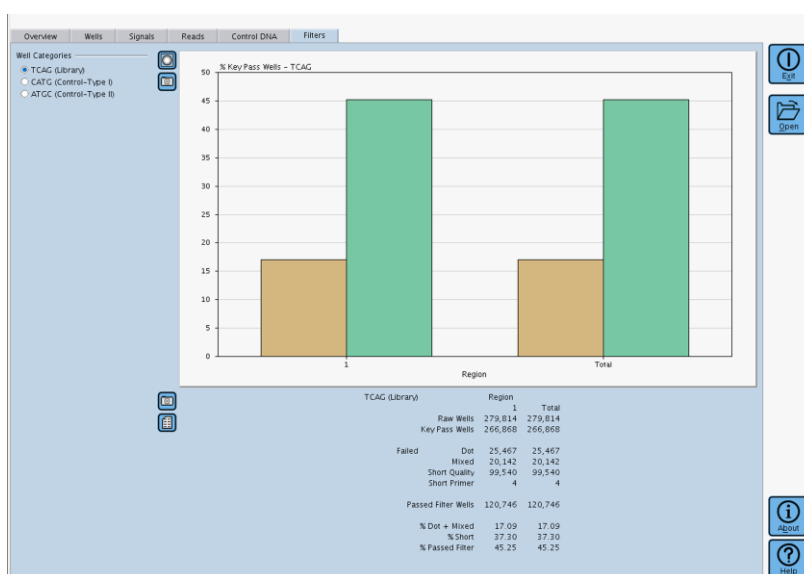
La suma de estos dos parámetros ha de ser <10%.

- **%Short:** Contabiliza el número de lecturas que no han pasado la prueba de longitud debido a una disminución de su calidad. Se permite hasta un 50%.
 - **%Passed filter:** Porcentaje del número de pocillos que han pasado los cinco filtros. Esto es, los pocillos que contienen ADN de alta calidad. Ha de ser >40%.
- d) **Control de ADN:** muestra resultados de precisión para las *beads* de ADN de control que se enriquecieron en la reacción de secuenciación. Refleja el porcentaje de lecturas de ADN control que coincide con su secuencia de referencia a un 95%, 98% y 100% de precisión, en cada región del dispositivo

PicoTiterPlate. Elegiremos un 98% de precisión (*%Match (200bp) 98%*), este parámetro debe de ser >70%.

- e) *Pocillos (Wells)*: muestra información sobre los pocillos identificados durante el procesamiento de datos. Muestra información sobre una región o el total del PTP. En color verde se señalan los pocillos que han pasado los filtros (*passed filter, control DNA*). Nos proporciona imágenes que nos permiten detectar la presencia o no de burbujas y las dimensiones de éstas, otro parámetro a evaluar en la calidad del proceso (**figura C11**).

A.



B.

TCAG (Library)		Region	
		1	Total
	Raw Wells	279,814	279,814
	Key Pass Wells	266,868	266,868
Failed	Dot	25,467	25,467
	Mixed	20,142	20,142
	Short Quality	99,540	99,540
	Short Primer	4	4
	Passed Filter Wells	120,746	120,746
	% Dot + Mixed	17.09	17.09
	% Short	37.30	37.30
	% Passed Filter	45.25	45.25

Figura C10. Sección de *filters* en el programa *GS Run Browser*. En **A** se observa una visualización general de la información que nos ofrece esta sección. En **B** se encuentra la imagen ampliada con un ejemplo de la información de los distintos parámetros.

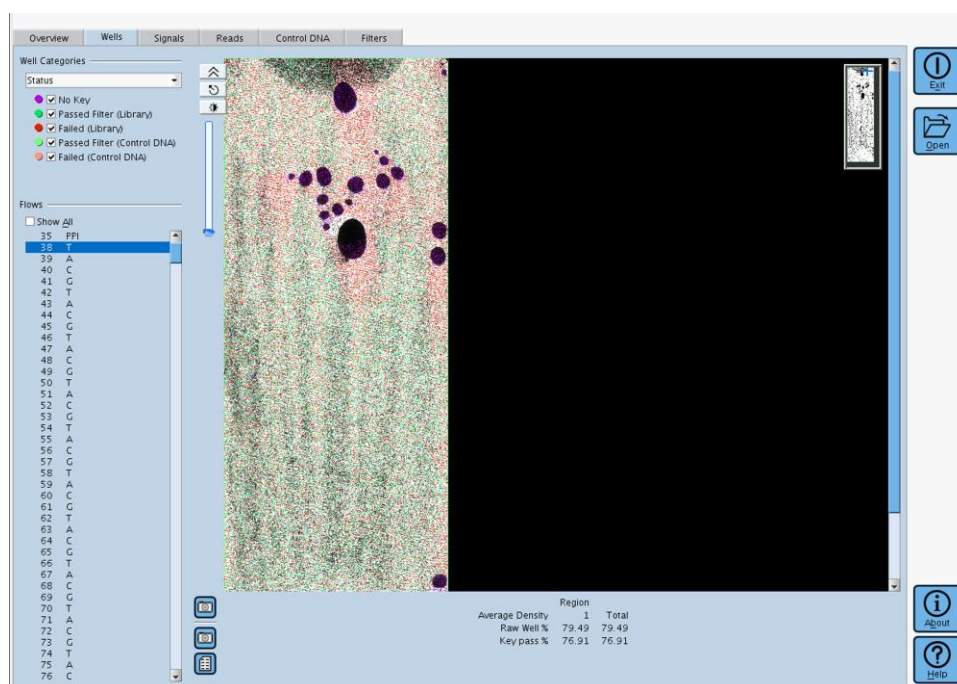


Figura C11. Sección de wells en el programa *GS Run Browser*. Se observa una visualización general de la información donde podemos distinguir la presencia de varias burbujas.

Interpretación de los resultados

Los resultados de la secuenciación de las librerías de ADN están diseñados principalmente para identificar y cuantificar tanto las variantes conocidas de ADN (por ejemplo, alelos raros) como las no descritas, según la cobertura de secuenciación de una o varias regiones de interés. En la interpretación de estos resultados emplearemos el soporte informático *GS Amplicon Variant Analyzer* (AVA).

El programa AVA alinea las lecturas e identifica las diferencias entre la lectura y la secuencia de referencia. Las variaciones se muestran tanto gráficamente en un histograma donde se indica las posiciones de la variante, y en forma de texto con un alineamiento múltiple con códigos de color destacando las regiones y las bases de diferencia a partir de la secuencia de referencia.

Además, el programa nos indica la frecuencia de las variantes definidas y las identifica en una tabla resumen (**figura C12**), lo que permite la detección y cuantificación de las variantes conocidas y nuevas en las muestras secuenciadas.

Por otra parte, varias herramientas nos permiten examinar las alineaciones de lectura en detalle para evaluar si las variantes identificadas son correctas (**figuras C13 y C14**). De esta manera, podemos aceptar o no estas variantes en el sistema, y decidir qué variantes incluiremos en el informe.

A partir de un archivo que contiene un *script* podremos crear y analizar un proyecto AVA de un modo automatizado. Posteriormente, utilizaremos un segundo *script* para extraer con facilidad el número de lecturas de nuestro proyecto AVA de todos los amplicones y de todas las muestras. A continuación, utilizaremos dos filtros en la tabla resumen que se nos genere:

- Número de lecturas: ≥ 40 .
- % de variantes en la misma posición: $\geq 20\%$.

Reference	Variant	Max	MID10	MID11	MID12	MID13	MID14	MID15	MID16
BRCA1	1254:T/C	100.00	0.00	48.37	100.00	0.00	42.21	50.75	50.24
BRCA1	25570:C/T	54.78	42.65	54.78	0.00	0.00	54.47	0.00	0.00
BRCA1	28146:T/-	▼ 32.08	0.00	1.42	0.00	0.00	0.00	▼ 32.08	0.00
BRCA1	31020:A/G	46.99	0.00	46.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BRCA1	32035:C/T	100.00	0.00	58.00	100.00	0.00	45.19	47.06	50.00
BRCA1	32264:T/C	100.00	0.00	49.49	100.00	0.00	42.24	49.02	50.20
BRCA1	32565:C/T	100.00	0.00	49.81	100.00	▼ 47.57	56.41	45.85	46.59
BRCA1	33066:A/G	100.00	0.00	49.85	100.00	0.00	49.85	42.94	52.18
BRCA1	33501:A/G	100.00	0.00	43.86	100.00	0.00	52.41	54.09	44.40
BRCA1	34311:A/C	100.00	0.00	47.26	100.00	46.79	52.94	48.09	50.76
BRCA1	43031:T/C	100.00	0.00	54.35	100.00	0.00	56.67	46.35	47.62
BRCA1	48860:C/T	49.58	0.00	49.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BRCA1	50900:C/G	100.00	0.00	47.86	100.00	0.00	55.10	48.03	50.35
BRCA1	54407:A/G	100.00	0.00	48.32	100.00	0.00	50.65	53.16	45.43
BRCA1	57697:A/G	100.00	0.00	43.27	100.00	0.00	45.60	45.16	50.61
BRCA1	57721:A/G	99.32	0.00	43.27	99.32	0.00	45.60	46.77	50.61
BRCA1	61676:G/A	100.00	0.00	53.29	100.00	0.00	57.69	61.29	44.39
BRCA1	62133:A/G	50.00	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00	0.00	0.00
BRCA2	956:G/A	54.69	40.52	53.19	0.00	0.00	0.00	49.36	54.69
BRCA2	9772:A/C	50.00	0.00	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BRCA2	10533:T/C	42.25	0.00	42.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BRCA2	11317:T/A	100.00	46.91	100.00	0.00	0.00	0.00	47.50	51.63
BRCA2	14069:C/T	58.78	0.00	0.00	55.05	0.00	58.78	0.00	0.00
BRCA2	16864:A/C	42.24	0.00	42.24	0.00	0.00	0.00	▼ 0.00	0.00
BRCA2	17113:A/C	100.00	49.53	0.00	49.30	100.00	43.16	0.00	0.00
BRCA2	17364:A/G	44.21	0.00	44.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BRCA2	21105:T/C	51.30	0.00	51.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BRCA2	21847:A/G	46.98	0.00	46.98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BRCA2	22272:A/G	49.60	45.61	49.60	0.00	0.00	0.00	46.51	49.56
BRCA2	22683:T/C	50.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	49.29	50.49
BRCA2	23055:G/A	50.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	50.55	0.00
BRCA2	23439:A/G	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.72
BRCA2	25389:G/C	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
BRCA2	25797-25...	49.43	49.43	48.42	0.00	0.00	0.00	48.00	45.45
BRCA2	39616:A/G	54.71	49.87	54.71	0.00	0.00	0.00	48.67	47.71
BRCA2	39862:C/T	44.64	0.00	44.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BRCA2	47030:T/C	100.00	41.57	100.00	50.77	48.21	59.62	▼ 40.56	53.31
BRCA2	63772:T/C	100.00	34.39	100.00	56.00	47.97	42.60	40.32	49.56
BRCA2	79194:T/C	41.57	41.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BRCA2	83009.5:-/A	38.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	38.20	0.00
BRCA2	83010:A/T	44.44	44.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
BRCA2	83396:A/C	49.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	46.06	49.48

Figura C12. Ejemplo del esquema resumen de las variantes que nos clasifica el programa GS Amplicon Variant Analyzer.

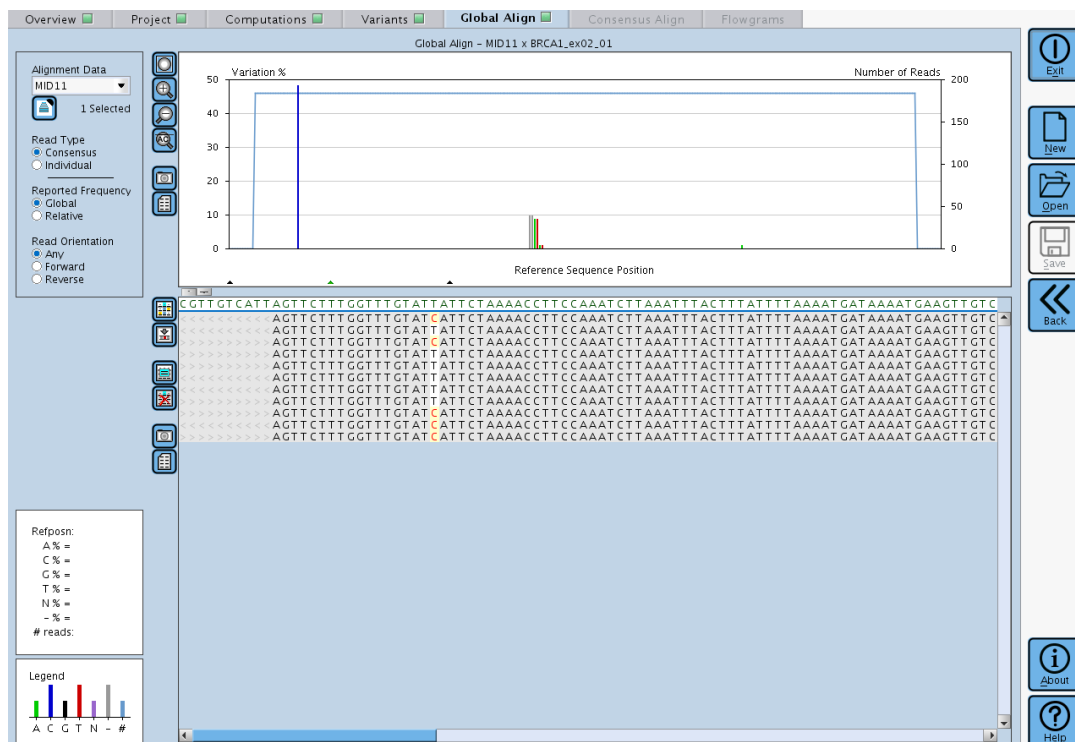


Figura C13. Ejemplo de un alineamiento de lectura con el programa *Amplicon Variant Analyzer* de una variante en heterocigosis.

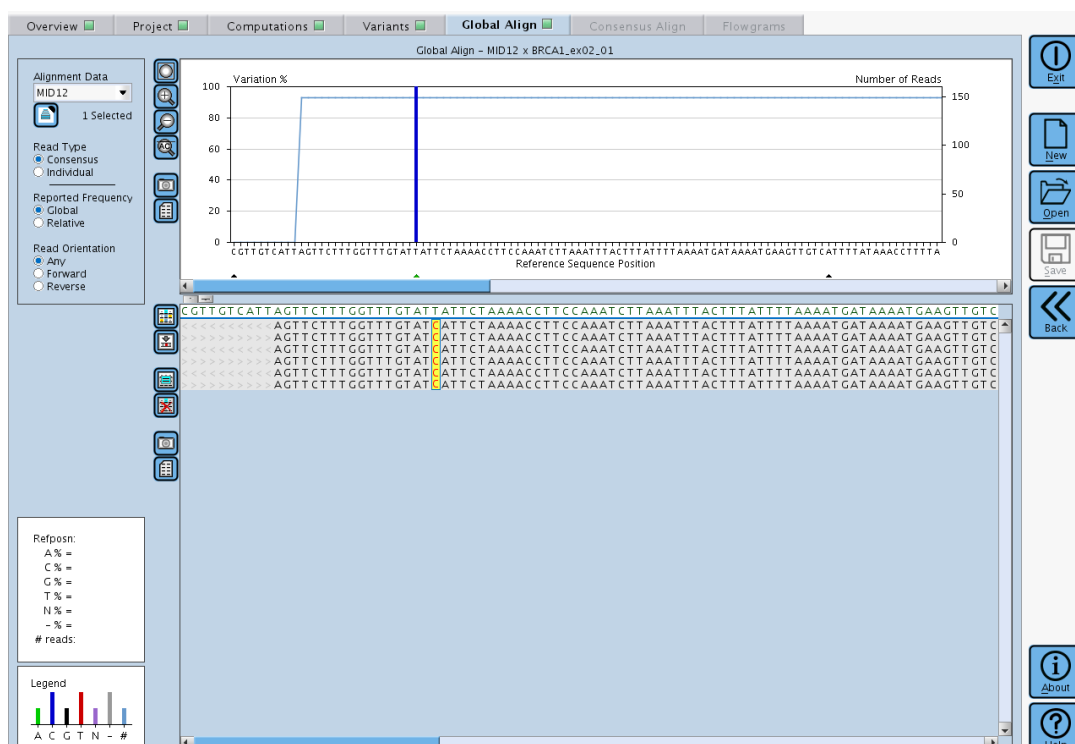


Figura C14. Ejemplo de un alineamiento de lectura con el programa *Amplicon Variant Analyzer* de una variante en homocigosis.

ANEXO D

SALSA MLPA P087-C1 BRCA1 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	BRCA1	BRCA2
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130 *	Reference probe 00797-L21056	5q31		
136	BRCA2 probe 02283-L01774			Exon 1
148	BRCA1 probe 02807-L01268		Exon 1a	
154 *	Reference probe 17136-L20328	1p22		
160 ¥	BRCA1 probe 02808-L25904		Upstream	
167	BRCA1 probe 02810-L02239		Exon 2	
175	BRCA1 probe 02811-L02240		Exon 3	
185	BRCA1 probe 03398-L02254		Exon 18	
193	Reference probe 03217-L02642	10q25		
200	BRCA1 probe 11457-L12189		Exon 22	
208	BRCA1 probe 02813-L02242		Exon 6	
219	BRCA1 probe 02814-L02243		Exon 7	
226	BRCA1 probe 02815-L02244		Exon 8	
234	BRCA1 probe 02816-L02245		Exon 9	
243 *	Reference probe 19134-L25333	21q22		
250 ¥	BRCA1 probe 03411-L25905		Exon 13	
256	BRCA2 probe 02279-L01770			Exon 11
263	BRCA1 probe 11802-L12190		Exon 14	
269 *	Reference probe 15957-L18109	6q15		
276	BRCA1 probe 02818-L02247		Exon 11	
287	BRCA1 probe 02819-L02248		Exon 12	
295	BRCA1 probe 03890-L03337		Exon 13	
310	BRCA2 probe 09809-L10644			Exon 5
319	Reference probe 00495-L03128	12p12		
329	BRCA1 probe 02821-L02250		Exon 15	
337	BRCA1 probe 02822-L02251		Exon 16	
346	BRCA1 probe 03395-L12877		Exon 5	
355	BRCA1 probe 03822-L03285		Exon 10	
364	BRCA1 probe 02826-L02255		Exon 19	
372 *	Reference probe 08893-L23475	14q24		
380	Reference probe 00655-L03268	4q27		
390	BRCA1 probe 02827-L02256		Exon 20	
397	BRCA1 probe 02828-L02257		Exon 21	
408	BRCA1 probe 03397-L13116		Exon 17	
416	BRCA1 probe 02830-L02259		Exon 23	
425	BRCA1 probe 04578-L04795		Exon 24	
436	BRCA1 probe 02100-L02537		Exon 1a	
445 *	Reference probe 06058-L05513	4p16		
454	Reference probe 02355-L01415	9q34		

BRCA1 probes arranged according to chromosomal location

Length (nt)	SALSA MLPA probe	BRCA1 Exon	Ligation site NM_007294.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	233-235 (ex 2)		
160 ¥	02808-L25904	Upstream	703 nt before ex 1a, rev	TCTGCGCACTCG-TAGTTCCACCCC	0.7 kb
148	02807-L01268	Exon 1a	67 nt before ex 1a	TCATCCGGGGGC-AGACTGGGTGGC	0.1 kb
436	02100-L02537	Exon 1a	67-68	CGTGGCAACGGA-AAAGCGCGGGAA	1.4 kb
167	02810-L02239	Exon 2	299-298, rev	GATGGGACACTC-TAAGATTTTCTG	8.3 kb
175	02811-L02240	Exon 3	361-360, rev	ACTTACTTGCAA-AATATGTGGTCA	9.3 kb
346	03395-L12877	Exon 5	3 nt after ex 5, rev	ACCAAATTATAT-ACCTTTTGGTTA	1.6 kb
208	02813-L02242	Exon 6	516-517	TGCTTTTCAGCT-TGACACAGGTTT	0.7 kb
219	02814-L02243	Exon 7	611-610, rev	GTAGCCCATACT-TTGGATGATAGA	4.3 kb
226	02815-L02244	Exon 8	9 nt before ex 8	GTTCTTTACCAT-ACTGTTTAGCAG	2.6 kb
234	02816-L02245	Exon 9	10 nt after ex 9, rev	CAAAGGTTCTCT-TTGACTCACCTG	1.4 kb
355	03822-L03285	Exon 10	884-883, rev	TGCAGAATCCAA-ACTGATTTTCATC	2.4 kb
276	02818-L02247	Exon 11	2238-2239	CCTACAACATCAT-GGAAGGTAAAGA	2.5 kb
287	02819-L02248	Exon 12	4400-4399, rev	GGTTAAAATGTC-ACTCTGAGAGGA	8.4 kb
250 ¥	03411-L25905	Exon 13	4473-4474	AATGGCTGAACT-AGAAGCTGTGTT	0.1 kb
295	03890-L03337	Exon 13	4542-4543	AAGTGACTCTTC-TGCCCTTGAGGA	5.9 kb
263	11802-L12190	Exon 14	4654-4655	GGCCTTTCTGCT-GACAAGTTTGAG	2.2 kb
329	02821-L02250	Exon 15	4852-4853	CAACAGCTGGAA-GAGTCTGGGCCA	3.2 kb
337	02822-L02251	Exon 16	4996-4997	CCAGAGTCAGCT-CGTGTTGGCAAC	3.5 kb
408	03397-L13116	Exon 17	9 nt after ex 17, rev	TGTAAAGGTTCT-TGGTATACCTGT	3.7 kb
185	03398-L02254	Exon 18	5371-5372	GGAAAATGGGTA-GTTAGCTATTTC	0.5 kb
364	02826-L02255	Exon 19	44 nt before ex 19	TGAAAAGAGCAC-GTTCTTCTGCTG	6.3 kb
390	02827-L02256	Exon 20	27 nt before ex 20	TTTCTCTTATCC-TGATGGGTTGTG	6.1 kb
397	02828-L02257	Exon 21	49 nt after ex 21	CCTTTGTCTTAC-ATAGTGGAGTAT	1.8 kb
200	11457-L12189	Exon 22	5575-5574, rev	TGTACCATCCAT-TCCAGTTGATCT	1.6 kb
416	02830-L02259	Exon 23	21 nt after ex 23	CTGCATGTACCT-GTGCTATATGGG	1.8 kb
425	04578-L04795	Exon 24	5722-5723	ATGTGTGAGGCA-CCTGTGGTGACC	
		<i>stop codon</i>	5822-5824 (ex 24)		

BRCA2 probes arranged according to chromosomal location

Length (nt)	SALSA MLPA probe	BRCA2 Exon	Ligation site NM_000059.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	228-230 (ex 2)		
136	02283-L01774	Exon 1	At mRNA start	CAGCGCGGGCTT- GTGGCGCGAGCT	10.6 kb
310	09809-L10644	Exon 5	688-689	TGTAACACCACA- AAGAGATAAGTC	10.2 kb
256	02279-L01770	Exon 11	2192-2193	TCTGAAGAACCA- ACTTTGTCCTTA	
		<i>stop codon</i>	10482-10484 (ex 27)		

SALSA MLPA P045-B3 BRCA2/CHEK2 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position		
		reference	CHEK2	BRCA2
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
130	Reference probe 00797-L00463	5q31		
137	BRCA2 probe 02283-L12281			Exon 1
148	BRCA2 probe 02285-L01776			Exon 1
154	BRCA2 probe 09297-L08066			Exon 14
160	FRY probe 02143-L09586			20 kb before BRCA2
166	BRCA2 probe 02486-L01985			Exon 2
172 ∫ +	BRCA2 probe 08898-L09587			Exon 3
178	BRCA2 probe 01599-L10642			Exon 3
184	Reference probe 01217-L00694	4q35		
191	BRCA2 probe 09812-L10643			Exon 23
197	BRCA2 probe 01600-L04671			Exon 4
202	BRCA2 probe 08265-L08128			Exon 7
211	Reference probe 02333-L01826	12q23		
220	BRCA2 probe 01602-L01184			Exon 8
229	BRCA2 probe 01603-L01185			Exon 9
238	Reference probe 00517-L00097	2q13		
247	BRCA2 probe 01604-L01186			Exon 10
256 ∫	BRCA2 probe 02279-L01770			Exon 11 start
265	HSCB (HSC20) probe 06800-L02040		Promoter region	
274	BRCA2 probe 01606-L01188			Exon 11 end
283	BRCA2 probe 01607-L01189			Exon 12
292	Reference probe 03018-L02458	12q13		
301	BRCA2 probe 02280-L01771			Exon 13
309 ∫	BRCA2 probe 09809-L10257			Exon 5
319 ∫	BRCA2 probe 09296-L11090			Exon 27
326	BRCA2 probe 01610-L01192			Exon 15
337	BRCA2 probe 01611-L01193			Exon 16
346	BRCA2 probe 04585-L03983			Exon 6
355	BRCA2 probe 02281-L01772			Exon 17
364 ∫	BRCA2 probe 01613-L01195			Exon 18
373	Reference probe 02667-L04984	11q22		
382	BRCA2 probe 01614-L01196			Exon 19
391	BRCA2 probe 08266-L08129			Exon 20
400 ∫	CHEK2 probe 02579-L12282		Exon 11 (10)	
409	BRCA2 probe 02069-L01970			Exon 21
418	BRCA2 probe 01617-L01199			Exon 22
427	Reference probe 06942-L06522	11q12		
436	BRCA2 probe 08267-L08130			Exon 24
445	BRCA2 probe 08268-L08131			Exon 25
454	N4BP2L1 (CG018) probe 02144-L01619			9 kb after BRCA2
463	BRCA2 probe 11984-L15346			Exon 26
476 ∫	BRCA2 probe 09293-L15678			Exon 27
486	Reference probe 05028-L15679	2q32		
495 ∫	CHEK2 probe 01772-L15680		Exon 13 (12)	

P045 probes arranged according to chromosomal location BRCA2

Length (nt)	SALSA MLPA probe	BRCA2 Exon	Ligation site NM_000059.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
160	02143-L09586	FRY gene		GGCCAGAGTTA-CCGAGTCCTCAC	20.1 kb
		<i>start codon</i>	<i>228-230 (ex 2)</i>		
137	02283-L12281	Exon 1	0-1	CAGCGCGGGCTT-GTGGCGGAGCT	0.2 kb
148	02285-L01776	Exon 1	22 nt after exon 1	TGGTAGTGGGTT-GGGACGAGCGCG	0.8 kb
166	02486-L01985	Exon 2	271-270; reverse	AGCGTGTCTTAA-AAATTTCAAAAA	2.8 kb
178	01599-L10642	Exon 3	472-473	AATAATATTCAA-AGAGCAAGGGCT	0.2 kb
172 ∞ +	08898-L09587	Exon 3	107 nt after exon 3	CTGGGCAATCA-GTCTCTCTGGCC	5.7 kb
197	01600-L04671	Exon 4	569-570	AATAGTAGACAT-AAAAGTCTTCGC	1.0 kb
309 ∞	09809-L10257	Exon 5	688-689	TGTAACACCACA-AAGAGATAAGTC	0.1 kb
346	04585-L03983	Exon 6	728-727; reverse	ACAACTTTGGT-GTATGAAACAAA	0.3 kb
202	08265-L08128	Exon 7	812-813	ATGTCTTGGTCA-AGTTCTTTAGCT	2.6 kb
220	01602-L01184	Exon 8	264 nt before exon 8	TCTGACTTTCCA-ACTCATTGTGGA	1.8 kb
229	01603-L01185	Exon 9	1001-1002	AACACAAATCAA-AGAGAAGCTGCA	1.6 kb
247	01604-L01186	Exon 10	1374-1375	GAAGTGACAAAA-TCTCCAAGGAAG	3.7 kb
256 °	02279-L01770	Exon 11	2192-2193	TCTGAAGAACCA-ACTTTGTCTTA	4.8 kb
274	01606-L01188	Exon 11	6992-6993	TCTCTTTTACA-TGTCCCAGAAAT	3.3 kb
283	01607-L01189	Exon 12	183 nt before exon 12	AAACAGAACAAA-AATGTAATTGAC	2.5 kb
301	02280-L01771	Exon 13	7216-7215; reverse	GTACACAGGTAA-TCGGCTCTAAAG	8.2 kb
154	09297-L08066	Exon 14	7394-7395	TCTGCTACAAGA-AATGAAAAATG	1.5 kb
326	01610-L01192	Exon 15	7762-7763	CAGTCTGTATCT-TGCAAAAACATC	1.3 kb
337	01611-L01193	Exon 16	7975-7976	ACAGTTGGCTGA-TGGTGGATGGCT	4.8 kb
355	02281-L01772	Exon 17	8158-8157; reverse	TTAGGCATCTAT-TAGCAAATTCCT	0.8 kb
364 ~	01613-L01195	Exon 18	8482-8483	TCAGAAGATTAT-TCTTCATGGAGC	7.0 kb
382	01614-L01196	Exon 19	8602-8603	GTATACCAAACT-TGGATTCTTTCC	0.5 kb
391	08266-L08129	Exon 20	8743-8744	ATCTGGATTATA-CATATTTGCAAA	5.7 kb
409	02069-L01970	Exon 21	8909-8910	ACAAGACAGCAA-GTTCGTGCTTTG	2.7 kb
418	01617-L01199	Exon 22	9100-9101	TGCTGAACAAAA-GGAACAAGGTTT	0.3 kb
191	09812-L10643	Exon 23	9214-9215	ATCATCAGATTT-ATATTCTCTGTT	0.3 kb
436	08267-L08130	Exon 24	9455-9454; reverse	GAAACGACAAAT-CCTATTAGGTCC	14.8 kb
445	08268-L08131	Exon 25	9706-9707	AGAGACATTCAA-CAAAATGAAAAA	2.0 kb
463	11984-L15346	Exon 26	9786-9787	TACTGCATGCAA-ATGATCCCAAGT	1.3 kb
476 ±	09293-L15678	Exon 27	9988-9989	AAAGTCTTGTA-AGGGGAGAAAGA	0.6 kb
319 ±	09296-L11090	Exon 27	10638-10639	ATCGGGCAAAAA-TCGTTTTGCCCG	8.4 kb
		<i>stop codon</i>	<i>10482-10484 (ex 27)</i>		
454	02144-L01619	N4BP2L1 (CG018) gene		CATTATTATTGA-TAATACCAACCT	

CHEK2

Length (nt)	SALSA MLPA probe	CHEK2 Exon	Ligation site NM_007194.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
265	06800-L02040	HSCB gene/ CHEK2 promoter	2.1 kb before exon 1	TGGCTGAAGAAA-TCTGGGTGGACA	44.0 kb
400 ^	02579-L12282	Exon 11 (10)	1008-1009	CTGTTTGACAAA-GTGGTGGGAAT	4.0 kb
495 ^ §	01772-L15680	Exon 13 (12)	1173-1171; reverse	TGCCCCAAATCA-TAATCTAAATTT	



Bibliografía

1. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2012. 24-4-2014.
2. Cabanes,A., Vidal,E., Aragones,N., Perez-Gomez,B., Pollan,M., Lope,V., and Lopez-Abente,G. (2010) Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007. *Ann.Oncol.*, 21 Suppl 3, iii14-iii20.
3. Sanchez,M.J., Payer,T., De,A.R., Larranaga,N., Capocaccia,R., and Martinez,C. (2010) Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann.Oncol.*, 21 Suppl 3, iii30-iii36.
4. Chirlaque MD, Salmerón D, Cirera L, Tortosa J, Valera I, Párraga E, and Navarro C. Actualización epidemiológica. Cáncer de mama. Situación en la Región de Murcia. 1-5-2012.
5. Pollan,M., Michelena,M.J., Ardanaz,E., Izquierdo,A., Sanchez-Perez,M.J., and Torrella,A. (2010) Breast cancer incidence in Spain before, during and after the implementation of screening programmes. *Ann.Oncol.*, 21 Suppl 3, iii97-102.
6. Sant,M., Allemani,C., Santaquilani,M., Knijn,A., Marchesi,F., and Capocaccia,R. (2009) EUROCARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur.J.Cancer*, 45, 931-991.
7. (2009) *Breast Cancer. Risk factors. A review of the evidence*. National Breast and Ovarian Cancer Centre 2009, Surry Hills, NSW.
8. Thomas,D.B. (1993) Breast cancer in men. *Epidemiol.Rev.*, 15, 220-231.
9. Ries LAG, Harkins D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, and et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003. Bethesda,MD: National Cancer Institute . 1-11-2005. 6-9-2013.
10. Chen,Y., Thompson,W., Semenciw,R., and Mao,Y. (1999) Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 8, 855-861.
11. Trentham-Dietz,A., Newcomb,P.A., Storer,B.E., and Remington,P.L. (2000) Risk factors for carcinoma in situ of the breast. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 9, 697-703.
12. Erbas,B., Provenzano,E., Armes,J., and Gertig,D. (2006) The natural history of ductal carcinoma in situ of the breast: a review. *Breast Cancer Res.Treat.*, 97, 135-144.
13. Hartmann,L.C., Sellers,T.A., Frost,M.H., Lingle,W.L., Degnim,A.C., Ghosh,K., Vierkant,R.A., Maloney,S.D., Pankratz,V.S., Hillman,D.W., Suman,V.J., Johnson,J., Blake,C., Tlsty,T., Vachon,C.M., Melton,L.J., III, and Visscher,D.W. (2005) Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N.Engl.J.Med.*, 353, 229-237.
14. Boyd,N.F., Byng,J.W., Jong,R.A., Fishell,E.K., Little,L.E., Miller,A.B., Lockwood,G.A., Tritchler,D.L., and Yaffe,M.J. (1995) Quantitative classification of mammographic densities and breast cancer risk: results from the Canadian National Breast Screening Study. *J.Natl.Cancer Inst.*, 87, 670-675.
15. Hankinson,S.E. and Eliassen,A.H. (2007) Endogenous estrogen, testosterone and progesterone levels in relation to breast cancer risk. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 106, 24-30.
16. Renehan,A.G., Zwahlen,M., Minder,C., O'Dwyer,S.T., Shalet,S.M., and Egger,M. (2004) Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet*, 363, 1346-1353.
17. (1997) Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*, 350, 1047-1059.
18. Marchbanks,P.A., McDonald,J.A., Wilson,H.G., Folger,S.G., Mandel,M.G., Daling,J.R., Bernstein,L., Malone,K.E., Ursin,G., Strom,B.L., Norman,S.A., Wingo,P.A., Burkman,R.T., Berlin,J.A., Simon,M.S., Spirtas,R., and Weiss,L.K. (2002) Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N.Engl.J.Med.*, 346, 2025-2032.

19. Bernstein,L. (2002) Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, 7, 3-15.
20. Colditz G., Baer H., and Tamini R. (2005) *Epidemiology of breast cancer*. Oxford University Press, New York.
21. Kelsey,J.L., Gammon,M.D., and John,E.M. (1993) Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol.Rev.*, 15, 36-47.
22. Ewertz,M., Duffy,S.W., Adami,H.O., Kvale,G., Lund,E., Meirik,O., Møller,M., Soini,I., and Tulinius,H. (1990) Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int.J.Cancer*, 46, 597-603.
23. (2002) Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*, 360, 187-195.
24. Reeves,G.K., Kan,S.W., Key,T., Tjønneland,A., Olsen,A., Overvad,K., Peeters,P.H., Clavel-Chapelon,F., Paoletti,X., Berrino,F., Krogh,V., Palli,D., Tumino,R., Panico,S., Vineis,P., Gonzalez,C.A., Ardanaz,E., Martinez,C., Amiano,P., Quiros,J.R., Tormo,M.R., Khaw,K.T., Trichopoulou,A., Psaltopoulou,T., Kalapothaki,V., Nagel,G., Chang-Claude,J., Boeing,H., Lahmann,P.H., Wirfalt,E., Kaaks,R., and Riboli,E. (2006) Breast cancer risk in relation to abortion: Results from the EPIC study. *Int.J.Cancer*, 119, 1741-1745.
25. Gadducci,A., Biglia,N., Sismondi,P., and Genazzani,A.R. (2005) Breast cancer and sex steroids: critical review of epidemiological, experimental and clinical investigations on etiopathogenesis, chemoprevention and endocrine treatment of breast cancer. *Gynecol.Endocrinol.*, 20, 343-360.
26. Globocan 2008. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2010 . 7-9-2013.
27. van den Brandt,P.A., Spiegelman,D., Yaun,S.S., Adami,H.O., Beeson,L., Folsom,A.R., Fraser,G., Goldbohm,R.A., Graham,S., Kushi,L., Marshall,J.R., Miller,A.B., Rohan,T., Smith-Warner,S.A., Speizer,F.E., Willett,W.C., Wolk,A., and Hunter,D.J. (2000) Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am.J.Epidemiol.*, 152, 514-527.
28. Friedenreich,C.M. (2001) Review of anthropometric factors and breast cancer risk. *Eur.J.Cancer Prev.*, 10, 15-32.
29. Yang,X.R., Chang-Claude,J., Goode,E.L., Couch,F.J., Nevanlinna,H., Milne,R.L., Gaudet,M., Schmidt,M.K., Broeks,A., Cox,A., Fasching,P.A., Hein,R., Spurdle,A.B., Blows,F., Driver,K., Flesch-Janys,D., Heinz,J., Sinn,P., Vrieling,A., Heikkinen,T., Aittomäki,K., Heikkilä,P., Blomqvist,C., Lissowska,J., Peplonska,B., Chanock,S., Figueroa,J., Brinton,L., Hall,P., Czene,K., Humphreys,K., Darabi,H., Liu,J., van,' V, van Leeuwen,F.E., Andrulis,I.L., Glendon,G., Knight,J.A., Mulligan,A.M., O'Malley,F.P., Weerasooriya,N., John,E.M., Beckmann,M.W., Hartmann,A., Weibrecht,S.B., Wachter,D.L., Jud,S.M., Loehberg,C.R., Baglietto,L., English,D.R., Giles,G.G., McLean,C.A., Severi,G., Lambrechts,D., Vonderp, T., Weltens,C., Paridaens,R., Smeets,A., Neven,P., Wildiers,H., Wang,X., Olson,J.E., Caouere,V., Fredericksen,Z., Kosel,M., Vachon,C., Cramp,H.E., Connley,D., Cross,S.S., Balasubramanian,S.P., Reed,M.W., Dork,T., Bremer,M., Meyer,A., Karstens,J.H., Ay,A., Park-Simon,T.W., Hillemanns,P., rias Perez,J.I., Menendez,R.P., Zamora,P., Benitez,J., Ko,Y.D., Fischer,H.P., Hamann,U., Pesch,B., Bruning,T., Justenhoven,C., Brauch,H., Eccles,D.M., Tapper,W.J., Gerty,S.M., Sawyer,E.J., Tomlinson,I.P., Jones,A., Kerin,M., Miller,N., McInerney,N., nton-Culver,H., Ziogas,A., Shen,C.Y., Hsiung,C.N., Wu,P.E., Yang,S.L., Yu,J.C., Chen,S.T., Hsu,G.C., Haiman,C.A., Henderson,B.E., Le,M.L., Kolonel,L.N., Lindblom,A., Margolin,S., Jakubowska,A., Lubinski,J., Huzarski,T., Byrski,T., Gorski,B., Gronwald,J., Hooning,M.J., Hollestelle,A., van den Ouweland,A.M., Jager,A., Kriege,M., Tilanus-Linthorst,M.M., Collee,M., Wang-Gohrke,S., Pylkas,K., Jukkola-Vuorinen,A., Mononen,K., Grip,M., Hirvikoski,P., Winqvist,R., Mannermaa,A., Kosma,V.M., Kauppinen,J., Kataja,V., Auvinen,P., Soini,Y., Sironen,R., Bojesen,S.E., Orsted,D.D., Kaur-Knudsen,D., Flyger,H., Nordestgaard,B.G., Holland,H., Chenevix-Trench,G., Manoukian,S., Barile,M., Radice,P., Hankinson,S.E., Hunter,D.J., Tamimi,R., Sangrajrang,S., Brennan,P., McKay,J., Odeh,F., Gaborieau,V., Devilee,P., Huijts,P.E., Tollenaar,R.A., Seynaeve,C., Dite,G.S., Apicella,C., Hopper,J.L., Hammet,F., Tsimiklis,H., Smith,L.D., Southey,M.C., Humphreys,M.K., Easton,D., Pharoah,P., Sherman,M.E., and Garcia-Closas,M. (2011) Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *J Natl Cancer Inst*, 103, 250-263.

30. Willett W, Rockhill B, Hankinson S, Hunter D, and Colditz G. (2004) Epidemiology and Nongenetic Causes of Breast Cancer. In Harris J (ed.) *Diseases of the Breast*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
31. Boyd,N.F., Stone,J., Vogt,K.N., Connelly,B.S., Martin,L.J., and Minkin,S. (2003) Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. *Br.J.Cancer*, 89, 1672-1685.
32. Gerber,B., Muller,H., Reimer,T., Krause,A., and Friese,K. (2003) Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, 79, 265-276.
33. Alexander,D.D., Morimoto,L.M., Mink,P.J., and Lowe,K.A. (2010) Summary and meta-analysis of prospective studies of animal fat intake and breast cancer. *Nutr.Res Rev.*, 23, 169-179.
34. Smith-Warner,S.A., Spiegelman,D., Adami,H.O., Beeson,W.L., van den Brandt,P.A., Folsom,A.R., Fraser,G.E., Freudenheim,J.L., Goldbohm,R.A., Graham,S., Kushi,L.H., Miller,A.B., Rohan,T.E., Speizer,F.E., Toniolo,P., Willett,W.C., Wolk,A., Zeleniuch-Jacquotte,A., and Hunter,D.J. (2001) Types of dietary fat and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int.J Cancer*, 92, 767-774.
35. Hu,J., La,V.C., Augustin,L.S., Negri,E., de,G.M., Morrison,H., and Mery,L. (2013) Glycemic index, glycemic load and cancer risk. *Ann Oncol*, 24, 245-251.
36. Romieu,I., Ferrari,P., Rinaldi,S., Slimani,N., Jenab,M., Olsen,A., Tjonneland,A., Overvad,K., Boutron-Ruault,M.C., Lajous,M., Kaaks,R., Teucher,B., Boeing,H., Trichopoulou,A., Naska,A., Vasilopoulou,E., Sacerdote,C., Tumino,R., Masala,G., Sieri,S., Panico,S., Bueno-de-Mesquita,H.B., Van,d.A.D., van Gils,C.H., Peeters,P.H., Lund,E., Skeie,G., Asli,L.A., Rodriguez,L., Navarro,C., Amiano,P., Sanchez,M.J., Barricarte,A., Buckland,G., Sonestedt,E., Wirfalt,E., Hallmans,G., Johansson,I., Key,T.J., Allen,N.E., Khaw,K.T., Wareham,N.J., Norat,T., Riboli,E., and Clavel-Chapelon,F. (2012) Dietary glycemic index and glycemic load and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Am.J Clin Nutr.*, 96, 345-355.
37. Gunter,M.J., Hoover,D.R., Yu,H., Wassertheil-Smoller,S., Rohan,T.E., Manson,J.E., Li,J., Ho,G.Y., Xue,X., Anderson,G.L., Kaplan,R.C., Harris,T.G., Howard,B.V., Wylie-Rosett,J., Burk,R.D., and Strickler,H.D. (2009) Insulin, insulin-like growth factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*, 101, 48-60.
38. Lawlor,D.A., Smith,G.D., and Ebrahim,S. (2004) Hyperinsulinaemia and increased risk of breast cancer: findings from the British Women's Heart and Health Study. *Cancer Causes Control*, 15, 267-275.
39. Verheus,M., Peeters,P.H., Rinaldi,S., Dossus,L., Biessy,C., Olsen,A., Tjonneland,A., Overvad,K., Jeppesen,M., Clavel-Chapelon,F., Tehard,B., Nagel,G., Linseisen,J., Boeing,H., Lahmann,P.H., Arvaniti,A., Psaltopoulou,T., Trichopoulou,A., Palli,D., Tumino,R., Panico,S., Sacerdote,C., Sieri,S., van Gils,C.H., Bueno-de-Mesquita,B.H., Gonzalez,C.A., Ardanaz,E., Larranaga,N., Garcia,C.M., Navarro,C., Quiros,J.R., Key,T., Allen,N., Bingham,S., Khaw,K.T., Slimani,N., Riboli,E., and Kaaks,R. (2006) Serum C-peptide levels and breast cancer risk: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int.J Cancer*, 119, 659-667.
40. Barone,B.B., Yeh,H.C., Snyder,C.F., Peairs,K.S., Stein,K.B., Derr,R.L., Wolff,A.C., and Brancati,F.L. (2008) Long-term all-cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 300, 2754-2764.
41. Larsson,S.C., Mantzoros,C.S., and Wolk,A. (2007) Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int.J Cancer*, 121, 856-862.
42. Liao,S., Li,J., Wei,W., Wang,L., Zhang,Y., Li,J., Wang,C., and Sun,S. (2011) Association between diabetes mellitus and breast cancer risk: a meta-analysis of the literature. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12, 1061-1065.
43. Michels,K.B., Solomon,C.G., Hu,F.B., Rosner,B.A., Hankinson,S.E., Colditz,G.A., and Manson,J.E. (2003) Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study. *Diabetes Care*, 26, 1752-1758.
44. Del Giudice,M.E., Fantus,I.G., Ezzat,S., Keown-Eyssen,G., Page,D., and Goodwin,P.J. (1998) Insulin and related factors in premenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.*, 47, 111-120.

45. Eliassen,A.H., Tworoger,S.S., Mantzoros,C.S., Pollak,M.N., and Hankinson,S.E. (2007) Circulating insulin and c-peptide levels and risk of breast cancer among predominately premenopausal women. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 16, 161-164.
46. (2000) Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet. the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *Eur.J.Cancer*, 36, 1588.
47. (2007) *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research, Washington DC.
48. Blackmore,K.M., Lesosky,M., Barnett,H., Raboud,J.M., Vieth,R., and Knight,J.A. (2008) Vitamin D from dietary intake and sunlight exposure and the risk of hormone-receptor-defined breast cancer. *Am.J Epidemiol.*, 168, 915-924.
49. Brasky,T.M., Lampe,J.W., Potter,J.D., Patterson,R.E., and White,E. (2010) Specialty supplements and breast cancer risk in the VITamins And Lifestyle (VITAL) Cohort. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 19, 1696-1708.
50. Engel,P., Fagherazzi,G., Mesrine,S., Boutron-Ruault,M.C., and Clavel-Chapelon,F. (2011) Joint effects of dietary vitamin D and sun exposure on breast cancer risk: results from the French E3N cohort. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 20, 187-198.
51. Lin,J., Manson,J.E., Lee,I.M., Cook,N.R., Buring,J.E., and Zhang,S.M. (2007) Intakes of calcium and vitamin D and breast cancer risk in women. *Arch.Intern.Med*, 167, 1050-1059.
52. Shin,M.H., Holmes,M.D., Hankinson,S.E., Wu,K., Colditz,G.A., and Willett,W.C. (2002) Intake of dairy products, calcium, and vitamin d and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 94, 1301-1311.
53. Abbas,S., Linseisen,J., Rohrmann,S., Chang-Claude,J., Peeters,P.H., Engel,P., Brustad,M., Lund,E., Skeie,G., Olsen,A., Tjonneland,A., Overvad,K., Boutron-Ruault,M.C., Clavel-Chapelon,F., Fagherazzi,G., Kaaks,R., Boeing,H., Buijsse,B., Adarakis,G., Ouranos,V., Trichopoulou,A., Masala,G., Krogh,V., Mattiello,A., Tumino,R., Sacerdote,C., Buckland,G., Suarez,M.V., Sanchez,M.J., Chirlaque,M.D., Barricarte,A., Amiano,P., Manjer,J., Wirfalt,E., Lenner,P., Sund,M., Bueno-de-Mesquita,H.B., van Duijnhoven,F.J., Khaw,K.T., Wareham,N., Key,T.J., Fedirko,V., Romieu,I., Gallo,V., Norat,T., Wark,P.A., and Riboli,E. (2013) Dietary intake of vitamin D and calcium and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Nutr.Cancer*, 65, 178-187.
54. Chen,P., Hu,P., Xie,D., Qin,Y., Wang,F., and Wang,H. (2010) Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, 121, 469-477.
55. Chlebowski,R.T., Johnson,K.C., Kooperberg,C., Pettinger,M., Wactawski-Wende,J., Rohan,T., Rossouw,J., Lane,D., O'Sullivan,M.J., Yasmeen,S., Hiatt,R.A., Shikany,J.M., Vitolins,M., Khandekar,J., and Hubbell,F.A. (2008) Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 100, 1581-1591.
56. Edvardsen,K., Veierod,M.B., Brustad,M., Braaten,T., Engelsen,O., and Lund,E. (2011) Vitamin D-effective solar UV radiation, dietary vitamin D and breast cancer risk. *Int.J Cancer*, 128, 1425-1433.
57. Gissel,T., Rejnmark,L., Mosekilde,L., and Vestergaard,P. (2008) Intake of vitamin D and risk of breast cancer--a meta-analysis. *J Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 111, 195-199.
58. Kuper,H., Yang,L., Sandin,S., Lof,M., Adami,H.O., and Weiderpass,E. (2009) Prospective study of solar exposure, dietary vitamin D intake, and risk of breast cancer among middle-aged women. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 18, 2558-2561.
59. McCullough,M.L., Rodriguez,C., Diver,W.R., Feigelson,H.S., Stevens,V.L., Thun,M.J., and Calle,E.E. (2005) Dairy, calcium, and vitamin D intake and postmenopausal breast cancer risk in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 14, 2898-2904.
60. McCullough,M.L., Stevens,V.L., Patel,R., Jacobs,E.J., Bain,E.B., Horst,R.L., Gapstur,S.M., Thun,M.J., and Calle,E.E. (2009) Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and postmenopausal breast cancer risk: a nested case control study in the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. *Breast Cancer Res*, 11, R64.

61. Hamajima,N., Hirose,K., Tajima,K., Rohan,T., Calle,E.E., Heath,C.W., Jr., Coates,R.J., Liff,J.M., Talamini,R., Chantarakul,N., Koetsawang,S., Rachawat,D., Morabia,A., Schuman,L., Stewart,W., Szklo,M., Bain,C., Schofield,F., Siskind,V., Band,P., Coldman,A.J., Gallagher,R.P., Hislop,T.G., Yang,P., Kolonel,L.M., Nomura,A.M., Hu,J., Johnson,K.C., Mao,Y., De,S.S., Lee,N., Marchbanks,P., Ory,H.W., Peterson,H.B., Wilson,H.G., Wingo,P.A., Ebeling,K., Kunde,D., Nishan,P., Hopper,J.L., Colditz,G., Gajalanski,V., Martin,N., Pardthaisong,T., Silpisomkosol,S., Theetranont,C., Boosiri,B., Chutivongse,S., Jimakorn,P., Virutamasen,P., Wongsrichanalai,C., Ewertz,M., Adami,H.O., Bergkvist,L., Magnusson,C., Persson,I., Chang-Claude,J., Paul,C., Skegg,D.C., Spears,G.F., Boyle,P., Evstifeeva,T., Daling,J.R., Hutchinson,W.B., Malone,K., Noonan,E.A., Stanford,J.L., Thomas,D.B., Weiss,N.S., White,E., Andrieu,N., Bremond,A., Clavel,F., Gairard,B., Lansac,J., Piana,L., Renaud,R., Izquierdo,A., Viladiu,P., Cuevas,H.R., Ontiveros,P., Palet,A., Salazar,S.B., Aristizabel,N., Cuadros,A., Tryggvadottir,L., Tulinius,H., Bachelot,A., Le,M.G., Peto,J., Franceschi,S., Lubin,F., Modan,B., Ron,E., Wax,Y., Friedman,G.D., Hiatt,R.A., Levi,F., Bishop,T., Kosmelj,K., Primic-Zakelj,M., Ravnihar,B., Stare,J., Beeson,W.L., Fraser,G., Bullbrook,R.D., Cuzick,J., Duffy,S.W., Fentiman,I.S., Hayward,J.L., Wang,D.Y., McMichael,A.J., McPherson,K., Hanson,R.L., Leske,M.C., Mahoney,M.C., Nasca,P.C., Varma,A.O., Weinstein,A.L., Moller,T.R., Olsson,H., Ranstam,J., Goldbohm,R.A., van den Brandt,P.A., Apelo,R.A., Baens,J., de,I.C., Jr., Javier,B., Lacaya,L.B., Ngelangel,C.A., La,V.C., Negri,E., Marubini,E., Ferraroni,M., Gerber,M., Richardson,S., Segala,C., Gatei,D., Kenya,P., Kungu,A., Mati,J.G., Brinton,L.A., Hoover,R., Schairer,C., Spirtas,R., Lee,H.P., Rookus,M.A., van Leeuwen,F.E., Schoenberg,J.A., McCredie,M., Gammon,M.D., Clarke,E.A., Jones,L., Neil,A., Vessey,M., Yeates,D., Appleby,P., Banks,E., Beral,V., Bull,D., Crossley,B., Goodill,A., Green,J., Hermon,C., Key,T., Langston,N., Lewis,C., Reeves,G., Collins,R., Doll,R., Peto,R., Mabuchi,K., Preston,D., Hannaford,P., Kay,C., Rosero-Bixby,L., Gao,Y.T., Jin,F., Yuan,J.M., Wei,H.Y., Yun,T., Zhiheng,C., Berry,G., Cooper,B.J., Jelihovsky,T., MacLennan,R., Shearman,R., Wang,Q.S., Baines,C.J., Miller,A.B., Wall,C., Lund,E., Stalsberg,H., Shu,X.O., Zheng,W., Katsouyanni,K., Trichopoulou,A., Trichopoulos,D., Dabancens,A., Martinez,L., Molina,R., Salas,O., Alexander,F.E., Anderson,K., Folsom,A.R., Hulka,B.S., Bernstein,L., Enger,S., Haile,R.W., Paganini-Hill,A., Pike,M.C., Ross,R.K., Ursin,G., Yu,M.C., Longnecker,M.P., Newcomb,P., Bergkvist,L., Kalache,A., Farley,T.M., Holck,S., and Meirik,O. (2002) Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br.J.Cancer*, 87, 1234-1245.
62. Khuder,S.A., Mutgi,A.B., and Nugent,S. (2001) Smoking and breast cancer: a meta-analysis. *Rev.Environ.Health*, 16, 253-261.
63. Morabia,A. (2002) Smoking (active and passive) and breast cancer: epidemiologic evidence up to June 2001. *Environ.Mol.Mutagen.*, 39, 89-95.
64. Terry,P.D. and Rohan,T.E. (2002) Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 11, 953-971.
65. Pirie,K., Beral,V., Peto,R., Roddam,A., Reeves,G., and Green,J. (2008) Passive smoking and breast cancer in never smokers: prospective study and meta-analysis. *Int.J Epidemiol.*, 37, 1069-1079.
66. Boyd,N.F., Stone,J., Martin,L.J., Jong,R., Fishell,E., Yaffe,M., Hammond,G., and Minkin,S. (2002) The association of breast mitogens with mammographic densities. *Br.J Cancer*, 87, 876-882.
67. Andrieu,N., Easton,D.F., Chang-Claude,J., Rookus,M.A., Brohet,R., Cardis,E., Antoniou,A.C., Wagner,T., Simard,J., Evans,G., Peock,S., Fricker,J.P., Nogues,C., Van't,V.L., van Leeuwen,F.E., and Goldgar,D.E. (2006) Effect of chest X-rays on the risk of breast cancer among BRCA1/2 mutation carriers in the international BRCA1/2 carrier cohort study: a report from the EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and IBCCS Collaborators' Group. *J Clin Oncol*, 24, 3361-3366.
68. (2002) Non-ionizing radiation. Part 1, static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon.
69. Feychting,M. and Forssen,U. (2006) Electromagnetic fields and female breast cancer. *Cancer Causes Control*, 17, 553-558.
70. Schernhammer,E.S. and Hankinson,S.E. (2009) Urinary melatonin levels and postmenopausal breast cancer risk in the Nurses' Health Study cohort. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 18, 74-79.

71. Rudel,R.A., Attfield,K.R., Schifano,J.N., and Brody,J.G. (2007) Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. *Cancer*, 109, 2635-2666.
72. Brody,J.G., Moysich,K.B., Humblet,O., Attfield,K.R., Beehler,G.P., and Rudel,R.A. (2007) Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies. *Cancer*, 109, 2667-2711.
73. Duijts,S.F., Zeegers,M.P., and Borne,B.V. (2003) The association between stressful life events and breast cancer risk: a meta-analysis. *Int.J Cancer*, 107, 1023-1029.
74. O'Donnell,M.C., Fisher,R., Irvine,K., Rickard,M., and McConaghy,N. (2000) Emotional suppression: can it predict cancer outcome in women with suspicious screening mammograms? *Psychol.Med*, 30, 1079-1088.
75. White,V.M., English,D.R., Coates,H., Lagerlund,M., Borland,R., and Giles,G.G. (2007) Is cancer risk associated with anger control and negative affect? Findings from a prospective cohort study. *Psychosom Med*, 69, 667-674.
76. Helgesson,O., Cabrera,C., Lapidus,L., Bengtsson,C., and Lissner,L. (2003) Self-reported stress levels predict subsequent breast cancer in a cohort of Swedish women. *Eur J Cancer Prev*, 12, 377-381.
77. Lillberg,K., Verkasalo,P.K., Kaprio,J., Teppo,L., Helenius,H., and Koskenvuo,M. (2001) Stress of daily activities and risk of breast cancer: a prospective cohort study in Finland. *Int.J Cancer*, 91, 888-893.
78. Nielsen,N.R., Zhang,Z.F., Kristensen,T.S., Netterstrom,B., Schnohr,P., and Gronbaek,M. (2005) Self reported stress and risk of breast cancer: prospective cohort study. *BMJ*, 331, 548.
79. (2001) Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*, 358, 1389-1399.
80. Rebbeck,T.R. (1999) Inherited genetic predisposition in breast cancer. A population-based perspective. *Cancer*, 86, 2493-2501.
81. Weber,B.L. and Nathanson,K.L. (2000) Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *Eur.J.Cancer*, 36, 1193-1199.
82. Peto,J. and Mack,T.M. (2000) High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. *Nat.Genet.*, 26, 411-414.
83. Claus,E.B., Risch,N., and Thompson,W.D. (1991) Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am.J.Hum.Genet.*, 48, 232-242.
84. Hall,J.M., Lee,M.K., Newman,B., Morrow,J.E., Anderson,L.A., Huey,B., and King,M.C. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250, 1684-1689.
85. Miki,Y., Swensen,J., Shattuck-Eidens,D., Futreal,P.A., Harshman,K., Tavtigian,S., Liu,Q., Cochran,C., Bennett,L.M., Ding,W., and . (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266, 66-71.
86. Newman,B., Austin,M.A., Lee,M., and King,M.C. (1988) Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 85, 3044-3048.
87. Hussain,S.P. and Harris,C.C. (1998) Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.*, 58, 4023-4037.
88. Apostolou,P. and Fostira,F. (2013) Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed.Res.Int.*, 2013, 747318.
89. Wooster,R., Bignell,G., Lancaster,J., Swift,S., Seal,S., Mangion,J., Collins,N., Gregory,S., Gumbs,C., and Mickletham,G. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378, 789-792.
90. Antoniou,A., Pharoah,P.D., Narod,S., Risch,H.A., Eyfjord,J.E., Hopper,J.L., Loman,N., Olsson,H., Johannsson,O., Borg,A., Pasini,B., Radice,P., Manoukian,S., Eccles,D.M., Tang,N., Olah,E., nton-

- Culver,H., Warner,E., Lubinski,J., Gronwald,J., Gorski,B., Tulinius,H., Thorlacius,S., Eerola,H., Nevanlinna,H., Syrjakoski,K., Kallioniemi,O.P., Thompson,D., Evans,C., Peto,J., Lalloo,F., Evans,D.G., and Easton,D.F. (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am.J.Hum.Genet.*, 72, 1117-1130.
91. Borresen-Dale,A.L. (2003) TP53 and breast cancer. *Hum.Mutat.*, 21, 292-300.
 92. Chen,J., Lindblom,P., and Lindblom,A. (1998) A study of the PTEN/MMAC1 gene in 136 breast cancer families. *Hum.Genet.*, 102, 124-125.
 93. Evans,D.G., Birch,J.M., Thorneycroft,M., McGown,G., Lalloo,F., and Varley,J.M. (2002) Low rate of TP53 germline mutations in breast cancer/sarcoma families not fulfilling classical criteria for Li-Fraumeni syndrome. *J.Med.Genet.*, 39, 941-944.
 94. Leggett,B.A., Young,J.P., and Barker,M. (2003) Peutz-Jeghers syndrome: genetic screening. *Expert.Rev.Anticancer Ther.*, 3, 518-524.
 95. Pharoah,P.D., Guilford,P., and Caldas,C. (2001) Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*, 121, 1348-1353.
 96. Meindl,A., Hellebrand,H., Wiek,C., Erven,V., Wappenschmidt,B., Niederacher,D., Freund,M., Lichtner,P., Hartmann,L., Schaal,H., Ramser,J., Honisch,E., Kubisch,C., Wichmann,H.E., Kast,K., Deissler,H., Engel,C., Muller-Myhsok,B., Neveling,K., Kiechle,M., Mathew,C.G., Schindler,D., Schmutzler,R.K., and Hanenberg,H. (2010) Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat.Genet.*, 42, 410-414.
 97. Rahman,N., Seal,S., Thompson,D., Kelly,P., Renwick,A., Elliott,A., Reid,S., Spanova,K., Barfoot,R., Chagtai,T., Jayatilake,H., McGuffog,L., Hanks,S., Evans,D.G., Eccles,D., Easton,D.F., and Stratton,M.R. (2007) PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat.Genet.*, 39, 165-167.
 98. Seal,S., Thompson,D., Renwick,A., Elliott,A., Kelly,P., Barfoot,R., Chagtai,T., Jayatilake,H., Ahmed,M., Spanova,K., North,B., McGuffog,L., Evans,D.G., Eccles,D., Easton,D.F., Stratton,M.R., and Rahman,N. (2006) Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat.Genet.*, 38, 1239-1241.
 99. Shamseldin,H.E., Elfaki,M., and Alkuraya,F.S. (2012) Exome sequencing reveals a novel Fanconi group defined by XRCC2 mutation. *J.Med.Genet.*, 49, 184-186.
 100. Loveday,C., Turnbull,C., Ramsay,E., Hughes,D., Ruark,E., Frankum,J.R., Bowden,G., Kalmrzaev,B., Warren-Perry,M., Snape,K., Adlard,J.W., Barwell,J., Berg,J., Brady,A.F., Brewer,C., Brice,G., Chapman,C., Cook,J., Davidson,R., Donaldson,A., Douglas,F., Greenhalgh,L., Henderson,A., Izatt,L., Kumar,A., Lalloo,F., Miedzybrodzka,Z., Morrison,P.J., Paterson,J., Porteous,M., Rogers,M.T., Shanley,S., Walker,L., Eccles,D., Evans,D.G., Renwick,A., Seal,S., Lord,C.J., Ashworth,A., Reis-Filho,J.S., Antoniou,A.C., and Rahman,N. (2011) Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat.Genet.*, 43, 879-882.
 101. Meijers-Heijboer,H., van den,O.A., Klijn,J., Wasielewski,M., de,S.A., Oldenburg,R., Hollestelle,A., Houben,M., Crepin,E., van Veghel-Plandsoen,M., Elstrodt,F., van,D.C., Bartels,C., Meijers,C., Schutte,M., McGuffog,L., Thompson,D., Easton,D., Sodha,N., Seal,S., Barfoot,R., Mangion,J., Chang-Claude,J., Eccles,D., Eeles,R., Evans,D.G., Houlston,R., Murday,V., Narod,S., Peretz,T., Peto,J., Phelan,C., Zhang,H.X., Szabo,C., Devilee,P., Goldgar,D., Futreal,P.A., Nathanson,K.L., Weber,B., Rahman,N., and Stratton,M.R. (2002) Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat.Genet.*, 31, 55-59.
 102. Orr,N., Lemnrau,A., Cooke,R., Fletcher,O., Tomczyk,K., Jones,M., Johnson,N., Lord,C.J., Mitsopoulos,C., Zvelebil,M., McDade,S.S., Buck,G., Blancher,C., Trainer,A.H., James,P.A., Bojesen,S.E., Bokmand,S., Nevanlinna,H., Mattson,J., Friedman,E., Laitman,Y., Palli,D., Masala,G., Zanna,I., Ottini,L., Giannini,G., Hollestelle,A., Ouweland,A.M., Novakovic,S., Krajc,M., Gago-Dominguez,M., Castela,J.E., Olsson,H., Hedenfalk,I., Easton,D.F., Pharoah,P.D., Dunning,A.M., Bishop,D.T., Neuhausen,S.L., Steele,L., Houlston,R.S., Garcia-Closas,M., Ashworth,A., and Swerdlow,A.J. (2012) Genome-wide association study

- identifies a common variant in RAD51B associated with male breast cancer risk. *Nat.Genet.*, 44, 1182-1184.
103. Thompson,D., Duedal,S., Kirner,J., McGuffog,L., Last,J., Reiman,A., Byrd,P., Taylor,M., and Easton,D.F. (2005) Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J.Natl.Cancer Inst.*, 97, 813-822.
 104. Heikkinen,K., Rapakko,K., Karppinen,S.M., Erkkö,H., Knuutila,S., Lundan,T., Mannermaa,A., Borresen-Dale,A.L., Borg,A., Barkardottir,R.B., Petrini,J., and Winqvist,R. (2006) RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. *Carcinogenesis*, 27, 1593-1599.
 105. Michailidou,K., Hall,P., Gonzalez-Neira,A., Ghoussaini,M., Dennis,J., Milne,R.L., Schmidt,M.K., Chang-Claude,J., Bojesen,S.E., Bolla,M.K., Wang,Q., Dicks,E., Lee,A., Turnbull,C., Rahman,N., Fletcher,O., Peto,J., Gibson,L., Dos,S.S., I, Nevanlinna,H., Muranen,T.A., Aittomäki,K., Blomqvist,C., Czene,K., Irwanto,A., Liu,J., Waisfisz,Q., Meijers-Heijboer,H., Adank,M., van der Luijt,R.B., Hein,R., Dahmen,N., Beckman,L., Meindl,A., Schmutzler,R.K., Müller-Miyhsok,B., Lichtner,P., Hopper,J.L., Southey,M.C., Makalic,E., Schmidt,D.F., Uitterlinden,A.G., Hofman,A., Hunter,D.J., Chanock,S.J., Vincent,D., Bacot,F., Tessier,D.C., Canisius,S., Wessels,L.F., Haiman,C.A., Shah,M., Luben,R., Brown,J., Luccarini,C., Schoof,N., Humphreys,K., Li,J., Nordestgaard,B.G., Nielsen,S.F., Flyger,H., Couch,F.J., Wang,X., Vachon,C., Stevens,K.N., Lambrechts,D., Moisse,M., Paridaens,R., Christiaens,M.R., Rudolph,A., Nickels,S., Flesch-Janys,D., Johnson,N., Aitken,Z., Aaltonen,K., Heikkinen,T., Broeks,A., Veer,L.J., van der Schoot,C.E., Guenel,P., Truong,T., Laurent-Puig,P., Menegaux,F., Marme,F., Schneeweiss,A., Sohn,C., Burwinkel,B., Zamora,M.P., Perez,J.I., Pita,G., Alonso,M.R., Cox,A., Brock,I.W., Cross,S.S., Reed,M.W., Sawyer,E.J., Tomlinson,I., Kerin,M.J., Miller,N., Henderson,B.E., Schumacher,F., Le,M.L., Andrulis,I.L., Knight,J.A., Glendon,G., Mulligan,A.M., Lindblom,A., Margolin,S., Hooning,M.J., Hollestelle,A., van den Ouweland,A.M., Jager,A., Bui,Q.M., Stone,J., Dite,G.S., Apicella,C., Tsimiklis,H., Giles,G.G., Severi,G., Baglietto,L., Fasching,P.A., Haeberle,L., Ekici,A.B., Beckmann,M.W., Brenner,H., Müller,H., Arndt,V., Stegmaier,C., Swerdlow,A., Ashworth,A., Orr,N., Jones,M., Figueroa,J., Lissowska,J., Brinton,L., Goldberg,M.S., Labreche,F., Dumont,M., Winqvist,R., Pylkas,K., Jukkola-Vuorinen,A., Grip,M., Brauch,H., Hamann,U., Brüning,T., Radice,P., Peterlongo,P., Manoukian,S., Bonanni,B., Devilee,P., Tollenaar,R.A., Seynaeve,C., van Asperen,C.J., Jakubowska,A., Lubinski,J., Jaworska,K., Durda,K., Mannermaa,A., Kataja,V., Kosma,V.M., Hartikainen,J.M., Bogdanova,N.V., Antonenkova,N.N., Dork,T., Kristensen,V.N., nton-Culver,H., Slager,S., Toland,A.E., Edge,S., Fostira,F., Kang,D., Yoo,K.Y., Noh,D.Y., Matsuo,K., Ito,H., Iwata,H., Sueta,A., Wu,A.H., Tseng,C.C., Van Den,B.D., Stram,D.O., Shu,X.O., Lu,W., Gao,Y.T., Cai,H., Teo,S.H., Yip,C.H., Phuah,S.Y., Cornes,B.K., Hartman,M., Miao,H., Lim,W.Y., Sng,J.H., Muir,K., Lophatananon,A., Stewart-Brown,S., Siriwanarangsang,P., Shen,C.Y., Hsiung,C.N., Wu,P.E., Ding,S.L., Sangrajrang,S., Gaborieau,V., Brennan,P., McKay,J., Blot,W.J., Signorello,L.B., Cai,Q., Zheng,W., ming-Halverson,S., Shrubsole,M., Long,J., Simard,J., Garcia-Closas,M., Pharoah,P.D., Chenevix-Trench,G., Dunning,A.M., Benitez,J., and Easton,D.F. (2013) Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat.Genet.*, 45, 353-2.
 106. Easton,D.F., Pooley,K.A., Dunning,A.M., Pharoah,P.D., Thompson,D., Ballinger,D.G., Struwing,J.P., Morrison,J., Field,H., Luben,R., Wareham,N., Ahmed,S., Healey,C.S., Bowman,R., Meyer,K.B., Haiman,C.A., Kolonel,L.K., Henderson,B.E., Le,M.L., Brennan,P., Sangrajrang,S., Gaborieau,V., Odefrey,F., Shen,C.Y., Wu,P.E., Wang,H.C., Eccles,D., Evans,D.G., Peto,J., Fletcher,O., Johnson,N., Seal,S., Stratton,M.R., Rahman,N., Chenevix-Trench,G., Bojesen,S.E., Nordestgaard,B.G., Axelsson,C.K., Garcia-Closas,M., Brinton,L., Chanock,S., Lissowska,J., Peplonska,B., Nevanlinna,H., Fagerholm,R., Eerola,H., Kang,D., Yoo,K.Y., Noh,D.Y., Ahn,S.H., Hunter,D.J., Hankinson,S.E., Cox,D.G., Hall,P., Wedren,S., Liu,J., Low,Y.L., Bogdanova,N., Schurmann,P., Dork,T., Tollenaar,R.A., Jacobi,C.E., Devilee,P., Klijn,J.G., Sigurdson,A.J., Doody,M.M., Alexander,B.H., Zhang,J., Cox,A., Brock,I.W., MacPherson,G., Reed,M.W., Couch,F.J., Goode,E.L., Olson,J.E., Meijers-Heijboer,H., van den,O.A., Uitterlinden,A., Rivadeneira,F., Milne,R.L., Ribas,G., Gonzalez-Neira,A., Benitez,J., Hopper,J.L., McCredie,M., Southey,M., Giles,G.G., Schroen,C., Justenhoven,C., Brauch,H., Hamann,U., Ko,Y.D., Spurdle,A.B., Beesley,J., Chen,X., Mannermaa,A., Kosma,V.M., Kataja,V., Hartikainen,J., Day,N.E., Cox,D.R., and Ponder,B.A. (2007) Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*, 447, 1087-1093.
 107. Cox,A., Dunning,A.M., Garcia-Closas,M., Balasubramanian,S., Reed,M.W., Pooley,K.A., Scollen,S., Baynes,C., Ponder,B.A., Chanock,S., Lissowska,J., Brinton,L., Peplonska,B., Southey,M.C., Hopper,J.L., McCredie,M.R., Giles,G.G., Fletcher,O., Johnson,N., Dos,S.S., I, Gibson,L., Bojesen,S.E., Nordestgaard,B.G., Axelsson,C.K., Torres,D., Hamann,U., Justenhoven,C., Brauch,H., Chang-Claude,J., Kropp,S., Risch,A., Wang-Gohrke,S., Schurmann,P., Bogdanova,N., Dork,T., Fagerholm,R., Aaltonen,K., Blomqvist,C., Nevanlinna,H., Seal,S., Renwick,A., Stratton,M.R., Rahman,N., Sangrajrang,S., Hughes,D., Odefrey,F., Brennan,P., Spurdle,A.B., Chenevix-Trench,G., Beesley,J., Mannermaa,A., Hartikainen,J., Kataja,V., Kosma,V.M., Couch,F.J., Olson,J.E., Goode,E.L., Broeks,A., Schmidt,M.K., Hogervorst,F.B.,

- Van't Veer,L.J., Kang,D., Yoo,K.Y., Noh,D.Y., Ahn,S.H., Wedren,S., Hall,P., Low,Y.L., Liu,J., Milne,R.L., Ribas,G., Gonzalez-Neira,A., Benitez,J., Sigurdson,A.J., Stredrick,D.L., Alexander,B.H., Struwing,J.P., Pharoah,P.D., and Easton,D.F. (2007) A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat.Genet.*, 39, 352-358.
108. Rosa-Rosa,J.M., Pita,G., Urioste,M., Llorca,G., Brunet,J., Lazaro,C., Blanco,I., Cajal,T., Diez,O., de la,H.M., Caldes,T., Tejada,M.I., Gonzalez-Neira,A., and Benitez,J. (2009) Genome-wide linkage scan reveals three putative breast-cancer-susceptibility loci. *Am.J.Hum.Genet.*, 84, 115-122.
109. Stacey,S.N., Manolescu,A., Sulem,P., Thorlacius,S., Gudjonsson,S.A., Jonsson,G.F., Jakobsdottir,M., Bergthorsson,J.T., Gudmundsson,J., Aben,K.K., Strobbe,L.J., Swinkels,D.W., van Engelenburg,K.C., Henderson,B.E., Kolonel,L.N., Le,M.L., Millastre,E., Andres,R., Saez,B., Lambea,J., Godino,J., Polo,E., Tres,A., Picelli,S., Rantala,J., Margolin,S., Jonsson,T., Sigurdsson,H., Jonsdottir,T., Hrafnkelsson,J., Johannsson,J., Sveinsson,T., Myrdal,G., Grimsson,H.N., Sveinsdottir,S.G., Alexiusdottir,K., Saemundsdottir,J., Sigurdsson,A., Kostic,J., Gudmundsson,L., Kristjansson,K., Masson,G., Fackenthal,J.D., Adebamowo,C., Ogundiran,T., Olopade,O.I., Haiman,C.A., Lindblom,A., Mayordomo,J.I., Kiemeny,L.A., Gulcher,J.R., Rafnar,T., Thorsteinsdottir,U., Johannsson,O.T., Kong,A., and Stefansson,K. (2008) Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat.Genet.*, 40, 703-706.
110. Gracia-Aznarez,F.J., Fernandez,V., Pita,G., Peterlongo,P., Dominguez,O., de la,H.M., Duran,M., Osorio,A., Moreno,L., Gonzalez-Neira,A., Rosa-Rosa,J.M., Sinilnikova,O., Mazoyer,S., Hopper,J., Lazaro,C., Southey,M., Odefrey,F., Manoukian,S., Catucci,I., Caldes,T., Lynch,H.T., Hilbers,F.S., van Asperen,C.J., Vasen,H.F., Goldgar,D., Radice,P., Devilee,P., and Benitez,J. (2013) Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. *PLoS.One.*, 8, e55681.
111. Wooster,R. and Weber,B.L. (2003) Breast and ovarian cancer. *N.Engl.J.Med.*, 348, 2339-2347.
112. Marquis,S.T., Rajan,J.V., Wynshaw-Boris,A., Xu,J., Yin,G.Y., Abel,K.J., Weber,B.L., and Chodosh,L.A. (1995) The developmental pattern of Brca1 expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nat.Genet.*, 11, 17-26.
113. Rajan,J.V., Wang,M., Marquis,S.T., and Chodosh,L.A. (1996) Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc.Natl Acad Sci.U.S.A.*, 93, 13078-13083.
114. Easton,D.F., Ford,D., and Bishop,D.T. (1995) Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am.J.Hum.Genet.*, 56, 265-271.
115. Schubert,E.L., Lee,M.K., Mefford,H.C., Argonza,R.H., Morrow,J.E., Hull,J., Dann,J.L., and King,M.C. (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.
116. Kurian,A.W. (2010) BRCA1 and BRCA2 mutations across race and ethnicity: distribution and clinical implications. *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.*, 22, 72-78.
117. Foulkes,W.D. and Shuen,A.Y. (2013) In brief: BRCA1 and BRCA2. *J.Pathol.*, 230, 347-349.
118. Meza,J.E., Brzovic,P.S., King,M.C., and Kleit,R.E. (1999) Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. *J.Biol.Chem.*, 274, 5659-5665.
119. Huen,M.S., Sy,S.M., and Chen,J. (2010) BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 11, 138-148.
120. Yun,M.H. and Hiom,K. (2009) CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*, 459, 460-463.
121. Zhang,F., Fan,Q., Ren,K., and Andreassen,P.R. (2009) PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol.Cancer Res.*, 7, 1110-1118.

122. Zhang,F., Ma,J., Wu,J., Ye,L., Cai,H., Xia,B., and Yu,X. (2009) PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr.Biol.*, 19, 524-529.
123. Manke,I.A., Lowery,D.M., Nguyen,A., and Yaffe,M.B. (2003) BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*, 302, 636-639.
124. Yu,X., Chini,C.C., He,M., Mer,G., and Chen,J. (2003) The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*, 302, 639-642.
125. Mohammad,D.H. and Yaffe,M.B. (2009) 14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 8, 1009-1017.
126. Weissman,A.M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 2, 169-178.
127. Reinstein,E. and Ciechanover,A. (2006) Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection. *Ann Intern.Med*, 145, 676-684.
128. Wu,L.C., Wang,Z.W., Tsan,J.T., Spillman,M.A., Phung,A., Xu,X.L., Yang,M.C., Hwang,L.Y., Bowcock,A.M., and Baer,R. (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat.Genet.*, 14, 430-440.
129. Baer,R. and Ludwig,T. (2002) The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 12, 86-91.
130. Brzovic,P.S., Keefe,J.R., Nishikawa,H., Miyamoto,K., Fox,D., III, Fukuda,M., Ohta,T., and Klevit,R. (2003) Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 5646-5651.
131. Ruffner,H., Joazeiro,C.A., Hemmati,D., Hunter,T., and Verma,I.M. (2001) Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98, 5134-5139.
132. Wu,W., Koike,A., Takeshita,T., and Ohta,T. (2008) The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Div.*, 3, 1.
133. Chen,A., Kleiman,F.E., Manley,J.L., Ouchi,T., and Pan,Z.Q. (2002) Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *J.Biol.Chem.*, 277, 22085-22092.
134. Horwitz,A.A., Affar,e.B., Heine,G.F., Shi,Y., and Parvin,J.D. (2007) A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 104, 6614-6619.
135. Mallery,D.L., Vandenberg,C.J., and Hiom,K. (2002) Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *EMBO J.*, 21, 6755-6762.
136. Yu,X., Fu,S., Lai,M., Baer,R., and Chen,J. (2006) BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. *Genes Dev.*, 20, 1721-1726.
137. Reid,L.J., Shakya,R., Modi,A.P., Lokshin,M., Cheng,J.T., Jasin,M., Baer,R., and Ludwig,T. (2008) E3 ligase activity of BRCA1 is not essential for mammalian cell viability or homology-directed repair of double-strand DNA breaks. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105, 20876-20881.
138. Shakya,R., Reid,L.J., Reczek,C.R., Cole,F., Egli,D., Lin,C.S., deRooij,D.G., Hirsch,S., Ravi,K., Hicks,J.B., Szabolcs,M., Jasin,M., Baer,R., and Ludwig,T. (2011) BRCA1 tumor suppression depends on BRCT phosphoprotein binding, but not its E3 ligase activity. *Science*, 334, 525-528.
139. Clark,S.L., Rodriguez,A.M., Snyder,R.R., Hankins,G.D., and Boehning,D. (2012) Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Comput.Struct.Biotechnol.J.*, 1.
140. Lindahl,T. and Barnes,D.E. (2000) Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 65, 127-133.
141. Khanna,K.K. and Jackson,S.P. (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat.Genet.*, 27, 247-254.

142. Jackson,S.P. and Bartek,J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461, 1071-1078.
143. Bouwman,P. and Jonkers,J. (2012) The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat.Rev.Cancer*, 12, 587-598.
144. Brandsma,I. and Gent,D.C. (2012) Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr.*, 3, 9.
145. Lin,F.L., Sperle,K., and Sternberg,N. (1984) Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol.Cell Biol.*, 4, 1020-1034.
146. Moynahan,M.E. and Jasin,M. (2010) Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 11, 196-207.
147. Sobhian,B., Shao,G., Lilli,D.R., Culhane,A.C., Moreau,L.A., Xia,B., Livingston,D.M., and Greenberg,R.A. (2007) RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science*, 316, 1198-1202.
148. Yan,J., Kim,Y.S., Yang,X.P., Li,L.P., Liao,G., Xia,F., and Jetten,A.M. (2007) The ubiquitin-interacting motif containing protein RAP80 interacts with BRCA1 and functions in DNA damage repair response. *Cancer Res.*, 67, 6647-6656.
149. Wang,B., Matsuoka,S., Ballif,B.A., Zhang,D., Smogorzewska,A., Gygi,S.P., and Elledge,S.J. (2007) Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science*, 316, 1194-1198.
150. Ayoub,N., Rajendra,E., Su,X., Jeyasekharan,A.D., Mahen,R., and Venkitaraman,A.R. (2009) The carboxyl terminus of Brca2 links the disassembly of Rad51 complexes to mitotic entry. *Curr.Biol.*, 19, 1075-1085.
151. Bergink,S. and Jentsch,S. (2009) Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature*, 458, 461-467.
152. Gravel,S., Chapman,J.R., Magill,C., and Jackson,S.P. (2008) DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev.*, 22, 2767-2772.
153. Huertas,P. and Jackson,S.P. (2009) Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J.Biol.Chem.*, 284, 9558-9565.
154. Mimitou,E.P. and Symington,L.S. (2008) Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, 455, 770-774.
155. Nimonkar,A.V., Ozsoy,A.Z., Genschel,J., Modrich,P., and Kowalczykowski,S.C. (2008) Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 105, 16906-16911.
156. Sartori,A.A., Lukas,C., Coates,J., Mistrik,M., Fu,S., Bartek,J., Baer,R., Lukas,J., and Jackson,S.P. (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450, 509-514.
157. Chen,L., Nievera,C.J., Lee,A.Y., and Wu,X. (2008) Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J.Biol.Chem.*, 283, 7713-7720.
158. Schlegel,B.P., Jodelka,F.M., and Nunez,R. (2006) BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation. *Cancer Res.*, 66, 5181-5189.
159. Yu,X. and Chen,J. (2004) DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol.Cell Biol.*, 24, 9478-9486.
160. Sy,S.M., Huen,M.S., and Chen,J. (2009) PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 106, 7155-7160.
161. Roy,R., Chun,J., and Powell,S.N. (2012) BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat.Rev.Cancer*, 12, 68-78.

162. Stark,J.M., Pierce,A.J., Oh,J., Pastink,A., and Jasin,M. (2004) Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Mol.Cell Biol.*, 24, 9305-9316.
163. Zhong,Q., Boyer,T.G., Chen,P.L., and Lee,W.H. (2002) Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from Brca1-null fibroblasts. *Cancer Res.*, 62, 3966-3970.
164. Moynahan,M.E., Chiu,J.W., Koller,B.H., and Jasin,M. (1999) Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol.Cell*, 4, 511-518.
165. Snouwaert,J.N., Gowen,L.C., Latour,A.M., Mohn,A.R., Xiao,A., DiBiase,L., and Koller,B.H. (1999) BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a brca1 transgene. *Oncogene*, 18, 7900-7907.
166. Wang,H., Zeng,Z.C., Bui,T.A., DiBiase,S.J., Qin,W., Xia,F., Powell,S.N., and Iliakis,G. (2001) Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. *Cancer Res.*, 61, 270-277.
167. Fabbro,M., Savage,K., Hobson,K., Deans,A.J., Powell,S.N., McArthur,G.A., and Khanna,K.K. (2004) BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. *J.Biol.Chem.*, 279, 31251-31258.
168. Xu,B., Kim,S., and Kastan,M.B. (2001) Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol.Cell Biol.*, 21, 3445-3450.
169. Cantor,S.B., Bell,D.W., Ganesan,S., Kass,E.M., Drapkin,R., Grossman,S., Wahrer,D.C., Sgroi,D.C., Lane,W.S., Haber,D.A., and Livingston,D.M. (2001) BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell*, 105, 149-160.
170. Greenberg,R.A., Sobhian,B., Pathania,S., Cantor,S.B., Nakatani,Y., and Livingston,D.M. (2006) Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev.*, 20, 34-46.
171. Kim,J.E., McAvoy,S.A., Smith,D.I., and Chen,J. (2005) Human TopBP1 ensures genome integrity during normal S phase. *Mol.Cell Biol.*, 25, 10907-10915.
172. Kumaraswamy,E. and Shiekhatar,R. (2007) Activation of BRCA1/BRCA2-associated helicase BACH1 is required for timely progression through S phase. *Mol.Cell Biol.*, 27, 6733-6741.
173. Makiniemi,M., Hillukkala,T., Tuusa,J., Reini,K., Vaara,M., Huang,D., Pospiech,H., Majuri,I., Westerling,T., Makela,T.P., and Syvaoja,J.E. (2001) BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J.Biol.Chem.*, 276, 30399-30406.
174. Wang,B. (2012) BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail. *Cell Biosci.*, 2, 6.
175. O'Donovan,P.J. and Livingston,D.M. (2010) BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*, 31, 961-967.
176. Chapman,M.S. and Verma,I.M. (1996) Transcriptional activation by BRCA1. *Nature*, 382, 678-679.
177. Monteiro,A.N., August,A., and Hanafusa,H. (1996) Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 13595-13599.
178. Scully,R., Anderson,S.F., Chao,D.M., Wei,W., Ye,L., Young,R.A., Livingston,D.M., and Parvin,J.D. (1997) BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94, 5605-5610.
179. Mullan,P.B., Quinn,J.E., and Harkin,D.P. (2006) The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene*, 25, 5854-5863.
180. Rosen,E.M., Fan,S., and Ma,Y. (2006) BRCA1 regulation of transcription. *Cancer Lett.*, 236, 175-185.

181. Aiyar,S.E., Cho,H., Lee,J., and Li,R. (2007) Concerted transcriptional regulation by BRCA1 and COBRA1 in breast cancer cells. *Int.J.Biol.Sci.*, 3, 486-492.
182. Kennedy,R.D., Gorski,J.J., Quinn,J.E., Stewart,G.E., James,C.R., Moore,S., Mulligan,K., Emberley,E.D., Lioe,T.F., Morrison,P.J., Mullan,P.B., Reid,G., Johnston,P.G., Watson,P.H., and Harkin,D.P. (2005) BRCA1 and c-Myc associate to transcriptionally repress psoriasin, a DNA damage-inducible gene. *Cancer Res.*, 65, 10265-10272.
183. Satih,S., Chalabi,N., Rabiau,N., Bignon,Y.J., and Bernard-Gallon,D.J. (2010) Transcriptional profiling of breast cancer cells exposed to soy phytoestrogens after BRCA1 knockdown with a whole human genome microarray approach. *Nutr.Cancer*, 62, 659-667.
184. Welsh,P.L., Lee,M.K., Gonzalez-Hernandez,R.M., Black,D.J., Mahadevappa,M., Swisher,E.M., Warrington,J.A., and King,M.C. (2002) BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99, 7560-7565.
185. Gorski,J.J., Savage,K.I., Mulligan,J.M., McDade,S.S., Blayney,J.K., Ge,Z., and Harkin,D.P. (2011) Profiling of the BRCA1 transcriptome through microarray and ChIP-chip analysis. *Nucleic Acids Res.*, 39, 9536-9548.
186. Holstege,H., Joosse,S.A., van Oostrom,C.T., Nederlof,P.M., de,V.A., and Jonkers,J. (2009) High incidence of protein-truncating TP53 mutations in BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res.*, 69, 3625-3633.
187. Phillips,K.A., Nichol,K., Ozcelik,H., Knight,J., Done,S.J., Goodwin,P.J., and Andrulis,I.L. (1999) Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 mutations. *J.Natl.Cancer Inst.*, 91, 469-473.
188. Jiang,J., Yang,E.S., Jiang,G., Nowsheen,S., Wang,H., Wang,T., Wang,Y., Billheimer,D., Chakravarthy,A.B., Brown,M., Haffty,B., and Xia,F. (2011) p53-dependent BRCA1 nuclear export controls cellular susceptibility to DNA damage. *Cancer Res.*, 71, 5546-5557.
189. Yarden,R.I. and Brody,L.C. (1999) BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 4983-4988.
190. Chai,Y.L., Cui,J., Shao,N., Shyam,E., Reddy,P., and Rao,V.N. (1999) The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene*, 18, 263-268.
191. Bochar,D.A., Wang,L., Beniya,H., Kinev,A., Xue,Y., Lane,W.S., Wang,W., Kashanchi,F., and Shiekhattar,R. (2000) BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell*, 102, 257-265.
192. Chang,S. and Sharan,S.K. (2013) The role of epigenetic transcriptional regulation in BRCA1-mediated tumor suppression. *Transcription.*, 4, 24-28.
193. Gunes,C. and Rudolph,K.L. (2013) The role of telomeres in stem cells and cancer. *Cell*, 152, 390-393.
194. Ribeyre,C. and Shore,D. (2013) Regulation of telomere addition at DNA double-strand breaks. *Chromosoma*, 122, 159-173.
195. Nandakumar,J. and Cech,T.R. (2013) Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 14, 69-82.
196. Lamarche,B.J., Orazio,N.I., and Weitzman,M.D. (2010) The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.*, 584, 3682-3695.
197. Al-Wahiby,S. and Slijepcevic,P. (2005) Chromosomal aberrations involving telomeres in BRCA1 deficient human and mouse cell lines. *Cytogenet.Genome Res*, 109, 491-496.
198. Ballal,R.D., Saha,T., Fan,S., Haddad,B.R., and Rosen,E.M. (2009) BRCA1 localization to the telomere and its loss from the telomere in response to DNA damage. *J Biol.Chem.*, 284, 36083-36098.

199. McPherson,J.P., Hande,M.P., Poonepalli,A., Lemmers,B., Zabolcki,E., Migon,E., Shehabeldin,A., Porras,A., Karaskova,J., Vukovic,B., Squire,J., and Hakem,R. (2006) A role for Brca1 in chromosome end maintenance. *Hum.Mol.Genet.*, 15, 831-838.
200. Wang,X., Liu,L., Montagna,C., Ried,T., and Deng,C.X. (2007) Haploinsufficiency of Parp1 accelerates Brca1-associated centrosome amplification, telomere shortening, genetic instability, apoptosis, and embryonic lethality. *Cell Death.Differ.*, 14, 924-931.
201. Xiong,J., Fan,S., Meng,Q., Schramm,L., Wang,C., Bouzahza,B., Zhou,J., Zafonte,B., Goldberg,I.D., Haddad,B.R., Pestell,R.G., and Rosen,E.M. (2003) BRCA1 inhibition of telomerase activity in cultured cells. *Mol.Cell Biol.*, 23, 8668-8690.
202. Cabuy,E., Newton,C., and Slijepcevic,P. (2008) BRCA1 knock-down causes telomere dysfunction in mammary epithelial cells. *Cytogenet.Genome Res*, 122, 336-342.
203. Wooster,R., Neuhausen,S.L., Mangion,J., Quirk,Y., Ford,D., Collins,N., Nguyen,K., Seal,S., Tran,T., Averill,D., and . (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265, 2088-2090.
204. Moynahan,M.E., Pierce,A.J., and Jasin,M. (2001) BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol.Cell*, 7, 263-272.
205. Yang,H., Jeffrey,P.D., Miller,J., Kinnucan,E., Sun,Y., Thoma,N.H., Zheng,N., Chen,P.L., Lee,W.H., and Pavletich,N.P. (2002) BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*, 297, 1837-1848.
206. Kojic,M., Yang,H., Kostrub,C.F., Pavletich,N.P., and Holloman,W.K. (2003) The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol.Cell*, 12, 1043-1049.
207. Kristensen,C.N., Bystol,K.M., Li,B., Serrano,L., and Brenneman,M.A. (2010) Depletion of DSS1 protein disables homologous recombinational repair in human cells. *Mutat.Res.*, 694, 60-64.
208. Li,J., Zou,C., Bai,Y., Wazer,D.E., Band,V., and Gao,Q. (2006) DSS1 is required for the stability of BRCA2. *Oncogene*, 25, 1186-1194.
209. Oliver,A.W., Swift,S., Lord,C.J., Ashworth,A., and Pearl,L.H. (2009) Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep.*, 10, 990-996.
210. Esashi,F., Christ,N., Gannon,J., Liu,Y., Hunt,T., Jasin,M., and West,S.C. (2005) CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*, 434, 598-604.
211. Sharan,S.K., Morimatsu,M., Albrecht,U., Lim,D.S., Regel,E., Dinh,C., Sands,A., Eichele,G., Hasty,P., and Bradley,A. (1997) Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature*, 386, 804-810.
212. Wong,A.K., Pero,R., Ormonde,P.A., Tavtigian,S.V., and Bartel,P.L. (1997) RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J Biol.Chem.*, 272, 31941-31944.
213. Venkitaraman,A.R. (2009) Linking the cellular functions of BRCA genes to cancer pathogenesis and treatment. *Annu.Rev.Pathol.*, 4, 461-487.
214. Pellegrini,L., Yu,D.S., Lo,T., Anand,S., Lee,M., Blundell,T.L., and Venkitaraman,A.R. (2002) Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, 420, 287-293.
215. Carreira,A., Hilario,J., Amitani,I., Baskin,R.J., Shivji,M.K., Venkitaraman,A.R., and Kowalczykowski,S.C. (2009) The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51. *Cell*, 136, 1032-1043.
216. Thorslund,T., Esashi,F., and West,S.C. (2007) Interactions between human BRCA2 protein and the meiosis-specific recombinase DMC1. *EMBO J*, 26, 2915-2922.

217. Milner,J., Ponder,B., Hughes-Davies,L., Selmann,M., and Kouzarides,T. (1997) Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature*, 386, 772-773.
218. Esashi,F., Galkin,V.E., Yu,X., Egelman,E.H., and West,S.C. (2007) Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, 14, 468-474.
219. Petalcorin,M.I., Sandall,J., Wigley,D.B., and Boulton,S.J. (2006) CeBRC-2 stimulates D-loop formation by RAD-51 and promotes DNA single-strand annealing. *J.Mol.Biol.*, 361, 231-242.
220. Saeki,H., Siaud,N., Christ,N., Wiegant,W.W., van Buul,P.P., Han,M., Zdzienicka,M.Z., Stark,J.M., and Jasin,M. (2006) Suppression of the DNA repair defects of BRCA2-deficient cells with heterologous protein fusions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 103, 8768-8773.
221. Yang,H., Li,Q., Fan,J., Holloman,W.K., and Pavletich,N.P. (2005) The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature*, 433, 653-657.
222. Jensen,R.B., Carreira,A., and Kowalczykowski,S.C. (2010) Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*, 467, 678-683.
223. Liu,J., Doty,T., Gibson,B., and Heyer,W.D. (2010) Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, 17, 1260-1262.
224. Thorslund,T., McIlwraith,M.J., Compton,S.A., Lekontsev,S., Petronczki,M., Griffith,J.D., and West,S.C. (2010) The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat.Struct.Mol.Biol.*, 17, 1263-1265.
225. Patel,K.J., Yu,V.P., Lee,H., Corcoran,A., Thistlethwaite,F.C., Evans,M.J., Colledge,W.H., Friedman,L.S., Ponder,B.A., and Venkitaraman,A.R. (1998) Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol.Cell*, 1, 347-357.
226. Xu,X., Weaver,Z., Linke,S.P., Li,C., Gotay,J., Wang,X.W., Harris,C.C., Ried,T., and Deng,C.X. (1999) Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol.Cell*, 3, 389-395.
227. Tutt,A., Gabriel,A., Bertwistle,D., Connor,F., Paterson,H., Peacock,J., Ross,G., and Ashworth,A. (1999) Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr.Biol.*, 9, 1107-1110.
228. Yu,V.P., Koehler,M., Steinlein,C., Schmid,M., Hanakahi,L.A., van Gool,A.J., West,S.C., and Venkitaraman,A.R. (2000) Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev.*, 14, 1400-1406.
229. Baumann,P., Benson,F.E., and West,S.C. (1996) Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*, 87, 757-766.
230. Sung,P. (1994) Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science*, 265, 1241-1243.
231. Benson,F.E., Stasiak,A., and West,S.C. (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *EMBO J.*, 13, 5764-5771.
232. Sung,P. and Robberson,D.L. (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell*, 82, 453-461.
233. Rajendra,E. and Venkitaraman,A.R. (2010) Two modules in the BRC repeats of BRCA2 mediate structural and functional interactions with the RAD51 recombinase. *Nucleic Acids Res.*, 38, 82-96.
234. Kowalczykowski,S.C. (2002) Molecular mimicry connects BRCA2 to Rad51 and recombinational DNA repair. *Nat.Struct.Biol.*, 9, 897-899.
235. Moldovan,G.L. and D'Andrea,A.D. (2009) How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu.Rev.Genet.*, 43, 223-249.

236. Howlett,N.G., Taniguchi,T., Olson,S., Cox,B., Waisfisz,Q., De Die-Smulders,C., Persky,N., Grompe,M., Joenje,H., Pals,G., Ikeda,H., Fox,E.A., and D'Andrea,A.D. (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*, 297, 606-609.
237. D'Andrea,A.D. and Grompe,M. (2003) The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat.Rev.Cancer*, 3, 23-34.
238. Venkitaraman,A.R. (2004) Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat.Rev.Cancer*, 4, 266-276.
239. Offit,K., Levran,O., Mullaney,B., Mah,K., Nafa,K., Batish,S.D., Diotti,R., Schneider,H., Deffenbaugh,A., Scholl,T., Proud,V.K., Robson,M., Norton,L., Ellis,N., Hanenberg,H., and Auerbach,A.D. (2003) Shared genetic susceptibility to breast cancer, brain tumors, and Fanconi anemia. *J.Natl.Cancer Inst.*, 95, 1548-1551.
240. Howlett,N.G., Taniguchi,T., Olson,S., Cox,B., Waisfisz,Q., De Die-Smulders,C., Persky,N., Grompe,M., Joenje,H., Pals,G., Ikeda,H., Fox,E.A., and D'Andrea,A.D. (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*, 297, 606-609.
241. Schlacher,K., Christ,N., Siaud,N., Egashira,A., Wu,H., and Jasin,M. (2011) Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell*, 145, 529-542.
242. Marmorstein,L.Y., Kinev,A.V., Chan,G.K., Bochar,D.A., Beniya,H., Epstein,J.A., Yen,T.J., and Shiekhatar,R. (2001) A human BRCA2 complex containing a structural DNA binding component influences cell cycle progression. *Cell*, 104, 247-257.
243. Lee,H., Trainer,A.H., Friedman,L.S., Thistlethwaite,F.C., Evans,M.J., Ponder,B.A., and Venkitaraman,A.R. (1999) Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, Brca2. *Mol.Cell*, 4, 1-10.
244. Diez,O., Gutierrez-Enriquez,S., Cajal,T., Alonso,C., Balmana,J., and Lloret,G. (2007) Caution should be used when interpreting alterations affecting the exon 3 of the BRCA2 gene in breast/ovarian cancer families. *J.Clin.Oncol.*, 25, 5035-5036.
245. Marmorstein,L.Y., Ouchi,T., and Aaronson,S.A. (1998) The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95, 13869-13874.
246. Fuks,F., Milner,J., and Kouzarides,T. (1998) BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene*, 17, 2531-2534.
247. Altinisik,J., Karateke,A., Coksuer,H., Ulutin,T., and Buyru,N. (2011) Expression of EMSY gene in sporadic ovarian cancer. *Mol.Biol.Rep.*, 38, 359-363.
248. Brown,L.A., Irving,J., Parker,R., Kim,H., Press,J.Z., Longacre,T.A., Chia,S., Magliocco,A., Makretsov,N., Gilks,B., Pollack,J., and Huntsman,D. (2006) Amplification of EMSY, a novel oncogene on 11q13, in high grade ovarian surface epithelial carcinomas. *Gynecol.Oncol.*, 100, 264-270.
249. Hughes-Davies,L., Huntsman,D., Ruas,M., Fuks,F., Bye,J., Chin,S.F., Milner,J., Brown,L.A., Hsu,F., Gilks,B., Nielsen,T., Schulzer,M., Chia,S., Ragaz,J., Cahn,A., Linger,L., Ozdag,H., Cattaneo,E., Jordanova,E.S., Schuurin,E., Yu,D.S., Venkitaraman,A., Ponder,B., Doherty,A., Aparicio,S., Bentley,D., Theillet,C., Ponting,C.P., Caldas,C., and Kouzarides,T. (2003) EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. *Cell*, 115, 523-535.
250. Raouf,A., Brown,L., Vrcelj,N., To,K., Kwok,W., Huntsman,D., and Eaves,C.J. (2005) Genomic instability of human mammary epithelial cells overexpressing a truncated form of EMSY. *J.Natl.Cancer Inst.*, 97, 1302-1306.
251. Meraldi,P., Honda,R., and Nigg,E.A. (2004) Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 14, 29-36.
252. Yang,F., Guo,X., Yang,G., Rosen,D.G., and Liu,J. (2011) AURKA and BRCA2 expression highly correlate with prognosis of endometrioid ovarian carcinoma. *Mod.Pathol.*, 24, 836-845.

253. Yang,G., Chang,B., Yang,F., Guo,X., Cai,K.Q., Xiao,X.S., Wang,H., Sen,S., Hung,M.C., Mills,G.B., Chang,S., Multani,A.S., Mercado-Uribe,I., and Liu,J. (2010) Aurora kinase A promotes ovarian tumorigenesis through dysregulation of the cell cycle and suppression of BRCA2. *Clin.Cancer Res.*, 16, 3171-3181.
254. Stefansson,O.A., Jonasson,J.G., Johannsson,O.T., Olafsdottir,K., Steinarsdottir,M., Valgeirsdottir,S., and Eyfjord,J.E. (2009) Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res.*, 11, R47.
255. Xia,B., Sheng,Q., Nakanishi,K., Ohashi,A., Wu,J., Christ,N., Liu,X., Jasin,M., Couch,F.J., and Livingston,D.M. (2006) Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol.Cell*, 22, 719-729.
256. Chang,S., Biswas,K., Martin,B.K., Stauffer,S., and Sharan,S.K. (2009) Expression of human BRCA1 variants in mouse ES cells allows functional analysis of BRCA1 mutations. *J.Clin.Invest*, 119, 3160-3171.
257. Alter,B.P. and Kupfer,G. (1993) Fanconi Anemia.
258. Feng,Z., Scott,S.P., Bussen,W., Sharma,G.G., Guo,G., Pandita,T.K., and Powell,S.N. (2011) Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 108, 686-691.
259. Cressman,V.L., Backlund,D.C., Hicks,E.M., Gowen,L.C., Godfrey,V., and Koller,B.H. (1999) Mammary tumor formation in p53- and BRCA1-deficient mice. *Cell Growth Differ.*, 10, 1-10.
260. Jonkers,J., Meuwissen,R., van der,G.H., Peterse,H., van,d., V, and Berns,A. (2001) Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat.Genet.*, 29, 418-425.
261. King,T.A., Li,W., Brogi,E., Yee,C.J., Gemignani,M.L., Olvera,N., Levine,D.A., Norton,L., Robson,M.E., Offit,K., Borgen,P.I., and Boyd,J. (2007) Heterogenic loss of the wild-type BRCA allele in human breast tumorigenesis. *Ann Surg.Oncol*, 14, 2510-2518.
262. Meek,D.W. (2009) Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat.Rev.Cancer*, 9, 714-723.
263. Cao,L., Kim,S., Xiao,C., Wang,R.H., Coumoul,X., Wang,X., Li,W.M., Xu,X.L., De Soto,J.A., Takai,H., Mai,S., Elledge,S.J., Motoyama,N., and Deng,C.X. (2006) ATM-Chk2-p53 activation prevents tumorigenesis at an expense of organ homeostasis upon Brca1 deficiency. *EMBO J*, 25, 2167-2177.
264. Sullivan,A., Yuille,M., Repellin,C., Reddy,A., Reelfs,O., Bell,A., Dunne,B., Gusterson,B.A., Osin,P., Farrell,P.J., Yulug,I., Evans,A., Ozcelik,T., Gasco,M., and Crook,T. (2002) Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. *Oncogene*, 21, 1316-1324.
265. Fan,S., Wang,J., Yuan,R., Ma,Y., Meng,Q., Erdos,M.R., Pestell,R.G., Yuan,F., Auborn,K.J., Goldberg,I.D., and Rosen,E.M. (1999) BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science*, 284, 1354-1356.
266. Zhu,Q., Pao,G.M., Huynh,A.M., Suh,H., Tonnu,N., Nederlof,P.M., Gage,F.H., and Verma,I.M. (2011) BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature*, 477, 179-184.
267. Hamada,J., Nakata,D., Nakae,D., Kobayashi,Y., Akai,H., Konishi,Y., Okada,F., Shibata,T., Hosokawa,M., and Moriuchi,T. (2001) Increased oxidative DNA damage in mammary tumor cells by continuous epidermal growth factor stimulation. *J Natl Cancer Inst*, 93, 214-219.
268. Lavigne,J.A., Goodman,J.E., Fonong,T., Odwin,S., He,P., Roberts,D.W., and Yager,J.D. (2001) The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer Res*, 61, 7488-7494.
269. Malins,D.C., Holmes,E.H., Polissar,N.L., and Gunselman,S.J. (1993) The etiology of breast cancer. Characteristic alteration in hydroxyl radical-induced DNA base lesions during oncogenesis with potential for evaluating incidence risk. *Cancer*, 71, 3036-3043.

270. Sipe,H.J., Jr., Jordan,S.J., Hanna,P.M., and Mason,R.P. (1994) The metabolism of 17 beta-estradiol by lactoperoxidase: a possible source of oxidative stress in breast cancer. *Carcinogenesis*, 15, 2637-2643.
271. Callagy,G., Cattaneo,E., Daigo,Y., Happerfield,L., Bobrow,L.G., Pharoah,P.D., and Caldas,C. (2003) Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn.Mol.Pathol.*, 12, 27-34.
272. Korsching,E., Packeisen,J., Agelopoulos,K., Eisenacher,M., Voss,R., Isola,J., van Diest,P.J., Brandt,B., Boecker,W., and Buerger,H. (2002) Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest*, 82, 1525-1533.
273. Lacroix,M. and Leclercq,G. (2004) Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.*, 83, 249-289.
274. Sorlie,T., Tibshirani,R., Parker,J., Hastie,T., Marron,J.S., Nobel,A., Deng,S., Johnsen,H., Pesich,R., Geisler,S., Demeter,J., Perou,C.M., Lonning,P.E., Brown,P.O., Borresen-Dale,A.L., and Botstein,D. (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc.Natl Acad Sci.U.S.A*, 100, 8418-8423.
275. van de,R.M., Perou,C.M., Tibshirani,R., Haas,P., Kallioniemi,O., Kononen,J., Torhorst,J., Sauter,G., Zuber,M., Kochli,O.R., Mross,F., Dieterich,H., Seitz,R., Ross,D., Botstein,D., and Brown,P. (2002) Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am.J Pathol.*, 161, 1991-1996.
276. Sorlie,T., Perou,C.M., Tibshirani,R., Aas,T., Geisler,S., Johnsen,H., Hastie,T., Eisen,M.B., van de,R.M., Jeffrey,S.S., Thorsen,T., Quist,H., Matese,J.C., Brown,P.O., Botstein,D., Lonning,P.E., and Borresen-Dale,A.L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc.Natl Acad Sci.U.S.A*, 98, 10869-10874.
277. Loi,S., Sotiriou,C., Haibe-Kains,B., Lallemand,F., Conus,N.M., Piccart,M.J., Speed,T.P., and McArthur,G.A. (2009) Gene expression profiling identifies activated growth factor signaling in poor prognosis (Luminal-B) estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Med Genomics*, 2, 37.
278. Sotiriou,C. and Pusztai,L. (2009) Gene-expression signatures in breast cancer. *N.Engl J Med*, 360, 790-800.
279. Wirapati,P., Sotiriou,C., Kunkel,S., Farmer,P., Pradervand,S., Haibe-Kains,B., Desmedt,C., Ignatiadis,M., Sengstag,T., Schutz,F., Goldstein,D.R., Piccart,M., and Delorenzi,M. (2008) Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res*, 10, R65.
280. Loi,S., Haibe-Kains,B., Desmedt,C., Lallemand,F., Tutt,A.M., Gillet,C., Ellis,P., Harris,A., Bergh,J., Foekens,J.A., Klijn,J.G., Larsimont,D., Buyse,M., Bontempi,G., Delorenzi,M., Piccart,M.J., and Sotiriou,C. (2007) Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol*, 25, 1239-1246.
281. Lakhani,S.R., Reis-Filho,J.S., Fulford,L., Penault-Llorca,F., van,d., V, Parry,S., Bishop,T., Benitez,J., Rivas,C., Bignon,Y.J., Chang-Claude,J., Hamann,U., Cornelisse,C.J., Devilee,P., Beckmann,M.W., Nestle-Kramling,C., Daly,P.A., Haites,N., Varley,J., Lalloo,F., Evans,G., Maugard,C., Meijers-Heijboer,H., Klijn,J.G., Olah,E., Gusterson,B.A., Pilotti,S., Radice,P., Scherneck,S., Sobol,H., Jacquemier,J., Wagner,T., Peto,J., Stratton,M.R., McGuffog,L., and Easton,D.F. (2005) Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res*, 11, 5175-5180.
282. Palacios,J., Honrado,E., Osorio,A., Cazorla,A., Sarrio,D., Barroso,A., Rodriguez,S., Cigudosa,J.C., Diez,O., Alonso,C., Lerma,E., Sanchez,L., Rivas,C., and Benitez,J. (2003) Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Clin Cancer Res*, 9, 3606-3614.
283. Lakhani,S.R., van,d., V, Jacquemier,J., Anderson,T.J., Osin,P.P., McGuffog,L., and Easton,D.F. (2002) The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*, 20, 2310-2318.

284. Palacios,J., Honrado,E., Osorio,A., Diez,O., Rivas,C., and Benitez,J. (2004) Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 96, 712-714.
285. Foulkes,W.D., Stefansson,I.M., Chappuis,P.O., Begin,L.R., Goffin,J.R., Wong,N., Trudel,M., and Akslen,L.A. (2003) Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1482-1485.
286. Nielsen,T.O., Hsu,F.D., Jensen,K., Cheang,M., Karaca,G., Hu,Z., Hernandez-Boussard,T., Livasy,C., Cowan,D., Dressler,L., Akslen,L.A., Ragaz,J., Gown,A.M., Gilks,C.B., van de,R.M., and Perou,C.M. (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10, 5367-5374.
287. Melchor,L. and Benitez,J. (2008) An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis*, 29, 1475-1482.
288. van der,G.P., Bouter,A., van der,Z.R., Siccama,I., Menko,F.H., Gille,J.J., van,K.C., van der,W.E., Verheijen,R.H., and van Diest,P.J. (2006) Distinction between hereditary and sporadic breast cancer on the basis of clinicopathological data. *J Clin Pathol.*, 59, 611-617.
289. Farshid,G., Balleine,R.L., Cummings,M., and Waring,P. (2006) Morphology of breast cancer as a means of triage of patients for BRCA1 genetic testing. *Am.J Surg.Pathol.*, 30, 1357-1366.
290. Eisinger,F., Nogues,C., Guinebretiere,J.M., Peyrat,J.P., Bardou,V.J., Noguchi,T., Vennin,P., Sauvan,R., Lidereau,R., Birnbaum,D., Jacquemier,J., and Sobol,H. (1999) Novel indications for BRCA1 screening using individual clinical and morphological features. *Int.J Cancer*, 84, 263-267.
291. Mulligan,A.M., Pinnaduwa,D., Bane,A.L., Bull,S.B., O'Malley,F.P., and Andrulis,I.L. (2011) CK8/18 expression, the basal phenotype, and family history in identifying BRCA1-associated breast cancer in the Ontario site of the breast cancer family registry. *Cancer*, 117, 1350-1359.
292. Balleine,R.L., Provan,P.J., Pupo,G.M., Pathmanathan,N., Cummings,M., Farshid,G., Salisbury,E.L., Bilous,A.M., Byth,K., and Mann,G.J. (2010) Familial concordance of breast cancer pathology as an indicator of genotype in multiple-case families. *Genes Chromosomes.Cancer*, 49, 1082-1094.
293. Bane,A.L., Pinnaduwa,D., Colby,S., Reedijk,M., Egan,S.E., Bull,S.B., O'Malley,F.P., and Andrulis,I.L. (2009) Expression profiling of familial breast cancers demonstrates higher expression of FGFR2 in BRCA2-associated tumors. *Breast Cancer Res.Treat.*, 117, 183-191.
294. Lakhani,S.R., Jacquemier,J., Sloane,J.P., Gusterson,B.A., Anderson,T.J., van,d, V, Farid,L.M., Venter,D., Antoniou,A., Storer-Isser,A., Smyth,E., Steel,C.M., Haite,N., Scott,R.J., Goldgar,D., Neuhausen,S., Daly,P.A., Ormiston,W., McManus,R., Scherneck,S., Ponder,B.A., Ford,D., Peto,J., Stoppa-Lyonnet,D., Bignon,Y.J., Struwing,J.P., Spurr,N.K., Bishop,D.T., Klijn,J.G., Devilee,P., Cornelisse,C.J., Lasset,C., Lenoir,G., Barkardottir,R.B., Egilsson,V., Hamann,U., Chang-Claude,J., Sobol,H., Weber,B., Stratton,M.R., and Easton,D.F. (1998) Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1138-1145.
295. Honrado,E., Osorio,A., Palacios,J., Milne,R.L., Sanchez,L., Diez,O., Cazorla,A., Syrjakoski,K., Huntsman,D., Heikkila,P., Lerma,E., Kallioniemi,A., Rivas,C., Foulkes,W.D., Nevanlinna,H., and Benitez,J. (2005) Immunohistochemical expression of DNA repair proteins in familial breast cancer differentiate BRCA2-associated tumors. *J Clin Oncol*, 23, 7503-7511.
296. Cheung,A.M., Elia,A., Tsao,M.S., Done,S., Wagner,K.U., Hennighausen,L., Hakem,R., and Mak,T.W. (2004) Brca2 deficiency does not impair mammary epithelium development but promotes mammary adenocarcinoma formation in p53(+/-) mutant mice. *Cancer Res*, 64, 1959-1965.
297. Ongusaha,P.P., Ouchi,T., Kim,K.T., Nytko,E., Kwak,J.C., Duda,R.B., Deng,C.X., and Lee,S.W. (2003) BRCA1 shifts p53-mediated cellular outcomes towards irreversible growth arrest. *Oncogene*, 22, 3749-3758.
298. Xu,X., Qiao,W., Linke,S.P., Cao,L., Li,W.M., Furth,P.A., Harris,C.C., and Deng,C.X. (2001) Genetic interactions between tumor suppressors Brca1 and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nat.Genet.*, 28, 266-271.

299. Simpson,P.T., Reis-Filho,J.S., Lambros,M.B., Jones,C., Steele,D., Mackay,A., Iravani,M., Fenwick,K., Dexter,T., Jones,A., Reid,L., Da,S.L., Shin,S.J., Hardisson,D., Ashworth,A., Schmitt,F.C., Palacios,J., and Lakhani,S.R. (2008) Molecular profiling pleomorphic lobular carcinomas of the breast: evidence for a common molecular genetic pathway with classic lobular carcinomas. *J Pathol.*, 215, 231-244.
300. (1997) Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet*, 349, 1505-1510.
301. Adem,C., Reynolds,C., Soderberg,C.L., Slezak,J.M., McDonnell,S.K., Sebo,T.J., Schaid,D.J., Myers,J.L., Sellers,T.A., Hartmann,L.C., and Jenkins,R.B. (2003) Pathologic characteristics of breast parenchyma in patients with hereditary breast carcinoma, including BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer*, 97, 1-11.
302. Claus,E.B., Petruzella,S., Matloff,E., and Carter,D. (2005) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in women diagnosed with ductal carcinoma in situ. *JAMA*, 293, 964-969.
303. Hwang,E.S., McLennan,J.L., Moore,D.H., Crawford,B.B., Esserman,L.J., and Ziegler,J.L. (2007) Ductal carcinoma in situ in BRCA mutation carriers. *J Clin Oncol*, 25, 642-647.
304. Rijnsburger,A.J., Obdeijn,I.M., Kaas,R., Tilanus-Linthorst,M.M., Boetes,C., Loo,C.E., Wasser,M.N., Bergers,E., Kok,T., Muller,S.H., Peterse,H., Tollenaar,R.A., Hoogerbrugge,N., Meijer,S., Bartels,C.C., Seynaeve,C., Hooning,M.J., Kriege,M., Schmitz,P.I., Oosterwijk,J.C., de Koning,H.J., Rutgers,E.J., and Klijn,J.G. (2010) BRCA1-associated breast cancers present differently from BRCA2-associated and familial cases: long-term follow-up of the Dutch MRISC Screening Study. *J Clin Oncol*, 28, 5265-5273.
305. Rodriguez,C., Hughes-Davies,L., Valles,H., Orsetti,B., Cuny,M., Ursule,L., Kouzarides,T., and Theillet,C. (2004) Amplification of the BRCA2 pathway gene EMSY in sporadic breast cancer is related to negative outcome. *Clin Cancer Res*, 10, 5785-5791.
306. Bane,A.L., Beck,J.C., Bleiweiss,I., Buys,S.S., Catalano,E., Daly,M.B., Giles,G., Godwin,A.K., Hibshoosh,H., Hopper,J.L., John,E.M., Layfield,L., Longacre,T., Miron,A., Senie,R., Southey,M.C., West,D.W., Whittemore,A.S., Wu,H., Andrulis,I.L., and O'Malley,F.P. (2007) BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays. *Am.J Surg.Pathol.*, 31, 121-128.
307. Honrado,E., Osorio,A., Milne,R.L., Paz,M.F., Melchor,L., Cascon,A., Urioste,M., Cazorla,A., Diez,O., Lerma,E., Esteller,M., Palacios,J., and Benitez,J. (2007) Immunohistochemical classification of non-BRCA1/2 tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCAX families. *Mod.Pathol.*, 20, 1298-1306.
308. Da,S.L. and Lakhani,S.R. (2010) Pathology of hereditary breast cancer. *Mod.Pathol.*, 23 Suppl 2, S46-S51.
309. Lakhani,S.R., Gusterson,B.A., Jacquemier,J., Sloane,J.P., Anderson,T.J., van,d., V, Venter,D., Freeman,A., Antoniou,A., McGuffog,L., Smyth,E., Steel,C.M., Haines,N., Scott,R.J., Goldgar,D., Neuhausen,S., Daly,P.A., Ormiston,W., McManus,R., Scherneck,S., Ponder,B.A., Futreal,P.A., Peto,J., Stoppa-Lyonnet,D., Bignon,Y.J., and Stratton,M.R. (2000) The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. *Clin.Cancer Res.*, 6, 782-789.
310. rderm-Jones,A., Kenen,R., and Eeles,R. (2005) Too much, too soon? Patients and health professionals' views concerning the impact of genetic testing at the time of breast cancer diagnosis in women under the age of 40. *Eur J Cancer Care (Engl)*, 14, 272-281.
311. Milne,R.L., Osorio,A., Cajal,T.R., Vega,A., Llort,G., de la,H.M., Diez,O., Alonso,M.C., Lazaro,C., Blanco,I., Sanchez-de-Abajo,A., Caldes,T., Blanco,A., Grana,B., Duran,M., Velasco,E., Chirivella,I., Cardenosa,E.E., Tejada,M.I., Beristain,E., Miramar,M.D., Calvo,M.T., Martinez,E., Guillen,C., Salazar,R., San,R.C., Antoniou,A.C., Urioste,M., and Benitez,J. (2008) The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. *Clin.Cancer Res.*, 14, 2861-2869.
312. Ford,D., Easton,D.F., Stratton,M., Narod,S., Goldgar,D., Devilee,P., Bishop,D.T., Weber,B., Lenoir,G., Chang-Claude,J., Sobol,H., Teare,M.D., Struwing,J., Arason,A., Scherneck,S., Peto,J., Rebbeck,T.R., Tonin,P., Neuhausen,S., Barkardottir,R., Eyfjord,J., Lynch,H., Ponder,B.A., Gayther,S.A., Zelada-

- Hedman,M., and . (1998) Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am.J.Hum.Genet.*, 62, 676-689.
313. Hopper,J.L., Southey,M.C., Dite,G.S., Jolley,D.J., Giles,G.G., McCredie,M.R., Easton,D.F., and Venter,D.J. (1999) Population-based estimate of the average age-specific cumulative risk of breast cancer for a defined set of protein-truncating mutations in BRCA1 and BRCA2. Australian Breast Cancer Family Study. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 8, 741-747.
 314. King,M.C., Marks,J.H., and Mandell,J.B. (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302, 643-646.
 315. Marroni,F., Aretini,P., D'Andrea,E., Caligo,M.A., Cortesi,L., Viel,A., Ricevuto,E., Montagna,M., Cipollini,G., Federico,M., Santarosa,M., Marchetti,P., Bailey-Wilson,J.E., Bevilacqua,G., Parmigiani,G., and Presciuttini,S. (2004) Penetrances of breast and ovarian cancer in a large series of families tested for BRCA1/2 mutations. *Eur.J.Hum.Genet.*, 12, 899-906.
 316. Mayr E. (1954) *Changes of Genetic Environment and Evolution*. George Allen & Unwin, London.
 317. Roa,B.B., Boyd,A.A., Volcik,K., and Richards,C.S. (1996) Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat.Genet.*, 14, 185-187.
 318. Helgason,A., Sigureth,a.S., Gulcher,J.R., Ward,R., and Stefansson,K. (2000) mtDNA and the origin of the Icelanders: deciphering signals of recent population history. *Am.J Hum.Genet.*, 66, 999-1016.
 319. Verhoog,L.C., van den Ouweland,A.M., Berns,E., van Veghel-Plandsoen,M.M., van,S., I, Wagner,A., Bartels,C.C., Tilanus-Linthorst,M.M., Devilee,P., Seynaeve,C., Halley,D.J., Niermeijer,M.F., Klijn,J.G., and Meijers-Heijboer,H. (2001) Large regional differences in the frequency of distinct BRCA1/BRCA2 mutations in 517 Dutch breast and/or ovarian cancer families. *Eur J Cancer*, 37, 2082-2090.
 320. Ghadirian,P., Robidoux,A., Zhang,P., Royer,R., Akbari,M., Zhang,S., Fafard,E., Costa,M., Martin,G., Potvin,C., Patockskai,E., Larouche,N., Younan,R., Nassif,E., Giroux,S., Narod,S.A., Rousseau,F., and Foulkes,W.D. (2009) The contribution of founder mutations to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Clin Genet.*, 76, 421-426.
 321. Gorski,B., Byrski,T., Huzarski,T., Jakubowska,A., Menkiszak,J., Gronwald,J., Pluzanska,A., Bebenek,M., Fischer-Maliszewska,L., Grzybowska,E., Narod,S.A., and Lubinski,J. (2000) Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am.J Hum.Genet.*, 66, 1963-1968.
 322. Sokolenko,A.P., Rozanov,M.E., Mitiushkina,N.V., Sherina,N.Y., Iyevleva,A.G., Chekmariova,E.V., Buslov,K.G., Shilov,E.S., Togo,A.V., Bit-Sava,E.M., Voskresenskiy,D.A., Chagunava,O.L., Devilee,P., Cornelisse,C., Semiglazov,V.F., and Imyanitov,E.N. (2007) Founder mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia. *Fam.Cancer*, 6, 281-286.
 323. Uglanitsa,N., Oszurek,O., Uglanitsa,K., Savonievich,E., Lubinski,J., Cybulski,C., Debniak,T., Narod,S.A., and Gronwald,J. (2010) The contribution of founder mutations in BRCA1 to breast cancer in Belarus. *Clin Genet.*, 78, 377-380.
 324. Elsakov,P., Kurtinaitis,J., Petraitis,S., Ostapenko,V., Razumas,M., Razumas,T., Meskauskas,R., Petrulis,K., Luksite,A., Lubinski,J., Gorski,B., Narod,S.A., and Gronwald,J. (2010) The contribution of founder mutations in BRCA1 to breast and ovarian cancer in Lithuania. *Clin Genet.*, 78, 373-376.
 325. Tikhomirova,L., Sinicka,O., Smite,D., Eglitis,J., Hodgson,S.V., and Stengrevics,A. (2005) High prevalence of two BRCA1 mutations, 4154delA and 5382insC, in Latvia. *Fam.Cancer*, 4, 77-84.
 326. Tulinius,H., Olafsdottir,G.H., Sigvaldason,H., Arason,A., Barkardottir,R.B., Egilsson,V., Ogmundsdottir,H.M., Tryggvadottir,L., Gudlaugsdottir,S., and Eyfjord,J.E. (2002) The effect of a single BRCA2 mutation on cancer in Iceland. *J Med Genet.*, 39, 457-462.
 327. Harboe,T.L., Eiberg,H., Kern,P., Ejlersen,B., Nedergaard,L., Timmermans-Wielenga,V., Nielsen,I.M., and Bisgaard,M.L. (2009) A high frequent BRCA1 founder mutation identified in the Greenlandic population. *Fam.Cancer*, 8, 413-419.

328. Loizidou,M., Marcou,Y., Anastasiadou,V., Newbold,R., Hadjisavvas,A., and Kyriacou,K. (2007) Contribution of BRCA1 and BRCA2 germline mutations to the incidence of early-onset breast cancer in Cyprus. *Clin Genet.*, 71, 165-170.
329. Donenberg,T., Lunn,J., Curling,D., Turnquest,T., Krill-Jackson,E., Royer,R., Narod,S.A., and Hurley,J. (2011) A high prevalence of BRCA1 mutations among breast cancer patients from the Bahamas. *Breast Cancer Res Treat.*, 125, 591-596.
330. Gomes,M.C., Costa,M.M., Borojevic,R., Monteiro,A.N., Vieira,R., Koifman,S., Koifman,R.J., Li,S., Royer,R., Zhang,S., and Narod,S.A. (2007) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat.*, 103, 349-353.
331. Torres,D., Rashid,M.U., Gil,F., Umana,A., Ramelli,G., Robledo,J.F., Tawil,M., Torregrosa,L., Briceno,I., and Hamann,U. (2007) High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia. *Breast Cancer Res Treat.*, 103, 225-232.
332. Vega,A., Campos,B., Bressac-De-Paillerets,B., Bond,P.M., Janin,N., Douglas,F.S., Domenech,M., Baena,M., Pericay,C., Alonso,C., Carracedo,A., Baiget,M., and Diez,O. (2001) The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum.Mutat.*, 17, 520-521.
333. Diez,O., Osorio,A., Duran,M., Martinez-Ferrandis,J.I., de la,H.M., Salazar,R., Vega,A., Campos,B., Rodriguez-Lopez,R., Velasco,E., Chaves,J., az-Rubio,E., Jesus,C.J., Torres,M., Esteban,E., Cervantes,A., Alonso,C., San Roman,J.M., Gonzalez-Sarmiento,R., Miner,C., Carracedo,A., Eugenia,A.M., Caldes,T., Benitez,J., and Baiget,M. (2003) Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum.Mutat.*, 22, 301-312.
334. Fackenthal,J.D. and Olopade,O.I. (2007) Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat.Rev.Cancer*, 7, 937-948.
335. Díez Gibert O. (2006) Estudio molecular de los genes BRCA1 y BRCA2 en cáncer de mama hereditario. *Ed.Cont.Lab.Clin.*, 9, 19-27.
336. Bojesen,S.E., Pooley,K.A., Johnatty,S.E., Beesley,J., Michailidou,K., Tyrer,J.P., Edwards,S.L., Pickett,H.A., Shen,H.C., Smart,C.E., Hillman,K.M., Mai,P.L., Lawrenson,K., Stutz,M.D., Lu,Y., Karevan,R., Woods,N., Johnston,R.L., French,J.D., Chen,X., Weischer,M., Nielsen,S.F., Maranian,M.J., Ghoussaini,M., Ahmed,S., Baynes,C., Bolla,M.K., Wang,Q., Dennis,J., McGuffog,L., Barrowdale,D., Lee,A., Healey,S., Lush,M., Tessier,D.C., Vincent,D., Bacot,F., Vergote,I., Lambrechts,S., Despiere,E., Risch,H.A., Gonzalez-Neira,A., Rossing,M.A., Pita,G., Doherty,J.A., Alvarez,N., Larson,M.C., Fridley,B.L., Schoof,N., Chang-Claude,J., Cicek,M.S., Peto,J., Kalli,K.R., Brooks,A., Armasu,S.M., Schmidt,M.K., Braaf,L.M., Winterhoff,B., Nevanlinna,H., Konecny,G.E., Lambrechts,D., Rogmann,L., Guenel,P., Teoman,A., Milne,R.L., Garcia,J.J., Cox,A., Shridhar,V., Burwinkel,B., Marme,F., Hein,R., Sawyer,E.J., Haiman,C.A., Wang-Gohrke,S., Andrulis,I.L., Moysich,K.B., Hopper,J.L., Odunsi,K., Lindblom,A., Giles,G.G., Brenner,H., Simard,J., Lurie,G., Fasching,P.A., Carney,M.E., Radice,P., Wilkens,L.R., Swerdlow,A., Goodman,M.T., Brauch,H., Garcia-Closas,M., Hillemanns,P., Winqvist,R., Durst,M., Devilee,P., Runnebaum,I., Jakubowska,A., Lubinski,J., Mannermaa,A., Butzow,R., Bogdanova,N.V., Dork,T., Peltari,L.M., Zheng,W., Leminien,A., nton-Culver,H., Bunker,C.H., Kristensen,V., Ness,R.B., Muir,K., Edwards,R., Meindl,A., Heitz,F., Matsuo,K., du,B.A., Wu,A.H., Harter,P., Teo,S.H., Schwaab,I., Shu,X.O., Blot,W., Hosono,S., Kang,D., Nakanishi,T., Hartman,M., Yatabe,Y., Hamann,U., Karlan,B.Y., Sangrajrang,S., Kjaer,S.K., Gaborieau,V., Jensen,A., Eccles,D., Hogdall,E., Shen,C.Y., Brown,J., Woo,Y.L., Shah,M., Azmi,M.A., Luben,R., Omar,S.Z., Czene,K., Vierkant,R.A., Nordestgaard,B.G., Flyger,H., Vachon,C., Olson,J.E., Wang,X., Levine,D.A., Rudolph,A., Weber,R.P., Flesch-Janys,D., Iversen,E., Nickels,S., Schildkraut,J.M., Silva,I.S., Cramer,D.W., Gibson,L., Terry,K.L., Fletcher,O., Vitonis,A.F., van der Schoot,C.E., Poole,E.M., Hogervorst,F.B., Tworoger,S.S., Liu,J., Bandera,E.V., Li,J., Olson,S.H., Humphreys,K., Orlov,I., Blomqvist,C., Rodriguez-Rodriguez,L., Aittomäki,K., Salvesen,H.B., Muranen,T.A., Wik,E., Brouwers,B., Krakstad,C., Wauters,E., Halle,M.K., Wildiers,H., Kiemeneij,L.A., Mulot,C., Aben,K.K., Laurent-Puig,P., Altena,A.M., Truong,T., Massuger,L.F., Benitez,J., Pejovic,T., Perez,J.I., Hoatlin,M., Zamora,M.P., Cook,L.S., Balasubramanian,S.P., Kelemen,L.E., Schneeweiss,A., Le,N.D., Sohn,C., Brooks-Wilson,A., Tomlinson,I., Kerin,M.J., Miller,N., Cybulski,C., Henderson,B.E., Menkiszak,J., Schumacher,F., Wentzensen,N., Le,M.L., Yang,H.P., Mulligan,A.M., Glendon,G., Engelholm,S.A., Knight,J.A., Hogdall,C.K., Apicella,C., Gore,M., Tsimiklis,H., Song,H., Southey,M.C., Jager,A., den Ouweland,A.M., Brown,R., Martens,J.W., Flanagan,J.M., Kriege,M., Paul,J., Margolin,S., Siddiqui,N., Severi,G., Whittemore,A.S., Baglietto,L., McGuire,V., Stegmaier,C., Sieh,W., Muller,H., Arndt,V., Labreche,F., Gao,Y.T., Goldberg,M.S., Yang,G.G.,

- Dumont,M., McLaughlin,J.R., Hartmann,A., Ekici,A.B., Beckmann,M.W., Phelan,C.M., Lux,M.P., Permuth-Wey,J., Peissel,B., Sellers,T.A., Ficarazzi,F., Barile,M., and Ziogas,A. (2013) Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer. *Nat.Genet.*, 45, 371-372.
337. Couch,F.J., Wang,X., McGuffog,L., Lee,A., Olswold,C., Kuchenbaecker,K.B., Soucy,P., Fredericksen,Z., Barrowdale,D., Dennis,J., Gaudet,M.M., Dicks,E., Kosel,M., Healey,S., Sinilnikova,O.M., Lee,A., Bacot,F., Vincent,D., Hogervorst,F.B., Peock,S., Stoppa-Lyonnet,D., Jakubowska,A., Radice,P., Schmutzler,R.K., Domchek,S.M., Piedmonte,M., Singer,C.F., Friedman,E., Thomassen,M., Hansen,T.V., Neuhausen,S.L., Szabo,C.I., Blanco,I., Greene,M.H., Karlan,B.Y., Garber,J., Phelan,C.M., Weitzel,J.N., Montagna,M., Olah,E., Andrulis,I.L., Godwin,A.K., Yannoukakos,D., Goldgar,D.E., Caldes,T., Nevanlinna,H., Osorio,A., Terry,M.B., Daly,M.B., van Rensburg,E.J., Hamann,U., Ramus,S.J., Toland,A.E., Caligo,M.A., Olopade,O.I., Tung,N., Claes,K., Beattie,M.S., Southey,M.C., Imyanitov,E.N., Tischkowitz,M., Janavicius,R., John,E.M., Kwong,A., Diez,O., Balmana,J., Barkardottir,R.B., Arun,B.K., Rennert,G., Teo,S.H., Ganz,P.A., Campbell,I., van der Hout,A.H., van Deurzen,C.H., Seynaeve,C., Gomez Garcia,E.B., van Leeuwen,F.E., Meijers-Heijboer,H.E., Gille,J.J., Ausems,M.G., Blok,M.J., Ligtenberg,M.J., Rookus,M.A., Devilee,P., Verhoef,S., van Os,T.A., Wijnen,J.T., Frost,D., Ellis,S., Fineberg,E., Platte,R., Evans,D.G., Izatt,L., Eeles,R.A., Adlard,J., Eccles,D.M., Cook,J., Brewer,C., Douglas,F., Hodgson,S., Morrison,P.J., Side,L.E., Donaldson,A., Houghton,C., Rogers,M.T., Dorkins,H., Eason,J., Gregory,H., McCann,E., Murray,A., Calender,A., Hardouin,A., Berthet,P., Delnatte,C., Nogues,C., Lasset,C., Houdayer,C., Leroux,D., Rouleau,E., Prieur,F., Damiola,F., Sobol,H., Coupier,I., Venat-Bouvet,L., Castera,L., Gauthier-Villars,M., Leone,M., Pujol,P., Mazoyer,S., Bignon,Y.J., Zlowocka-Perlowska,E., Gronwald,J., Lubinski,J., Durda,K., Jaworska,K., Huzarski,T., Spurdle,A.B., Viel,A., Peissel,B., Bonanni,B., Melloni,G., Ottini,L., Papi,L., Varesco,L., Tibiletti,M.G., Peterlongo,P., Volorio,S., Manoukian,S., Pensotti,V., Arnold,N., Engel,C., Deissler,H., Gadzicki,D., Gehrig,A., Kast,K., Rhiem,K., Meindl,A., Niederacher,D., Ditsch,N., Plendl,H., Preisler-Adams,S., Engert,S., Sutter,C., Varon-Mateeva,R., Wappenschmidt,B., Weber,B.H., Arver,B., Stenmark-Askmal,M., Loman,N., Rosenquist,R., Einbeigi,Z., Nathanson,K.L., Rebbeck,T.R., Blank,S.V., Cohn,D.E., Rodriguez,G.C., Small,L., Friedlander,M., Bae-Jump,V.L., Fink-Retter,A., Rappaport,C., Gschwantler-Kaulich,D., Pfeiler,G., Tea,M.K., Lindor,N.M., Kaufman,B., Shimon,P.S., Laitman,Y., Skytte,A.B., Gerdes,A.M., Pedersen,I.S., Moeller,S.T., Kruse,T.A., Jensen,U.B., Vijai,J., Sarrel,K., Robson,M., Kauff,N., Mulligan,A.M., Glendon,G., Ozelik,H., Ejlersen,B., Nielsen,F.C., Jonson,L., Andersen,M.K., Ding,Y.C., Steele,L., Foretova,L., Teule,A., Lazaro,C., Brunet,J., Pujana,M.A., Mai,P.L., Loud,J.T., Walsh,C., Lester,J., Orsulic,S., Narod,S.A., Herzog,J., Sand,S.R., Tognazzo,S., Agata,S., Vaszko,T., Weaver,J., Stavropoulou,A.V., Buys,S.S., Romero,A., de la,H.M., Aittomaki,K., Muranen,T.A., Duran,M., Chung,W.K., Lasa,A., Dorfling,C.M., Miron,A., Benitez,J., Senter,L., Huo,D., Chan,S.B., Sokolenko,A.P., Chiquette,J., Tihomirova,L., Friebel,T.M., Agnarsson,B.A., Lu,K.H., Lejbkiewicz,F., James,P.A., Hall,P., Dunning,A.M., Tessier,D., Cunningham,J., Slager,S.L., Wang,C., Hart,S., and Stevens,K. (2013) Genome-wide association study in BRCA1 mutation carriers identifies novel loci associated with breast and ovarian cancer risk. *PLoS.Genet.*, 9, e1003212.
338. Stevens,K.N., Wang,X., Fredericksen,Z., Pankratz,V.S., Greene,M.H., Andrulis,I.L., Thomassen,M., Caligo,M., Nathanson,K.L., Jakubowska,A., Osorio,A., Hamann,U., Godwin,A.K., Stoppa-Lyonnet,D., Southey,M., Buys,S.S., Singer,C.F., Hansen,T.V., Arason,A., Offit,K., Piedmonte,M., Montagna,M., Imyanitov,E., Tihomirova,L., Sucheston,L., Beattie,M., Neuhausen,S.L., Szabo,C.I., Simard,J., Spurdle,A.B., Healey,S., Chen,X., Rebbeck,T.R., Easton,D.F., Chenevix-Trench,G., Antoniou,A.C., and Couch,F.J. (2012) Evaluation of chromosome 6p22 as a breast cancer risk modifier locus in a follow-up study of BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat.*, 136, 295-302.
339. Ready,K., Gutierrez-Barrera,A.M., Amos,C., Meric-Bernstam,F., Lu,K., Hortobagyi,G., and Arun,B. (2011) Cancer risk management decisions of women with BRCA1 or BRCA2 variants of uncertain significance. *Breast J*, 17, 210-212.
340. Mohammadi,L., Vreeswijk,M.P., Oldenburg,R., van den,O.A., Oosterwijk,J.C., van der Hout,A.H., Hoogerbrugge,N., Ligtenberg,M., Ausems,M.G., van der Luijt,R.B., Dommering,C.J., Gille,J.J., Verhoef,S., Hogervorst,F.B., van Os,T.A., Gomez,G.E., Blok,M.J., Wijnen,J.T., Helmer,Q., Devilee,P., van Asperen,C.J., and van Houtwelingen,H.C. (2009) A simple method for co-segregation analysis to evaluate the pathogenicity of unclassified variants; BRCA1 and BRCA2 as an example. *BMC Cancer*, 9, 211.
341. Thompson,D., Easton,D.F., and Goldgar,D.E. (2003) A full-likelihood method for the evaluation of causality of sequence variants from family data. *Am.J Hum.Genet.*, 73, 652-655.
342. Domchek,S.M., Tang,J., Stopfer,J., Lilli,D.R., Hamel,N., Tischkowitz,M., Monteiro,A.N., Messick,T.E., Powers,J., Yonker,A., Couch,F.J., Goldgar,D.E., Davidson,H.R., Nathanson,K.L., Foulkes,W.D., and

- Greenberg,R.A. (2013) Biallelic deleterious BRCA1 mutations in a woman with early-onset ovarian cancer. *Cancer Discov.*, 3, 399-405.
343. Spurdle,A.B., Whaley,P.J., Thompson,B., Feng,B., Healey,S., Brown,M.A., Pettigrew,C., van Asperen,C.J., Ausems,M.G., Kattentidt-Mouravieva,A.A., van den Ouweland,A.M., Lindblom,A., Pigg,M.H., Schmutzler,R.K., Engel,C., Meindl,A., Caputo,S., Sinilnikova,O.M., Lidereau,R., Couch,F.J., Guidugli,L., Hansen,T., Thomassen,M., Eccles,D.M., Tucker,K., Benitez,J., Domchek,S.M., Toland,A.E., van Rensburg,E.J., Wappenschmidt,B., Borg,A., Vreeswijk,M.P., and Goldgar,D.E. (2012) BRCA1 R1699Q variant displaying ambiguous functional abrogation confers intermediate breast and ovarian cancer risk. *J Med Genet.*, 49, 525-532.
 344. Dorfman,R., Nalpathamkalam,T., Taylor,C., Gonska,T., Keenan,K., Yuan,X.W., Corey,M., Tsui,L.C., Zielinski,J., and Durie,P. (2010) Do common in silico tools predict the clinical consequences of amino-acid substitutions in the CFTR gene? *Clin Genet.*, 77, 464-473.
 345. Hicks,S., Wheeler,D.A., Plon,S.E., and Kimmel,M. (2011) Prediction of missense mutation functionality depends on both the algorithm and sequence alignment employed. *Hum.Mutat.*, 32, 661-668.
 346. Lovelock,P.K., Spurdle,A.B., Mok,M.T., Farrugia,D.J., Lakhani,S.R., Healey,S., Arnold,S., Buchanan,D., Couch,F.J., Henderson,B.R., Goldgar,D.E., Tavtigian,S.V., Chenevix-Trench,G., and Brown,M.A. (2007) Identification of BRCA1 missense substitutions that confer partial functional activity: potential moderate risk variants? *Breast Cancer Res*, 9, R82.
 347. Guidugli,L., Pankratz,V.S., Singh,N., Thompson,J., Erding,C.A., Engel,C., Schmutzler,R., Domchek,S., Nathanson,K., Radice,P., Singer,C., Tonin,P.N., Lindor,N.M., Goldgar,D.E., and Couch,F.J. (2013) A classification model for BRCA2 DNA binding domain missense variants based on homology-directed repair activity. *Cancer Res*, 73, 265-275.
 348. Chenevix-Trench,G., Healey,S., Lakhani,S., Waring,P., Cummings,M., Brinkworth,R., Deffenbaugh,A.M., Burbidge,L.A., Pruss,D., Judkins,T., Scholl,T., Bekessy,A., Marsh,A., Lovelock,P., Wong,M., Tesoriero,A., Renard,H., Southey,M., Hopper,J.L., Yannoukakos,K., Brown,M., Easton,D., Tavtigian,S.V., Goldgar,D., and Spurdle,A.B. (2006) Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance. *Cancer Res*, 66, 2019-2027.
 349. Spearman,A.D., Sweet,K., Zhou,X.P., McLennan,J., Couch,F.J., and Toland,A.E. (2008) Clinically applicable models to characterize BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance. *J Clin Oncol*, 26, 5393-5400.
 350. Goldgar,D.E., Easton,D.F., Byrnes,G.B., Spurdle,A.B., Iversen,E.S., and Greenblatt,M.S. (2008) Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Hum.Mutat.*, 29, 1265-1272.
 351. Plon,S.E., Eccles,D.M., Easton,D., Foulkes,W.D., Genuardi,M., Greenblatt,M.S., Hogervorst,F.B., Hoogerbrugge,N., Spurdle,A.B., and Tavtigian,S.V. (2008) Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum.Mutat.*, 29, 1282-1291.
 352. Tavtigian,S.V., Greenblatt,M.S., Goldgar,D.E., and Boffetta,P. (2008) Assessing pathogenicity: overview of results from the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. *Hum.Mutat.*, 29, 1261-1264.
 353. Tavtigian,S.V., Greenblatt,M.S., Lesueur,F., and Byrnes,G.B. (2008) In silico analysis of missense substitutions using sequence-alignment based methods. *Hum.Mutat.*, 29, 1327-1336.
 354. Tavtigian,S.V., Byrnes,G.B., Goldgar,D.E., and Thomas,A. (2008) Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Hum.Mutat.*, 29, 1342-1354.
 355. Lindor,N.M., Goldgar,D.E., Tavtigian,S.V., Plon,S.E., and Couch,F.J. (2013) BRCA1/2 sequence variants of uncertain significance: a primer for providers to assist in discussions and in medical management. *Oncologist.*, 18, 518-524.

356. Resta,R., Biesecker,B.B., Bennett,R.L., Blum,S., Hahn,S.E., Strecker,M.N., and Williams,J.L. (2006) A new definition of Genetic Counseling: National Society of Genetic Counselors' Task Force report. *J Genet.Couns.*, 15, 77-83.
357. Antoniou,A.C., Cunningham,A.P., Peto,J., Evans,D.G., Lalloo,F., Narod,S.A., Risch,H.A., Eyfjord,J.E., Hopper,J.L., Southey,M.C., Olsson,H., Johannsson,O., Borg,A., Pasini,B., Radice,P., Manoukian,S., Eccles,D.M., Tang,N., Olah,E., nton-Culver,H., Warner,E., Lubinski,J., Gronwald,J., Gorski,B., Tryggvadottir,L., Syrjakoski,K., Kallioniemi,O.P., Eerola,H., Nevanlinna,H., Pharoah,P.D., and Easton,D.F. (2008) The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: updates and extensions. *Br.J Cancer*, 98, 1457-1466.
358. Berry,D.A., Iversen,E.S., Jr., Gudbjartsson,D.F., Hiller,E.H., Garber,J.E., Peshkin,B.N., Lerman,C., Watson,P., Lynch,H.T., Hilsenbeck,S.G., Rubinstein,W.S., Hughes,K.S., and Parmigiani,G. (2002) BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol*, 20, 2701-2712.
359. Evans,D.G., Lalloo,F., Wallace,A., and Rahman,N. (2005) Update on the Manchester Scoring System for BRCA1 and BRCA2 testing. *J Med Genet.*, 42, e39.
360. (2003) American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*, 21, 2397-2406.
361. De,S.S., Leone,M., Berez,V., Izquierdo,A., Font,R., Brunet,J.M., Louat,T., Vilardell,L., Borrás,J., Viladiu,P., Bosch,F.X., Lenoir,G.M., and Sinilnikova,O.M. (2003) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: a population-based study. *Int.J Cancer*, 106, 588-593.
362. Moller,P., Hagen,A.I., Apold,J., Maehle,L., Clark,N., Fiane,B., Lovslett,K., Hovig,E., and Vabo,A. (2007) Genetic epidemiology of BRCA mutations--family history detects less than 50% of the mutation carriers. *Eur J Cancer*, 43, 1713-1717.
363. Haffty,B.G., Silber,A., Matloff,E., Chung,J., and Lannin,D. (2006) Racial differences in the incidence of BRCA1 and BRCA2 mutations in a cohort of early onset breast cancer patients: African American compared to white women. *J Med Genet.*, 43, 133-137.
364. Hamann,U., Liu,X., Bungardt,N., Ulmer,H.U., Bastert,G., and Sinn,H.P. (2003) Similar contributions of BRCA1 and BRCA2 germline mutations to early-onset breast cancer in Germany. *Eur J Hum.Genet.*, 11, 464-467.
365. Malone,K.E., Daling,J.R., Neal,C., Suter,N.M., O'Brien,C., Cushing-Haugen,K., Jonasdottir,T.J., Thompson,J.D., and Ostrander,E.A. (2000) Frequency of BRCA1/BRCA2 mutations in a population-based sample of young breast carcinoma cases. *Cancer*, 88, 1393-1402.
366. Robson,M., Dabney,M.K., Rosenthal,G., Ludwig,S., Seltzer,M.H., Gilewski,T., Haas,B., Osborne,M., Norton,L., Gilbert,F., and Offit,K. (1997) Prevalence of recurring BRCA mutations among Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *Genet.Test.*, 1, 47-51.
367. Gorski,B., Jakubowska,A., Huzarski,T., Byrski,T., Gronwald,J., Grzybowska,E., Mackiewicz,A., Stawicka,M., Bebenek,M., Sorokin,D., Fiszer-Maliszewska,L., Haus,O., Janiszewska,H., Niepsuj,S., Gozdz,S., Zaremba,L., Posmyk,M., Pluzanska,M., Kilar,E., Czudowska,D., Wasko,B., Miturski,R., Kowalczyk,J.R., Urbanski,K., Szwiec,M., Koc,J., Debniak,B., Rozmiarek,A., Debniak,T., Cybulski,C., Kowalska,E., Toloczko-Grabarek,A., Zajaczek,S., Menkiszak,J., Medrek,K., Masojc,B., Mierzejewski,M., Narod,S.A., and Lubinski,J. (2004) A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *Int.J Cancer*, 110, 683-686.
368. Young,S.R., Pilarski,R.T., Donenberg,T., Shapiro,C., Hammond,L.S., Miller,J., Brooks,K.A., Cohen,S., Tenenholz,B., Desai,D., Zandvakili,I., Royer,R., Li,S., and Narod,S.A. (2009) The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*, 9, 86.
369. Fernandez-Ramires,R., Sole,X., De,C.L., Llort,G., Cazorla,A., Bonifaci,N., Garcia,M.J., Caldes,T., Blanco,I., Gariboldi,M., Pierotti,M.A., Pujana,M.A., Benitez,J., and Osorio,A. (2009) Gene expression profiling integrated into network modelling reveals heterogeneity in the mechanisms of BRCA1 tumorigenesis. *Br.J Cancer*, 101, 1469-1480.

370. Miyoshi,Y., Murase,K., and Oh,K. (2008) Basal-like subtype and BRCA1 dysfunction in breast cancers. *Int.J Clin Oncol*, 13, 395-400.
371. Mavaddat,N., Rebbeck,T.R., Lakhani,S.R., Easton,D.F., and Antoniou,A.C. (2010) Incorporating tumour pathology information into breast cancer risk prediction algorithms. *Breast Cancer Res*, 12, R28.
372. James,P.A., Doherty,R., Harris,M., Mukesh,B.N., Milner,A., Young,M.A., and Scott,C. (2006) Optimal selection of individuals for BRCA mutation testing: a comparison of available methods. *J Clin Oncol*, 24, 707-715.
373. Offit,K., Groeger,E., Turner,S., Wadsworth,E.A., and Weiser,M.A. (2004) The "duty to warn" a patient's family members about hereditary disease risks. *JAMA*, 292, 1469-1473.
374. Fong,P.C., Boss,D.S., Yap,T.A., Tutt,A., Wu,P., Mergui-Roelvink,M., Mortimer,P., Swaisland,H., Lau,A., O'Connor,M.J., Ashworth,A., Carmichael,J., Kaye,S.B., Schellens,J.H., and de Bono,J.S. (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N.Engl J Med*, 361, 123-134.
375. Fong,P.C., Yap,T.A., Boss,D.S., Carden,C.P., Mergui-Roelvink,M., Gourley,C., De,G.J., Lubinski,J., Shanley,S., Messiou,C., A'Hern,R., Tutt,A., Ashworth,A., Stone,J., Carmichael,J., Schellens,J.H., de Bono,J.S., and Kaye,S.B. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *J Clin Oncol*, 28, 2512-2519.
376. Metcalfe,K., Lynch,H.T., Ghadirian,P., Tung,N., Olivotto,I., Warner,E., Olopade,O.I., Eisen,A., Weber,B., McLennan,J., Sun,P., Foulkes,W.D., and Narod,S.A. (2004) Contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol*, 22, 2328-2335.
377. Herrinton,L.J., Barlow,W.E., Yu,O., Geiger,A.M., Elmore,J.G., Barton,M.B., Harris,E.L., Rolnick,S., Pardee,R., Husson,G., Macedo,A., and Fletcher,S.W. (2005) Efficacy of prophylactic mastectomy in women with unilateral breast cancer: a cancer research network project. *J Clin Oncol*, 23, 4275-4286.
378. van Sprundel,T.C., Schmidt,M.K., Rookus,M.A., Brohet,R., van Asperen,C.J., Rutgers,E.J., Van't Veer,L.J., and Tollenaar,R.A. (2005) Risk reduction of contralateral breast cancer and survival after contralateral prophylactic mastectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Br.J Cancer*, 93, 287-292.
379. Lostumbo,L., Carbine,N., Wallace,J., and Ezzo,J. (2004) Prophylactic mastectomy for the prevention of breast cancer. *Cochrane.Database.Syst.Rev.*, CD002748.
380. Meijers-Heijboer,H., van,G.B., van Putten,W.L., Henzen-Logmans,S.C., Seynaeve,C., Menke-Pluymers,M.B., Bartels,C.C., Verhoog,L.C., van den Ouweland,A.M., Niermeijer,M.F., Brekelmans,C.T., and Klijn,J.G. (2001) Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N.Engl J Med*, 345, 159-164.
381. Rebbeck,T.R., Friebel,T., Lynch,H.T., Neuhausen,S.L., van,' V, Garber,J.E., Evans,G.R., Narod,S.A., Isaacs,C., Matloff,E., Daly,M.B., Olopade,O.I., and Weber,B.L. (2004) Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. *J Clin Oncol*, 22, 1055-1062.
382. Hartmann,L.C., Schaid,D.J., Woods,J.E., Crotty,T.P., Myers,J.L., Arnold,P.G., Petty,P.M., Sellers,T.A., Johnson,J.L., McDonnell,S.K., Frost,M.H., and Jenkins,R.B. (1999) Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *N.Engl J Med*, 340, 77-84.
383. Rebbeck,T.R., Lynch,H.T., Neuhausen,S.L., Narod,S.A., Van't,V.L., Garber,J.E., Evans,G., Isaacs,C., Daly,M.B., Matloff,E., Olopade,O.I., and Weber,B.L. (2002) Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N.Engl J Med*, 346, 1616-1622.
384. Robson,M. (2004) Breast cancer surveillance in women with hereditary risk due to BRCA1 or BRCA2 mutations. *Clin Breast Cancer*, 5, 260-268.
385. Kriege,M., Brekelmans,C.T., Boetes,C., Besnard,P.E., Zonderland,H.M., Obdeijn,I.M., Manoliu,R.A., Kok,T., Peterse,H., Tilanus-Linthorst,M.M., Muller,S.H., Meijer,S., Oosterwijk,J.C., Beex,L.V., Tollenaar,R.A., de Koning,H.J., Rutgers,E.J., and Klijn,J.G. (2004) Efficacy of MRI and mammography for breast-cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N.Engl J Med*, 351, 427-437.

386. Leach,M.O., Boggis,C.R., Dixon,A.K., Easton,D.F., Eeles,R.A., Evans,D.G., Gilbert,F.J., Griebisch,I., Hoff,R.J., Kessar,P., Lakhani,S.R., Moss,S.M., Nerurkar,A., Padhani,A.R., Pointon,L.J., Thompson,D., and Warren,R.M. (2005) Screening with magnetic resonance imaging and mammography of a UK population at high familial risk of breast cancer: a prospective multicentre cohort study (MARIBS). *Lancet*, 365, 1769-1778.
387. Warner,E., Plewes,D.B., Hill,K.A., Causer,P.A., Zubovits,J.T., Jong,R.A., Cutrara,M.R., DeBoer,G., Yaffe,M.J., Messner,S.J., Meschino,W.S., Piron,C.A., and Narod,S.A. (2004) Surveillance of BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with magnetic resonance imaging, ultrasound, mammography, and clinical breast examination. *JAMA*, 292, 1317-1325.
388. King,M.C., Wieand,S., Hale,K., Lee,M., Walsh,T., Owens,K., Tait,J., Ford,L., Dunn,B.K., Costantino,J., Wickerham,L., Wolmark,N., and Fisher,B. (2001) Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial. *JAMA*, 286, 2251-2256.
389. Ghadirian,P., Lubinski,J., Lynch,H., Neuhausen,S.L., Weber,B., Isaacs,C., Baruch,R.G., Randall,S., Ainsworth,P., Friedman,E., Horsman,D., Tonin,P., Foulkes,W.D., Tung,N., Sun,P., and Narod,S.A. (2004) Smoking and the risk of breast cancer among carriers of BRCA mutations. *Int.J Cancer*, 110, 413-416.
390. Kotsopoulos,J., Olopado,O.I., Ghadirian,P., Lubinski,J., Lynch,H.T., Isaacs,C., Weber,B., Kim-Sing,C., Ainsworth,P., Foulkes,W.D., Eisen,A., Sun,P., and Narod,S.A. (2005) Changes in body weight and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res*, 7, R833-R843.
391. Kauff,N.D., Satagopan,J.M., Robson,M.E., Scheuer,L., Hensley,M., Hudis,C.A., Ellis,N.A., Boyd,J., Borgen,P.I., Barakat,R.R., Norton,L., Castiel,M., Nafa,K., and Offit,K. (2002) Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N.Engl J Med*, 346, 1609-1615.
392. Olivier,R.I., van,B.M., Lubsen,M.A., Rookus,M.A., Mooij,T.M., van,d., V, and Van't Veer,L.J. (2004) Clinical outcome of prophylactic oophorectomy in BRCA1/BRCA2 mutation carriers and events during follow-up. *Br.J Cancer*, 90, 1492-1497.
393. Rutter,J.L., Wacholder,S., Chetrit,A., Lubin,F., Menczer,J., Ebbes,S., Tucker,M.A., Struewing,J.P., and Hartge,P. (2003) Gynecologic surgeries and risk of ovarian cancer in women with BRCA1 and BRCA2 Ashkenazi founder mutations: an Israeli population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1072-1078.
394. Casey,M.J., Synder,C., Bewtra,C., Narod,S.A., Watson,P., and Lynch,H.T. (2005) Intra-abdominal carcinomatosis after prophylactic oophorectomy in women of hereditary breast ovarian cancer syndrome kindreds associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Gynecol.Oncol*, 97, 457-467.
395. Eisen,A., Lubinski,J., Klijn,J., Moller,P., Lynch,H.T., Offit,K., Weber,B., Rebbeck,T., Neuhausen,S.L., Ghadirian,P., Foulkes,W.D., Gershoni-Baruch,R., Friedman,E., Rennert,G., Wagner,T., Isaacs,C., Kim-Sing,C., Ainsworth,P., Sun,P., and Narod,S.A. (2005) Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol*, 23, 7491-7496.
396. Finch,A., Beiner,M., Lubinski,J., Lynch,H.T., Moller,P., Rosen,B., Murphy,J., Ghadirian,P., Friedman,E., Foulkes,W.D., Kim-Sing,C., Wagner,T., Tung,N., Couch,F., Stoppa-Lyonnet,D., Ainsworth,P., Daly,M., Pasini,B., Gershoni-Baruch,R., Eng,C., Olopade,O.I., McLennan,J., Karlan,B., Weitzel,J., Sun,P., and Narod,S.A. (2006) Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA*, 296, 185-192.
397. Rebbeck,T.R., Kauff,N.D., and Domchek,S.M. (2009) Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 101, 80-87.
398. Claes,E., Evers-Kiebooms,G., Boogaerts,A., Decruyenaere,M., Denayer,L., and Legius,E. (2004) Diagnostic genetic testing for hereditary breast and ovarian cancer in cancer patients: women's looking back on the pre-test period and a psychological evaluation. *Genet.Test.*, 8, 13-21.
399. Meiser,B., Gaff,C., Julian-Reynier,C., Biesecker,B.B., Esplen,M.J., Vodermaier,A., and Tibben,A. (2006) International perspectives on genetic counseling and testing for breast cancer risk. *Breast Dis.*, 27, 109-125.

400. Pasacreta,J.V. (2003) Psychosocial issues associated with genetic testing for breast and ovarian cancer risk: an integrative review. *Cancer Invest*, 21, 588-623.
401. Quinn,G.P., Vadaparampil,S.T., Tollin,S., Miree,C.A., Murphy,D., Bower,B., and Silva,C. (2010) BRCA carriers' thoughts on risk management in relation to preimplantation genetic diagnosis and childbearing: when too many choices are just as difficult as none. *Fertil.Steril.*, 94, 2473-2475.
402. Oktay,K., Hourvitz,A., Sahin,G., Oktem,O., Safro,B., Cil,A., and Bang,H. (2006) Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *J Clin Endocrinol.Metab*, 91, 3885-3890.
403. Schouten,J.P., McElgunn,C.J., Waaijer,R., Zwijnenburg,D., Diepvens,F., and Pals,G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30, e57.
404. Vaughn,C.P., Lyon,E., and Samowitz,W.S. (2008) Confirmation of single exon deletions in MLH1 and MSH2 using quantitative polymerase chain reaction. *J Mol.Diagn.*, 10, 355-360.
405. Unger,M.A., Nathanson,K.L., Calzone,K., ntin-Ozerkis,D., Shih,H.A., Martin,A.M., Lenoir,G.M., Mazoyer,S., and Weber,B.L. (2000) Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. *Am.J Hum.Genet.*, 67, 841-850.
406. Grantham,R. (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*, 185, 862-864.
407. Abkevich,V., Zharkikh,A., Deffenbaugh,A.M., Frank,D., Chen,Y., Shattuck,D., Skolnick,M.H., Gutin,A., and Tavtigian,S.V. (2004) Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation. *J Med Genet.*, 41, 492-507.
408. Tavtigian,S.V., Deffenbaugh,A.M., Yin,L., Judkins,T., Scholl,T., Samollow,P.B., de,S.D., Zharkikh,A., and Thomas,A. (2006) Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet.*, 43, 295-305.
409. Ng,P.C. and Henikoff,S. (2003) SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*, 31, 3812-3814.
410. Saunders,C.T. and Baker,D. (2002) Evaluation of structural and evolutionary contributions to deleterious mutation prediction. *J Mol.Biol.*, 322, 891-901.
411. Schwarz,J.M., Rodelsperger,C., Schuelke,M., and Seelow,D. (2010) MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat.Methods*, 7, 575-576.
412. Yeo,G. and Burge,C.B. (2004) Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput.Biol.*, 11, 377-394.
413. Reese,M.G., Eeckman,F.H., Kulp,D., and Haussler,D. (1997) Improved splice site detection in Genie. *J Comput.Biol.*, 4, 311-323.
414. Shapiro,M.B. and Senapathy,P. (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res*, 15, 7155-7174.
415. Eng,L., Coutinho,G., Nahas,S., Yeo,G., Tanouye,R., Babaei,M., Dork,T., Burge,C., and Gatti,R.A. (2004) Nonclassical splicing mutations in the coding and noncoding regions of the ATM Gene: maximum entropy estimates of splice junction strengths. *Hum.Mutat.*, 23, 67-76.
416. (1992) *AJCC Manual for Staging of Cancer*. Lippincott-Raven Publisher, Chicago.
417. Carey,L.A., Perou,C.M., Livasy,C.A., Dressler,L.G., Cowan,D., Conway,K., Karaca,G., Troester,M.A., Tse,C.K., Edmiston,S., Deming,S.L., Geradts,J., Cheang,M.C., Nielsen,T.O., Moorman,P.G., Earp,H.S., and Millikan,R.C. (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 295, 2492-2502.

418. J Sambrook, EF Fritsch, and T Maniatis (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*.
419. Rasmussen R. (2001) Quantification on the LightCycler. In Muer S., Wittwer CT, and Nakagawara K. (eds.) *Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, New York, pp 21-34.
420. Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
421. Pfaffl,M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
422. Database UniSTS (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/>. 2013.
423. Sagi,M., Eilat,A., Ben,A.L., Goldberg,Y., Bercovich,D., Hamburger,T., Peretz,T., and Lerer,I. (2011) Two BRCA1/2 founder mutations in Jews of Sephardic origin. *Fam.Cancer*, 10, 59-63.
424. den Dunnen,J.T. and Antonarakis,S.E. (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum.Mutat.*, 15, 7-12.
425. Deffenbaugh,A.M., Frank,T.S., Hoffman,M., Cannon-Albright,L., and Neuhausen,S.L. (2002) Characterization of common BRCA1 and BRCA2 variants. *Genet.Test.*, 6, 119-121.
426. Goldgar,D.E., Easton,D.F., Deffenbaugh,A.M., Monteiro,A.N., Tavtigian,S.V., and Couch,F.J. (2004) Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am.J Hum.Genet.*, 75, 535-544.
427. Lee,E., Kean-Cowdin,R., Ma,H., Chen,Z., Van Den,B.D., Henderson,B.E., Bernstein,L., and Ursin,G. (2008) Evaluation of unclassified variants in the breast cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2 using five methods: results from a population-based study of young breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 10, R19.
428. Kumar,P., Henikoff,S., and Ng,P.C. (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat.Protoc.*, 4, 1073-1081.
429. Vreeswijk,M.P., Kraan,J.N., van der Klift,H.M., Vink,G.R., Cornelisse,C.J., Wijnen,J.T., Bakker,E., van Asperen,C.J., and Devilee,P. (2009) Intronic variants in BRCA1 and BRCA2 that affect RNA splicing can be reliably selected by splice-site prediction programs. *Hum.Mutat.*, 30, 107-114.
430. Bergman,A., Flodin,A., Engwall,Y., Arkblad,E.L., Berg,K., Einbeigi,Z., Martinsson,T., Wahlstrom,J., Karlsson,P., and Nordling,M. (2005) A high frequency of germline BRCA1/2 mutations in western Sweden detected with complementary screening techniques. *Fam.Cancer*, 4, 89-96.
431. Durocher,F., Tonin,P., Shattuck-Eidens,D., Skolnick,M., Narod,S.A., and Simard,J. (1996) Mutation analysis of the BRCA1 gene in 23 families with cases of cancer of the breast, ovary, and multiple other sites. *J Med Genet.*, 33, 814-819.
432. Esteban,C.E., Bolufer,G.P., Palanca,S.S., Oltra,S.S., Barragan,G.E., Velasco,S.E., Chirivella,G., I, Segura,H.A., Guillen,P.C., and Martinez de,D.E. (2008) Twenty-three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families of Eastern Spain. *Breast Cancer Res Treat.*, 112, 69-73.
433. Takahashi,H., Behbakht,K., McGovern,P.E., Chiu,H.C., Couch,F.J., Weber,B.L., Friedman,L.S., King,M.C., Furusato,M., LiVolsi,V.A., and . (1995) Mutation analysis of the BRCA1 gene in ovarian cancers. *Cancer Res*, 55, 2998-3002.
434. Simard,J., Tonin,P., Durocher,F., Morgan,K., Rommens,J., Gingras,S., Samson,C., Leblanc,J.F., Belanger,C., Dion,F., and . (1994) Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat.Genet.*, 8, 392-398.
435. Hall,M.J., Reid,J.E., Burbidge,L.A., Pruss,D., Deffenbaugh,A.M., Frye,C., Wenstrup,R.J., Ward,B.E., Scholl,T.A., and Noll,W.W. (2009) BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. *Cancer*, 115, 2222-2233.

436. Díez,O., Osorio,A., Robledo,M., Barroso,A., Domenech,M., Cortes,J., Albertos,J., Sanz,J., Brunet,J., SanRoman,J.M., Alonso,M.C., Baiget,M., and Benitez,J. (1999) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Jewish mutations in Spanish breast cancer patients. *Br.J Cancer*, 79, 1302-1303.
437. Al-Mulla,F., Bland,J.M., Serratt,D., Miller,J., Chu,C., and Taylor,G.T. (2009) Age-dependent penetrance of different germline mutations in the BRCA1 gene. *J Clin Pathol.*, 62, 350-356.
438. Díez,O., Brunet,J., Sanz,J., del,R.E., Alonso,M.C., and Baiget,M. (1997) Differences in phenotypic expression of a new BRCA1 mutation in identical twins. *Lancet*, 350, 713.
439. Díez Gibert O., Cornet Ciurana M., Gutierrez-Enriquez,S., Doménech Maria M., Ramón y Cajal Asensio T., Alonso Muñoz C., and Baiget,M. (2007) Estudio de los genes BRCA1 y BRCA2 en 200 familias con cáncer de mama hereditario. *Revista Química Clínica*, 26, 202-206.
440. Salazar,R., Cruz-Hernandez,J.J., Sanchez-Valdivieso,E., Rodriguez,C.A., Gomez-Bernal,A., Barco,E., Fonseca,E., Portugal,T., and Gonzalez-Sarmiento,R. (2006) BRCA1-2 mutations in breast cancer: identification of nine new variants of BRCA1-2 genes in a population from central Western Spain. *Cancer Lett.*, 233, 172-177.
441. Torres,D., Rashid,M.U., Gil,F., Umana,A., Ramelli,G., Robledo,J.F., Tawil,M., Torregrosa,L., Briceno,I., and Hamann,U. (2007) High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia. *Breast Cancer Res Treat.*, 103, 225-232.
442. Blay,P., Santamaria,I., Pitiot,A.S., Luque,M., Alvarado,M.G., Lastra,A., Fernandez,Y., Paredes,A., Freije,J.M., and Balbin,M. (2013) Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer families from Asturias (Northern Spain). *BMC Cancer*, 13, 243.
443. Blesa,J.R., Garcia,J.A., and Ochoa,E. (2000) Frequency of germ-line BRCA1 mutations among Spanish families from a Mediterranean area. *Hum.Mutat.*, 15, 381-382.
444. Esteban,C.E., Bolufer,G.P., Palanca,S.S., Barragan,G.E., Oltra,S.S., Chirivella,G., I, Segura,H.A., Guillen,P.C., Martinez de,D.E., Cuevas,C.D., and Salas,T.D. (2008) [BRCA1 and BRCA2 mutations in families studied in the program of genetic counselling in cancer of the Valencian community (Spain)]. *Med Clin (Barc.)*, 130, 121-126.
445. de,J.J., I, Garcia,C.Z., Palanca,S.S., Esteban,C.E., Lopez Guerrero,J.A., Segura,H.A., Chirivella,G., I, Sanchez Heras,A.B., Juan Fita,M.J., Tena,G., I, Guillen,P.C., Martinez de,D.E., Romero,N., I, Salas,T.D., Goicoechea,S.M., and Bolufer,G.P. (2013) Novel and recurrent BRCA1/BRCA2 mutations in early onset and familial breast and ovarian cancer detected in the Program of Genetic Counseling in Cancer of Valencian Community (eastern Spain). Relationship of family phenotypes with mutation prevalence. *Fam.Cancer*, 12, 767-777.
446. Díez,O., Gutierrez-Enriquez,S., and Balmana,J. (2010) Heterogeneous prevalence of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain according to the geographical area: implications for genetic testing. *Fam.Cancer*, 9, 187-191.
447. Roa,B.B., Boyd,A.A., Volcik,K., and Richards,C.S. (1996) Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat.Genet.*, 14, 185-187.
448. Hamel,N., Feng,B.J., Foretova,L., Stoppa-Lyonnet,D., Narod,S.A., Imyanitov,E., Sinilnikova,O., Tihomirova,L., Lubinski,J., Gronwald,J., Gorski,B., Hansen,T., Nielsen,F.C., Thomassen,M., Yannoukakos,D., Konstantopoulou,I., Zajac,V., Ciernikova,S., Couch,F.J., Greenwood,C.M.T., Goldgar,D.E., and Foulkes,W.D. (2011) On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations. *Eur J Hum.Genet.*, 19, 300-306.
449. Miramar,M.D., Calvo,M.T., Rodriguez,A., Anton,A., Lorente,F., Barrio,E., Herrero,A., Burriel,J., and Garcia de,J.A. (2008) Genetic analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast/ovarian cancer families from Aragon (Spain): two novel truncating mutations and a large genomic deletion in BRCA1. *Breast Cancer Res Treat.*, 112, 353-358.
450. Antoniou,A.C., Pharoah,P.D., Narod,S., Risch,H.A., Eyfjord,J.E., Hopper,J.L., Olsson,H., Johannsson,O., Borg,A., Pasini,B., Radice,P., Manoukian,S., Eccles,D.M., Tang,N., Olah,E., nton-Culver,H., Warner,E., Lubinski,J., Gronwald,J., Gorski,B., Tulinius,H., Thorlacius,S., Eerola,H., Nevanlinna,H., Syrjäkoski,K.,

- Kallioniemi,O.P., Thompson,D., Evans,C., Peto,J., Lalloo,F., Evans,D.G., and Easton,D.F. (2005) Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies. *J Med Genet.*, 42, 602-603.
451. Eerola,H., Heikkilä,P., Tamminen,A., Aittomäki,K., Blomqvist,C., and Nevanlinna,H. (2005) Histopathological features of breast tumours in BRCA1, BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res*, 7, R93-100.
 452. Gabaldó Barrios,X., Sarabia Meseguer,M., Alonso Romero,J.L., Marín Vera,M., Marín Zafra,G., Sánchez Henarejos,P., Sánchez Bermúdez,A.I., and Ruiz Espejo,F. (2014) Novel BRCA1 deleterious mutation (c.1918C>T) in familial breast and ovarian cancer syndrome who share a common ancestry. *Familial Cancer*,1-5.
 453. Rashid,M.U., Zaidi,A., Torres,D., Sultan,F., Benner,A., Naqvi,B., Shakoori,A.R., Seidel-Renkert,A., Farooq,H., Narod,S., Amin,A., and Hamann,U. (2006) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in Pakistani breast and ovarian cancer patients. *Int.J Cancer*, 119, 2832-2839.
 454. Friedman,L.S., Ostermeyer,E.A., Szabo,C.I., Dowd,P., Lynch,E.D., Rowell,S.E., and King,M.C. (1994) Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat.Genet.*, 8, 399-404.
 455. Janavicius,R. (2010) Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA.J*, 1, 397-412.
 456. Gorski,B., Byrski,T., Huzarski,T., Jakubowska,A., Menkiszak,J., Gronwald,J., Pluzanska,A., Bebenek,M., Fischer-Maliszewska,L., Grzybowska,E., Narod,S.A., and Lubinski,J. (2000) Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am.J Hum.Genet.*, 66, 1963-1968.
 457. Cherbal,F., Salhi,N., Bakour,R., Adane,S., Boualga,K., and Maillet,P. (2012) BRCA1 and BRCA2 unclassified variants and missense polymorphisms in Algerian breast/ovarian cancer families. *Dis.Markers*, 32, 343-353.
 458. Van Der,L.M., Szabo,C., Besznyak,I., Liszka,G., Csokay,B., Pulay,T., Toth,J., Devilee,P., King,M.C., and Olah,E. (2000) Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary. *Int.J Cancer*, 86, 737-740.
 459. Musolino,A., Bella,M.A., Bortesi,B., Michiara,M., Naldi,N., Zanelli,P., Capelletti,M., Pezzuolo,D., Camisa,R., Savi,M., Neri,T.M., and Ardizzoni,A. (2007) BRCA mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer: a population-based study. *Breast*, 16, 280-292.
 460. Futreal,P.A., Liu,Q., Shattuck-Eidens,D., Cochran,C., Harshman,K., Tavtigian,S., Bennett,L.M., Haugen-Strano,A., Swensen,J., Miki,Y., and . (1994) BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 266, 120-122.
 461. Vega,A., Campos,B., Bressac-De-Paillerets,B., Bond,P.M., Janin,N., Douglas,F.S., Domenech,M., Baena,M., Pericay,C., Alonso,C., Carracedo,A., Baiget,M., and Diez,O. (2001) The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum.Mutat.*, 17, 520-521.
 462. Morris,J.R., Pangon,L., Boutell,C., Katagiri,T., Keep,N.H., and Solomon,E. (2006) Genetic analysis of BRCA1 ubiquitin ligase activity and its relationship to breast cancer susceptibility. *Hum.Mol.Genet.*, 15, 599-606.
 463. Friedman,L.S., Szabo,C.I., Ostermeyer,E.A., Dowd,P., Butler,L., Park,T., Lee,M.K., Goode,E.L., Rowell,S.E., and King,M.C. (1995) Novel inherited mutations and variable expressivity of BRCA1 alleles, including the founder mutation 185delAG in Ashkenazi Jewish families. *Am.J Hum.Genet.*, 57, 1284-1297.
 464. Sanz,D.J., Acedo,A., Infante,M., Duran,M., Perez-Cabornero,L., Esteban-Cardenosa,E., Lastra,E., Pagani,F., Miner,C., and Velasco,E.A. (2010) A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*, 16, 1957-1967.
 465. Menendez,M., Castellsague,J., Mirete,M., Pros,E., Feliubadalo,L., Osorio,A., Calaf,M., Tornado,E., del,V.J., Fernandez-Rodriguez,J., Quiles,F., Salinas,M., Velasco,A., Teule,A., Brunet,J., Blanco,I.,

- Capella,G., and Lazaro,C. (2012) Assessing the RNA effect of 26 DNA variants in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast Cancer Res Treat.*, 132, 979-992.
466. Millevoi,S., Bernat,S., Telly,D., Fouque,F., Gladieff,L., Favre,G., Vagner,S., and Toulas,C. (2010) The c.5242C>A BRCA1 missense variant induces exon skipping by increasing splicing repressors binding. *Breast Cancer Res Treat.*, 120, 391-399.
467. Futreal,P.A., Liu,Q., Shattuck-Eidens,D., Cochran,C., Harshman,K., Tavtigian,S., Bennett,L.M., Haugen-Strano,A., Swensen,J., Miki,Y., and . (1994) BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 266, 120-122.
468. Tesoriero,A.A., Wong,E.M., Jenkins,M.A., Hopper,J.L., Brown,M.A., Chenevix-Trench,G., Spurdle,A.B., and Southey,M.C. (2005) Molecular characterization and cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 splice site variants identified in multiple-case breast cancer families. *Hum.Mutat.*, 26, 495.
469. Velasco,S.E., Esteban,C.E., Infante,S.M., Duran,D.M., Lastra,A.E., Garcia,G.C., and Miner,P.C. (2002) [Molecular study of the BRCA1 and BRCA2 genes in 153 breast cancer families from Castilla and Leon (Spain): new nine unclassified variants identified]. *Med Clin (Barc.)*, 119, 441-445.
470. Kang,P.C., Phuah,S.Y., Sivanandan,K., Kang,I.N., Thirthagiri,E., Liu,J.J., Hassan,N., Yoon,S.Y., Thong,M.K., Hui,M., Hartman,M., Yip,C.H., Mohd Taib,N.A., and Teo,S.H. (2014) Recurrent mutation testing of BRCA1 and BRCA2 in Asian breast cancer patients identify carriers in those with presumed low risk by family history. *Breast Cancer Res Treat.*, 144, 635-642.
471. Salgado,J., Gutierrez,C., Gil,C., Robles,M., and Garcia-Foncillas,J. (2010) Comparative disease pattern of a patient with a novel BRCA2 truncation and knockout models for BRCA2. *Breast Cancer Res Treat.*, 123, 291-293.
472. Llort,G., Munoz,C.Y., Tuser,M.P., Guillermo,I.B., Lluch,J.R., Bale,A.E., and Franco,M.A. (2002) Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain. *Hum.Mutat.*, 19, 307.
473. Wagner,J.E., Tolar,J., Levran,O., Scholl,T., Deffenbaugh,A., Satagopan,J., Ben-Porat,L., Mah,K., Batish,S.D., Kutler,D.I., MacMillan,M.L., Hanenberg,H., and Auerbach,A.D. (2004) Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood*, 103, 3226-3229.
474. Risch,H.A., McLaughlin,J.R., Cole,D.E., Rosen,B., Bradley,L., Kwan,E., Jack,E., Vesprini,D.J., Kuperstein,G., Abrahamson,J.L., Fan,I., Wong,B., and Narod,S.A. (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.
475. Lubinski,J., Phelan,C.M., Ghadirian,P., Lynch,H.T., Garber,J., Weber,B., Tung,N., Horsman,D., Isaacs,C., Monteiro,A.N., Sun,P., and Narod,S.A. (2004) Cancer variation associated with the position of the mutation in the BRCA2 gene. *Fam.Cancer*, 3, 1-10.
476. Esteban,C.E., Bolufer,G.P., de,J.J., I, Palanca,S.S., Barragan,G.E., Chirivella,G., I, Segura,H.A., Guillen,P.C., and Martinez de,D.E. (2010) Broad BRCA1 and BRCA2 mutational spectrum and high incidence of recurrent and novel mutations in the eastern Spain population. *Breast Cancer Res Treat.*, 121, 257-260.
477. Weitzel,J.N., Clague,J., Martir-Negron,A., Ogaz,R., Herzog,J., Ricker,C., Jungbluth,C., Cina,C., Duncan,P., Unzeitig,G., Saldivar,J.S., Beattie,M., Feldman,N., Sand,S., Port,D., Barragan,D.I., John,E.M., Neuhausen,S.L., and Larson,G.P. (2013) Prevalence and type of BRCA mutations in Hispanics undergoing genetic cancer risk assessment in the southwestern United States: a report from the Clinical Cancer Genetics Community Research Network. *J Clin Oncol*, 31, 210-216.
478. Meyer,S., Tischkowitz,M., Chandler,K., Gillespie,A., Birch,J.M., and Evans,D.G. (2014) Fanconi anaemia, BRCA2 mutations and childhood cancer: a developmental perspective from clinical and epidemiological observations with implications for genetic counselling. *J Med Genet.*, 51, 71-75.
479. Kaufman,B., Laitman,Y., Carvalho,M.A., Edelman,L., Menachem,T.D., Zidan,J., Monteiro,A.N., and Friedman,E. (2006) The P1812A and P25T BRCA1 and the 5164del4 BRCA2 mutations: occurrence in high-risk non-Ashkenazi Jews. *Genet.Test.*, 10, 200-207.

480. Infante,M., Duran,M., Esteban-Cardenosa,E., Miner,C., and Velasco,E. (2006) High proportion of novel mutations of BRCA1 and BRCA2 in breast/ovarian cancer patients from Castilla-Leon (central Spain). *J Hum.Genet.*, 51, 611-617.
481. Markham,N.R. and Zuker,M. (2008) UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. *Methods Mol.Biol.*, 453, 3-31.
482. Wright,B.E., Reimers,J.M., Schmidt,K.H., and Reschke,D.K. (2002) Hypermutable bases in the p53 cancer gene are at vulnerable positions in DNA secondary structures. *Cancer Res*, 62, 5641-5644.
483. Infante,M., Duran,M., Acedo,A., Perez-Cabornero,L., Sanz,D.J., Garcia-Gonzalez,M., Beristain,E., Esteban-Cardenosa,E., de la,H.M., Teule,A., Vega,A., Tejada,M.I., Lastra,E., Miner,C., and Velasco,E.A. (2010) BRCA1 5272-1G>A and BRCA2 5374delTATG are founder mutations of high relevance for genetic counselling in breast/ovarian cancer families of Spanish origin. *Clin Genet.*, 77, 60-69.
484. Marshall,M., Solomon,S., and Lawrence,W.D. (2009) Case report: de novo BRCA2 gene mutation in a 35-year-old woman with breast cancer. *Clin Genet.*, 76, 427-430.
485. Stegel,V., Krajc,M., Zgajnar,J., Teugels,E., De,G.J., Hocevar,M., and Novakovic,S. (2011) The occurrence of germline BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in Slovenian population. *BMC Med Genet.*, 12, 9.
486. Campos,B., Diez,O., Odefrey,F., Domenech,M., Moncoutier,V., Martinez-Ferrandis,J.I., Osorio,A., Balmana,J., Barroso,A., Armengod,M.E., Benitez,J., Alonso,C., Stoppa-Lyonnet,D., Goldgar,D., and Baiget,M. (2003) Haplotype analysis of the BRCA2 9254delATCAT recurrent mutation in breast/ovarian cancer families from Spain. *Hum.Mutat.*, 21, 452.
487. Vogel,K.J., Atchley,D.P., Erlichman,J., Broglio,K.R., Ready,K.J., Valero,V., Amos,C.I., Hortobagyi,G.N., Lu,K.H., and Arun,B. (2007) BRCA1 and BRCA2 genetic testing in Hispanic patients: mutation prevalence and evaluation of the BRCAPRO risk assessment model. *J Clin Oncol*, 25, 4635-4641.
488. Infante,M., Duran,M., Lasa,A., Acedo,A., de la,H.M., Esteban-Cardenosa,E., Sanz,D.J., Perez-Cabornero,L., Lastra,E., Miner,C., and Velasco,E.A. (2010) Two founder BRCA2 mutations predispose to breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat.*, 122, 567-571.
489. Evans,D.G., Bulman,M., Young,K., Howard,E., Bayliss,S., Wallace,A., and Lalloo,F. (2008) BRCA1/2 mutation analysis in male breast cancer families from North West England. *Fam.Cancer*, 7, 113-117.
490. Gutierrez-Enriquez,S., Ramon,Y.C., Alonso,C., Corral,A., Carrasco,P., Cornet,M., Sanz,J., Ribas,M., Baiget,M., and Diez,O. (2011) Ionizing radiation or mitomycin-induced micronuclei in lymphocytes of BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat.*, 127, 611-622.
491. Caux-Moncoutier,V., Pages-Berhouet,S., Michaux,D., Asselain,B., Castera,L., De,P.A., Buecher,B., Gauthier-Villars,M., Stoppa-Lyonnet,D., and Houdayer,C. (2009) Impact of BRCA1 and BRCA2 variants on splicing: clues from an allelic imbalance study. *Eur J Hum.Genet.*, 17, 1471-1480.
492. Duran,M., Esteban-Cardenosa,E., Velasco,E., Infante,M., and Miner,C. (2003) Mutational analysis of BRCA2 in Spanish breast cancer patients from Castilla-Leon: identification of four novel truncating mutations. *Hum.Mutat.*, 21, 448.
493. Dutil,J., Colon-Colon,J.L., Matta,J.L., Sutphen,R., and Echenique,M. (2012) Identification of the prevalent BRCA1 and BRCA2 mutations in the female population of Puerto Rico. *Cancer Genet.*, 205, 242-248.
494. Thomassen,M., Kruse,T.A., Jensen,P.K., and Gerdes,A.M. (2006) A missense mutation in exon 13 in BRCA2, c.7235G>A, results in skipping of exon 13. *Genet.Test.*, 10, 116-120.
495. Machackova,E., Foretova,L., Lukesova,M., Vasickova,P., Navratilova,M., Coene,I., Pavlu,H., Kosinova,V., Kuklova,J., and Claes,K. (2008) Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. *BMC Cancer*, 8, 140.
496. Acedo,A., Sanz,D.J., Duran,M., Infante,M., Perez-Cabornero,L., Miner,C., and Velasco,E.A. (2012) Comprehensive splicing functional analysis of DNA variants of the BRCA2 gene by hybrid minigenes. *Breast Cancer Res*, 14, R87.

497. Peelen,T., van,V.M., Bosch,A., Bignell,G., Vasen,H.F., Klijn,J.G., Meijers-Heijboer,H., Stratton,M., van Ommen,G.J., Cornelisse,C.J., and Devilee,P. (2000) Screening for BRCA2 mutations in 81 Dutch breast-ovarian cancer families. *Br.J Cancer*, 82, 151-156.
498. Burk-Herrick,A., Scally,M., mrine-Madsen,H., Stanhope,M.J., and Springer,M.S. (2006) Natural selection and mammalian BRCA1 sequences: elucidating functionally important sites relevant to breast cancer susceptibility in humans. *Mamm.Genome*, 17, 257-270.
499. Thery,J.C., Krieger,S., Gaildrat,P., Revillion,F., Buisine,M.P., Killian,A., Duponchel,C., Rousselin,A., Vaur,D., Peyrat,J.P., Berthet,P., Frebourg,T., Martins,A., Hardouin,A., and Tosi,M. (2011) Contribution of bioinformatics predictions and functional splicing assays to the interpretation of unclassified variants of the BRCA genes. *Eur J Hum.Genet.*, 19, 1052-1058.
500. Borg,A., Haile,R.W., Malone,K.E., Capanu,M., Diep,A., Torngren,T., Teraoka,S., Begg,C.B., Thomas,D.C., Concannon,P., Mellekjær,L., Bernstein,L., Tellhed,L., Xue,S., Olson,E.R., Liang,X., Dolle,J., Borresen-Dale,A.L., and Bernstein,J.L. (2010) Characterization of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations and variants of unknown clinical significance in unilateral and bilateral breast cancer: the WECARE study. *Hum.Mutat.*, 31, E1200-E1240.
501. Riahi,A., Kharrat,M., Ghourabi,M.E., Khomsi,F., Gamoudi,A., Lariani,I., May,A.E., Rahal,K., and Chaabouni-Bouhamed,H. (2013) Mutation spectrum and prevalence of BRCA1 and BRCA2 genes in patients with familial and early-onset breast/ovarian cancer from Tunisia. *Clin Genet.*
502. Houdayer,C., Caux-Moncoutier,V., Krieger,S., Barrois,M., Bonnet,F., Bourdon,V., Bronner,M., Buisson,M., Coulet,F., Gaildrat,P., Lefol,C., Leone,M., Mazoyer,S., Muller,D., Remenieras,A., Revillion,F., Rouleau,E., Sokolowska,J., Vert,J.P., Lidereau,R., Soubrier,F., Sobol,H., Sevenet,N., Bressac-de,P.B., Hardouin,A., Tosi,M., Sinilnikova,O.M., and Stoppa-Lyonnet,D. (2012) Guidelines for splicing analysis in molecular diagnosis derived from a set of 327 combined in silico/in vitro studies on BRCA1 and BRCA2 variants. *Hum.Mutat.*, 33, 1228-1238.
503. Mazoyer,S., Dunning,A.M., Serova,O., Dearden,J., Puget,N., Healey,C.S., Gayther,S.A., Mangion,J., Stratton,M.R., Lynch,H.T., Goldgar,D.E., Ponder,B.A., and Lenoir,G.M. (1996) A polymorphic stop codon in BRCA2. *Nat.Genet.*, 14, 253-254.
504. Wu,K., Hinson,S.R., Ohashi,A., Farrugia,D., Wendt,P., Tavtigian,S.V., Deffenbaugh,A., Goldgar,D., and Couch,F.J. (2005) Functional evaluation and cancer risk assessment of BRCA2 unclassified variants. *Cancer Res*, 65, 417-426.
505. Balia,C., Galli,A., and Caligo,M.A. (2011) Effect of the overexpression of BRCA2 unclassified missense variants on spontaneous homologous recombination in human cells. *Breast Cancer Res Treat.*, 129, 1001-1009.
506. Bonnet,C., Krieger,S., Vezain,M., Rousselin,A., Tournier,I., Martins,A., Berthet,P., Chevrier,A., Dugast,C., Layet,V., Rossi,A., Lidereau,R., Frebourg,T., Hardouin,A., and Tosi,M. (2008) Screening BRCA1 and BRCA2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription PCR on patient RNA and an ex vivo assay based on a splicing reporter minigene. *J Med Genet.*, 45, 438-446.
507. Han,S.H., Lee,K.R., Lee,D.G., Kim,B.Y., Lee,K.E., and Chung,W.S. (2006) Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 from 793 Korean patients with sporadic breast cancer. *Clin Genet.*, 70, 496-501.
508. Wagner,T.M., Hirtenlehner,K., Shen,P., Moeslinger,R., Muhr,D., Fleischmann,E., Concin,H., Doeller,W., Haid,A., Lang,A.H., Mayer,P., Petru,E., Ropp,E., Langbauer,G., Kubista,E., Scheiner,O., Underhill,P., Mountain,J., Stierer,M., Zielinski,C., and Oefner,P. (1999) Global sequence diversity of BRCA2: analysis of 71 breast cancer families and 95 control individuals of worldwide populations. *Hum.Mol.Genet.*, 8, 413-423.
509. Pettigrew,C.A., Wayte,N., Wronski,A., Lovelock,P.K., Spurdle,A.B., and Brown,M.A. (2008) Colocalisation of predicted exonic splicing enhancers in BRCA2 with reported sequence variants. *Breast Cancer Res Treat.*, 110, 227-234.
510. Johnson,N., Fletcher,O., Palles,C., Rudd,M., Webb,E., Sellick,G., Dos,S.S., I, McCormack,V., Gibson,L., Fraser,A., Leonard,A., Gilham,C., Tavtigian,S.V., Ashworth,A., Houlston,R., and Peto,J. (2007) Counting

- potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility. *Hum.Mol.Genet.*, 16, 1051-1057.
511. Judkins,T., Hendrickson,B.C., Deffenbaugh,A.M., Eliason,K., Leclair,B., Norton,M.J., Ward,B.E., Pruss,D., and Scholl,T. (2005) Application of embryonic lethal or other obvious phenotypes to characterize the clinical significance of genetic variants found in trans with known deleterious mutations. *Cancer Res*, 65, 10096-10103.
 512. Easton,D.F., Deffenbaugh,A.M., Pruss,D., Frye,C., Wenstrup,R.J., Ien-Brady,K., Tavtigian,S.V., Monteiro,A.N., Iversen,E.S., Couch,F.J., and Goldgar,D.E. (2007) A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer-predisposition genes. *Am.J.Hum.Genet.*, 81, 873-883.
 513. Thomassen,M., Blanco,A., Montagna,M., Hansen,T.V., Pedersen,I.S., Gutierrez-Enriquez,S., Menendez,M., Fachal,L., Santamarina,M., Steffensen,A.Y., Jonson,L., Agata,S., Whiley,P., Tognazzo,S., Tornero,E., Jensen,U.B., Balmana,J., Kruse,T.A., Goldgar,D.E., Lazaro,C., Diez,O., Spurdle,A.B., and Vega,A. (2012) Characterization of BRCA1 and BRCA2 splicing variants: a collaborative report by ENIGMA consortium members. *Breast Cancer Res Treat.*, 132, 1009-1023.
 514. Li,L., Biswas,K., Habib,L.A., Kuznetsov,S.G., Hamel,N., Kirchhoff,T., Wong,N., Armel,S., Chong,G., Narod,S.A., Claes,K., Offit,K., Robson,M.E., Stauffer,S., Sharan,S.K., and Foulkes,W.D. (2009) Functional redundancy of exon 12 of BRCA2 revealed by a comprehensive analysis of the c.6853A>G (p.I2285V) variant. *Hum.Mutat.*, 30, 1543-1550.
 515. Gutierrez-Enriquez,S., de la,H.M., Martinez-Bouzas,C., Sanchez de,A.A., Cajal,T., Lloret,G., Blanco,I., Beristain,E., az-Rubio,E., Alonso,C., Tejada,M.I., Caldes,T., and Diez,O. (2007) Screening for large rearrangements of the BRCA2 gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, 103, 103-107.
 516. Ruiz de,G.G., Gutierrez-Enriquez,S., Garre,P., Bonache,S., Romero,A., Palomo,L., Sanchez de,A.A., Benitez,J., Balmana,J., Perez-Segura,P., az-Rubio,E., Diez,O., Caldes,T., and de la,H.M. (2012) Characterization of four novel BRCA2 large genomic rearrangements in Spanish breast/ovarian cancer families: review of the literature, and reevaluation of the genetic mechanisms involved in their origin. *Breast Cancer Res Treat.*, 133, 273-283.
 517. Baudhuin,L.M., Mai,M., French,A.J., Kruckeberg,K.E., Swanson,R.L., Winters,J.L., Courteau,L.K., and Thibodeau,S.N. (2005) Analysis of hMLH1 and hMSH2 gene dosage alterations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients by novel methods. *J Mol.Diagn.*, 7, 226-235.
 518. Wehner,M., Mangold,E., Sengteller,M., Friedrichs,N., Aretz,S., Friedl,W., Propping,P., and Pagenstecher,C. (2005) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: pitfalls in deletion screening in MSH2 and MLH1 genes. *Eur J Hum.Genet.*, 13, 983-986.
 519. Weitzel,J.N., Lagos,V., Blazer,K.R., Nelson,R., Ricker,C., Herzog,J., McGuire,C., and Neuhausen,S. (2005) Prevalence of BRCA mutations and founder effect in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 14, 1666-1671.
 520. Frank,T.S., Deffenbaugh,A.M., Reid,J.E., Hulick,M., Ward,B.E., Lingenfelter,B., Gumpfer,K.L., Scholl,T., Tavtigian,S.V., Pruss,D.R., and Critchfield,G.C. (2002) Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J.Clin.Oncol.*, 20, 1480-1490.
 521. Vega,A., Torres,M., Martinez,J.I., Ruiz-Ponte,C., Barros,F., and Carracedo,A. (2002) Analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast and breast/ovarian cancer families shows population substructure in the Iberian peninsula. *Ann Hum.Genet.*, 66, 29-36.
 522. Beristain,E., Martinez-Bouzas,C., Guerra,I., Viguera,N., Moreno,J., Ibanez,E., Diez,J., Rodriguez,F., Mallabiabarrena,G., Lujan,S., Gorostiaga,J., De Pablo,J.L., Mendizabal,J.L., and Tejada,M.I. (2007) Differences in the frequency and distribution of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast/ovarian cancer cases from the Basque country with respect to the Spanish population: implications for genetic counselling. *Breast Cancer Res Treat.*, 106, 255-262.
 523. Chen,S., Iversen,E.S., Friebel,T., Finkelstein,D., Weber,B.L., Eisen,A., Peterson,L.E., Schildkraut,J.M., Isaacs,C., Peshkin,B.N., Corio,C., Leondaridis,L., Tomlinson,G., Dutson,D., Kerber,R., Amos,C.I.,

- Strong, L.C., Berry, D.A., Euhus, D.M., and Parmigiani, G. (2006) Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. *J Clin Oncol*, 24, 863-871.
524. Chen, S. and Parmigiani, G. (2007) Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol*, 25, 1329-1333.
525. Narod, S.A. and Foulkes, W.D. (2004) BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat.Rev.Cancer*, 4, 665-676.
526. Gayther, S.A., Mangion, J., Russell, P., Seal, S., Barfoot, R., Ponder, B.A., Stratton, M.R., and Easton, D. (1997) Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat.Genet.*, 15, 103-105.
527. Thompson, D. and Easton, D. (2001) Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *Am.J Hum.Genet.*, 68, 410-419.
528. Thompson, D. and Easton, D. (2002) Variation in BRCA1 cancer risks by mutation position. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 11, 329-336.
529. Risch, H.A., McLaughlin, J.R., Cole, D.E., Rosen, B., Bradley, L., Fan, I., Tang, J., Li, S., Zhang, S., Shaw, P.A., and Narod, S.A. (2006) Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. *J Natl Cancer Inst*, 98, 1694-1706.
530. Spurdle, A.B. (2010) Clinical relevance of rare germline sequence variants in cancer genes: evolution and application of classification models. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 20, 315-323.
531. Pilato, B., Martinucci, M., Danza, K., Pinto, R., Petriella, D., Lacalamita, R., Bruno, M., Lambo, R., D'Amico, C., Paradiso, A., and Tommasi, S. (2011) Mutations and polymorphic BRCA variants transmission in breast cancer familial members. *Breast Cancer Res Treat.*, 125, 651-657.
532. Sehl, M.E., Langer, L.R., Papp, J.C., Kwan, L., Seldon, J.L., Arellano, G., Reiss, J., Reed, E.F., Dandekar, S., Korin, Y., Sinsheimer, J.S., Zhang, Z.F., and Ganz, P.A. (2009) Associations between single nucleotide polymorphisms in double-stranded DNA repair pathway genes and familial breast cancer. *Clin Cancer Res*, 15, 2192-2203.
533. Baynes, C., Healey, C.S., Pooley, K.A., Scollen, S., Luben, R.N., Thompson, D.J., Pharoah, P.D., Easton, D.F., Ponder, B.A., and Dunning, A.M. (2007) Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk. *Breast Cancer Res*, 9, R27.
534. Cox, D.G., Kraft, P., Hankinson, S.E., and Hunter, D.J. (2005) Haplotype analysis of common variants in the BRCA1 gene and risk of sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 7, R171-R175.
535. Freedman, M.L., Penney, K.L., Stram, D.O., Le, M.L., Hirschhorn, J.N., Kolonel, L.N., Altshuler, D., Henderson, B.E., and Haiman, C.A. (2004) Common variation in BRCA2 and breast cancer risk: a haplotype-based analysis in the Multiethnic Cohort. *Hum.Mol.Genet.*, 13, 2431-2441.
536. Freedman, M.L., Penney, K.L., Stram, D.O., Riley, S., Kean-Cowdin, R., Le, M.L., Altshuler, D., and Haiman, C.A. (2005) A haplotype-based case-control study of BRCA1 and sporadic breast cancer risk. *Cancer Res*, 65, 7516-7522.
537. Dunning, A.M., Chiano, M., Smith, N.R., Dearden, J., Gore, M., Oakes, S., Wilson, C., Stratton, M., Peto, J., Easton, D., Clayton, D., and Ponder, B.A. (1997) Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Hum.Mol.Genet.*, 6, 285-289.
538. Cox, D.G., Hankinson, S.E., and Hunter, D.J. (2005) No association between BRCA2 N372H and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 14, 1353-1354.
539. Healey, C.S., Dunning, A.M., Teare, M.D., Chase, D., Parker, L., Burn, J., Chang-Claude, J., Mannermaa, A., Kataja, V., Huntsman, D.G., Pharoah, P.D., Luben, R.N., Easton, D.F., and Ponder, B.A. (2000) A common variant in BRCA2 is associated with both breast cancer risk and prenatal viability. *Nat.Genet.*, 26, 362-364.
540. Hughes, D.J., Ginolhac, S.M., Coupier, I., Corbex, M., Bressac-De-Paillerets, B., Chompret, A., Bignon, Y.J., Uhrhammer, N., Lasset, C., Giraud, S., Hardouin, A., Berthet, P., Peyrat, J.P., Fournier, J., Nogues, C., Lidereau, R., Muller, D., Fricker, J.P., Longy, M., Toulas, C., Guimbaud, R., Maugard, C., Olschwang, S.,

- Yannoukakos,D., Durocher,F., Moisan,A.M., Simard,J., Mazoyer,S., Lynch,H.T., Szabo,C., Lenoir,G.M., Goldgar,D.E., Stoppa-Lyonnet,D., and Sinilnikova,O.M. (2005) Common BRCA2 variants and modification of breast and ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 14, 265-267.
541. Ishitobi,M., Miyoshi,Y., Ando,A., Hasegawa,S., Egawa,C., Tamaki,Y., Monden,M., and Noguchi,S. (2003) Association of BRCA2 polymorphism at codon 784 (Met/Val) with breast cancer risk and prognosis. *Clin Cancer Res*, 9, 1376-1380.
542. Spurdle,A.B., Hopper,J.L., Chen,X., Dite,G.S., Cui,J., McCredie,M.R., Giles,G.G., Ellis-Steinborner,S., Venter,D.J., Newman,B., Southey,M.C., and Chenevix-Trench,G. (2002) The BRCA2 372 HH genotype is associated with risk of breast cancer in Australian women under age 60 years. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 11, 413-416.
543. Armour,J.A., Barton,D.E., Cockburn,D.J., and Taylor,G.R. (2002) The detection of large deletions or duplications in genomic DNA. *Hum.Mutat.*, 20, 325-337.
544. Brownstein,Z., Friedman,L.M., Shahin,H., Oron-Karni,V., Kol,N., Abu,R.A., Parzefall,T., Lev,D., Shalev,S., Frydman,M., Davidov,B., Shohat,M., Rahile,M., Lieberman,S., Levy-Lahad,E., Lee,M.K., Shomron,N., King,M.C., Walsh,T., Kanaan,M., and Avraham,K.B. (2011) Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in Middle Eastern families. *Genome Biol.*, 12, R89.
545. Lim,B.C., Lee,S., Shin,J.Y., Kim,J.I., Hwang,H., Kim,K.J., Hwang,Y.S., Seo,J.S., and Chae,J.H. (2011) Genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing technology: comprehensive mutational search in a single platform. *J Med Genet.*, 48, 731-736.
546. Walsh,T., Casadei,S., Lee,M.K., Pennil,C.C., Nord,A.S., Thornton,A.M., Roeb,W., Agnew,K.J., Stray,S.M., Wickramanayake,A., Norquist,B., Pennington,K.P., Garcia,R.L., King,M.C., and Swisher,E.M. (2011) Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc.Natl Acad Sci.U.S.A*, 108, 18032-18037.
547. Judkins,T., Rosenthal,E., Arnell,C., Burbidge,L.A., Geary,W., Barrus,T., Schoenberger,J., Trost,J., Wenstrup,R.J., and Roa,B.B. (2012) Clinical significance of large rearrangements in BRCA1 and BRCA2. *Cancer*, 118, 5210-5216.
548. Walsh,T., Casadei,S., Coats,K.H., Swisher,E., Stray,S.M., Higgins,J., Roach,K.C., Mandell,J., Lee,M.K., Ciernikova,S., Foretova,L., Soucek,P., and King,M.C. (2006) Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA*, 295, 1379-1388.
549. Woodward,A.M., Davis,T.A., Silva,A.G., Kirk,J.A., and Leary,J.A. (2005) Large genomic rearrangements of both BRCA2 and BRCA1 are a feature of the inherited breast/ovarian cancer phenotype in selected families. *J Med Genet.*, 42, e31.
550. Hansen,T., Jonson,L., Albrechtsen,A., Andersen,M.K., Ejlersen,B., and Nielsen,F.C. (2009) Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat.*, 115, 315-323.
551. Ticha,I., Kleibl,Z., Stribna,J., Kotlas,J., Zimovjanova,M., Mateju,M., Zikan,M., and Pohlreich,P. (2010) Screening for genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 genes in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients: high proportion of population specific alterations in BRCA1 gene. *Breast Cancer Res Treat.*, 124, 337-347.
552. Buffone,A., Capalbo,C., Ricevuto,E., Sidoni,T., Ottini,L., Falchetti,M., Cortesi,E., Marchetti,P., Scambia,G., Tomao,S., Rinaldi,C., Zani,M., Ferraro,S., Frati,L., Screpanti,I., Gulino,A., and Giannini,G. (2007) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in a cohort of consecutive Italian breast and/or ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat.*, 106, 289-296.
553. de la,H.M., Gutierrez-Enriquez,S., Velasco,E., Osorio,A., Sanchez de,A.A., Vega,A., Salazar,R., Esteban,E., Llort,G., Gonzalez-Sarmiento,R., Carracedo,A., Benitez,J., Miner,C., Diez,O., az-Rubio,E., and Caldes,T. (2006) Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Clin Chem.*, 52, 1480-1485.

554. Mazoyer,S. (2005) Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum.Mutat.*, 25, 415-422.
555. Weitzel,J.N., Lagos,V.I., Herzog,J.S., Judkins,T., Hendrickson,B., Ho,J.S., Ricker,C.N., Lowstuter,K.J., Blazer,K.R., Tomlinson,G., and Scholl,T. (2007) Evidence for common ancestral origin of a recurring BRCA1 genomic rearrangement identified in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev*, 16, 1615-1620.
556. Machado,P.M., Brandao,R.D., Cavaco,B.M., Eugenio,J., Bento,S., Nave,M., Rodrigues,P., Fernandes,A., and Vaz,F. (2007) Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. *J Clin Oncol*, 25, 2027-2034.
557. Peixoto,A., Santos,C., Rocha,P., Pinheiro,M., Principe,S., Pereira,D., Rodrigues,H., Castro,F., Abreu,J., Gusmao,L., Amorim,A., and Teixeira,M.R. (2009) The c.156_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Res Treat.*, 114, 31-38.
558. Sluiter,M.D. and van Rensburg,E.J. (2011) Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res Treat.*, 125, 325-349.
559. Tournier,I., Paillet,B.B., Sobol,H., Stoppa-Lyonnet,D., Lidereau,R., Barrois,M., Mazoyer,S., Coulet,F., Hardouin,A., Chompret,A., Lortholary,A., Chappuis,P., Bourdon,V., Bonadona,V., Maugard,C., Gilbert,B., Nogues,C., Frebourg,T., and Tosi,M. (2004) Significant contribution of germline BRCA2 rearrangements in male breast cancer families. *Cancer Res*, 64, 8143-8147.
560. Seal,S., Thompson,D., Renwick,A., Elliott,A., Kelly,P., Barfoot,R., Chagtai,T., Jayatilake,H., Ahmed,M., Spanova,K., North,B., McGuffog,L., Evans,D.G., Eccles,D., Easton,D.F., Stratton,M.R., and Rahman,N. (2006) Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat.Genet.*, 38, 1239-1241.
561. Rahman,N., Seal,S., Thompson,D., Kelly,P., Renwick,A., Elliott,A., Reid,S., Spanova,K., Barfoot,R., Chagtai,T., Jayatilake,H., McGuffog,L., Hanks,S., Evans,D.G., Eccles,D., Easton,D.F., and Stratton,M.R. (2007) PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat.Genet.*, 39, 165-167.
562. Antoniou,A.C., Pharoah,P.D., McMullan,G., Day,N.E., Stratton,M.R., Peto,J., Ponder,B.J., and Easton,D.F. (2002) A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br.J Cancer*, 86, 76-83.
563. Balmana,J., Diez,O., Rubio,I.T., and Cardoso,F. (2011) BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*, 22 Suppl 6, vi31-vi34.
564. Goffin,J.R., Chappuis,P.O., Begin,L.R., Wong,N., Brunet,J.S., Hamel,N., Paradis,A.J., Boyd,J., and Foulkes,W.D. (2003) Impact of germline BRCA1 mutations and overexpression of p53 on prognosis and response to treatment following breast carcinoma: 10-year follow up data. *Cancer*, 97, 527-536.
565. Moller,P., Borg,A., Evans,D.G., Haites,N., Reis,M.M., Vasen,H., Anderson,E., Steel,C.M., Apold,J., Goudie,D., Howell,A., Lalloo,F., Maehle,L., Gregory,H., and Heimdal,K. (2002) Survival in prospectively ascertained familial breast cancer: analysis of a series stratified by tumour characteristics, BRCA mutations and oophorectomy. *Int.J Cancer*, 101, 555-559.
566. Atchley,D.P., Albarracin,C.T., Lopez,A., Valero,V., Amos,C.I., Gonzalez-Angulo,A.M., Hortobagyi,G.N., and Arun,B.K. (2008) Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J.Clin.Oncol.*, 26, 4282-4288.
567. Xu,J., Wang,B., Zhang,Y., Li,R., Wang,Y., and Zhang,S. (2012) Clinical implications for BRCA gene mutation in breast cancer. *Mol.Biol.Rep.*, 39, 3097-3102.
568. Brekelmans,C.T., Seynaeve,C., Menke-Pluymers,M., Bruggenwirth,H.T., Tilanus-Linthorst,M.M., Bartels,C.C., Kriege,M., van Geel,A.N., Crepin,C.M., Blom,J.C., Meijers-Heijboer,H., and Klijn,J.G. (2006) Survival and prognostic factors in BRCA1-associated breast cancer. *Ann.Oncol.*, 17, 391-400.

569. Garcia-Etienne,C.A., Barile,M., Gentilini,O.D., Botteri,E., Rotmensz,N., Sagona,A., Farante,G., Galimberti,V., Luini,A., Veronesi,P., and Bonanni,B. (2009) Breast-conserving surgery in BRCA1/2 mutation carriers: are we approaching an answer? *Ann Surg.Oncol*, 16, 3380-3387.
570. Pierce,L.J., Strawderman,M., Narod,S.A., Oliviotto,I., Eisen,A., Dawson,L., Gaffney,D., Solin,L.J., Nixon,A., Garber,J., Berg,C., Isaacs,C., Heimann,R., Olopade,O.I., Haffty,B., and Weber,B.L. (2000) Effect of radiotherapy after breast-conserving treatment in women with breast cancer and germline BRCA1/2 mutations. *J Clin Oncol*, 18, 3360-3369.
571. Pierce,L.J., Levin,A.M., Rebbeck,T.R., Ben-David,M.A., Friedman,E., Solin,L.J., Harris,E.E., Gaffney,D.K., Haffty,B.G., Dawson,L.A., Narod,S.A., Olivotto,I.A., Eisen,A., Whelan,T.J., Olopade,O.I., Isaacs,C., Merajver,S.D., Wong,J.S., Garber,J.E., and Weber,B.L. (2006) Ten-year multi-institutional results of breast-conserving surgery and radiotherapy in BRCA1/2-associated stage I/II breast cancer. *J Clin Oncol*, 24, 2437-2443.
572. Verhoog,L.C., Brekelmans,C.T., Seynaeve,C., Dahmen,G., van Geel,A.N., Bartels,C.C., Tilanus-Linthorst,M.M., Wagner,A., Devilee,P., Halley,D.J., van den Ouweland,A.M., Meijers-Heijboer,E.J., and Klijn,J.G. (1999) Survival in hereditary breast cancer associated with germline mutations of BRCA2. *J Clin Oncol*, 17, 3396-3402.
573. Haffty,B.G., Harrold,E., Khan,A.J., Pathare,P., Smith,T.E., Turner,B.C., Glazer,P.M., Ward,B., Carter,D., Matloff,E., Bale,A.E., and varez-Franco,M. (2002) Outcome of conservatively managed early-onset breast cancer by BRCA1/2 status. *Lancet*, 359, 1471-1477.
574. Hamann,U. and Sinn,H.P. (2000) Survival and tumor characteristics of German hereditary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.*, 59, 185-192.
575. Kirova,Y.M., Stoppa-Lyonnet,D., Savignoni,A., Sigal-Zafrani,B., Fabre,N., and Fourquet,A. (2005) Risk of breast cancer recurrence and contralateral breast cancer in relation to BRCA1 and BRCA2 mutation status following breast-conserving surgery and radiotherapy. *Eur J Cancer*, 41, 2304-2311.
576. Struwing,J.P., Hartge,P., Wacholder,S., Baker,S.M., Berlin,M., McAdams,M., Timmerman,M.M., Brody,L.C., and Tucker,M.A. (1997) The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N.Engl J Med*, 336, 1401-1408.
577. Fentiman,I.S., Fourquet,A., and Hortobagyi,G.N. (2006) Male breast cancer. *Lancet*, 367, 595-604.
578. Leongamornlert,D., Mahmud,N., Tymrakiewicz,M., Saunders,E., Dadaev,T., Castro,E., Goh,C., Govindasami,K., Guy,M., O'Brien,L., Sawyer,E., Hall,A., Wilkinson,R., Easton,D., Goldgar,D., Eeles,R., and Kote-Jarai,Z. (2012) Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Br.J Cancer*, 106, 1697-1701.
579. Tai,Y.C., Domchek,S., Parmigiani,G., and Chen,S. (2007) Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 99, 1811-1814.
580. Thorlacius,S., Sigurdsson,S., Bjarnadottir,H., Olafsdottir,G., Jonasson,J.G., Tryggvadottir,L., Tulinius,H., and Eyfjord,J.E. (1997) Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population. *Am.J Hum.Genet.*, 60, 1079-1084.
581. Mavaddat,N., Barrowdale,D., Andrulis,I.L., Domchek,S.M., Eccles,D., Nevanlinna,H., Ramus,S.J., Spurdle,A., Robson,M., Sherman,M., Mulligan,A.M., Couch,F.J., Engel,C., McGuffog,L., Healey,S., Sinilnikova,O.M., Southey,M.C., Terry,M.B., Goldgar,D., O'Malley,F., John,E.M., Janavicius,R., Tihomirova,L., Hansen,T.V., Nielsen,F.C., Osorio,A., Stavropoulou,A., Benitez,J., Manoukian,S., Peissel,B., Barile,M., Volorio,S., Pasini,B., Dolcetti,R., Putignano,A.L., Ottini,L., Radice,P., Hamann,U., Rashid,M.U., Hogervorst,F.B., Kriege,M., van der Luitj,R.B., Peock,S., Frost,D., Evans,D.G., Brewer,C., Walker,L., Rogers,M.T., Side,L.E., Houghton,C., Weaver,J., Godwin,A.K., Schmutzler,R.K., Wappenschmidt,B., Meindl,A., Kast,K., Arnold,N., Niederacher,D., Sutter,C., Deissler,H., Gadzicki,D., Preisler-Adams,S., Varon-Mateeva,R., Schonbuchner,I., Gevensleben,H., Stoppa-Lyonnet,D., Belotti,M., Barjhoux,L., Isaacs,C., Peshkin,B.N., Caldes,T., de la,H.M., Canadas,C., Heikkinen,T., Heikkila,P., Aittomaki,K., Blanco,I., Lazaro,C., Brunet,J., Agnarsson,B.A., Arason,A., Barkardottir,R.B., Dumont,M., Simard,J., Montagna,M., Agata,S., D'Andrea,E., Yan,M., Fox,S., Rebbeck,T.R., Rubinstein,W., Tung,N., Garber,J.E., Wang,X., Fredericksen,Z., Pankratz,V.S., Lindor,N.M., Szabo,C., Offit,K., Sakr,R., Gaudet,M.M., Singer,C.F., Tea,M.K., Rappaport,C., Mai,P.L., Greene,M.H., Sokolenko,A., Imyaninov,E., Toland,A.E., Senter,L., Sweet,K., Thomassen,M., Gerdes,A.M., Kruse,T., Caligo,M., Aretini,P., Rantala,J.,

- von, W.A., Henriksson, K., Steele, L., Neuhausen, S.L., Nussbaum, R., Beattie, M., Odunsi, K., Sucheston, L., Gayther, S.A., Nathanson, K., Gross, J., Walsh, C., Karlan, B., Chenevix-Trench, G., Easton, D.F., and Antoniou, A.C. (2012) Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 21, 134-147.
582. Laakso, M., Loman, N., Borg, A., and Isola, J. (2005) Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Mod. Pathol.*, 18, 1321-1328.
583. Eisinger, F., Nogues, C., Guinebretiere, J.M., Peyrat, J.P., Bardou, V.J., Noguchi, T., Vennin, P., Sauvan, R., Lidereau, R., Birnbaum, D., Jacquemier, J., and Sobol, H. (1999) Novel indications for BRCA1 screening using individual clinical and morphological features. *Int. J. Cancer*, 84, 263-267.
584. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490, 61-70.
585. Risch, H.A., McLaughlin, J.R., Cole, D.E., Rosen, B., Bradley, L., Kwan, E., Jack, E., Vesprini, D.J., Kuperstein, G., Abrahamson, J.L., Fan, I., Wong, B., and Narod, S.A. (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.
586. Sogaard, M., Kjaer, S.K., and Gayther, S. (2006) Ovarian cancer and genetic susceptibility in relation to the BRCA1 and BRCA2 genes. Occurrence, clinical importance and intervention. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 85, 93-105.
587. Watson, P., Butzow, R., Lynch, H.T., Mecklin, J.P., Jarvinen, H.J., Vasen, H.F., Madlensky, L., Fidalgo, P., and Bernstein, I. (2001) The clinical features of ovarian cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gynecol. Oncol.*, 82, 223-228.
588. Crijnen, T.E., Janssen-Heijnen, M.L., Gelderblom, H., Morreau, J., Nooij, M.A., Kenter, G.G., and Vasen, H.F. (2005) Survival of patients with ovarian cancer due to a mismatch repair defect. *Fam. Cancer*, 4, 301-305.
589. Malander, S., Rambech, E., Kristoffersson, U., Halvarsson, B., Ridderheim, M., Borg, A., and Nilbert, M. (2006) The contribution of the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome to the development of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 101, 238-243.
590. Rubin, S.C., Benjamin, I., Behbakht, K., Takahashi, H., Morgan, M.A., LiVolsi, V.A., Berchuck, A., Muto, M.G., Garber, J.E., Weber, B.L., Lynch, H.T., and Boyd, J. (1996) Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1. *N. Engl. J. Med.*, 335, 1413-1416.
591. Aida, H., Takakuwa, K., Nagata, H., Tsuneki, I., Takano, M., Tsuji, S., Takahashi, T., Sonoda, T., Hatae, M., Takahashi, K., Hasegawa, K., Mizunuma, H., Toyoda, N., Kamata, H., Torii, Y., Saito, N., Tanaka, K., Yakushiji, M., Araki, T., and Tanaka, K. (1998) Clinical features of ovarian cancer in Japanese women with germ-line mutations of BRCA1. *Clin. Cancer Res.*, 4, 235-240.
592. Berchuck, A., Heron, K.A., Carney, M.E., Lancaster, J.M., Fraser, E.G., Vinson, V.L., Deffenbaugh, A.M., Miron, A., Marks, J.R., Futreal, P.A., and Frank, T.S. (1998) Frequency of germline and somatic BRCA1 mutations in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, 4, 2433-2437.
593. Lu, K.H., Cramer, D.W., Muto, M.G., Li, E.Y., Niloff, J., and Mok, S.C. (1999) A population-based study of BRCA1 and BRCA2 mutations in Jewish women with epithelial ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.*, 93, 34-37.
594. Crum, C.P., Drapkin, R., Kindelberger, D., Medeiros, F., Miron, A., and Lee, Y. (2007) Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clin. Med. Res.*, 5, 35-44.
595. Carlson, J.W., Miron, A., Jarboe, E.A., Parast, M.M., Hirsch, M.S., Lee, Y., Muto, M.G., Kindelberger, D., and Crum, C.P. (2008) Serous tubal intraepithelial carcinoma: its potential role in primary peritoneal serous carcinoma and serous cancer prevention. *J. Clin. Oncol.*, 26, 4160-4165.
596. (1999) Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 1310-1316.
597. Thompson, D. and Easton, D.F. (2002) Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 94, 1358-1365.

- 598. Petersen,G.M. and Hruban,R.H. (2003) Familial pancreatic cancer: where are we in 2003? *J Natl Cancer Inst*, 95, 180-181.
- 599. Tryggvadottir,L., Vidarsdottir,L., Thorgeirsson,T., Jonasson,J.G., Olafsdottir,E.J., Olafsdottir,G.H., Rafnar,T., Thorlacius,S., Jonsson,E., Eyfjord,J.E., and Tulinius,H. (2007) Prostate cancer progression and survival in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 99, 929-935.
- 600. Fostira F, Tsitlaidou M, Gogas H, and et al. Prevalence of BRCA1 mutations among 284 women with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 28(15)(suppl). 2010.
- 601. Robertson,L., Hanson,H., Seal,S., Warren-Perry,M., Hughes,D., Howell,I., Turnbull,C., Houlston,R., Shanley,S., Butler,S., Evans,D.G., Ross,G., Eccles,D., Tutt,A., and Rahman,N. (2012) BRCA1 testing should be offered to individuals with triple-negative breast cancer diagnosed below 50 years. *Br.J Cancer*, 106, 1234-1238.

