



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES GERMINALES EN 143 GENES DE
PREDISPOSICIÓN AL CÁNCER EN PACIENTES MEXICANOS CON
SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO POR SECUENCIACIÓN
MASIVA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
ROSALIA QUEZADA URBAN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Felipe Vaca Paniagua
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM
COMITÉ TUTOR: Dra. Claudia María García Cuellar
Instituto Nacional de Cancerología
COMITÉ TUTOR: Dra. Sara Frías Vázquez
Instituto Nacional de Pediatría/Instituto de
Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.




Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de agosto de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **QUEZADA URBAN ROSALIA**, con número de cuenta **409068498**, con la tesis titulada **"Identificación de mutaciones germinales en 143 genes de predisposición al cáncer en pacientes mexicanos con síndrome de cáncer de mama hereditario por secuenciación masiva"**, realizada bajo la dirección del DR. **FELIPE VACA PANIAGUA**:

Presidente: DRA. CLARA ESTELA DÍAZ VELÁSQUEZ
Vocal: DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ
Secretario: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
Suplente: DRA. ELIZABETH ORTÍZ SÁNCHEZ
Suplente: DRA. CLAUDIA MARIA GARCÍA CUELLAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 26 de septiembre de 2017.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Al posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM por brindarme las facilidades y apoyo en el programa de posgrado.

A CONACYT por la beca de manutención recibida durante el periodo 2015-1 al 2017-2. Este proyecto contó con el apoyo de los proyectos PAPIIT IA204215 UNAM y CONACyT: 232630, 252854, 264410, 271685.

Al Dr. Felipe Vaca Paniagua por darme las herramientas y apoyo necesario para realizar el posgrado.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Claudia Cuellar y Dra. Sara Frías, por su apoyo, tiempo y críticas para la realización de este proyecto.

Agradecimientos personales

A mi familia, por todo el apoyo incondicional durante esta etapa del posgrado

Al Dr. Felipe Vaca

A la Dra. Clara Diaz

A la UNAM

Al laboratorio 13 de la UBIMED

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi papá

INDICE

| | |
|---|----|
| Lista de Figuras y Tablas..... | |
| Lista de abreviaturas..... | |
| Resumen..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| 1. Introducción..... | 3 |
| 1.1.1 Definición de cáncer..... | 3 |
| 1.1.2 Epidemiología del cáncer..... | 3 |
| 1.1.3 Factores de riesgo en cáncer de mama..... | 5 |
| 1.1.4 Síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario..... | 8 |
| 1.1.5 Características del SHCMO..... | 8 |
| 1.1.6 Estructura y función de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> | 11 |
| 1.1.7 Arquitectura genética del SHCMO..... | 15 |
| 2. Antecedentes..... | 20 |
| 3. Justificación..... | 22 |
| 5. Hipótesis..... | 23 |
| 6. Objetivos..... | 24 |
| 6.1.1 Objetivo general..... | 24 |
| 6.1.2 Objetivos particulares..... | 24 |
| 7. Materiales y métodos..... | 25 |
| 7.1 Diseño y estrategia experimental..... | 25 |
| 7.2 Descripción de la muestra..... | 25 |
| 7.2.1 Participantes..... | 25 |
| 7.2.2 Tipo de población..... | 26 |
| 7.2.3 Tipo de muestreo..... | 26 |
| 7.2.4 Selección de la muestra..... | 26 |
| 7.2.5 Criterios de inclusión..... | 26 |
| 7.2.6 Criterios de eliminación..... | 27 |
| 7.3 Selección de 143 genes..... | 28 |
| 7.4 Flujo de trabajo experimental..... | 28 |
| 7.4.1 Extracción de DNA..... | 28 |
| 7.4.2 Cuantificación y calidad de DNA..... | 29 |
| 7.4.3 Enriquecimiento por PCR multiplex..... | 29 |
| 7.4.4 Preparación de bibliotecas..... | 30 |
| 7.4.5 Cuantificación, calidad y mezcla de bibliotecas..... | 31 |
| 7.4.6 Secuenciación masiva en paralelo..... | 32 |

| | | |
|-------|--|----|
| 7.4.7 | Análisis bioinformático | 33 |
| 8. | Resultados | 38 |
| 8.1 | Análisis de calidad de las corridas de secuenciación | 38 |
| 9. | Discusión..... | 48 |
| 10. | Conclusiones | 55 |
| 11. | Perspectivas | 56 |
| 12. | Bibliografía..... | 57 |

Lista de Figuras y Tablas

| | |
|--|----|
| Figura 1. Datos epidemiológicos del cáncer a nivel mundial | 4 |
| Figura 2. Mortalidad por cáncer de mama y cérvico-uterino. | 4 |
| Figura 3. Estructura del gen BRCA1..... | 14 |
| Figura 4. Estructura del gen BRCA2..... | 15 |
| Figura 5. Arquitectura molecular del SHCMO..... | 16 |
| Figura 6. Estados participantes..... | 26 |
| Figura 7. Panel de genes seleccionados..... | 28 |
| Figura 8. PCR multiplex..... | 30 |
| Figura 9. Flujo de trabajo para preparación de bibliotecas..... | 31 |
| Figura 10. Configuración de una biblioteca..... | 32 |
| Figura 11. Proceso de secuenciación por síntesis..... | 33 |
| Figura 12. Flujo de trabajo bioinformático..... | 34 |
| Figura 13. Flujo de trabajo del filtrado bioinformático.. | 35 |
| Figura 14. Diseño de primers para delección 9-12..... | 37 |
| Figura 15. Histograma con curva de densidad..... | 39 |
| Figura 16. Proporciones de las variantes detectadas en los 331 pacientes analizados. ... | 39 |
| Figura 17. Distribución alélica de las variantes patogénicas detectadas | 41 |
| Figura 18. Distribución alélica de las variantes patogénicas en pacientes sin cáncer | 42 |
| Figura 19. VUS detectadas en los 331 pacientes..... | 45 |
| Figura 20. Representación gráfica de las proteínas AIP y APC..... | 46 |
| Figura 21. Análisis in silico de CNV..... | 47 |
| Figura 22. Mutación fundadora en BRCA1..... | 47 |
| Tabla 1. Antecedentes personales y heredofamiliares en SHCMO..... | 9 |
| Tabla 2: Riesgo asociado por BRCA1 y BRCA2..... | 10 |
| Tabla 3. Genes emergentes y candidatos para el riesgo de cáncer de mama y ovario asociado a SHCMO..... | 17 |
| Tabla 4. Uso de paneles genéticos para la detección de alelos patogénicos en cáncer de mama hereditario | 18 |
| Tabla 5. Síndromes asociados a variantes patogénicas detectadas | 43 |

Lista de abreviaturas

| <i>Abreviatura</i> | <i>Significado</i> |
|-----------------------|--|
| <i>AKT</i> | Proteína cinasa B |
| <i>AD</i> | Autosómico Dominante |
| <i>ANNOVAR</i> | Annotate Variation |
| <i>AR</i> | Autosómico Recesivo |
| <i>ATM</i> | Ataxia Telangiectasia Mutated |
| <i>ATR</i> | Ataxia telangiectasia and Rad3 related |
| <i>BACH1</i> | BTB Domain And CNC Homolog 1 |
| <i>BARD1</i> | <i>BRCA1</i> Associated RING Domain 1 |
| <i>BASC</i> | <i>BRCA1</i> -associated genome surveillance complex |
| <i>BIC</i> | Breast Cancer Information Core |
| <i>BLM</i> | Bloom Syndrome RecQ Like Helicase |
| <i>BRCA1</i> | Early Onset Breast Cancer 1 |
| <i>BRCA2</i> | Breast Cancer 2, Early Onset |
| <i>BRCT</i> | BRCA1 C Terminus |
| <i>BRIP1</i> | <i>BRCA1</i> Interacting Protein C-Terminal Helicase 1 |
| <i>BWA</i> | Burrows-Wheeler Aligner |
| <i>CD96</i> | Cell Surface Antigen CD96 |
| <i>CDH1</i> | Cadherin 1 |
| <i>CHEK2</i> | Checkpoint Kinase 2 |
| <i>ClinVar</i> | Clinical Variants |
| <i>CM</i> | Cáncer de mama |
| <i>CMTN</i> | Cáncer de mama triple negativo |
| <i>CNVkit</i> | Copy Number Variant kit |
| <i>COSMIC</i> | Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer |
| <i>DMC1</i> | recombinasa meiótica |
| <i>DNA</i> | Ácido desoxirribonucleico |
| <i>dNTPs</i> | Desoxinucleótidos trifosfato |
| <i>E1</i> | Estrona |
| <i>E2</i> | Estradiol |
| <i>E3</i> | Estriol |
| <i>ER</i> | Receptor de estrógenos |
| <i>ERCC3</i> | ERCC Excision Repair 3 |
| <i>FAM175A/CCDC98</i> | Family With Sequence Similarity 175 Member A |
| <i>FANCB</i> | Fanconi Anemia Complementation Group B |
| <i>FANCC</i> | Fanconi Anemia Complementation Group C |
| <i>FANCF</i> | Fanconi Anemia Complementation Group F |
| <i>FANCI</i> | Fanconi Anemia Complementation Group I |

| | |
|-------------------|--|
| <i>FANCL</i> | Fanconi Anemia Complementation Group L |
| <i>FANCM</i> | Fanconi Anemia Complementation Group M |
| <i>GATA3</i> | GATA Binding Protein 3 |
| <i>GATK</i> | Genome Analysis Toolkit |
| <i>GLOBOCAN</i> | The Global Cancer Atlas |
| <i>GRCh37</i> | Referencia del genoma humano |
| <i>HDGC</i> | Hereditary Difuse Gastric Cancer |
| <i>HER2/ErbB2</i> | Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano |
| <i>IARC</i> | International Agency For Research on Cancer |
| <i>ICGC</i> | International Cancer Genome Consortium |
| <i>LCB</i> | Cancer de mama lobular |
| <i>LIG4</i> | DNA Ligase 4 |
| <i>MEMs</i> | Maximal Exact Matches |
| <i>MLH1</i> | MutL Homolog 1 |
| <i>MRE11</i> | MRE11 Homolog, Double Strand Break Repair Nuclease |
| <i>MSH2</i> | MutS Homolog 2 |
| <i>MSH6</i> | MutS Homolog 6 |
| <i>MSR1</i> | Macrophage Scavenger Receptor 1 |
| <i>mTOR</i> | Mechanistic Target Of Rapamycin |
| <i>NBN</i> | Nibrin |
| <i>NCCN</i> | National Comprehensive Cancer Network |
| <i>NF1</i> | Neurofibromin 1 |
| <i>NLS</i> | Nuclear Localization Sequences |
| <i>OMIM</i> | Online Mendelian Inheritance in Man |
| <i>OMS</i> | Organización Mundial de la Salud |
| <i>PALB2</i> | Partner And Localizer Of <i>BRCA2</i> |
| <i>PCR</i> | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| <i>PDE11A</i> | Phosphodiesterase 11A |
| <i>PI3K</i> | Fosfoinositol- 3- quinasa |
| <i>PMS2</i> | PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component |
| <i>POLH</i> | DNA Polymerase Eta |
| <i>PolyPhen2</i> | Polymorphism Phenotyping v2 |
| <i>PR</i> | Receptor de progesterona |
| <i>PTEN</i> | Phosphatase And Tensin Homolog |
| <i>RAD51B</i> | RAD51 Paralog B |
| <i>RAD51C</i> | RAD51 Paralog C |
| <i>RAD51D</i> | RAD51 Paralog D |
| <i>Rb</i> | Proteína del Retinoblastoma |
| <i>RECQL</i> | RecQ Like Helicase |

| | |
|---------------|---|
| <i>RECQL4</i> | RecQ Like Helicase 4 |
| <i>RH</i> | Recombinación Homóloga |
| <i>RHNM</i> | Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas |
| <i>RING</i> | Really Interesting New Gene |
| <i>RINT1</i> | RAD50 Interactor 1 |
| <i>RNA</i> | Ácido ribonucleico |
| <i>rpm</i> | Revoluciones por minuto |
| <i>SCD</i> | SQ/TQ cluster domain |
| <i>SDHB</i> | Succinate Dehydrogenase Complex Iron Sulfur Subunit B |
| <i>SHCMO</i> | Síndrome Hereditario de Cáncer de Mama y Ovario |
| <i>SIFT</i> | Sorts Intolerant From Tolerant |
| <i>ssDNA</i> | DNA de cadena sencilla |
| <i>STK11</i> | Serine/Threonine Kinase 11 |
| <i>TAE</i> | Buffer Tris-acetato-EDTA |
| <i>TCGA</i> | The Cancer Genome Atlas |
| <i>TERT</i> | Telomerase Reverse Transcriptase |
| <i>TP53</i> | Tumor Protein P53 |
| <i>TSC2</i> | Tuberous Sclerosis 2 |
| <i>UV</i> | ultravioleta |
| <i>VUS</i> | Variantes con significado clínico incierto |
| <i>WRN</i> | Werner Syndrome RecQ Like Helicase |
| <i>XLR</i> | recesivo ligado al X |

Resumen

El síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario (SHCMO) es una enfermedad autosómica dominante que representa aproximadamente el 5-10% de todos los pacientes con cáncer de mama. Este síndrome se asocia principalmente a alelos patogénicos de alto riesgo en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, pero sólo en el 25% de los casos de SHCMO. Más de 25 genes se han asociado con el cáncer de mama y ovario familiar y se espera que este número se incremente. En la población mexicana se han realizado algunos esfuerzos para analizar este síndrome, pero se limitan a los genes *BRCA1/2*. Este trabajo tiene como objetivo encontrar nuevos alelos patogénicos en sitios exónicos y de splicing en un panel de 143 genes que predisponen al cáncer en 300 pacientes mexicanos con cáncer y sospecha de SHCMO, y en 31 pacientes sin cáncer con antecedentes familiares de cáncer, utilizando la tecnología de secuenciación masiva en paralelo. En el grupo de pacientes oncológicos, el 15.3% (46/300) tuvo una única variante patogénica en heterocigosis y un paciente (0.33%) presentó 2 o más variantes patogénicas; el 24% (72/300) tuvieron variantes con significado clínico desconocido (VUS) y el 60.3% (181/300) no presentaron ninguna alteración. Los genes con más variantes patogénicas fueron *BRCA1* 27.6% (13/47), *BRCA2* 14.8% (7/47), *MSR1* 4.2% (2/47), *ATM* 4.2% (2/47), *ERCC3* 4.2% (2/47), *FANCI* 4.2% (2/47), *PDE11A* 4.2% (2/47) y *LIG4* 4.2% (2/47). El grupo sin cáncer tuvo variantes patogénicas en 32.2% (10/31) de los individuos, uno de ellos (3.2%; 1/31) presentó dos variantes patogénicas en heterocigosis, el 12.9% (4/31) de los pacientes tuvo variantes VUS y el 51.6% (16/31) fueron negativos. En este grupo se encontraron variantes patogénicas en *BRCA2* 54.5% (6/11), *BRCA1* 18.1% (2/11), *FANCF* 9% (1/11), *PDE11A* 9% (1/11), *POLH* 9% (1/11) y *WRN* 9% (1/11). Respecto a todos los participantes, las variantes privadas o ultra-raras definidas como VUS (ClinVar, deletéreo en SIFT/Polyphen2, menos de 0.001% en ExAC/1KG/ESP6500) se encontraron en 56 genes. Este estudio demuestra que hay una mayor contribución de alelos patogénicos en otros genes con susceptibilidad al cáncer (55.1%) que en *BRCA1/2* (48.3%), lo que confirma que la secuenciación de los paneles genéticos extendidos identifica nuevas variantes, raras y privadas que eventualmente se traducirán en un mejor diagnóstico molecular y evaluación de riesgo personalizada en los portadores. El impacto clínico de las VUS identificadas aquí debe ser evaluado con mayor profundidad con otros métodos.

Abstract

Hereditary breast and ovarian cancer syndrome (SHCMO) is an autosomal dominant disease that represents approximately 5–10% of all patients with breast cancer. This syndrome is mainly associated to high risk pathogenic alleles in *BRCA1* and *BRCA2* genes, but only for 25% of SHCMO cases. More than 25 genes have been associated with familial breast and/or ovarian cancer and still more are expected to emerge. In the Mexican population there have been some efforts to analyze this syndrome, but they are limited to *BRCA1/2* genes. This work aimed to find new pathogenic alleles in exonic and splice sites in a panel of 143 cancer-predisposing genes in 300 Mexican cancer patients with suspicion of SHCMO and 31 non-cancer patients with a severe family history of cancer, using massive parallel sequencing technology. In the group of cancer patients 15.3% (46/300) had pathogenic variants, 0.33% had two or more pathogenic variants, 24% (72/300) harbored variants with unknown clinical significance (VUS) and 60.3% (181/300) were negative. The genes most frequently affected with pathogenic variants were *BRCA1* 27.6% (13/47), *BRCA2* 14.8% (7/47), *MSR1* 4.2% (2/47), *ATM* 4.2% (2/47), *ERCC3* 4.2% (2/47), *FANCI* 4.2% (2/47), *PDE11A* 4.2% (2/47) and *LIG4* 4.2% (2/47). The non-cancer group had a 32.2% (10/31) of patients with pathogenic variants, (3%; 1/31) had two or more pathogenic variants, 12% (4/31) had VUS and 51% (16/31) were negative. In this group pathogenic variants were found in *BRCA2* 54.5% (6/11), *BRCA1* 18.1% (2/11), *FANCF* 9% (1/11), *PDE11A* 9% (1/11), *POLH* 9% (1/11) and *WRN* 9% (1/11). Private or ultra-rare variants defined as VUS (ClinVar, deleterious in SIFT/Polyphen2, less than 0.001% in ExAC/1KG/ESP6500) were found in 56 genes. This study demonstrates that there is a higher contribution of pathogenic alleles in other susceptibility cancer genes (55.1%) than *BRCA1/2* (48.3%), confirming that clinical sequencing of expanded gene panels will identify new, rare and private, variants and eventually will translate in better molecular diagnosis and personalized risk assessment in carriers. Clinical impact of the VUS identified here must be further evaluated.

1. Introducción

1.1.1 Definición de cáncer

El cáncer es una enfermedad causada por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas durante un periodo, estos cambios provocan alteraciones en la expresión génica, las cuales conducen a un desequilibrio en procesos como la proliferación, muerte celular, angiogénesis, estabilidad genómica de la célula y finalmente conlleva a la progresión de una población de células que adquieren la habilidad de invadir los tejidos adyacentes y ocasionar metástasis en sitios distantes (1).

1.1.2 Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las enfermedades que más ha afectado a la población mundial. En el 2012 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) reportó 14.1 millones de casos de cáncer, y la mortalidad de 8.2 millones de personas a nivel global(2). Los tipos de cáncer comúnmente diagnosticados en todo el mundo fueron los de pulmón (1.8 millones, 13.0% del total), mama (1.7 millones, 11.9%), y colorectal (1.4 millones, 9.7%); mientras que las causas más comunes de muerte por cáncer fueron debidas a las neoplasias de pulmón (1.6 millones, el 19.4% del total), de hígado (0.8 millones, 9.1%) y estómago (0.7 millones, 8.8%). En México se estima que en el 2012 la prevalencia de cáncer fue de 147,000 casos y la mortalidad alcanzó 78,000 casos. Respecto al cáncer de mama, en ese año la incidencia fue de 20,444 y la mortalidad de 5680 personas (3).

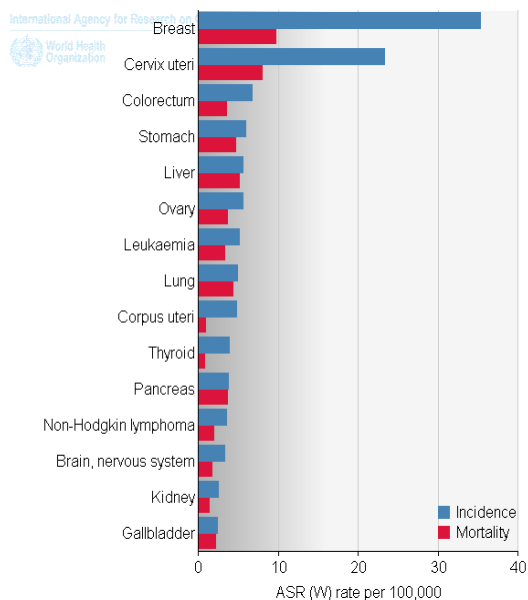


Figura 1. Datos epidemiológicos del cáncer a nivel mundial generados por la IARC. Incidencia y mortalidad en mujeres a nivel nacional. Imagen tomada de GLOBOCAN (3).

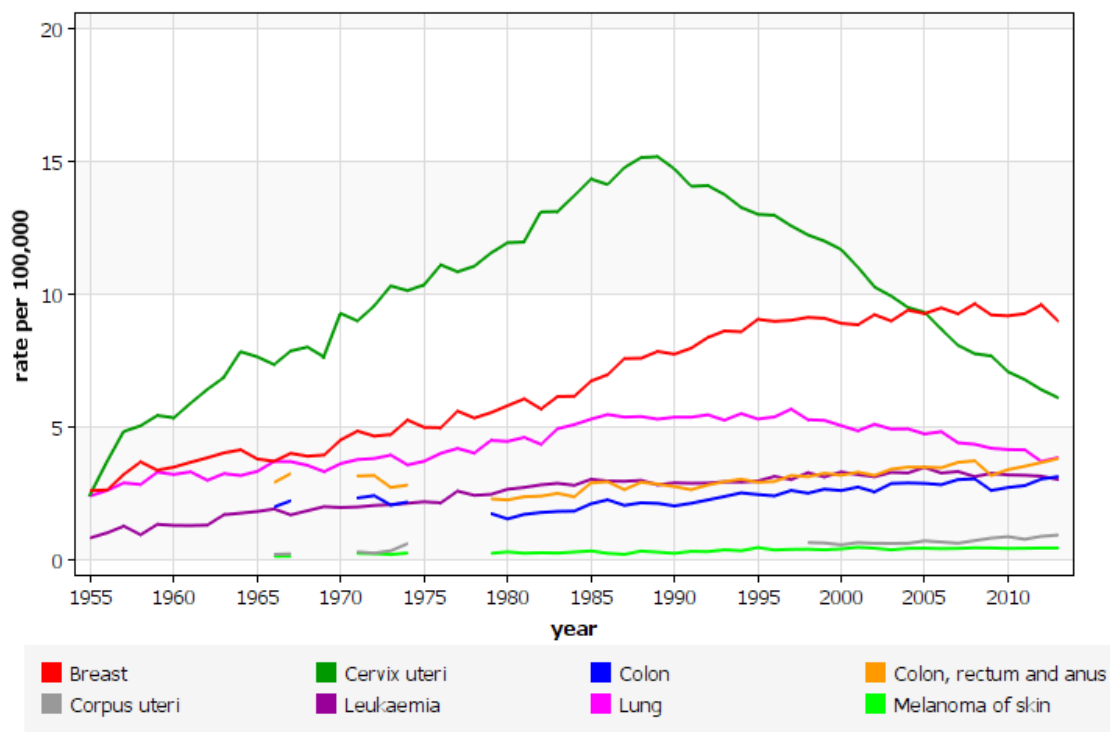


Figura 2. Mortalidad por cáncer de mama y cérvico-uterino en México generados por la IARC. Imagen tomada de GLOBOCAN (3).

El cáncer de mama en México, ocupa el primer lugar en mortalidad por tumor maligno (Figura 1) en las mujeres mayores de 25 años desde 2006, por encima de los cánceres cérvico-uterino, pulmón, colon, leucemia y melanoma (Figura 2). En el año 2010, la tasa estandarizada de mortalidad fue de 18.7 por 100 mil mujeres de 25 años en adelante, lo que representa un incremento del 49.5% en los últimos 20 años. Los estados con mayor número de muertes por cáncer de mama son Ciudad de México (13.4%), Estado de México (12.4%), Jalisco (8.2%), Veracruz (6.4%), Nuevo León (6%) y Guanajuato (3.8%)(4).

Respecto a la incidencia, según los datos del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), en 2003 se presentaron 12,433 nuevos casos de cáncer de mama, la mayor parte en los grupos de 40 a 59 y de 70 años. El porcentaje promedio de diagnósticos, de acuerdo con el estadio clínico, es el siguiente: Estadios 0 y I, 7.4%; estadio II, 34.4%; estadios III y IV, 42.1%; no clasificables, 16.1%(4). Para el año 2030 se proyecta que el número de nuevos casos en México se incremente a 34,425 casos (5).

Este panorama epidemiológico en México nos indica que es necesario implementar programas que beneficien la prevención y detección primaria del cáncer de mama.

1.1.3 Factores de riesgo en cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial, la mayoría de los factores de riesgo están directamente relacionados con el estilo de vida y son modificables, aunque existen otros factores no modificables como los factores genéticos hereditarios. Los factores de riesgo se pueden clasificar en: demográficos, genéticos, reproductivos, hormonales y de estilo de vida.

1.1.3.1 Edad, origen étnico y estado socioeconómico

La incidencia del cáncer de mama comienza a aumentar de manera notoria con la edad, específicamente en la etapa postmenopáusica donde el riesgo de padecer cáncer de mama se duplica cada 10 años (6). Aunado a la edad, el origen étnico también influye con mayor frecuencia en mujeres blancas, seguidas de mujeres negras e hispanas, y con menor frecuencia en mujeres asiáticas (6).

Se ha descrito que el cáncer de mama ocurre con mayor frecuencia en las personas con un estado socioeconómico alto. Esta asociación se atribuye a la acumulación de factores de riesgo que están correlacionados con este estado socioeconómico, incluyendo nuliparidad y una edad > 35 años en el primer parto (6–8).

1.1.3.2 Hormonales y reproductivos

Los eventos relacionados a la salud reproductiva de la mujer incluyen la menarca, partos, lactancia y menopausia; todos estos provocan cambios fisiológicos que pueden influir en el riesgo de padecer cáncer de mama (6). La menarca a temprana edad representa un factor de alto riesgo al igual que la menopausia a edad tardía, probablemente debido a la constante exposición de hormonas endógenas durante un mayor tiempo (9,10). Así mismo la nuliparidad y el primer parto a edad tardía aumentan la incidencia de cáncer de mama, ya que el embarazo induce la diferenciación terminal de las glándulas mamarias, lo que permiten tener un componente proliferativo menor (11). El primer embarazo induce cambios irreversibles que hacen que el propio tejido mamario sea menos susceptible a la inducción del cáncer o reduzca el estímulo carcinogénico de la mama (12). Las mujeres producen cantidades sustanciales principalmente de tres estrógenos: estrona (E1), estradiol (E2) y estriol (E3), durante el embarazo, la secreción total de estrógenos aumenta considerablemente, con E3 aumentado a un grado mucho mayor que E1 o E2 (11). También se sugiere que E3 puede tener menor potencial carcinogénico que los otros estrógenos y por lo tanto, las mujeres más jóvenes con una baja proporción de E3 a E1 y E2 están en alto riesgo de cáncer de mama (13). Esto sugiere que existe una reducción del riesgo de cáncer de mama asociado con el embarazo temprano (11,12). La lactancia disminuye el riesgo de cáncer de mama en mujeres que han tenido varios hijos (6,14), esto debido a que la lactancia aumenta la proporción de células diferenciadas en la mama, en modelos animales, se ha demostrado que la diferenciación de las células de la glándula mamaria, antes de la exposición a un carcinógeno, los protege de la transformación maligna (15).

Las hormonas endógenas tienen un efecto proliferativo y apoyan la observación de que la exposición exógena a las hormonas, en forma de anticonceptivos orales, principalmente a estrógenos, se asocia con el riesgo de cáncer de mama. Del mismo modo, datos epidemiológicos en todo el mundo confirman que el uso de la terapia hormonal posmenopáusica se asocia con una mayor incidencia de cáncer de mama (6,16).

1.1.3.3 Estilo de vida

Otros factores de riesgo relacionados al cáncer de mama son de estilo de vida, como los hábitos alimenticios, ya que existe una correlación estrecha entre la incidencia de cáncer de mama y la obesidad (17). La obesidad es un factor de riesgo para el cáncer de mama debido a que niveles altos de estrógenos derivados de la aromatización de androstenediona ocurren por la elevada expresión de la aromatasas en el exceso de tejido adiposo, el cual puede presentar inflamación (18,19).

Otros estudios también han mostrado una relación entre el consumo de alcohol y la incidencia de cáncer de mama (20). En general, el alcohol se asocia al desarrollo de distintos tipos de cáncer, debido a que al ser metabolizado por la alcohol deshidrogenasa se produce acetaldehído, el cual puede formar aductos mutagénicos con el ADN (21). En tumores de mama formados, el alcohol puede aumentar la movilidad de las células tumorales al inducir la reorganización del citoesqueleto y promover la invasión de las células cancerosas causando degradación y reconstrucción de la matriz extracelular (22). Por otra parte, el alcohol promueve la transición epitelio-mesénquima, la cual es un mecanismo característico de los tumores invasivos (23). Además, el etanol puede estimular la angiogénesis tumoral, promoviendo el crecimiento tumoral (23). El alcohol puede ser metabolizado en los tejidos mamarios y en las células de cáncer de mama, donde se producen especies reactivas de oxígeno que causan estrés oxidativo, el cual favorece el crecimiento tumoral y la mutagénesis (24). Estudios recientes sugieren que genes de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico, principalmente ErbB2, están implicados en la promoción del tumor mediada por el alcohol, así las células de cáncer de mama o las células epiteliales mamarias que sobre-expresan ErbB2 son más sensibles a los efectos promotores de tumores del alcohol (22). Por lo tanto, el consumo de alcohol, se considera un factor de riesgo para el cáncer de mama.

1.1.3.4 Genéticos: Antecedentes Familiares

Las mujeres con una historia familiar de cáncer de mama, principalmente en parientes de primer grado, tienen el doble de riesgo de desarrollar cáncer de mama, en comparación con mujeres sin historial familiar de cáncer de mama. El riesgo es mayor si el cáncer de mama se diagnosticó a una edad temprana (<40 años) o si más de un pariente consanguíneo fue afectado (6). Se estima que

entre el 5-10% de todos los casos de cáncer de mama y aproximadamente 20% de los casos de cáncer de ovario se deben a una predisposición monogénica (25). Los genes principalmente involucrados en dicha predisposición son *BRCA1* y *BRCA2*, aunque éstos sólo contribuyen con un 25% de los casos asociados al Síndrome Hereditario de Cáncer de Mama y Ovario (SHCMO) (25).

1.1.4 Síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario

El síndrome cáncer de mama y ovario hereditario (SHCMO) es una enfermedad con patrón de herencia autosómico dominante y con penetrancia incompleta, que resulta en un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama y/u ovario(26). La predisposición genética del SHCMO se debe generalmente a una mutación germinal heredada en un alelo de los genes *BRCA1* o *BRCA2* y la subsiguiente pérdida de heterocigosidad en los tejidos somáticos(26). Lo anterior da origen a células somáticas deficientes (nulas) en estos genes, las cuales tienen una tasa de mutación acelerada (27). Algunas de las características de este síndrome incluyen múltiples miembros de la familia con cáncer de mama y/u ovario, antecedentes personales de cáncer de mama y de ovario, desarrollo de cáncer de mama o de ovario a una edad temprana y antecedentes familiares o personales de cáncer de mama masculino(28,29). De acuerdo a distintos estudios, el 20% de los casos de cáncer de ovario y 5-10% de los casos de cáncer de mama se asocian al SHCMO, y mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* son responsables del 25% de los casos del SHCMO(25).

En presencia de una mutación *BRCA1*, las mujeres tienen hasta un 60% de riesgo a lo largo de toda la vida de desarrollar cáncer de mama y hasta un 45% de riesgo de desarrollar cáncer de ovario(30–32). En *BRCA2* existe un 50-60% de riesgo a lo largo de toda la vida de desarrollar cáncer de mama y un 30% de riesgo de desarrollar cáncer de ovario(30–32). Estos genes pertenecen a la familia de genes supresores de tumores por implicación en mecanismos de reparación del ADN dañado, a través de un proceso conocido como reparación de ADN por RH (28). Por lo tanto, una mutación heredada en cualquiera de estos genes combinada con la pérdida de heterocigosidad predispone a las células a la inestabilidad genómica y aumenta en gran medida la probabilidad de transformación maligna y el desarrollo del cáncer(33).

1.1.5 Características del SHCMO

Se sospecha del SHCMO asociado a *BRCA1/2* cuando existen antecedentes de cáncer, de manera personal o en familiares consanguíneos cercanos (1er, 2do y 3er grado). Los criterios para la

detección de estas familias han sido desarrollados por distintas instituciones de salud, entre las que destacan las recomendaciones de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN)(34). Estas guías indican que si existen uno o más de los criterios señalados, se debe considerar una evaluación genética del paciente. Estos criterios se incluyen en la siguiente tabla.

Tabla 1. Antecedentes personales y heredofamiliares en SHCMO

| Antecedentes de cáncer personales | Antecedentes heredofamiliares de cáncer |
|---|--|
| <p>Un individuo con cáncer de mama que cumpla cualquiera de los siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Una mutación conocida en un gen con susceptibilidad al cáncer en algún familiar • Edad de diagnóstico < 50 años • Diagnóstico de cáncer de mama triple negativo (ER-,PR- y HER2-) antes de los 60 años • Tumores primarios sincrónicos bilaterales o ipsilaterales • Diagnostico a cualquier edad mas <ul style="list-style-type: none"> ○ ≥ 1 familiar cercano con cáncer ≤ 50 años, o ○ ≥ 1 familiar cercano con cáncer de ovario invasivo a cualquier edad, o ○ ≥ 2 familiares cercanos con cáncer de mama y/o páncreas a cualquier edad, o ○ Cáncer pancreático a cualquier edad ○ Procedente de una población de alto riesgo ○ Hombre con cáncer de mama | <p>Un individuo sin antecedentes personal de cáncer pero con alguno de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pariente cercano con cualquiera de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> ○ Una mutación conocida en algún gen de susceptibilidad al cáncer ○ ≥ 2 tumores primarios en mama en un solo individuo ○ ≥ 2 individuos con cáncer de mama del mismo lado de la familia con al menos uno diagnosticado ≤ 50 años ○ Cáncer de ovario ○ Cáncer de mama en hombre • Pariente cercano con cáncer de mama diagnosticado ≤ 45 años • Pariente cercano con tres o más de los siguientes tipos de cáncer: mama, páncreas, próstata, melanoma, sarcoma, carcinoma adrenocortical, tumor cerebral, leucemia, cáncer gástrico difuso, cáncer de colon, cáncer endometrial, cáncer de tiroides y cáncer en riñón. |
| <p>Un individuo con cáncer de ovario</p> | |

Un individuo de descendencia Judía Ashkenazi con cáncer de mama, ovario o páncreas a cualquier edad

Un individuo con tres o más de los siguientes tipos de cáncer: mama, páncreas, próstata, melanoma, sarcoma, carcinoma adrenocortical, tumor cerebral, leucemia, cáncer gástrico difuso, cáncer de colon, cáncer endometrial, cáncer de tiroides y cáncer en riñón.

Criterios descritos en la guía Genet/Familial High-risk Assesment: Breast and Ovarian V1.2014. Sitio web: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf

Una de las características del SHCMO es el incremento del riesgo para desarrollar cáncer de mama y ovario, sin embargo, estos pacientes también pueden desarrollar cáncer en otros órganos, incluyendo próstata, páncreas y melanoma (31-35). En la tabla 2, se muestra el riesgo que predisponen mutaciones patogénicas en línea germinal los genes *BRCA1/2*, tabla tomada de Antoniou, et.al. (31).

Tabla 2: Riesgo asociado por *BRCA1* y *BRCA2*

| Tipo de cáncer | Riesgo en la población general | Riesgo con variantes patogénicas(32,35-38) | |
|--------------------------------|--------------------------------|--|---|
| | | <i>BRCA1</i> | <i>BRCA2</i> |
| Mama | 12% | 46%-87%% | 38%-84% |
| Segundo tumor primario de mama | 2% dentro de 5 años | 21.1% dentro de los 10 años 83% a los 70 años | 10.8% dentro de los 10 años 62% a los 70 |
| Ovario | 1%-2% | 39%-63% | 16.5%-27% |
| Mama en hombres | 0.1% | 1.2% | Hasta un 8.9%% |
| Próstata | 6% hasta los 69 años | 8.6% hasta los 65 años | 15% a los 65 años 20% durante toda la vida |
| Páncreas | 0.50% | 1%-3% | 2%-7% |
| Melanoma (cutáneo y ocular) | 1.6% | | Riesgo elevado |

Los pacientes con SHCMO con un diagnóstico de cáncer de mama a temprana edad, antecedentes familiares de cáncer de mama de inicio temprano, y alguna variante patogénica en los genes *BRCA*(39) tienen riesgo de presentar cáncer de mama contralateral (CMC). El riesgo de CMC disminuye a mayor edad de diagnóstico y aumenta con el número de familiares de primer grado afectados con cáncer de mama(40). En una cohorte no seleccionada de individuos con cáncer de mama, se encontraron riesgos acumulativos de cáncer de mama contralateral a diez años de: 21.1%

para aquellos con variantes patógenas *BRCA1* y 10.8% para aquellos con variantes patógenas *BRCA2*(40,41).

Los tumores relacionados con *BRCA1* muestran una histopatología medular, son de alto grado histológico, tienen más probabilidades de ser negativos para receptores de estrógenos y progesterona, y son menos probables de demostrar una sobreexpresión de HER2(42). Por lo tanto, entre un 80-90% de los tumores relacionados con *BRCA1* se clasifican como cáncer de mama "triple negativo", los cuales tienen características similares a los cánceres de mama de tipo basal(43). También se ha sugerido un vínculo entre las variantes germinales patogénicas de *BRCA2* y el cáncer de mama triple negativo. En estudios de personas con cáncer de mama triple negativo, la incidencia de las variantes patogénicas en *BRCA2* de la línea germinal oscila entre el 3% y el 17%(44–46).

1.1.6 Estructura y función de *BRCA1* y *BRCA2*

BRCA1

El gen *BRCA1* codifica para la fosfoproteína nuclear de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1, conocida como BRCA1 y está localizado en la región cromosómica 17q21.31 (47). Esta proteína desempeña un papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica, y también actúa como un supresor de tumores (47,48). BRCA1 se une a otros supresores de tumores, proteínas que sensan el daño a ADN y transductores de señales para formar un complejo de alta masa molecular con multi-subunidades, conocido como el complejo de vigilancia del genoma asociado a BRCA1 (BASC)(33,47). BASC es un complejo que se compone por las proteínas MSH2, MSH6, MLH1, ATM, BLM y el complejo MRN (MRE11, RAD50 y NBN) y se asocia a la detección del daño en ADN, principalmente participa en la vía de reparación por escisión de bases(49,50)

Adicionalmente, BRCA1 se asocia con la ARN polimerasa II, a través del dominio C-terminal y también interactúa con los complejos de desacetilasa de histonas(47). Esta proteína desempeña un papel en la transcripción, la reparación de la ruptura de doble cadena del ADN por recombinación homóloga (RH)(25).

Dentro de las ~15,000 mutaciones de *BRCA1* reportadas base de datos del Consorcio para la Información de Cáncer de Mama (BIC), existen 1,769 mutaciones únicas reportadas para este gen (51). Las mutaciones clínicamente significativas causan un mayor riesgo para desarrollar cáncer y

dan como resultado una proteína con función reducida o ningún producto proteico(28). Hay tres dominios en la proteína BRCA1 que están mutados en pacientes con cáncer de mama con una frecuencia relativamente alta. Estos dominios incluyen el dominio RING (exones 2-7), una región codificada por los exones 11-13 y el dominio BRCT (exones 17-24)(28) (Figura 3, tomada y modificada de Narod y Foulkes, H2004(52)).

Una de los dominios funcionales de BRCA1 es el dominio RING de, que consiste en un dedo RING flanqueado por dos hélices alfa que abarcan los aminoácidos 1-109 (exones 2-7)(53). A través de siete residuos conservados de cisteína y un residuo de histidina, el dedo RING regula dos átomos de Zn^{2+} que estabilizan la estructura de RING(54,55). El dedo RING conforma una estructura globular con láminas β y una hélice central(28,56), y es un dominio altamente conservado que se encuentra en un gran número de proteínas, es responsable de la actividad ligasa E3-ubiquitina de BRCA1(57). El proceso de ubiquitinación consta de tres enzimas esenciales: una enzima activadora de ubiquitina (E1), una enzima de conjugación de ubiquitina (E2) y una ubiquitina ligasa (E3). Este último, es encargado de la formación de cadenas de poliubiquitina, utilizando las ubiquitinas que han sido activadas por las enzimas E1 y E2 y las transfiere sobre el sustrato específico a través de enlaces isopeptídicos (58). Las hélices N y C-terminal son responsables de la interacción de BRCA1 con BARD1 (Dominio RING asociado a BRCA1) (57). La formación del heterodímero de BRCA1/BARD1 incrementa la actividad ubiquitina ligasa de BRCA1 (59). Existen un gran número de mutaciones que predisponen al cáncer de mama que afectan las interacciones BRCA1-BARD1 o BRCA1-UbcH5, así como la función ligasa E3 del dominio RING, y se sugiere que la actividad de la ubiquitina ligasa de BRCA1 es esencial para su función supresora de tumores(60).

La región que abarca los exones 11-13 cubre más del 65% de la secuencia de *BRCA1* y codifica dos secuencias de localización nuclear (NLS). Las mutaciones en los dominios de localización nuclear afectan la unión de BRCA1 con la importina α , lo que afecta la localización de BRCA1 en el núcleo y el proceso de reparación al DNA (61). Los exones 11-13 también codifican secuencias de unión para proteínas como retinoblastoma (RB), cMyc, Rad50 y Rad51 (62). Los aminoácidos codificados por esta región forman parte de un dominio helicoidal, que regula las interacciones con la proteína PALB2, y también forman parte de un dominio que contiene serinas (SCD) el cual comprende el sitio de fosforilación de ATM (28).

A pesar de que los exones 11-13 contienen un gran porcentaje de las mutaciones clínicamente relevantes, se sabe muy poco sobre la estructura o función de esta región en comparación con los dominios RING o BRCT(63). Los exones 11-13 de *BRCA1* están asociados a una gran variedad de vías celulares. Myc es un proto oncogen que actúa como una fosfoproteína nuclear que participa en la proliferación celular, progresión del ciclo celular y apoptosis (64). Rad50, Rad51 y PALB2 están involucrados en la reparación del ADN (65–67) y RB se encuentra asociado al control de la progresión del ciclo celular(62). Por su interacción con estas proteínas y el gran número de mutaciones que ocurren en los exones 11-13 en pacientes con SHCMO, sugiere que esta región es importante para la función supresora de tumores de *BRCA1*(28).

El dominio C-terminal de *BRCA1* (BRCT), ubicado en los exones 16-24, fue identificado originalmente en *BRCA1*, pero también es un dominio conservado en otras proteínas (principalmente involucradas en la reparación del daño del ADN)(28). Los dominios BRCT se encuentran como un único dominio, como una repetición en tándem (como se encuentra en *BRCA1*, que tiene 2 repeticiones), en repeticiones múltiples, o en fusiones entre dos dominios(28,68). El dominio BRCT regula las interacciones de *BRCA1* y proteínas fosforiladas por ATM y ATR, dos cinasas que se activan por el daño al ADN(68). Los dominios BRCT se basan en el reconocimiento estructural de las fosfoproteínas que interactúan con ellos(69). Los dominios BRCT de Clase I interactúan con los residuos de fosfoserina (pSer), mientras que los dominios BRCT de Clase II se unen a los residuos pSer y fosfotreonina (pThr)(68). El dominio BRCT de *BRCA1* reconoce la secuencia pSer-X-X-Phe y, por tanto, es un dominio BRCT de Clase I(70). Aunque la principal función del dominio BRCT en *BRCA1* es la regulación de las interacciones entre *BRCA1* y las fosfoproteínas, este dominio también puede actuar en la unión del ADN y otras interacciones con proteínas sin función de cinasa(28,68).

Varios estudios han encontrado mutaciones en el dominio BRCT de *BRCA1* en tumores de mama y ovario(71–73). Específicamente, hay mutaciones que afectan el núcleo hidrofóbico del dominio BRCT inhibiendo la capacidad de *BRCA1* para reconocer fosfoligandos(72). Estos hallazgos sugieren que la mutación de residuos necesarios para el reconocimiento de ligandos fosforilados alteran la capacidad de *BRCA1* para llevar a cabo su papel bioquímico en la vía de reparación de daño al ADN por RH(28,73).

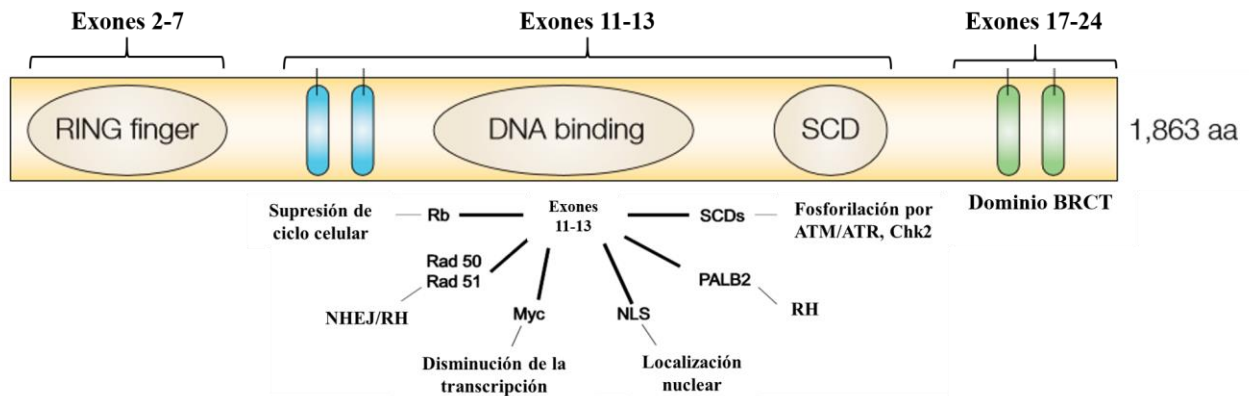


Figura 3. Estructura del gen *BRCA1*. Se esquematizan los dominios funcionales de la proteína, sus ligandos y sus funciones. Tomada y modificada de Narod y Foulkes, 2004(52)

BRCA2

El gen supresor de tumores *BRCA2* codifica para una proteína de 3,418 aminoácidos, su localización genómica es 13q13.1 y se compone de múltiples dominios que están principalmente involucrados en la reparación del ADN por RH(74,75).

La región central de la proteína contiene ocho repeticiones de ~80 a 300 aminoácidos, denominadas "BRC", que se son específicos para la unión a RAD51(76). Las repeticiones de BRC permiten la unión de los filamentos de RAD51 en el ADN de cadena sencilla (ssDNA)(74) (Figura 4, tomada y modificada de Narod y Foulkes,2004(52)).

Un paso esencial en la RH es la incorporación de la recombinasa RAD51 a la cadena sencilla de ADN generada por la ruptura de la cadena doble. La recombinasa que se une a la cadena sencilla de DNA forma filamentos de nucleoproteínas helicoidales, que posteriormente controlan la búsqueda de secuencias homólogas con la cromátida hermana no dañada(74,77). Posteriormente, hay un intercambio de cadenas de ADN entre la secuencia homóloga dañada y no dañada, lo que permite la formación de intermediarios de recombinación en los que las cadenas de ADN que interactúan se unen de manera covalente(78).

Las células con mutaciones en BRCA2 son sensibles a los agentes de entrecruzamiento de ADN y muestran una eficiencia disminuida en la reparación del ADN por RH, así como la incapacidad para promover el reinicio eficiente de las horquillas de replicación bloqueadas(79). También fallan en promover la localización nuclear de RAD51 después del daño exógeno del ADN(80). Esta incapacidad de dirigir RAD51 a sitios de reparación indica que BRCA2 actúa como un mediador para la formación de filamentos RAD51(80). Más allá de la región BRC que interactúa con RAD51, el conocimiento relacionado con las funciones de otras regiones de esta proteína es limitado: se ha descrito que la región N-terminal interactúa con PALB2 (65), un dominio central interactúa con la recombinasa meiótica DMC1(81) y la región C-terminal contiene un dominio α -helicoidal seguido de tres pliegues de unión a oligonucleótido-oligosacárido que se unen al DNA de cadena sencilla(82).

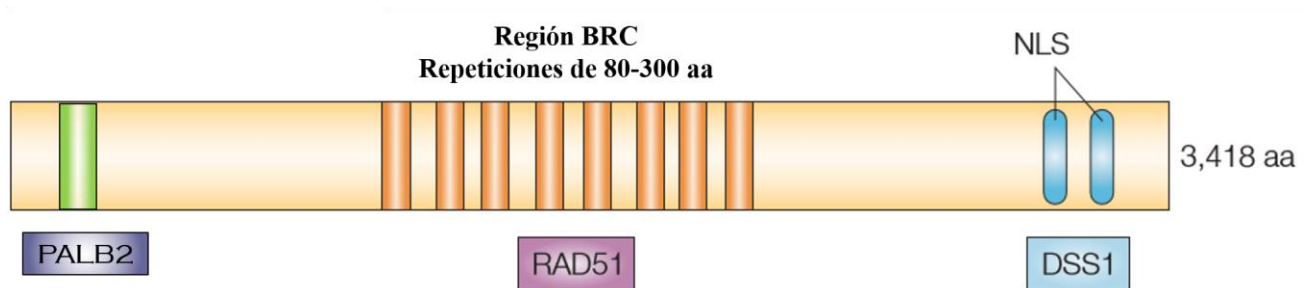


Figura 4. Estructura del gen *BRCA2*. Se indican los dominios funcionales de la proteína, sus ligandos y sus funciones. Tomada y modificada de Narod y Foulkes, 2004(52).

1.1.7 Arquitectura genética del SHCMO

Los dos genes más importantes del cáncer de mama son *BRCA1* y *BRCA2*, estos confieren un riesgo de cáncer de mama a los portadores de 10 a 30 veces más alto que el riesgo entre las mujeres en la población general(83). La probabilidad de que existan otros genes con una frecuencia de población y un perfil de riesgo similar a *BRCA1* o *BRCA2* es muy baja(84). Aunque en la mayoría de las poblaciones las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* son raras (ocurren en aproximadamente 1 de 400 personas), las alteraciones genéticas en estos genes son mucho más comunes en la población judía Ashkenazi, en la que 1 de 40 personas lleva una de las tres principales mutaciones causantes de la enfermedad(83).

BRCA1 y *BRCA2*, no son los únicos genes que confieren riesgo para el SHCMO (Figura 5, datos obtenidos de Foulkes, 2008(83)). Hay otros genes de alto riesgo que representan menos del 1% de los casos de cáncer de mama con componente hereditario; estos genes son *TP53*, *PTEN*, *CDH1* y *STK11*(83).

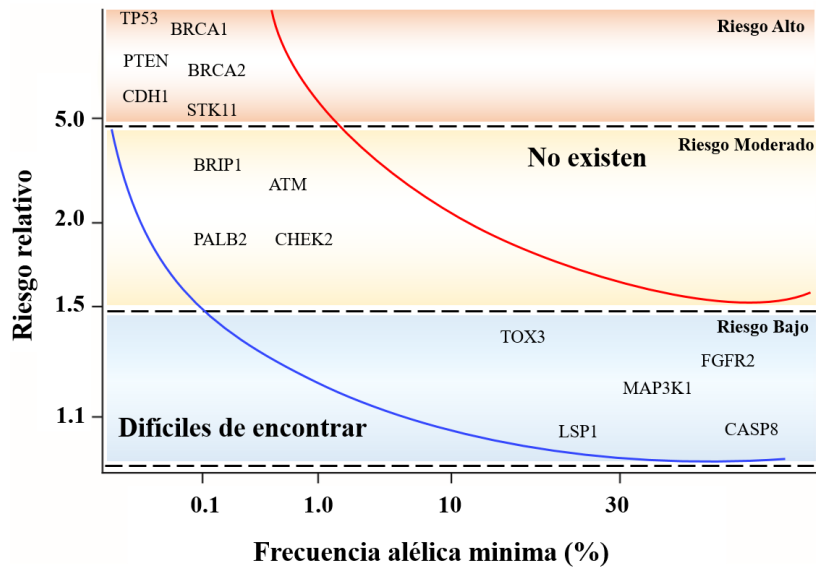


Figura 5. Arquitectura molecular del SHCMO. Distintos genes que se asocian al SHCMO se ilustran de acuerdo al grado de riesgo que confieren. Adaptada de Foulkes et al(83). En esta figura se muestra que existe una correlación negativa entre la frecuencia alélica mínima y el riesgo relativo.

PTEN se asocia al síndrome de Cowden y al síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley-Smith(84,85), variantes patogénicas en este gen confieren un riesgo de hasta el 85% para cáncer de mama a los 70 años(25,85). Otro síndrome que predispone al desarrollo de cáncer de mama es el de Li-Fraumeni causado por mutaciones en *TP53*, el cual incluye sarcomas en edad temprana y múltiples tumores primarios a lo largo de su vida; para cáncer de mama confiere un riesgo de 78% en mujeres pre menopáusicas(85).

Las mutaciones patogénicas en *CDH1* son de alto riesgo en cáncer gástrico difuso hereditario (HDGC), con un riesgo estimado de por vida del 70% para los hombres y del 56% para las mujeres a los 80 años de edad(25,83). El cáncer de mama lobular (LBC) es el segundo tipo más frecuente de malignidad en HDGC. El riesgo acumulado de LBC en mujeres con una mutación en *CDH1* es de 42% a los 80 años de edad(46). Por otra parte, estudios recientes han identificado la aparición

temprana de los casos bilaterales LBC sin ningún tipo de cáncer gástrico difuso en la familia, lo que indica que LBC puede ser una manifestación temprana de HDGC(25).

El síndrome de Peutz-Jeghers es causado por mutaciones en *STK11* (86). Los pacientes son propensos a pólipos en el tracto gastrointestinal, pigmentación mucocutánea y mayor riesgo de cáncer, incluyendo el cáncer de mama y ginecológico (cervical, ovárico y uterino). El riesgo acumulado de cáncer de mama femenino y ginecológico se estima en 32% y 13%, respectivamente, a los 60 años (86).

A través de los avances en las nuevas tecnologías de secuenciación, las cuales han hecho posible el análisis de *loci* amplios o el genoma completo, se han detectado más genes que se han propuesto como candidatos de susceptibilidad al cáncer de mama hereditario, pero aún se desconoce el riesgo que confieren(25,87) (Tabla 3). Estos genes están involucrados en vías de señalización que conducen a la estabilidad genómica, reparación y respuesta al daño en el ADN.

Tabla 3. Genes emergentes y candidatos para el riesgo de cáncer de mama y ovario asociado a SHCMO. Tomada de Nielsen et. al.(25)

| Gen | Riesgo de por vida estimado para cáncer de mama (edad en años) | Riesgo de por vida estimado para cáncer de ovario (edad en años) |
|----------------|---|---|
| <i>ATM</i> | 60% a la edad 80 | Desconocido |
| <i>BARD1</i> | Desconocido | Baja o ninguna |
| <i>BLM</i> | Desconocido | Baja o ninguna |
| <i>BRIP1</i> | RM: <2.0 | ~6% a la edad 80 |
| <i>CDH1</i> | 42% a la edad 80 | Baja o ninguna |
| <i>CHEK2</i> | 37% a la edad 70 | Desconocido |
| <i>FAM175A</i> | Desconocido | Desconocido |
| <i>FANCC</i> | Desconocido | Desconocido |
| <i>FANCM</i> | Desconocido | Desconocido |
| <i>MLH1</i> | ~19% a la edad 70 | 20% a la edad 70 |
| <i>MRE11</i> | Desconocido | Desconocido |
| <i>MSH2</i> | ~11% a la edad 70 | 24% a la edad 70 |
| <i>NBN</i> | RM: 3.0 | Baja o ninguna |
| <i>NF1</i> | 6.5-veces más en mujeres de 30–39 | Desconocido |
| <i>PALB2</i> | 35% a la edad 70 | Baja o ninguna |
| <i>PMS2</i> | SIR: 3.8 | SIR: 12.0 |
| <i>PTEN</i> | 85% a la edad 70 | Baja o ninguna |
| <i>RAD51B</i> | Desconocido | Baja o ninguna |
| <i>RAD51C</i> | Desconocido | 9% a la edad 80 |
| <i>RAD51D</i> | Desconocido | RM: 12 |
| <i>RECQL</i> | Desconocido | Desconocido |
| <i>RINT1</i> | Desconocido | Desconocido |
| <i>STK11</i> | 32% a la edad 60 | Ginecológico*: 13% a la edad 60 |
| <i>TP53</i> | 25% a la edad 70 | Desconocido |

RM: Razón de momios, SIR: razón estandarizada de incidencia, *Ginecológico: incluye cáncer cervical, ovario y útero.

Sin embargo, se requieren más estudios clínicos para la clasificación y asociación de estas variantes posiblemente patogénicas, los cuales deben basarse en pruebas clínicas, con datos de cohorte, casos y controles y de co-segregación(88). Una estrategia que se ha empleado para la identificación de variantes genéticas predisponentes de una manera rápida y efectiva es el uso de paneles genéticos (Tabla 4). En estos estudios, se han analizado genes que predisponen a síndromes de cáncer hereditario.

Tabla 4. Uso de paneles genéticos para la detección de alelos patogénicos en cáncer de mama hereditario

| Año | Genes | Muestra | País | Métodos | Hallazgos | | | Ref |
|------|-------|---------------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|--|------|
| | | | | | BRCA | No-BRCA | Genes No-BRCA | |
| 2017 | 21 | 65 057 | Multicéntrico | Múltiple | 2.8% (1874/65057) | 5.26% (3422/65057) | CDH1, PTEN, TP53, ATM, BARD1, CHEK2, PALB2, y RAD51D. | (89) |
| 2017 | 94 | 255 | Italia | Trusight Cancer (Illumina) | 22.3% (57/255) | 6.6% (17/255) | PALB2, ATM, BRIP1, RAD51D, MSH6, PPM1D, RECQL4, ERCC3, TSC2, SLX4 y otros genes de Anemia de Fanconi | (90) |
| 2017 | 25 | 85 | Colombia | MyRisk (Myriad) | 17.6% (15/85) | 4.7% (4/85) | PALB2, ATM, MSH2 y PMS2 | (91) |
| 2016 | 29 | 10,030 | EUA | SureSelect targeted capture | 2.54% (255/10,030) | 6.7% (682/10,030) | MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, APC, MUTYH, CDH1, PTEN, STK11, y TP53 | (92) |
| 2016 | 4 | 1427 479=Sanger 948=NGS | China | Diseño de PCR | 8.8% (126/1427) | 0.49% (7/1427) | TP53 y PTEN | (93) |
| 2016 | 19 | 684 Pacientes negativos BRCA | Australia | Agilent Target Enrichment | NA | 11.1% (76/684) | TP53, PALB2, ATM, CHEK2, CDH1, PTEN and STK11 Estudio de segregación: CDH1, CHEK2, PALB2 and TP53 | (94) |
| 2016 | 10 | 581 | Alemania | TruSight Cancer | 12.4% (72/581) | 5.5% (32/581) | CHEK2, PALB2, NBN, RAD51C, ATM, TP53, RAD51D y MSH6 | (95) |
| 2016 | 13 | 141 | India | Trusight Cancer | 4.9% (7/141) | 9.92% (14/141) | ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2, RAD51C y | (96) |

| | | | | | | | | |
|------|-----------------------------|--|----------|---|---|--|---|-------|
| 2016 | 68 | 133 | Taiwan | NimbleGen capture (Roche NimbleGen, INC.) | 15.03% (20/133) | 7.51% (10/133) | <i>TP53</i> <i>RAD50, TP53, ATM, BRIP1, FANCI, MSH2, MUTYH, y RAD51C</i> | (97) |
| 2015 | 25 | 2158 Cohorte 1= 1781(BRCA1/2) Cohorte 2= 377 negativo BRCA | EUA | Sistema RainDance Thunderstorm emulsion polymerase chain reaction (PCR) | Cohorte 1 9.3% (165/1781) Cohorte 2 NA | Cohorte 1 4.2% (15/377) Cohorte 2 3.7% (14/377) | <i>CHEK2, ATM y PALB2</i> | (98) |
| 2015 | 29 | Total(1062) 735- Clínicamente representativos | EUA | SureSelect and Integrated DNA Technologies Hereditary Cancer Syndromes test (Invitae) | 9.0% (66/735) | 3.9% (26/735) | <i>ATM, PALB2, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, y PMS2</i> | (99) |
| 2015 | 29 (Invitae) 25 (Myriad) | 1046 Pacientes negativos <i>BRCA</i> | EUA | MyRisk test (Myriad Genetics) | NA | 3.8% (40/1046) | <i>CHEK2, ATM, PALB2</i> | (100) |
| 2015 | 94 genes and 284 SNPs | 620 | Alemania | TruSight (Illumina) and HaloPlex | 9.19% (57/620) | 2.9% (18/620) | <i>CHEK2, ATM, CDH1, NBN, PALB2 y TP53</i> | (88) |
| 2015 | 25 | 155 | Japón | AmpliSeq Library Kit 2.0 | 7% (11/155) | 1.9% (3/155) | <i>ATM, MRE11A y MSH6</i> | (101) |

2. Antecedentes

En México, existen estudios enfocados al SHCMO, los cuales se centran solamente en el análisis de los genes *BRCA1/2*. Uno de los primeros esfuerzos para analizar el síndrome es de Vaca-Paniagua y colaboradores en el 2012 (102), en el que se analizaron las regiones exónicas y sitios de splicing en *BRCA1/2* de 39 pacientes con cáncer de mama u ovario que además presentaban un antecedente heredofamiliar de cáncer de mama. Este estudio utilizó la tecnología de pirosecuenciación masiva en paralelo y detectó 4 deleciones no descritas previamente, dos de estas en *BRCA1* (c.2805_2808delAGAT y c.3124_3133delAGCAATATTA) y las otras dos en *BRCA2* (c.2639_2640delTG y c.5114_5117delTAAA). La prevalencia de las variantes patogénicas en los genes *BRCA1/2* en esos pacientes fue de 10.2%. Además, hallaron 16 variantes con significado clínico incierto, de las cuales 4 son potencialmente patogénicas según análisis *in silico*. Este trabajo concluyó que el uso de estas tecnologías para la detección de mutaciones en cáncer de mama es una estrategia viable en la práctica clínica.

Otro estudio de alto impacto en la población mexicana es realizado por Torres-Mejía y colaboradores en el 2015(103), en donde 810 pacientes mexicanas con cáncer de mama fueron seleccionadas sin importar los antecedentes heredofamiliares. Se analizaron 26 mutaciones detectadas previamente en la población mexicana en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, 21 de estas en *BRCA1* y 5 en *BRCA2*. Se realizó la prueba de proteína trunca para el exón 11 en *BRCA1* y los exones 10 y 11 en *BRCA2*. Este análisis usó 22 de las 26 variantes a analizar, 17 de estas mutaciones en *BRCA1* y 5 en *BRCA2*. Las 4 mutaciones restantes en *BRCA1* se analizaron por 3 distintos métodos, uno de estos es un ensayo TAQ-MAN (Thermo Fisher) para detectar el rearrreglo genómico de *BRCA1* ex9–12del, identificada como mutación fundadora mexicana. Detectaron treinta y cinco mutaciones en 34 pacientes, 20 de estas en *BRCA1* y 15 en *BRCA2*. Sólo 5 de estos pacientes presentaban antecedentes heredofamiliares de cáncer de mama. Se concluyó que se deben considerar a todas las mujeres con cáncer de mama para este tipo de análisis genéticos y no seleccionar únicamente a las pacientes con antecedentes heredofamiliares de cáncer de mama y ovario.

Un estudio realizado por Weitzel y colaboradores(104), analizó los re-arreglos genómicos largos que existen en *BRCA1* y que en poblaciones afroamericanas representan un 8% a 15% de las

mutaciones patogénicas. Este tipo de variantes fueron analizadas en 106 mexicanas por medio de una PCR multiplex cuantitativa diferencial. Detectaron una delección del exón 9 al 12 en 5 pacientes no relacionados consanguíneamente. Esta variante sugiere que existe un posible efecto fundador asociado a re arreglos genómicos grandes, en la población mexicana.

Otro estudio del SHCMO realizado en la población mexicana es el de Villarreal-Garza y colaboradores (2015)(105). En este trabajo participaron 188 pacientes, 92 con cáncer de ovario y 96 con cáncer de mama, sin importar los antecedentes heredofamiliares. Se realizó un análisis para las mutaciones en *BRCA* utilizando el panel de mutaciones hispánicas (HISPANEL) que consiste en 115 mutaciones recurrentes en un ensayo multiplex, 114 fueron analizadas por una plataforma de espectroscopia de masas y la delección del exón 9-12 mediante PCR. Posteriormente, se secuenciaron todas las regiones codificantes de los genes *BRCA* y para los pacientes con resultado negativo en HISPANEL, se realizó un ensayo de ligación dependiente de sondas múltiples (MLPA) en el gen *BRCA1*. Detectaron que un 21.2% de su muestra presentaba mutaciones en los genes *BRCA*, la mayoría de estas pacientes fue diagnosticada con un cáncer local avanzado. La mutación fundadora mexicana representó un 35% de cánceres de ovario asociados a los genes *BRCA* y un 29% a los canceres de mama asociados a *BRCA*. En conclusión, este estudio observó una alta prevalencia de mutaciones en *BRCA1/2* en pacientes con cáncer de mama y ovario sin historial heredofamiliar, y destacó la alta frecuencia de la delección ex9-12 en *BRCA1* lo cual indica el posible origen de la mutación fundadora en la Ciudad de México, representando un problema de salud pública.

3. Justificación

A pesar de los esfuerzos en la investigación del SHCMO, actualmente se ignora la proporción de genes que contribuyen a la susceptibilidad a esta enfermedad, y estudios recientes sugieren que un porcentaje de casos es de carácter poligénico, mediante la interacción de dos o más genes con alteraciones genéticas de baja penetrancia individual. Lo anterior resalta uno de los mayores problemas actuales en el diagnóstico de las enfermedades oncológicas hereditarias, en donde los análisis genéticos solicitados convencionalmente en la práctica clínica para pacientes con sospecha de SHCMO únicamente incluyen los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Por lo tanto, muchas mutaciones en genes adicionales causales de enfermedad no son identificadas en pacientes con enfermedad hereditaria. Debido a esto es necesario identificar nuevas mutaciones patogénicas heredadas que permitan analizar detalladamente la epidemiología molecular del SHCMO.

Por lo anterior, en este proyecto realizamos el análisis de 143 genes de predisposición al cáncer en pacientes con SHCMO. Los genes que estudiamos se basan en: (i) los estudios colaborativos de secuenciación más grandes, realizados por The Cancer Genome Atlas (TCGA) y el International Cancer Genome Consortium (ICGC), los cuales han identificado mutaciones patogénicas en más de 10,000 pacientes con 20 tipos de cáncer, incluyendo los de mama y ovario; (ii) los genes descritos en las bases de datos ClinVar (National Center for Biotechnology Information) y Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), las cuales son las más grandes a nivel internacional y recaban la información mundial sobre susceptibilidad genética a más de 4,600 enfermedades hereditarias, entre ellas todas las enfermedades oncológicas hereditarias mendelianas conocidas (106,107). Mediante secuenciación masiva y análisis bioinformáticos se identificaron mutaciones en la región exónica y en los sitios de corte y empalme de los 143 genes de susceptibilidad al cáncer hereditario. Este proyecto permitirá ofrecer un diagnóstico a nivel molecular a pacientes con SHCMO, con el cual podrán acceder a tratamiento y seguimiento personalizado. Además hará posible identificar nuevas alteraciones en genes que participen en el desarrollo del SHCMO, contribuyendo al conocimiento de la epidemiología molecular de esta enfermedad en la población mexicana.

5. Hipótesis

Se identificarán en al menos 25% de los pacientes con sospecha de SHCMO variantes patogénicas en uno de los 143 genes analizados.

6. Objetivos

6.1.1 Objetivo general

Analizar regiones exónicas y sitios de splicing en 143 genes de 331 pacientes con sospecha de SHCMO por medio de secuenciación masiva, para identificar nuevas variantes asociadas a este síndrome.

6.1.2 Objetivos particulares

1. Identificar la proporción de brca y no-brca en pacientes mexicanos con cáncer
2. Identificar la proporción de brca y no-brca en pacientes mexicanos sin cáncer con posible susceptibilidad al síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario
3. Evaluar la frecuencia de la mutación con efecto fundador en la población mexicana del gen *BRCA1*.

7. Materiales y métodos

7.1 Diseño y estrategia experimental

El diseño de la investigación es exploratorio, transversal y descriptivo. La estrategia experimental consta de:

1. Selección de la población
2. Recolección de la muestra de sangre periférica
3. Extracción de ADN
4. Cuantificación y control de calidad del ADN
5. Elaboración de bibliotecas
6. Secuenciación Masiva
7. Análisis bioinformático
8. Validación de variantes patogénicas por secuenciación Sanger

7.2 Descripción de la muestra

7.2.1 Participantes

En este estudio multicéntrico se contó con la colaboración para la selección de pacientes y recolección de la muestra de sangre de los siguientes institutos y fundaciones:

1. Fundación ALMA
2. Instituto Nacional de Salud Pública
3. Instituto de Oncología en Torreón
4. Instituto Estatal de Cancerología Colima
5. Instituto Estatal de Cancerología Guerrero

7.2.2 Tipo de población

Se seleccionaron pacientes con cáncer de mama para los cuales, mediante criterios de inclusión específicos del National Comprehensive Cancer Network (NCCN: en la guía Genetc/Familial High-risk Assesment: Breast and Ovarian V1.2014), exista la sospecha de variantes genéticas heredables que causen predisposición al Síndrome Hereditario de Cáncer de Mama y Ovario.

7.2.3 Tipo de muestreo

No probabilístico por criterios de inclusión.

7.2.4 Selección de la muestra

Para determinar el número de pacientes se utilizó un método probabilístico, con un nivel de confianza del 95%, un margen de error de 5% y un nivel de heterogeneidad del 50%, se obtuvo que se requirieren un total de 341 pacientes. Los pacientes fueron seleccionados de 5 estados de la República Mexicana (Figura 6)



Figura 6. Estados participantes.

7.2.5 Criterios de inclusión

Los siguientes criterios de inclusión se basan en la recomendación de la National Comprehensive Cancer Network (34) de Estados Unidos, un organismo líder en la creación de guías de práctica clínica a nivel mundial. En este apartado solo se describen los criterios con mayor relevancia.

Los pacientes deben cumplir con los siguientes criterios:

- i. Nacionalidad Mexicana.
- ii. Edad: ≥ 18 años
- iii. Mujer con cáncer de mama que:

1. Diagnosticada antes de los 45 años
 2. Diagnosticada antes de los 50 años y tiene un tumor primario adicional
 3. Tiene cáncer de mama triple negativo antes de los 60 años
 4. Tiene cáncer de ovario
 5. Tiene cáncer de mama bilateral y ambos tumores se diagnosticaron antes de los 50 años
 6. Tiene ≥ 1 familiar consanguíneo (1º, 2º o 3er grado) con cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años
 7. Tiene ≥ 2 familiares consanguíneos (1º, 2º o 3er grado) con cáncer de mama diagnosticados a cualquier edad
 8. Tiene ≥ 1 familiar consanguíneo (primero, segundo o tercer grado) con cáncer de ovario epitelial
 9. Tiene ≥ 2 familiares consanguíneos (1º, 2º o 3er grado) con cáncer de páncreas o próstata (puntaje de la escala de Gleason ≥ 7) diagnosticados a cualquier edad
 10. Tiene ≥ 1 familiar consanguíneo (1º, 2º o 3er grado) hombre con cáncer de mama
 11. Pertenece a etnicidades con mayor frecuencia de mutaciones (ejemplo Judíos Ashkenazi)
- iv. Mujer con cáncer de ovario que:
Tiene cáncer de ovario no mucinoso diagnosticado a cualquier edad
- v. Hombre con cáncer de mama diagnosticado a cualquier edad
- vi. Individuo con cáncer de páncreas o de próstata (Gleason ≥ 7) con ≥ 2 familiares consanguíneos (primero, segundo o tercer grado) con cáncer de mama y/o ovario y/o cáncer de páncreas o de próstata (Gleason ≥ 7) diagnosticados a cualquier edad
- vii. Individuo no afectado que:
1. Tiene familiares consanguíneos (1º, 2º o 3er grado) que cumplen con los criterios previamente mencionados
 2. Individuo de una familia con una mutación patogénica en *BRCA1/2*

7.2.6 Criterios de eliminación

- i. Muestras sin cantidad suficiente de ADN para el análisis molecular.

ii. Paciente sin el expediente clínico completo.

7.3 Selección de 143 genes

El panel seleccionado para el análisis molecular se basan en estudios colaborativos de gran escala de secuenciación realizados por The Cancer Genome Atlas (TCGA) y el International Cancer Genome Consortium (ICGC), así como genes descritos en bases de datos como ClinVar y Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) asociados a la mayoría de las enfermedades oncológicas hereditarias (Figura 7). El diseño de los primers se enfoca en el enriquecimiento de la región codificante (exones) y los sitios de splicing de los 143 genes.

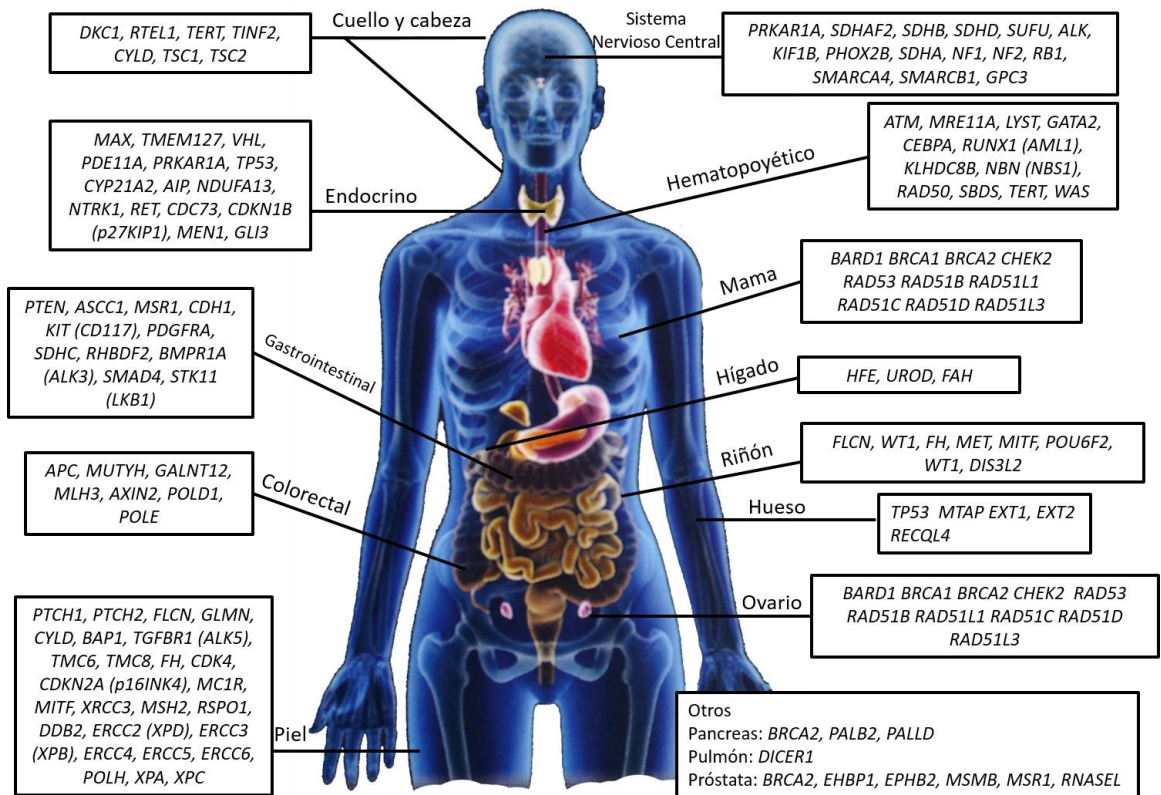


Figura 7. Panel de genes seleccionados. Se incluyen 88 síndromes relacionados al cáncer hereditario

7.4 Flujo de trabajo experimental

7.4.1 Extracción de DNA

Se aisló ADN a partir de 100 μ L de sangre venosa periférica total, utilizando el kit DNAeasy Blood & Tissue (Qiagen). El método de extracción está basado en el principio de columna por afinidad con membrana de sílica.

Este método comienza con una lisis celular utilizando proteinasa K, la lisis celular se lleva a cabo en una incubación a 56°C durante una hora. Terminada la incubación las muestras son centrifugadas a través de la columna de afinidad, esto permite que la carga negativa del ADN sea atraída, en presencia de una cantidad alta de sales caotrópicas, por la membrana de sílica y éste permanezca en la membrana(108). Posteriormente, continúan dos ciclos de lavado, los cuales permiten filtrar los restos de inhibidores de la enzima *Taq* y sales depositadas en la membrana. Una vez terminados los ciclos de lavado se recuperó el ADN en agua estéril libre de DNasas.

7.4.2 Cuantificación y calidad de DNA

El DNA de cada paciente se cuantificó por espectrofotometría y fluorometría. La espectrofotometría además de obtener un dato de concentración también proporciona datos para calcular la pureza a través de la relación A260/A280. Este método de espectrometría se basa en la absorbancia de luz UV de las bases nitrogenadas de los nucleótidos, la longitud de onda de máxima absorción para los ácidos nucleicos es de 260 nm(109). Un valor >1.8 en la relación A260/280 es lo esperado después del proceso de extracción de DNA.

La cuantificación por fluorometría se utilizó justo antes de realizar las diluciones necesarias para el protocolo de preparación de bibliotecas, ya que este método proporciona una mayor sensibilidad, precisión y exactitud, debido al uso de colorantes fluorescentes que emiten una señal cuando se encuentran intercalados en la doble cadena del ADN(110).

La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con tinción de bromuro de etidio. Este método se utilizó para poder observar el peso molecular del ADN, donde esperamos fragmentos mayores a 10,000 kilobases, un indicativo de que el ADN se encuentra integro.

7.4.3 Enriquecimiento por PCR multiplex

El enriquecimiento consiste en amplificar la región de interés mediante una PCR multiplex con el kit GeneRead DNaseq Gene Panel V2 (Qiagen), el cual contiene un set de primers con un diseño de superposición para 6582 amplicones correspondientes a las regiones codificantes y sitios de splicing de los 143 genes blanco. Este método utiliza 4 reacciones independientes con 10 ng de ADN en cada una para obtener el enriquecimiento deseado de las 620,318 bases que comprenden la región blanco. Los productos de PCR tienen un tamaño promedio de 150 pb. Esta amplificación de acuerdo a las instrucciones del fabricante. (Figura 8).

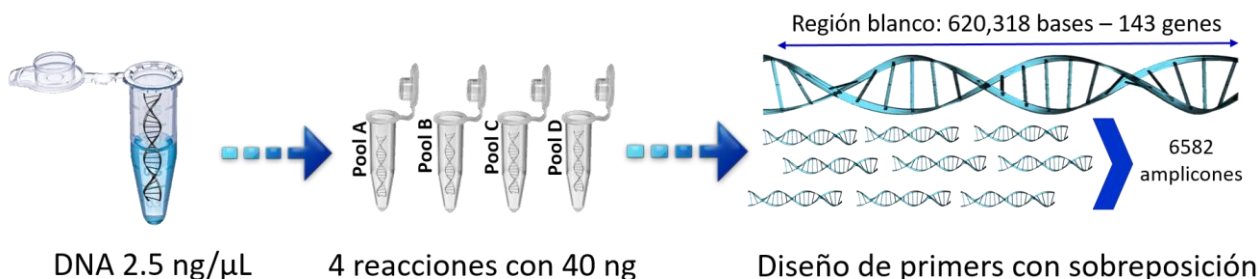


Figura 8. PCR multiplex. Se realizaron 4 reacciones de 10 ng por cada paciente para obtener la región blanco amplificada.

7.4.4 Preparación de bibliotecas

La preparación de bibliotecas es un proceso en donde se deben añadir adaptadores en los extremos de los productos de PCR (Figura 9). Dichos adaptadores se emplean para amplificar, identificar y secuenciar a las moléculas amplificadas. El primer paso después de la amplificación multiplex es mezclar las 4 reacciones previas en una sola, después se realiza una purificación en donde se remueven los fragmentos no amplificados, restos de la enzima de amplificación y el exceso de primers restante. Esta limpieza se realiza con perlas paramagnéticas de fase solida (Ampure XPBeads, Beckman Coulter). Una vez purificados los productos de PCR, se realiza la reparación de extremos, la cual consiste en eliminar extremos salientes de las regiones 5' y 3' para generar extremos romos, a los cuales se les puedan ligar los fragmentos deseados. Posteriormente se añade una adenina en los extremos 3' usando una *Tac* polimerasa con actividad adeninatransferasa terminal, para prevenir que los fragmentos se ligen unos con otros durante el proceso de ligación de adaptadores, el cual consiste la adición de adaptadores de 24 pb en cada extremo. Los adaptadores contienen la secuencia complementaria del primer de secuenciación de Illumina.

Posteriormente se hace una selección fina de fragmentos de ~200 pb (productos de PCR: 150 pb + adaptadores en los extremos: 24x2 ≈ 200 pb) con las perlas paramagnéticas de fase sólida. Este paso aumenta la probabilidad de seleccionar únicamente los productos amplificados de las regiones blanco y eliminar productos inespecíficos. Los productos seleccionados son amplificados nuevamente por PCR con un segundo adaptador que contiene las secuencias llamadas etiquetas moleculares (8 nt). Estos segundos adaptadores se combinan para que sean dos distintos en cada muestra. Esto nos permite identificar cada muestra durante el proceso de secuenciación. Cada una de estas etiquetas moleculares contiene en un extremo una secuencia de ~ 35 pb que es complementaria a los oligos utilizados en la lámina de secuenciación. Una vez amplificadas las bibliotecas, se purifican nuevamente por el método de perlas paramagnéticas para eliminar residuos de enzima y primers.

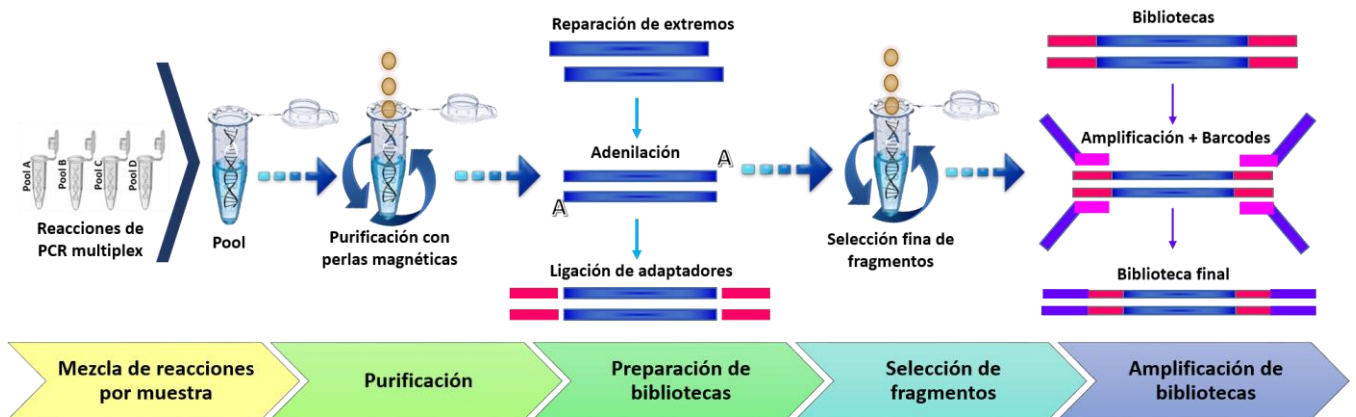


Figura 9. Flujo de trabajo para preparación de bibliotecas. Consiste en la purificación, ligación de adaptadores y amplificación con adición de etiquetas moleculares a la región blanco.

7.4.5 Cuantificación, calidad y mezcla de bibliotecas

Se cuantificaron las bibliotecas, se verificó su perfil de tamaño molecular (calidad) y se mezclaron equimolarmente en grupos de 50-60 para cada corrida. La cuantificación se realizó por fluorometría y obtuvieron concentraciones ≥ 5 ng/ μ L. Posteriormente se verificó el tamaño de los

fragmentos por Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), una electroforesis basada en micro canales que permite separar las moléculas de acuerdo a su masa molecular. Esta medición se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor. Las bibliotecas finales tuvieron un peso molecular ~300 pb. En la figura 10, se muestra la estructura del producto final de una biblioteca.

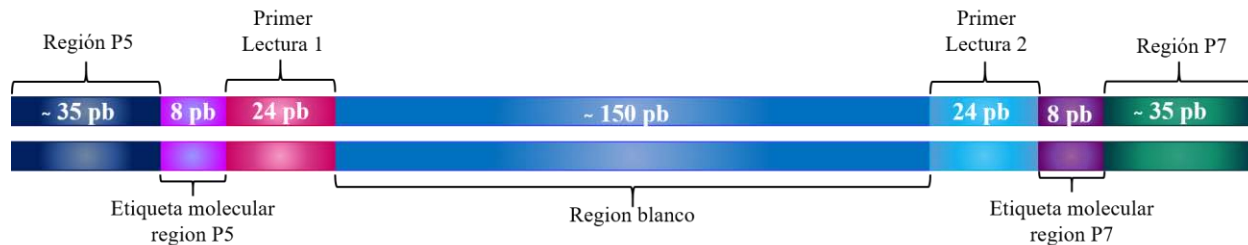


Figura 10. Configuración de una biblioteca. Cuenta con 3 regiones en cada extremo, cada uno con una función en particular para la secuenciación por síntesis

Una vez obtenida la concentración y el tamaño de los fragmentos se realizaron cálculos para obtener una dilución de cada muestra a una concentración 4 nM en 20 μ L. Finalmente, se mezclaron 5 μ L de cada muestra diluida a 4 nM en un tubo de 1.5 mL, para obtener la mezcla final de todas la muestras.

7.4.6 Secuenciación masiva en paralelo

Para realizar el proceso de secuenciación masiva en paralelo es necesario preparar el cartucho de secuenciación y reactivos al igual que desnaturalizar las bibliotecas. Este proceso se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor, la concentración final de las bibliotecas fue de 14 pM.

El proceso de secuenciación masiva en paralelo comienza con la hibridación de la región complementaria de los adaptadores (P5 y P7) a los oligos que se encuentran en la lámina de secuenciación (Figura 11). Una vez unidos, una polimerasa sintetiza la hebra complementaria, quedando unida covalentemente a la lámina de secuenciación. Posteriormente, se elimina la hebra que no está unida covalentemente a la lámina de secuenciación mediante un ciclo de lavado. Las hebras sintetizadas se doblan para formar puentes con los oligos en la lámina de la región complementaria P5 o P7, una polimerasa de alta fidelidad se encarga de sintetizar el reverso

complementario y así obtener las dos cadenas. Este proceso se repite múltiples veces hasta obtener la misma molécula amplificada con un mínimo de 1000 veces.

Una vez generados los clústeres, el proceso de secuenciación por síntesis comienza. El primer de secuenciación hibrida con la región complementaria en el adaptador. La DNA polimerasa inicia la síntesis de la cadena complementaria con nucleótidos fluorescentes que tienen terminadores reversibles, estos nucleótidos emiten fluorescencia, cada uno emite una señal e intensidad distinta cuando se unen a la cadena, esta fluorescencia es captada por una cámara interna en el equipo. La primera lectura consiste en la cadena con sentido 5' → 3', posteriormente, en la lectura 2, se lee las etiquetas moleculares en la región P5, la lectura 3 consiste en las etiquetas moleculares de la región P7 y la última lectura es para la hebra complementaria con sentido 3' → 5'.

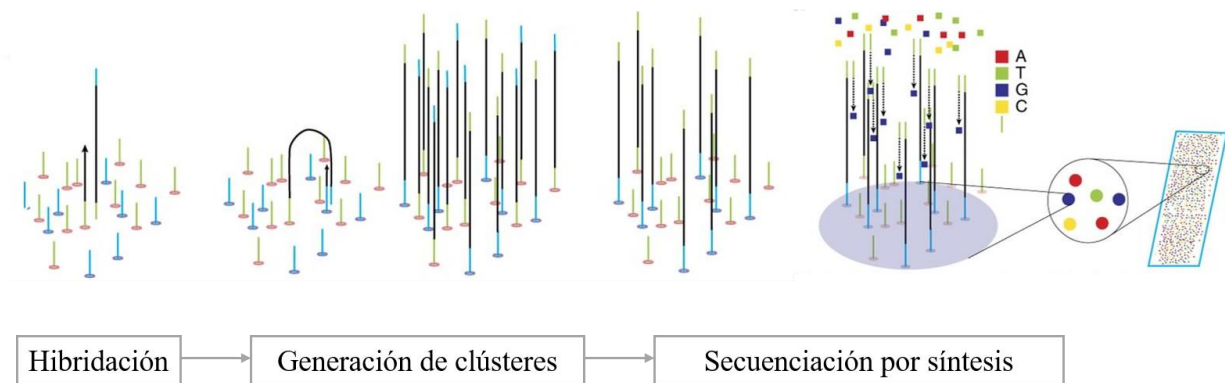


Figura 11. Proceso de secuenciación por síntesis. Consiste en la amplificación por puentes para formar clústeres y su secuenciación por síntesis con terminadores reversibles.

7.4.7 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático consta de 4 procesos, el alineamiento, identificación de variantes, anotación y filtrado.

Para alinear las secuencias con la secuencia de referencia del genoma humano (GRCh37) de los 143 genes se empleó el programa BWA-MEM(111). Esta herramienta alinea las secuencias de 70bp-1Mbp, el algoritmo funciona mediante alineamientos semilla o con coincidencias exactas máximas (MEMs) y luego extiende dichos alineamientos con el algoritmo basado en afinidad

de brechas Smith-Waterman(111). Para detectar las variantes se utilizó la plataforma GeneReader (Qiagen) que emplea el programa GATK (Broad Institute) (Figura 12).

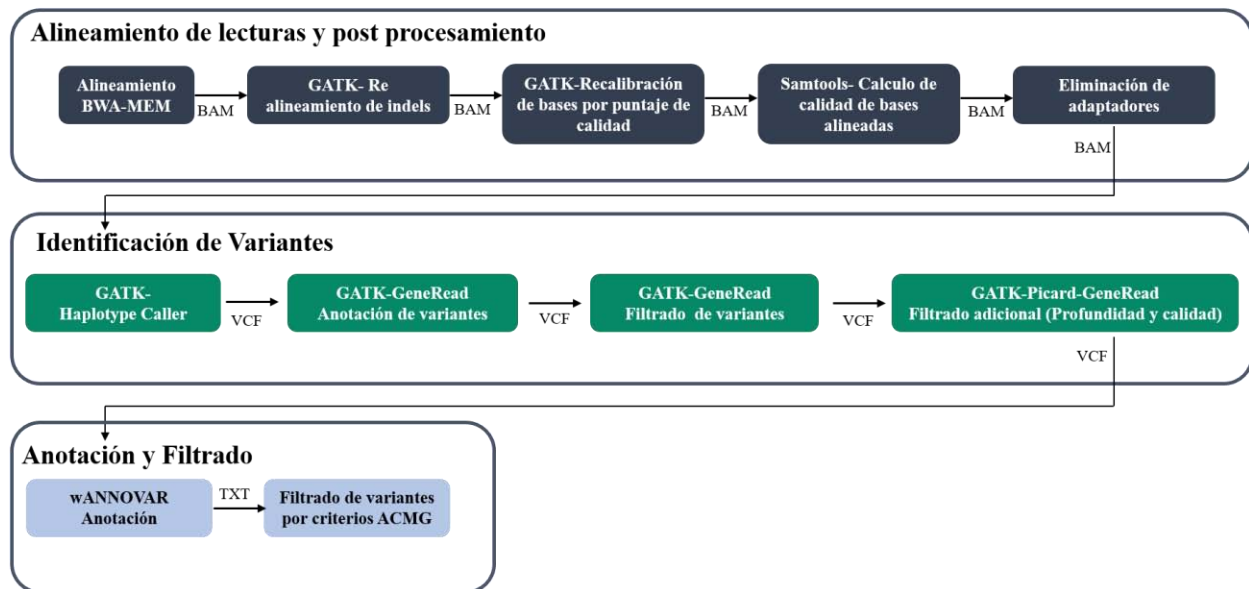


Figura 12. Flujo de trabajo bioinformático. Se esquematiza el proceso de análisis de datos, en donde se realiza un alineamiento de secuencias, detección de variantes, anotación y filtrado de variantes anotadas.

7.4.7.1 Filtrado de variantes

Se consideraron varios aspectos técnicos para filtrar las variantes detectadas (Figura 13). Estos criterios consideran la profundidad, la presencia de variantes en homopolímeros, secuencias duplicadas y variantes en secuencias intrónicas o no codificantes. Dichas variantes fueron excluidas del análisis. Las alteraciones consideradas fueron: cambios de 1 nucleótido, inserciones y deleciones. Las muestras con alteraciones potencialmente patogénicas fueron visualizadas y analizadas con los paquetes IGV, PolyPhen2, SIFT y ANNOVAR(112), y se cotejaron con bases de datos internacionales de cáncer y variación genética en humanos (COSMIC, 1000 Genomes Project, Exome Sequencing Project NHLBI, dbSNP 141, TCGA) para identificar a las alteraciones con impacto en la función. Para confirmar la presencia de mutaciones potencialmente patogénicas, las muestras fueron validadas mediante la amplificación específica (PCR) de cada alteración individual y se analizaron de manera independiente por medio de secuenciación tipo Sanger.

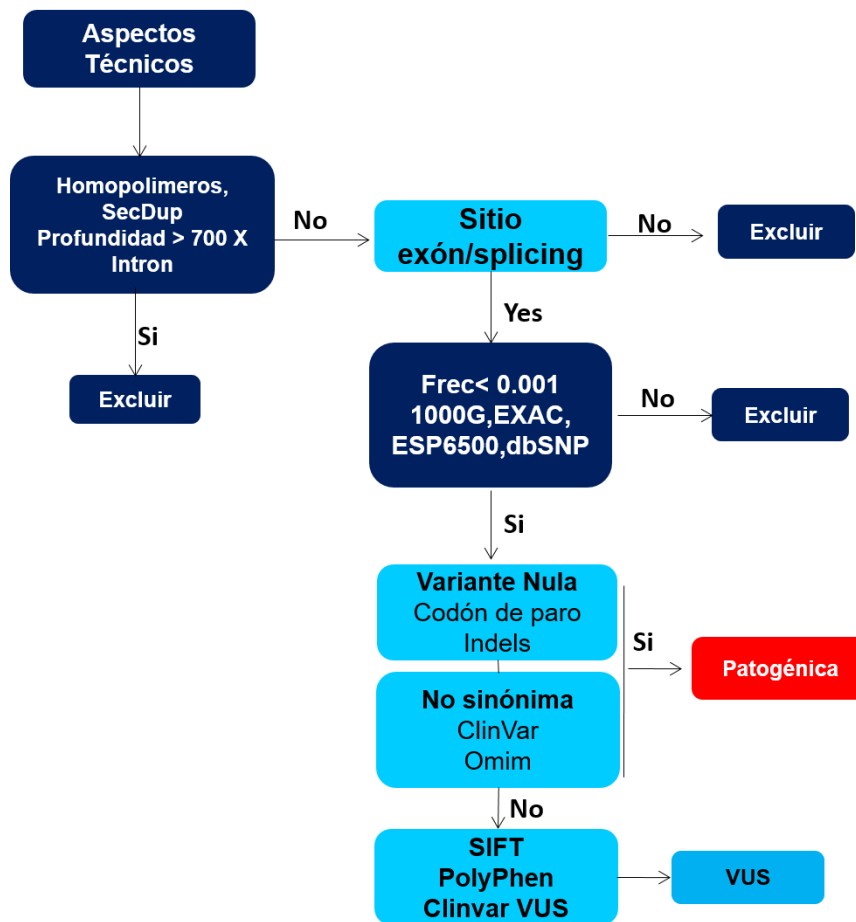


Figura 13. Flujo de trabajo del filtrado bioinformático. Se presentan los criterios de filtrado de variantes.

7.4.7.2 Análisis de sitios de fosforilación en variantes con significado clínico incierto

El análisis de las variantes de cambio de aminoácido (cambio de sentido, *missense*) con significado clínico incierto se realizó con el programa ReKINect(113), el cual evalúa el impacto de la variante genética en los sitios de fosforilación. ReKinect hace un análisis en donde predice si el sitio de fosforilación está afectado debido al cambio en el tipo de aminoácido. Este programa utiliza los datos de las secuencias y las posiciones de todos los dominios de las 538 cinasas, 111 dominios SH2 y 140,000 mil sitios de fosforilación detectados en el proyecto de proteoma. Esta información permite modelar el posible efecto funcional en los sitios de fosforilación(113).

7.4.7.3 Análisis de variación del número de copias

Para detectar la variación del número de copias se utilizó el programa CNVkit que es una biblioteca de Python y un conjunto de herramientas de software en línea de comandos para inferir y visualizar el número de copias de los datos de secuenciación de ADN. CNVkit utiliza métodos estadísticos robustos para extraer datos utilizables de las muestras de referencia. Cada muestra de entrada es primero centrada en la mediana de profundidad de secuenciación, luego se realizan correcciones de polarización de lectura-profundidad en cada una de las muestras normales por separado(114). Los valores medidos de la mediana en las muestras, son normalizados (\log_2), y se combinan con los valores de lectura-profundidad para tomar un promedio ponderado (Tukey's biweight ubicación) y varianza (Tukey biweight midvariance) de los valores de cada uno. Estos valores son utilizados para visualizar la pérdida o ganancia del número de copias. El parámetro utilizado como punto de corte fue de ± 0.2 sobre los valores normalizados(114). En este trabajo el análisis de número de copias se restringió a los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

7.4.7.4 Diseño de primers para detectar delección de los exones 9 a 12

Se utilizó como referencia el trabajo de Weitzel y colaboradores(104), para obtener la secuencia de las regiones intrónicas y posibles sitios de ruptura del gen *BRCA1*. El diseño consiste en 3 oligonucleótidos (Figura 14), el primero es el primer que hibrida con la región del intrón 8 en sentido $5' \rightarrow 3'$ (P1), el segundo es un primer con sentido reverso ($3' \rightarrow 5'$) que se encuentra en la región del intrón 8 (P2) y el tercero es un primer con sentido reverso que se encuentra en el intron 12 (P3). La combinación P1-P2, genera un producto silvestre de 450 pb, mientras que el producto de P1-P3 proviene el alelo mutado con la delección del exón 9 al 12.

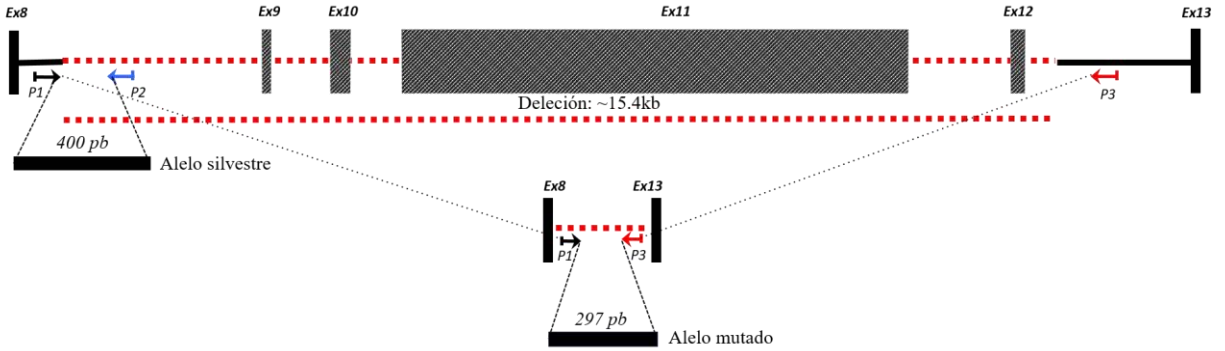
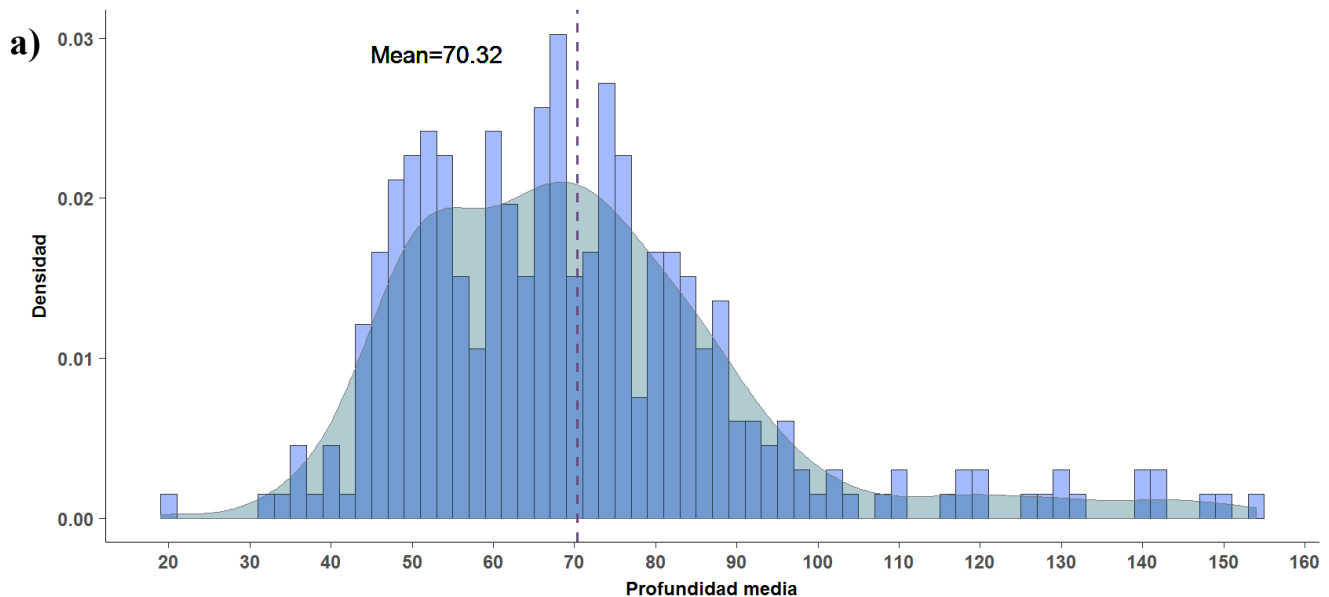


Figura 14. Diseño de primers para delección 9-12. Se ilustra el *locus* de *BRCA1*, exones 8-13. Cada exon está representado por una caja y los intrones por líneas. Las posiciones de los oligonucleótidos P1, P2, P3, y el tamaño de sus productos están indicados.

8. Resultados

8.1 Análisis de calidad de las corridas de secuenciación

Para analizar la calidad de las corridas de secuenciación se analizaron los porcentajes de lecturas de alta calidad (Q30) y la profundidad. El valor Q30 indica cuántas lecturas tienen una posibilidad de error $\leq 0.1\%$, valor considerado como lecturas de alta calidad. Todas las corridas de secuenciación presentaron valores de Q30 mayores al 92%. La profundidad representa el número de lecturas que hay por región (X), en este caso todos los amplicones de los 143 genes. En la Figura 15, se muestra los histogramas con curva de densidad en donde se graficó la profundidad media obtenida por cada muestra y el porcentaje de cobertura por profundidad. Para realizar la detección de variantes en línea germinal es necesario un mínimo de 30X (30 lecturas)(115). En las muestras secuenciadas obtuvo una media de 70.32X, con un intervalo de 20-155. Las muestras que presentaron profundidad media menor a 20X se volvieron a secuenciar.



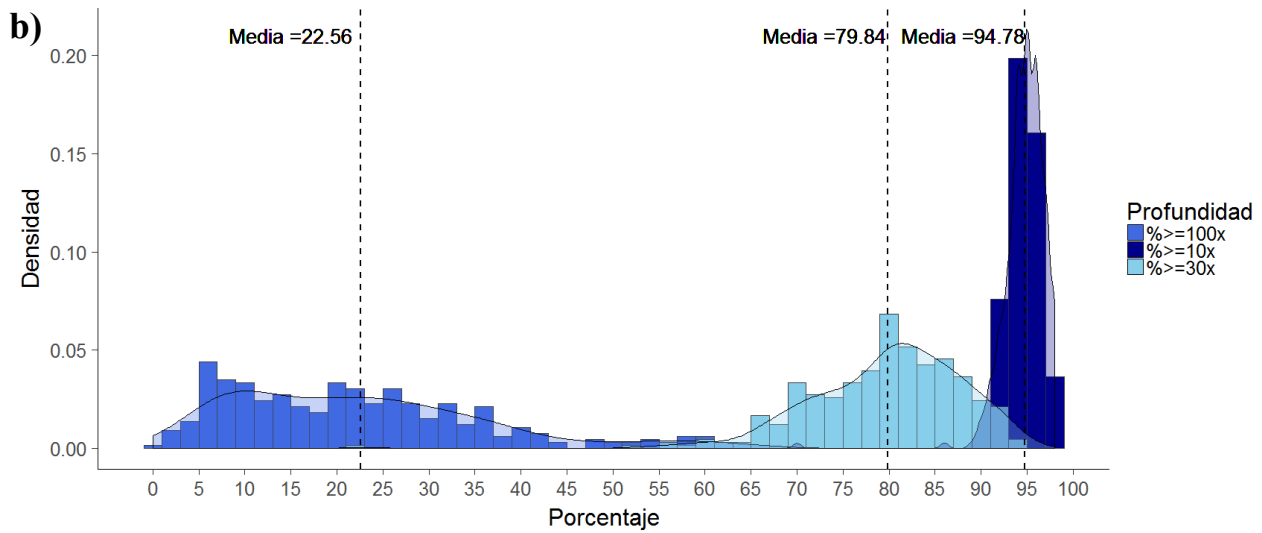


Figura 15. Histograma con curva de densidad. a) Se ilustra la profundidad obtenida por muestra, una media de 70.32 ± 21.35 . b) Se presenta el porcentaje de la región blanco a las profundidades de 10X, 30X y 100X.

8.2 Detección de variantes

En el 15.3% (46/300) de los pacientes con cáncer se encontró una variante patogénica en heterocigosis, y un paciente presentó 2 o más variantes patogénicas 0.33%(1). También en este grupo, el 24% (72/300) de los pacientes tuvieron variantes con significado clínico desconocido (VUS) y el 60% (181/300) no presentaron ninguna alteración. El grupo de pacientes sin cáncer tuvo variantes patogénicas en 32.2% (10/31) de los pacientes, un paciente presentó (3.2%; 1/31) dos variantes patogénicas en heterocigosis, el 12.9% (4/31) de los pacientes tuvo variantes VUS y el 51.6% (16/31) fueron negativos (Figura 16).

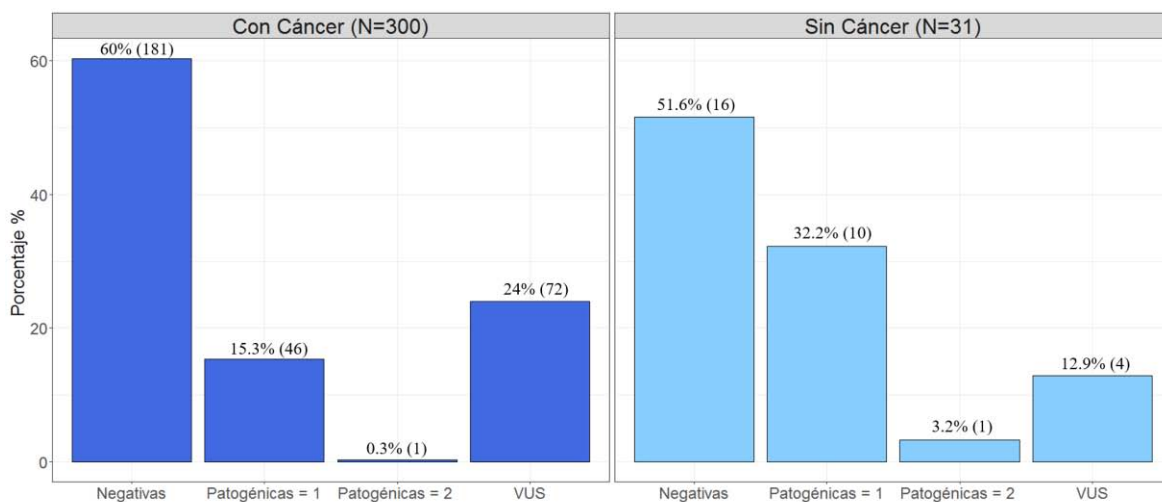


Figura 16. Proporciones de las variantes detectadas en los 331 pacientes analizados. Los datos incluyen 300 pacientes con cáncer y 31 pacientes sin cáncer pero con antecedentes heredofamiliares de cáncer de mama. Patogénicas =1: Se refiere a que únicamente se detectó un alelo patogénico. Patogénico=2: Detección de 2 alelos patogénicos en distintos genes. VUS: variante con significado clínico desconocido.

8.3 Distribución alélica de las variantes patogénicas

La distribución alélica de las variantes patogénicas detectadas en las pacientes con cáncer abarcó 26 genes alterados en 46 pacientes. Destaca que el 55.1% de estas variantes patogénicas se observó en genes distintos a *BRCA1/2* (Figura 17). Los tipos de mutaciones que se detectaron con mayor frecuencia fueron los codones de paro prematuros (stopgain) y las deleciones, presentes en el 61.6% de las variantes patogénicas. Los genes con más variantes patogénicas fueron *BRCA1* 27.6% (13/47), *BRCA2* 14.8% (7/47), *MSR1* 4.2% (2/47), *ATM* 4.2% (2/47), *ERCC3* 4.2% (2/47), *FANCI* 4.2% (2/47), *PDE11A* 4.2% (2/47) y *LIG4* 4.2% (2/47).

En los pacientes sin cáncer con antecedentes heredo-familiares de cáncer de mama, se detectaron 11 pacientes con variantes patogénicas en *BRCA1*, *BRCA2*, *POLH*, *FANCF* y *WRN*. Un paciente tuvo dos variantes patogénicas, en los genes *BRCA2* y *PDE11A*. En estos pacientes *BRCA2* presentó la mayor frecuencia de variantes patogénicas (54.5%; Figura 18).

De los 26 genes detectados con variantes patogénicas, el 8% de estos genes (*BRCA1/2*) son considerados de alto riesgo para el desarrollo de SHCMO, mientras que 3 genes (*NBN*, *ATM* y *CHEK2*), el 11.5%, se consideran de riesgo moderado. Importantemente, para 17 genes (68%) no se ha establecido el riesgo para SHCMO, pero son genes que se proponen como posibles candidatos al síndrome (87,116) y un 16% no se había detectado en pacientes con cáncer de mama y ovario. Respecto a los patrones de herencia, 40% de los genes condicionan a síndromes autosómicos dominantes y autosómicos recesivos, el 36% tienen sólo un patrón de herencia autosómico recesivo, el 20% con un patrón autosómico dominante y un 4% tienen un patrón recesivo ligado al X. En todos los casos el patrón de herencia autosómico dominante corresponde a la susceptibilidad a síndromes oncológicos y el patrón autosómico recesivo a síndromes distintos al cáncer. Para el caso del gen *FANCB*, se tiene un patrón de herencia recesivo ligado al X. De estos genes detectados, sólo 6 (24%) se encuentran dentro de los genes que el Colegio Americano de Genética Médica (ACMG) sugiere que deben ser reportados al paciente, y el 56% no debe ser reportado, y en un 20% no hay indicaciones.

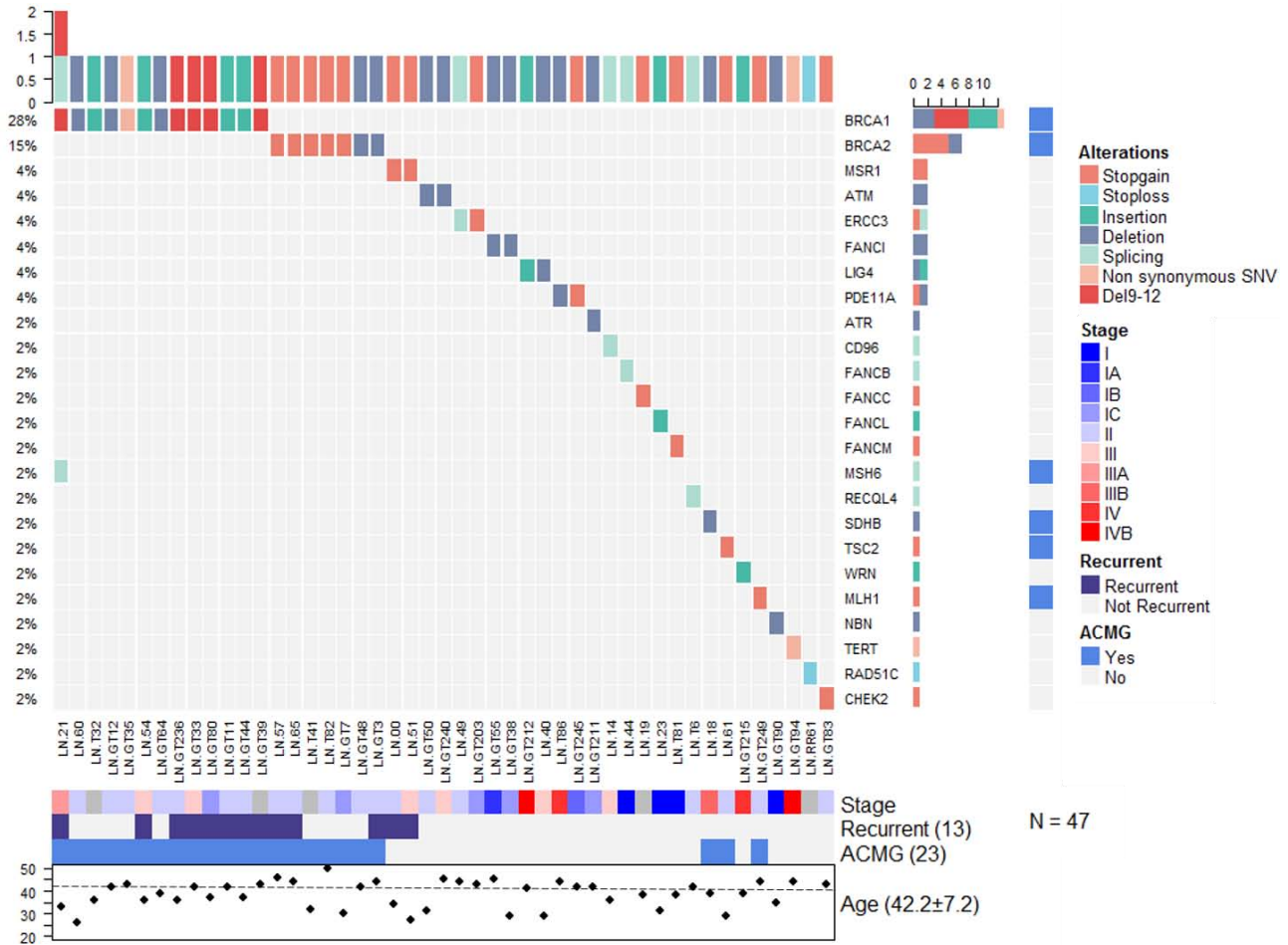


Figura 17. Distribución alélica de las variantes patogénicas detectadas (N=47). En naranja se muestran variantes con generación de un codón de paro prematuro, en azul claro, variantes con la pérdida del codón de paro, en verde oscuro, variantes con inserciones que corren el marco de lectura, en morado, variantes con deleciones que corren el marco de lectura, en verde claro, variantes que ocurren en sitios de corte y empalme, en rosa claro, variantes de un solo nucleótido no sinónimas y en rojo la deleción fundadora mexicana.

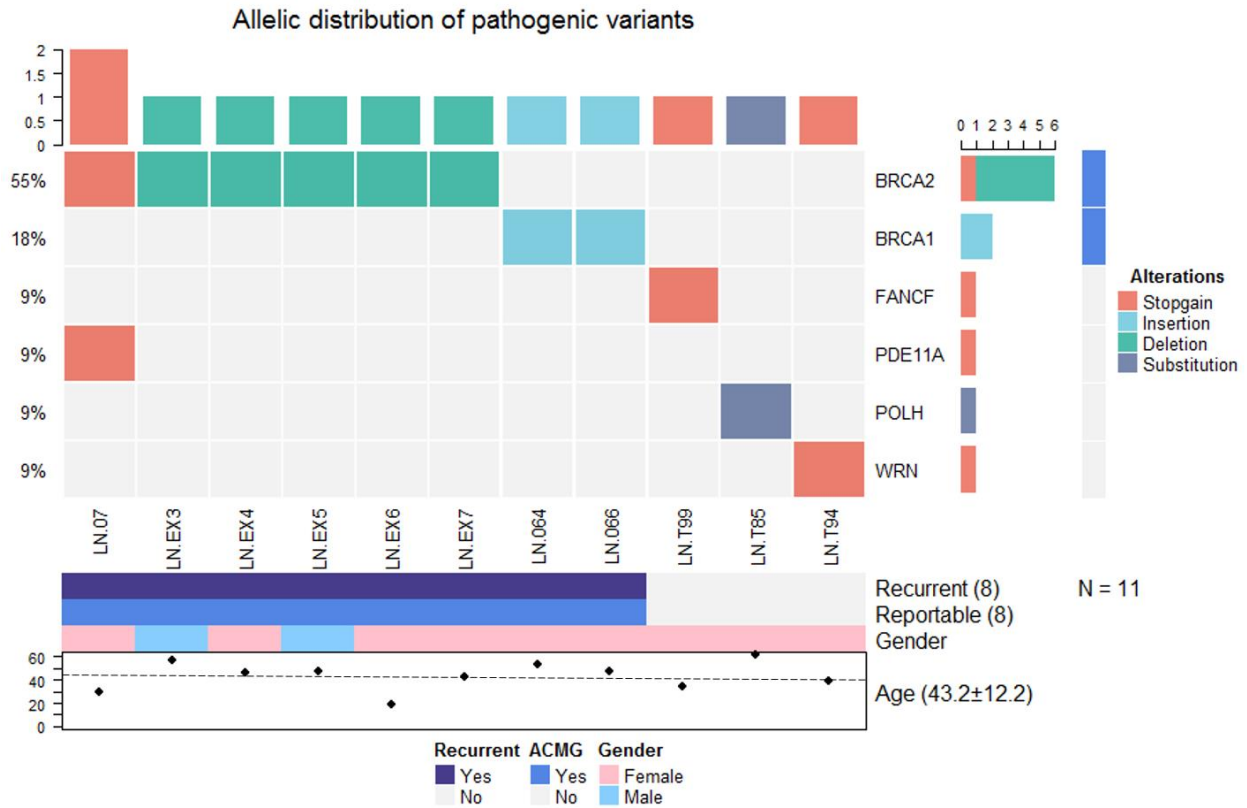


Figura 18. Distribución alélica de las variantes patogénicas detectadas en pacientes sin cáncer con antecedentes heredofamiliares de cáncer de mama (N=11). En naranja se muestran variantes con generación de un codón de paro prematuro; en azul claro, variantes con inserciones que corren el marco de lectura; en morado, variantes con sustitución de un solo nucleótido y en verde oscuro, deleciones que corren el marco de lectura

Tabla 5. Síndromes asociados a variantes patogénicas detectadas

| Gen | ID-LN | Frec. | Síndrome (OMIM) ¹⁷ | Riesgo a cáncer de mama ¹⁸ | Patrón de herencia ¹⁸ | Principales vías de señalización ¹⁹ | Reportable en ACMG ¹⁸ |
|--------------|---|-------|--|---------------------------------------|----------------------------------|---|----------------------------------|
| <i>BRCA1</i> | 21,54, 60, 64, 66, GT11, GT12, GT236, GT33, GT35, GT39, GT44, GT64, GT80, T32 | 15 | Cáncer de Mama-Ovario Hereditario/Anemia de Fanconi | Alto | AD | Daño de doble cadena (RH) | Si |
| <i>BRCA2</i> | 7, 57, 65, EX3, EX4, EX5, EX6, EX7, GT3, GT48, GT7, T41, 82 | 13 | Anemia Fanconi / Cáncer de Mama-Ovario Hereditario / Cáncer Pancreático Familiar / Cáncer Próstata Hereditario | Alto | AD/AR | Daño de doble cadena (RH) | Si |
| <i>ATM</i> | GT240, GT50 | 2 | Susceptibilidad a Cáncer de Mama /Ataxia Telangiectasia | Moderado | AD/AR | Daño de doble cadena (RH) | No |
| <i>NBN</i> | GT90 | 1 | Anemia Aplásica /Leucemia linfoblástica aguda /Síndrome breakage Nijmegen | Moderado | AD/AR | Vía de respuesta al daño de doble cadena del DNA | No |
| <i>CHEK2</i> | GT83 | 1 | Li-Fraumeni syndrome /Suceptibilidad a cancer de mama, prostate y colon | Moderado | AD | Regulador de punto de control del ciclo celular | No |
| <i>ERCC3</i> | 49, GT203 | 2 | Xeroderma Pigmentosum | No Establecido | AR | Vía de iniciación de la transcripción de la RNA Pol II | No |
| <i>FANCI</i> | GT38, GT55 | 2 | Anemia de Fanconi | No Establecido | AR | Vía anemia de Fanconi y respuesta al daño de doble cadena del DNA | No |
| <i>WRN</i> | GT215,T94 | 2 | Síndrome Werner | No Establecido | AR | Síntesis de la hebra C del Telómero y Puntos de control del ciclo celular | No |
| <i>ATR</i> | GT211 | 1 | Telangiectasia cutánea y síndrome familiar de cáncer | No Establecido | AD/AR | Regulador de punto de control del ciclo celular | No |
| <i>FANCB</i> | 44 | 1 | Anemia de Fanconi | No Establecido | XLR | Vía anemia de Fanconi y respuesta al daño de doble cadena del DNA | No |
| <i>FANCC</i> | 19 | 1 | Anemia de Fanconi | No Establecido | AD/AR | Vía anemia de Fanconi y eventos con BARD1 | No |
| <i>FANCF</i> | T99 | 1 | Anemia de Fanconi | No Establecido | AR | Vía anemia de Fanconi y eventos con BARD1 | No |
| <i>FANCL</i> | 23 | 1 | Anemia de Fanconi | No Establecido | AR | Vía anemia de Fanconi y Daño | No |

| | | | | | | al DNA ATM/ATR Regulación de los puntos de control G1/S | |
|---------------|------------|---|---|-------------------|-------|---|----|
| <i>FANCM</i> | T81 | 1 | Anemia de Fanconi | No Establecido | AD/AR | Vía anemia de Fanconi y respuesta al daño de doble cadena del DNA | No |
| <i>MLH1</i> | GT249 | 1 | Cáncer colorrectal hereditario sin pólipos, tipo 2 | No Establecido | AD/AR | Sistema de reparación del DNA por mal apareamiento | Si |
| <i>MSH6</i> | 21 | 1 | Síndrome de Lynch/ Síndrome de cáncer por reparación Mismatch | No Establecido | AD/AR | Sistema de reparación del DNA por mal apareamiento | Si |
| <i>POLH</i> | T85 | 1 | Xeroderma pigmentosum | No Establecido | AR | Emparejamiento de DNA homólogo e Intercambio de hebras | No |
| <i>RAD51C</i> | RR61 | 1 | Anemia de Fanconi, grupo de complementación O/Susceptibilidad a cáncer de Mama-Ovario | No Establecido | AD/AR | Vía de reparación por recombinación homóloga | NA |
| <i>RECQL4</i> | T06 | 1 | Síndrome Rothmund-Thompson | No Establecido | AR | Respuesta al daño del DNA | No |
| <i>SDHB</i> | 18 | 1 | Síndrome Carney-Stratakis | No Establecido | AD | Metabolismo(Ciclo de Krebs) | Si |
| <i>TERT</i> | GT94 | 1 | Leucemia Mieloide aguda /Melanoma maligno | No Establecido | AD/AR | Mantenimiento de los cromosomas | No |
| <i>TSC2</i> | 61 | 1 | Esclerosis Tuberosa | No Establecido | AD | Vía RET y Vía integrada del cáncer de mama | Si |
| <i>MSR1</i> | 00, 51 | 2 | Esófago de Barret hereditario/ Adenocarcinoma esofágico / Cáncer de próstata hereditario | Novel | AD | Transporte mediado por vesícula y Vía AGE/RAGE | NA |
| <i>PDE11A</i> | GT245, T86 | 2 | Enfermedad Adenocortical primaria nodular pigmentada | Novel | AD | Vía de proteínas G acopladas a receptores (GPCR) y Metabolismo de purinas | NA |
| <i>CD96</i> | 14 | 1 | Síndrome Opitz Trigonoccephaly | Novel | AR | Interacciones inmunoregulatorias | NA |
| <i>LIG4</i> | 40, GT212 | 1 | Síndrome LIG4 | Novel | AR | Reparación por escisión de nucleótidos | NA |

Abreviaturas: AD, autosómico dominante; AR, autosómico recesivo; XLR, recesivo ligado al X. Los genes que no han sido asociados a cáncer de mama se encuentran en negritas.

Mediante los análisis con los programas SIFT y PolyPhen-2, que predicen el posible efecto de una mutación en la función de la proteína, tomando como criterio un resultado con efecto potencialmente dañino, se detectaron en total 76 pacientes con una variante de significado clínico incierto (VUS), de los cuales se identificaron 53 genes en total (Figura 19), los genes *BRIP1*, *FANCA*, *PTCH1*, *TSC2* cada uno con el 3.9%. Posteriormente, los genes *AIP*, *ATM*, *ATR*, *BARD1*, *CHEK2*, *ERCC6*, *FANCI*, *FANCM*, *LYST*, *MSH2*, *PALLD*, *POLE*, *RAD51C*, *RNASEL*, *SDHA* con un 2.6% y finalmente los genes de menor frecuencia *ALK*, *ANTXR2*, *APC*, *ASCC1*, *BLM*, *CD96*, *CYP21A2*, *DIS3L2*, *ERCC3*, *EXT2*, *FANCD2*, *FANCE*, *GATA2*, *GLI3*, *GLMN*, *KDR*, *KIF1B*, *MET*, *MLH1*, *MSR1*, *MTAP*, *NF1*, *NF2*, *NTRK1*, *PDFGRA*, *PIK3CA*, *PTCH2*, *RAD50*, *RHBDF2*, *RUNX1*, *SDHB*, *SDHC*, *SMARCA4* y *TMC6* con un 1.3%.

Para evaluar si las alteraciones genéticas de cambio de sentido afectan sitios de fosforilación, se analizaron *in silico* las variantes VUS con el programa ReKINect (113). Se detectó que en el gen *AIP* la variante V49M afecta el sitio de fosforilación (117,118) . Otra variante fue detectada en el gen *APC*, con la variante S2535G, esta se encuentra en el dominio APC_basic y sugiere una destrucción del sitio de fosforilación (Figura 20).

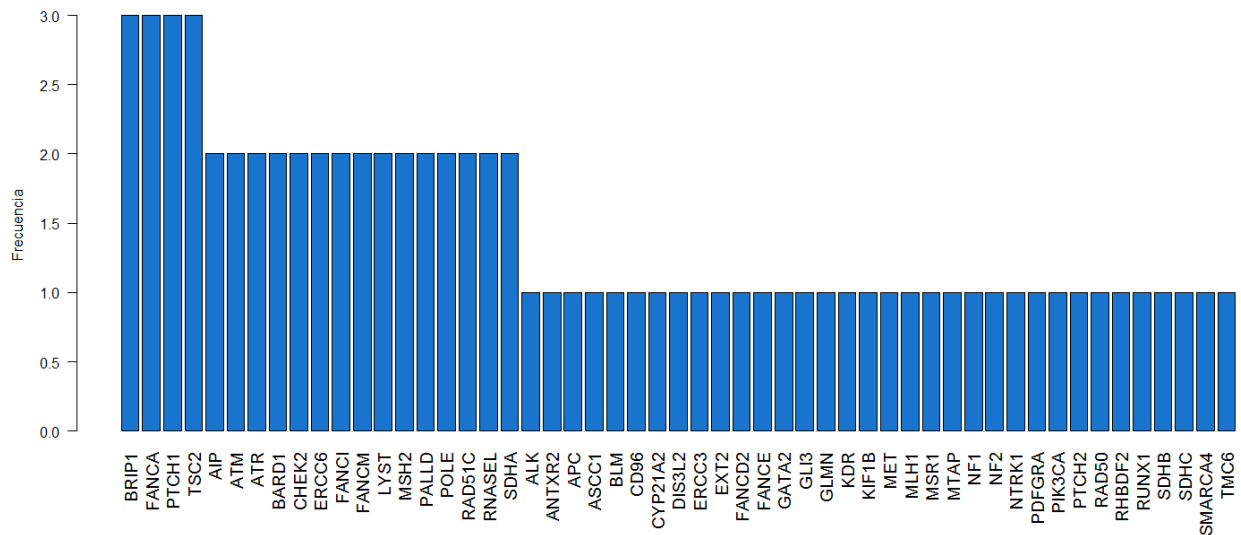


Figura 19. VUS detectadas en los 331 pacientes. Se muestra la frecuencia obtenida en cada gen.

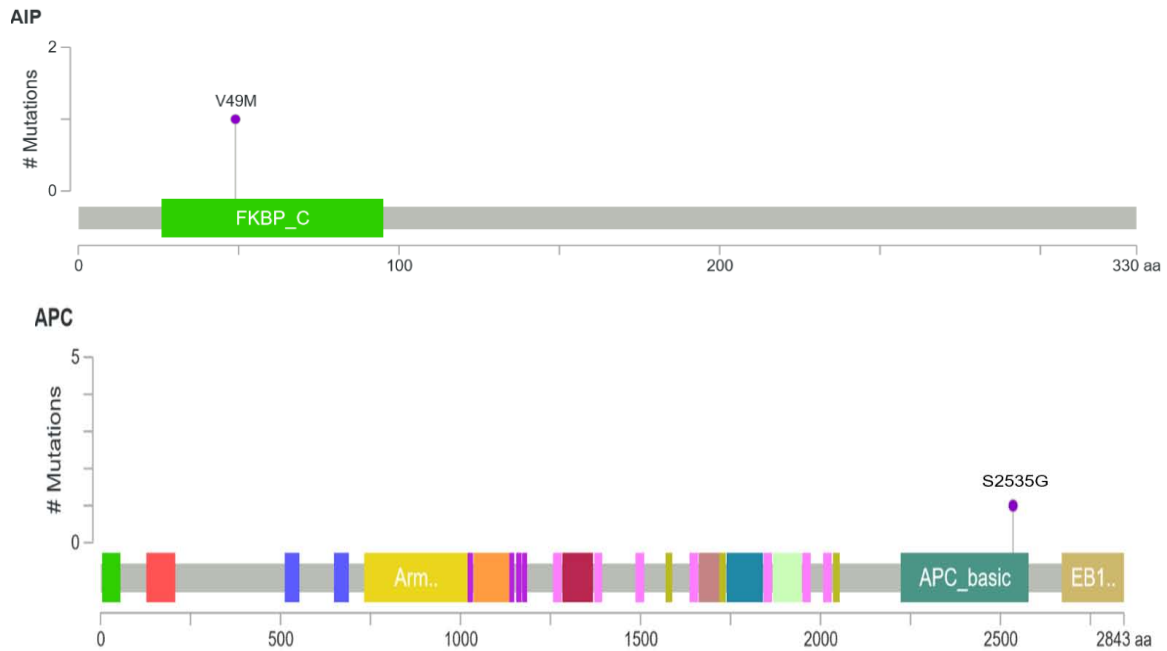


Figura 20. Representación gráfica de las proteínas AIP y APC, y el sitio donde se identifica la VUS. Los dominios funcionales se indican en forma de cajas. Diagramas obtenidos de cBioportal (www.cbioportal.org). Los cambios de aminoácidos se indican con un círculo encima de su posición en la proteína.

8.4 Detección de mutación fundadora

Se realizó el análisis *in silico* mediante la librería de CNVKit en Python, este algoritmo detectó 4 pacientes con posibles cambios de profundidad en la región de los exones 9-12 en *BRCA1* (Figura 21), lo que indica una posible delección en esta región. Para confirmarlas se diseñaron primers específicos para amplificar estas regiones (ver Métodos) y todos los pacientes fueron analizados. De los 331 pacientes, 5 presentaron la delección de los exones 9-12 en *BRCA1* (Figura 22).

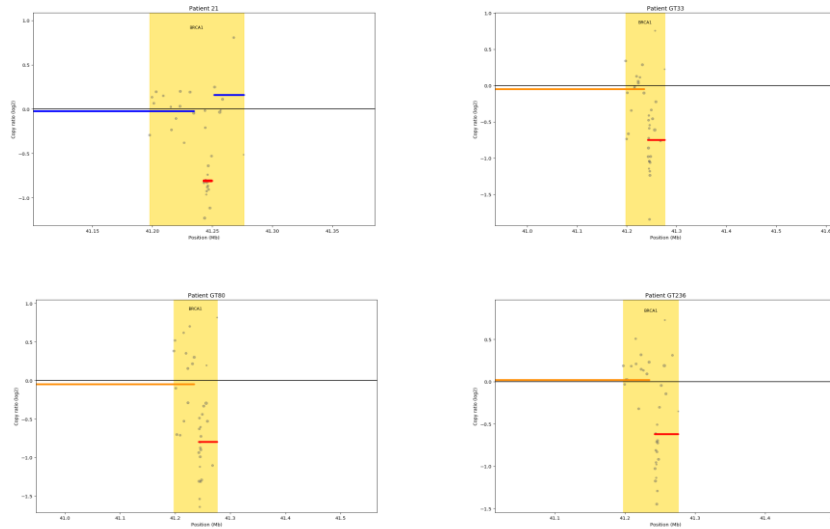


Figura 21. Análisis *in silico* de CNV. En sombreado amarillo se muestra la región codificante de *BRCA1*, la línea de color representa las lecturas normalizadas.

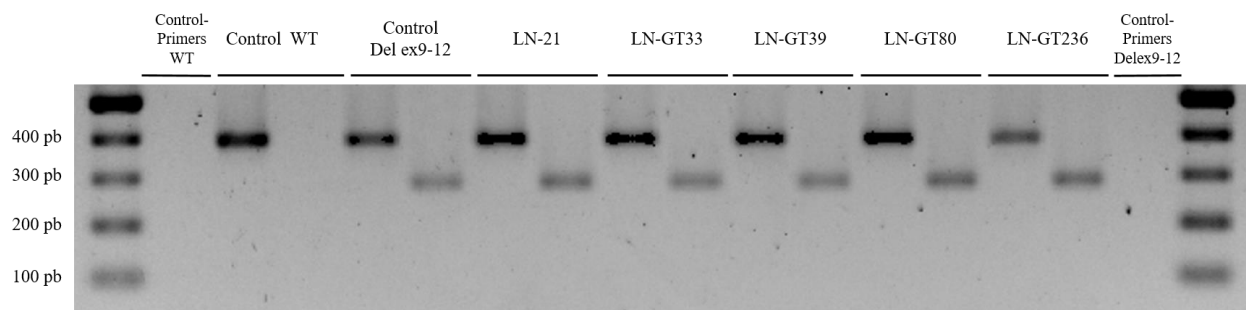


Figura 22. Mutación fundadora en *BRCA1*. Gel de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio.

9. Discusión

En este proyecto se analizaron 143 genes de predisposición al cáncer por medio de secuenciación masiva en paralelo en 3331 pacientes con sospecha o antecedentes heredo-familiares de SHCMO, con el objetivo de detectar nuevos alelos patogénicos que posiblemente contribuyan al desarrollo de esta enfermedad. Una de las fortalezas de este trabajo fue la inclusión de un panel ampliado de genes que no se había analizado previamente en población mexicana. Con este diseño experimental y el enfoque multicéntrico de este proyecto se buscó generar evidencia de la prevalencia de alelos patogénicos en pacientes con sospecha de SHCMO para contribuir a la epidemiología molecular de esta enfermedad en nuestro país. Se detectó en el grupo de pacientes con cáncer un total de 47 (16.6%) pacientes con variantes patogénicas, 72 (24%) con VUS y 181 (60%) pacientes con resultado negativo. El grupo con pacientes sin cáncer tuvo variantes patogénicas en 35.4% (11/31) de los pacientes, el 12.9% (4/31) de los pacientes tuvo variantes VUS y el 51.6% (16/31) fueron negativos. Un punto relevante a destacar de este grupo de pacientes sin cáncer y la razón por la cual la proporción de detección es elevada, se debe a que 5 de estos pacientes están relacionados consanguíneamente. Los familiares presentan la misma variante patogénica en *BRCA2* (R1704fs). Su antecedente heredofamiliar consiste en 2 familiares de primer grado y un familiar de segundo grado con cáncer de mama y con alteraciones genéticas en *BRCA1/2*.

Los genes con mayor proporción de variantes patogénicas fueron *BRCA1/2* con el 42.6%. Se ha descrito en los análisis de gran escala que la proporción esperada de variantes patogénicas en una población con SHCMO en los genes de *BRCA1/2* es de ~25%(30), siendo estos los genes que confieren un mayor riesgo (57-65%) de desarrollar cáncer de mama u ovario (31,119). *BRCA1/2* son genes supresores de tumores y principalmente participan en las vías de señalización que involucran la estabilidad genómica, especialmente en la reparación del ADN por recombinación homóloga(25).

Uno de los hallazgos más relevantes de este proyecto fue la detección de la mutación fundadora mexicana en *BRCA1* en el 33% (5/15) de los pacientes con alteraciones en este gen. Esta delección abarca del exón 9 al 12. Uno de los exones de *BRCA1* con mayor relevancia, por alta frecuencia de mutación, es el exón 11, que cubre más del 50% de la secuencia del gen y codifica dos secuencias de localización nuclear (NLS) y sitios de unión para varias proteínas incluyendo la proteína de retinoblastoma (RB), cMyc, Rad50 y Rad51(62). Esta región regula las interacciones con PALB2, así como una porción de un dominio que contiene serinas (SCD) que son fosforiladas

por ATM en la vía de recombinación homóloga(25). A pesar de que los exones 11-13 contienen un gran porcentaje de las mutaciones clínicamente relevantes, se sabe muy poco sobre la estructura o función de esta región en comparación con los dominios RING o BRCT(63). El gran número de mutaciones que ocurren en esta región, sugiere que esta región es importante para la función supresora de tumores de *BRCA1*(28). Por sus implicaciones funcionales y su alta frecuencia de mutación, este trabajo demuestra que se debe realizar el análisis de esta región en todos los pacientes mexicanos que tengan sospecha de SHCMO. Estos análisis no se deben basar en la secuenciación masiva ni en ensayos bioinformáticos, ya que este cambio genómico es muy grande y no es detectable por los enfoques estándar de secuenciación masiva y los análisis bioinformáticos no están validados y tienen sensibilidades variables(105). Por ejemplo, en este estudio los análisis bioinformáticos detectaron a 4 de 5 pacientes con la deleción, por lo que la PCR es un método de detección más adecuado por ser más sensible. La alta frecuencia de esta mutación en nuestra población representa un problema de salud pública relevante y los pacientes mexicanos de alto riesgo deben ser examinados para detectar su presencia y poder obtener el asesoramiento genético correspondiente.

Recientemente la secuenciación de exomas, la región codificante completa del genoma, ha permitido detectar que existen variantes en distintos genes que producen el mismo fenotipo patológico observado en el SHCMO, a esto se le conoce como heterogeneidad de *locus* y en el SHCMO se han detectado cerca de 25 genes que posiblemente se asocian a este síndrome, y se espera que conforme los análisis genéticos se incrementen se pueda expandir esta lista de genes, y a su vez determinar el riesgo que predisponen(120). En este estudio se detectaron tres genes en donde ya se ha establecido que predisponen a un riesgo moderado de desarrollar cáncer de mama, uno de ellos es *NBN* con una proporción del 2.1% (1/47), participa en el complejo MRN el cual funciona activando a la cinasa serina/treonina ataxia telangiectasia mutada (*ATM*) (121–123) perteneciente a la vía de señalización que activa punto de control cuando existe daño al ADN; *ATM* es otro de los genes de riesgo moderado que presentó alteraciones con una proporción del 4.2% (2/47). Los productos proteicos de ambos genes son relevantes en el inicio del proceso de la reparación del daño al ADN por el mecanismo de RH, proceso que mantiene la estabilidad genómica de la célula(121). Se ha observado que *ATM* confiere un riesgo para cáncer de mama del 60% hasta los 80 años, mientras que a *NBN* se le atribuye 3 veces más riesgo de padecer cáncer de

mama (RM: 3.0)(25). Hasta la fecha se desconoce si la mutación de *ATM* y *NBN* causa algún riesgo a cáncer de ovario(25). El tercer gen de riesgo moderado es *CHEK2*, con una proporción de 2.1% (1/47). La proteína codificada por este gen es un regulador del ciclo celular, que actúa en el la misma vía de ATM para la activación del punto de control del ciclo celular y es considerado como un supresor de tumores(124). *CHEK2* contiene un dominio de interacción proteico asociado a la horquilla de replicación que es esencial para la activación en respuesta al daño al ADN y es fosforilado por ATM en respuesta al daño en la doble cadena(125). Cuando se activa, inhibe la fosfatasa CDC25C, impidiendo la entrada a la fase de mitosis(126). También se ha demostrado que *CHEK2* estabiliza a la proteína supresora de tumores p53, dando lugar a la interrupción del ciclo celular en G1¹³⁷. Además, esta proteína interactúa con BRCA1, permitiendo que se restaure la supervivencia después del daño al ADN(127). Las mutaciones en este gen se han relacionado con el síndrome de Li-Fraumeni, un fenotipo de cáncer familiar altamente penetrante asociado generalmente con mutaciones heredadas en TP53(128). Además, se cree que las mutaciones en este gen confieren una predisposición a sarcomas, cáncer de mama y tumores cerebrales(129). El riesgo que confiere para cáncer de mama es de 37% para la edad de 70 años y se desconoce el riesgo para el desarrollo de cáncer de ovario(25).

La mayoría de los genes que presentaron mutaciones patogénicas son supresores de tumores involucrados en el mantenimiento de la estabilidad genómica que no han sido estudiados suficientemente(25).

En este estudio, se encontraron variantes patogénicas en 17 genes no-BRCA que están involucrados en distintas vías relacionadas a la estabilidad genómica (*ATR, LIG4, POLH, ERCC3, WRN, FANCB, FANCC, FANCF, FANCI, FANCL, FANCM, RAD51C/FANCR, RECQL4, MLH1, MSH6, TERT, TSC2*), las cuales incluyen los mecanismos de reparación del ADN por RH, por apareamientos de bases erróneos, por unión de extremos no homólogos y por escisión de bases(25). Estos genes son considerados candidatos a la predisposición del cáncer de mama y ovario, debido a las vías de señalización en las que están involucrados y a las frecuencias con que se han detectado en diversos análisis poblacionales (25,87). Estos estudios sugieren que existe una asociación entre las mutaciones en estos genes y el desarrollo de cáncer de mama, aunque debido a la baja frecuencia de estos alelos en las poblaciones estudiadas el riesgo que confieren todavía es desconocido. En este sentido, este trabajo aporta evidencia de que los portadores de variantes patogénicas en estos genes mutados en baja frecuencia están presentes en los pacientes que reúnen

los criterios de inclusión de la NCCN y que posiblemente tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama y otros tipos de tumores, debido a que los pacientes que se analizaron tienen familiares consanguíneos afectados con distintos tipos de cáncer.

Se detectaron las alteraciones patogénicas en los genes *MSR1*, *PDE11A*, *CD96* y *LIG4*, los cuales no han sido reportados previamente en pacientes con cáncer de mama y ovario, interesantemente todos, con excepción de *LIG4*, no están involucrados en el mantenimiento de la estabilidad genómica. La variante R293X en *MSR1*, fue detectada en dos pacientes con cáncer de mama no relacionados consanguíneamente. Este gen codifica para un receptor de macrófagos (macrophage scavenger receptor 1) que participa en la mediación de la unión, internalización y procesamiento de macromoléculas cargadas negativamente(130). Su ubicación citogenética es 8p22, consiste en 11 exones y los transcritos generados son productos de corte y empalme alternativo(130). Una delección en la región 8p23-p22 de *MSR1*, ha demostrado tener una asociación al desarrollo de cáncer de próstata hereditario con un patrón de herencia autosómico dominante(131). Los otros fenotipos patológicos descritos que se asocian a alteraciones genéticas hereditarias en *MSR1*, son el esófago de Barrett, una enfermedad inflamatoria, y el adenocarcinoma de esófago. En estudios realizados en población europea se ha determinado que existe una asociación entre la inflamación, el aumento en el ciclo celular, el esófago de Barret y adenocarcinoma de esofago(132). Actualmente, no existe información de la asociación de variantes en *MSR1* y el cáncer de mama. Para definir la penetrancia de estas variantes es necesario realizar estudios de co-segregación en las dos familias que presentaron la mutación R293X en *MSR1*.

En *PDE11A*, otro gen no asociado al cáncer de mama, se detectaron 3 pacientes con distintas variantes; dos de ellas en el exón 2 que truncan a la proteína (R329X, R307X) y una delección en el exón 1 que corre el marco de lectura (G57fs). *PDE11A* es una fosfodiesterasa que hidroliza a los segundos mensajeros cAMP y cGMP, su localización citogenética es 2q31.2 y está asociada a la enfermedad adenocortical primaria nodular pigmentada con un patrón de herencia autosómica dominante (R307X). No se tiene reporte de la variante R329X en OMIM, aunque en la base de datos EXAC, que cuenta con 60,706 exomas secuenciados, esta reportada con una frecuencia de 0.00035 (4/11554) en la población hispana, indicando que es una variante rara. La variante G57fs está reportada en OMIM como una variante de significado clínico incierto para la enfermedad adenocortical primaria nodular pigmentada y se tiene una frecuencia alta en población de Asia del sur. Se han detectado variantes en este gen que están asociadas al cáncer familiar testicular de

célula germinal, todas siendo variantes que inactivan a la proteína(133). No se ha reportado algún caso que esté relacionado al cáncer de mama.

Otro de los genes no asociados al cáncer de mama que presentó una mutación patogénica en un sitio de corte y empalme es *CD96*. Este gen participa en la activación de células T, su localización citogenética es 3q13.1-q13.2 y está asociado al Síndrome C, con un patrón de herencia autosómico recesivo. Las variantes asociadas a este síndrome, interfieren con el crecimiento y la adhesión celular (134). No se tiene reporte de alguna variante en sitio de corte y empalme en OMIM, aunque en las base de datos EXAC y de 1000G esta reportada con una frecuencia inferior al 0.001 en diferentes poblaciones, lo que indica que es una variante rara y con posible fenotipo patológico.

En el gen *LIG4* se detectaron 2 variantes (S205fs, R505fs) en el exón 2 que corren el marco de lectura abierto. Este gen codifica para una ligasa de ADN en el *locus* 13q33.3 y se asocia al síndrome de *LIG4* con un patrón de herencia autosómico recesivo, caracterizado por microcefalia, facies anormales, sensibilidad a la radiación ionizante e inmunodeficiencias. El producto del gen *LIG4* es parte del mecanismo de unión de extremos no homólogos requerido para la reparación de las rupturas de doble cadena del ADN, y es necesario para evitar la mutagénesis y apoptosis generada por las rupturas de doble cadena(135). Aunque no se ha reportado hasta el momento, existe la posibilidad de que debido al papel bioquímico que tiene *LIG4* en la reparación del ADN, este gen pueda tener alguna repercusión en el desarrollo de cáncer de mama y ovario.

Existen genes, que no presentaron alteraciones en este estudio, que aparentemente no están directamente relacionados en vías de señalización asociadas a cáncer de mama y ovario pero cuya mutación ya se ha descrito como determinante genética al desarrollo del SHCMO. Un ejemplo es *CDH1*, la cual codifica para caderina-E que es una glicoproteína transmembranal involucrada en la adhesión celular, Mutaciones de *CDH1* en la línea germinal están asociadas al cáncer gástrico difuso hereditario (OMIM137215), y al desarrollo tumores secundarios de mama lobular asociadas al cáncer gástrico difuso hereditario (136). En el SHCMO se ha calculado que mutaciones en este gen confieren un riesgo de 42% para la edad de 80 años(25). Otro caso es *NF1*, el cual está involucrado en regular la vía de señalización de RAS y que confiere hasta 6.5 veces más riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres de 30 a 39 años(137). Un tercer ejemplo es *PTEN*, una fosfatasa que regula la vía PI3K–AKT–mTOR, y que aporta un 85% de riesgo de padecer cáncer de mama para los 70 años. Por último, el gen *STK11* es una cinasa de serinas y treoninas, que regula la vía AMPK, involucrada en el metabolismo celular de crecimiento y biosíntesis de

organelos (86). Mutaciones en este gen incrementan el riesgo de padecer cáncer de mama hasta en 32%, para la edad de 60 años y de cáncer de ovario un 13% para los 60 años(25). El producto del gen *STK11* ha sido recientemente asociado a la vía de reparación por RH, debido al incremento de rupturas de doble cadena cuando esta ruta está inhibida en líneas celulares(138). Estos genes son un claro ejemplo de la posibilidad que existe en detectar nuevos candidatos que no estén relacionados a vías del mantenimiento de la estabilidad genómica para el desarrollo del SHCMO. Es por lo anterior que los genes no asociados previamente al cáncer de mama que presentaron variantes patogénicas en esta investigación no pueden ser descartados en su totalidad. Debido a la falta de más evidencia de su mutación en familias con antecedentes de cáncer, y a que aún no es claro el mecanismo por el cual algunos de estos genes puedan estar involucrados en el desarrollo de SHCMO, es necesario realizar análisis de ligamiento en los familiares y en más pacientes para determinar si existe alguna relación causal con la enfermedad.

En la mayoría de los genes asociados a SHCMO existe evidencia del riesgo que confieren las variantes que truncan a la proteína, asumiendo que por consiguiente pierden su función (116). Para las variantes con significado clínico incierto (VUS), las cuales implican cambios de aminoácido, se analizó si estas variantes afectan directamente los sitios de fosforilación mediante el algoritmo *in silico* ReKINect. Dos variantes resultaron afectar el sitio de fosforilación: una en *AIP* y otra en *APC*. Estos genes han sido reportados como posibles candidatos a generar susceptibilidad al cáncer (87). La variante en *AIP* (V49M) se encuentra cerca del sitio de fosforilación, en el dominio FKBP_C, que tiene actividad de protilisomerasa. En un estudio previo se realizaron ensayos *in vitro* de variantes en este gen y se detectó que la variante alélica V49M de la proteína de *AIP*, detectada en este trabajo, pierde significativamente su función de activación transcripcional de genes del metabolismo de xenobióticos y tienen menor estabilidad(139). Se han encontrado mutaciones en la región N- terminal de *AIP* en casos de familias con adenomas pituitarios, sin embargo el impacto de estas mutaciones sigue siendo controversial(139). Este estudio aporta evidencia de la posible implicación de mutaciones en *AIP* en el SHCMO.

La variante en *APC* (S2535G), fue la única que se detectó con un efecto destructivo del sitio de fosforilación, ya que el aminoácido fosforilado S se cambió por uno no fosforilable G. Dicho sitio está presente en un dominio que contiene una proporción alta de aminoácidos con carga positiva y que interactúa con los microtúbulos. No se encontró evidencia de ensayos *in vitro* que sustenten

el efecto de esta variante en la función de la proteína, por lo que es necesario hacer estudios funcionales para determinar su potencial efecto patogénico.

Es un reto determinar si estas variantes con significado clínico incierto tienen algún impacto en la función de la proteína, la detección de éstas puede variar dependiendo los criterios que se tomen en cuenta para clasificarlas. Se ha estimado que en el 28% de las familias con una variante patogénica en genes de predisposición al cáncer de mama, tiene al menos un familiar con una VUS (87).

De acuerdo a nuestra hipótesis, basada en la literatura, se esperaba encontrar en al menos 25% de los pacientes una mutación patogénica en uno de los 143 genes analizados. La frecuencia de mutaciones fue de 13% (58/331), lo cual sugiere que existen otros genes o *loci* (no codificantes) relacionados al desarrollo de la enfermedad, los cuales aún no han sido identificados. En conjunto, este trabajo muestra que, a través del análisis de paneles de genes ampliados, se pueden detectar alelos con alteraciones potencialmente causales del SHCMO en genes distintos a *BRCA1/2*, así como variantes genéticas de cambio de aminoácido que son candidatas a ensayos funcionales y estudios poblacionales para determinar su asociación al SHCMO.

10. Conclusiones

En este trabajo identificamos mutaciones patogénicas en 26 genes relacionados al desarrollo del cáncer hereditario en pacientes con historial heredo-familiar de cáncer, lo cual demuestra que *BRCA1* y *BRCA2* no son los únicos genes que participan en la epidemiología molecular del SHCMO en pacientes mexicanos. La alta frecuencia de la mutación fundadora mexicana en *BRCA1* plantea la posibilidad de su detección en una prueba rápida, sensible y económica.

Existe una mayor contribución de alelos patogénicos en otros genes con susceptibilidad al cáncer (55.1%) que en *BRCA1/2* (48.3%), que posiblemente contribuyen al riesgo de padecer este síndrome en nuestra población, el amplio espectro de variantes patogénicas presente en estos pacientes resalta la necesidad de utilizar tecnologías de detección de alto desempeño como la secuenciación masiva con paneles genéticos extendidos para la identificación de mutaciones en números grandes de pacientes, con la posibilidad de un mejor diagnóstico molecular y evaluación de riesgo personalizada en los portadores.

Las VUS representaron un 22.9% en total y es de gran relevancia definir la implicación de estas variantes presentes en nuestra población en el desarrollo de la enfermedad. El hecho de que en este estudio el 62.30% de pacientes no presentó ninguna mutación, sugiere que existen más alteraciones genéticas en el SHCMO que deben ser descubiertas, para el beneficio de los pacientes.

A nivel clínico, la implementación de estos análisis con paneles extendidos de genes que predisponen al cáncer puede apoyar la toma de decisiones en la evaluación de riesgo para el SHCMO y contribuir a la terapia personalizada de familias que padecen este síndrome, especialmente en los portadores asintomáticos de mutaciones, como medida de prevención primaria y secundaria (detección oportuna de la enfermedad).

Por último, Los resultados de este proyecto permiten plantear perspectivas para continuar investigando el impacto de las alteraciones en un número amplio de genes en el desarrollo del SHCMO en nuestro país.

11. Perspectivas

Este proyecto aporta datos que invitan a continuar investigando el SHCMO desde un enfoque de epidemiología molecular en nuestro país. Una de sus perspectivas principales es el análisis de los familiares consanguíneos que están relacionados a pacientes con variantes patogénicas, con el fin de comenzar a establecer el riesgo que confieren estas mutaciones en nuestra población.

Las variantes con significado clínico incierto detectadas en los pacientes de esta investigación están sujetas a ser analizadas mediante ensayos funcionales que permitan establecer si estas mutaciones tienen algún impacto en la función proteica.

A nivel regional, este trabajo mostró por primera vez en pacientes de una nación de América Latina, que aun analizando una cantidad considerable de genes que predisponen al cáncer, la frecuencia de pacientes que no presentó ninguna variante patogénica sigue siendo alta. En estos pacientes existe la oportunidad de continuar estos análisis moleculares para detectar re-arreglos genómicos grandes con métodos como MLPA e hibridación genómica comparativa (CGH), ya que existe una proporción considerable de mutaciones en genes como *BRCA1/2* y los genes de la familia *FANC* que puede presentar este tipo de alteraciones estructurales no son detectables por secuenciación masiva. Aunque también existe la posibilidad de que las mutaciones no se encuentren en regiones codificantes y se deba extender el análisis a regiones promotoras y regiones no traducibles de los genes, con métodos genómicos como la secuenciación del exoma.

Colectivamente este trabajo plantea la necesidad de implementar métodos genómicos de alto rendimiento para contribuir en el conocimiento de la heterogeneidad a nivel de locus que participa en el desarrollo y susceptibilidad del cáncer de mama hereditario. Lo anterior se traducirá en mejores estrategias de diagnóstico molecular y seguimiento clínico de los pacientes de alto riesgo.

12. Bibliografía

1. Ruddon RW. Characteristics of human cancer. In: Cancer Biology. Fourth Edition. New York: Oxford University Press; 2007. p. 4.
2. GLOBOCAN [Internet]. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. 2013 [cited 2014 Dec 3]. Available from: http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=126484&Text-p=Mexico&selection_cancer=3152&Text-c=Breast&pYear=3&type=1&window=1&submit=%C2%A0Execute%C2%A0
3. GLOBOCAN [Internet]. [cited 2014 Dec 3]. Available from: http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=126484&Text-p=Mexico&selection_cancer=3152&Text-c=Breast&pYear=18&type=0&window=1&submit=%C2%A0Execute%C2%A0
4. Cárdenas Sánchez J, Bargalló Rocha JE, Erazo Valle A, Poitevin Chacón A, Valero Castillo V, Pérez Sánchez V. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario [Internet]. Elsevier; 2015. Available from: <http://consensocancermamario.com>
5. GLOBOCAN [Internet]. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide: Prediction 2030 Breast Cancer incidence in Mexico. 2013 [cited 2014 Dec 3]. Available from: http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=126484&Text-p=Mexico&selection_cancer=3152&Text-c=Breast&pYear=18&type=1&window=1&submit=%C2%A0Execute%C2%A0
6. Sauter ER, Daly MB, editors. Breast Cancer Risk Reduction and Early Detection [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2010 [cited 2015 Apr 24]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-87583-5>
7. Laden F, Spiegelman D, Neas L. Geographic variation in breast cancer incidence rates in a cohort of U.S. women. *Natl Cancer Inst.* 1997;89(18):1373–8.
8. Krieger N. Social class and the black/white crossover in the age-specific incidence of breast cancer: a study linking census-derived data to population-based registry records. *Am J Epidemiol.* 1990;131(5):804–14.
9. Nichols H, Trentham-Dietz A, Hampton J. From menarche to menopause: trends among US women born from 1912 to 1969. *Am J Epidemiol.* 2006;164(10):1003–11.
10. Kelsey J, Gammon M, John E. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* 1993;15(1):36–47.
11. Kapil U, Bhadoria AS, Sareen N, Singh P, Dwivedi SN. Reproductive factors and risk of breast cancer: A Review. *Indian J Cancer.* 2014 Oct 1;51(4):571.
12. MacMahon B, Cole P, Brown J. Etiology of human breast cancer: a review. *J Natl Cancer Inst.* 1973 Jan;50(1):21–42.

13. Cole P, MacMahon B. Oestrogen fractions during early reproductive life in the aetiology of breast cancer. *Lancet Lond Engl*. 1969 Mar 22;1(7595):604–6.
14. Kasum M, Beketić-Orešković L, Orešković S. Subsequent pregnancy and prognosis in breast cancer survivors. *Acta Clin Croat*. 2014;53(3):334–41.
15. Russo J, Tay LK, Russo IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 1982;2(1):5–73.
16. Hanf V, Hanf D. Reproduction and breast cancer risk. *Breast Care Basel Switz*. 2014;9(6):398–405.
17. Ghose A, Kundu R, Toumeh A, Hornbeck C, Mohamed I. A review of obesity, insulin resistance, and the role of exercise in breast cancer patients. *Nutr Cancer*. 67(2):197–202.
18. Au CC, Furness JB, Brown KA. Ghrelin and Breast Cancer: Emerging Roles in Obesity, Estrogen Regulation, and Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 19];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2016.00265/full>
19. Harvie M, Hooper L, Howell AH. Central obesity and breast cancer risk: a systematic review. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2003 Aug;4(3):157–73.
20. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000 Sep 9;321(7261):624–8.
21. Weinberg RA. Chapter 2: The nature of cancer. In: *The biology of cancer*. Second Edition. United States of America: Garland Science; 2014. p. 55.
22. Wang Y, Xu M, Ke Z-J, Luo J. Cellular and molecular mechanisms underlying alcohol-induced aggressiveness of breast cancer. *Pharmacol Res*. 2017 Jan;115:299–308.
23. Shield KD, Soerjomataram I, Rehm J. Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016 Jun;40(6):1166–81.
24. Dumitrescu RG, Shields PG. The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol Fayettev N*. 2005 Apr;35(3):213–25.
25. Nielsen FC, van Overeem Hansen T, Sørensen CS. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer*. 2016 Sep;16(9):599–612.
26. American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG Committee on Practice Bulletins--Gynecology, ACOG Committee on Genetics, Society of Gynecologic Oncologists. ACOG Practice Bulletin No. 103: Hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Obstet Gynecol*. 2009 Apr;113(4):957–66.
27. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):415–21.

28. Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GDV, Boehning D. Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2012 Mar 19 [cited 2017 May 5];1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3380633/>
29. Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Front Biosci Landmark Ed.* 2013;18:1358–72.
30. Kast K, Rhiem K, Wappenschmidt B, Hahnen E, Hauke J, Bluemcke B, et al. Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J Med Genet.* 2016 Jul;53(7):465–71.
31. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. 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.* 2003 May;72(5):1117–30.
32. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1995 Jan;56(1):265–71.
33. Powell SN, Kachnic LA. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene.* 2003;22(37):5784–91.
34. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [Internet]. [cited 2017 Jan 21]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
35. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet Lond Engl.* 1994 Mar 19;343(8899):692–5.
36. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998 Mar;62(3):676–89.
37. Robson M, Gilewski T, Haas B, Levin D, Borgen P, Rajan P, et al. BRCA-associated breast cancer in young women. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1998 May;16(5):1642–9.
38. Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, Chen S. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Dec 5;99(23):1811–4.
39. Shulman LP. Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC): Clinical Features and Counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch Syndrome, Cowden Syndrome, and Li-Fraumeni Syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2010 Mar;37(1):109–33.
40. Metcalfe K, Gershman S, Lynch HT, Ghadirian P, Tung N, Kim-Sing C, et al. Predictors of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer.* 2011 Apr 26;104(9):1384–92.
41. Mavaddat N, Peock S, Frost D, Ellis S, Platte R, Fineberg E, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Jun 5;105(11):812–22.

42. Lee E, McKean-Cowdin R, Ma H, Spicer DV, Van Den Berg D, Bernstein L, et al. Characteristics of triple-negative breast cancer in patients with a BRCA1 mutation: results from a population-based study of young women. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Nov 20;29(33):4373–80.
43. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2010 Nov 11;363(20):1938–48.
44. Evans DG, Howell A, Ward D, Lalloo F, Jones JL, Eccles DM. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in triple negative breast cancer. *J Med Genet*. 2011 Aug;48(8):520–2.
45. Meyer P, Landgraf K, Högel B, Eiermann W, Ataseven B. BRCA2 mutations and triple-negative breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(5):e38361.
46. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015 Feb 1;33(4):304–11.
47. BRCA1 BRCA1, DNA repair associated [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2017 Jun 7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672>
48. Futaki M, Liu JM. Chromosomal breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex. *Trends Mol Med*. 2001 Dec;7(12):560–5.
49. Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*. 2000 Apr 15;14(8):927–39.
50. BASC complex - Oxford Reference [Internet]. [cited 2017 Aug 2]. Available from: <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803095449710>
51. Online Research Resources Developed at NHGRI [Internet]. Online Research Resources Developed at NHGRI. [cited 2017 Jun 9]. Available from: <https://research.nhgri.nih.gov/>
52. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2004 Sep;4(9):665–76.
53. Meza JE, Brzovic PS, King MC, Klevit RE. Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. *J Biol Chem*. 1999 Feb 26;274(9):5659–65.
54. Lipkowitz S, Weissman AM. RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2011 Aug 24;11(9):629–43.
55. Bienstock RJ, Darden T, Wiseman R, Pedersen L, Barrett JC. Molecular modeling of the amino-terminal zinc ring domain of BRCA1. *Cancer Res*. 1996 Jun 1;56(11):2539–45.
56. Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):11364–9.

57. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet.* 1996 Dec;14(4):430–40.
58. Wu W, Koike A, Takeshita T, Ohta T. The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Div.* 2008 Jan 7;3:1.
59. Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, et al. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem.* 2001 May 4;276(18):14537–40.
60. Greenberg RA. Cancer. BRCA1, everything but the RING? *Science.* 2011 Oct 28;334(6055):459–60.
61. Chen CF, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem.* 1996 Dec 20;271(51):32863–8.
62. Deng CX, Brodie SG. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* 2000 Aug;22(8):728–37.
63. Irwin JJ. Community benchmarks for virtual screening. *J Comput Aided Mol Des.* 2008 Apr;22(3–4):193–9.
64. MYC MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2017 Aug 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4609>
65. Sy SM-H, Huen MSY, Zhu Y, Chen J. PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization. *J Biol Chem.* 2009 Jul 3;284(27):18302–10.
66. Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Jun 10]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Song%2C%2%A0H.+et%2C%2%A0al.+Contribution+of+germline+mutations+in+the+RAD51B%2C+RAD51C%2C+and+RAD51D+genes+to+ovarian+cancer+in+the+population.+J.%2C%20Clin.+Oncol.+33%2C++2901%E2%80%932907+\(2015\).](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Song%2C%2%A0H.+et%2C%2%A0al.+Contribution+of+germline+mutations+in+the+RAD51B%2C+RAD51C%2C+and+RAD51D+genes+to+ovarian+cancer+in+the+population.+J.%2C%20Clin.+Oncol.+33%2C++2901%E2%80%932907+(2015).)
67. Loveday C, Turnbull C, Ruark E, Xicola RMM, Ramsay E, Hughes D, et al. Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet.* 2012 Apr 26;44(5):475–476; author reply 476.
68. Leung CCY, Glover JNM. BRCT domains: easy as one, two, three. *Cell Cycle Georget Tex.* 2011 Aug 1;10(15):2461–70.
69. Mohammad DH, Yaffe MB. 14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response. *DNA Repair.* 2009 Sep 2;8(9):1009–17.
70. Yu X, Chini CCS, He M, Mer G, Chen J. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science.* 2003 Oct 24;302(5645):639–42.
71. Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, et al. Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. *Nat Genet.* 1994 Dec;8(4):387–91.

72. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):120–2.
73. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):66–71.
74. Shahid T, Soroka J, Kong EH, Malivert L, McIlwraith MJ, Pape T, et al. Structure and mechanism of action of the BRCA2 breast cancer tumor suppressor. *Nat Struct Mol Biol*. 2014 Nov;21(11):962–8.
75. BRCA2 BRCA2, DNA repair associated [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2017 Jun 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/675>
76. Siaud N, Barbera MA, Egashira A, Lam I, Christ N, Schlacher K, et al. Plasticity of BRCA2 Function in Homologous Recombination: Genetic Interactions of the PALB2 and DNA Binding Domains. *PLOS Genet*. 2011 Dec 15;7(12):e1002409.
77. Tarsounas M, Davies D, West SC. BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene*. 2003 Feb 27;22(8):1115–23.
78. Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, et al. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):287–93.
79. Lee SA, Roques C, Magwood AC, Masson J-Y, Baker MD. Recovery of deficient homologous recombination in Brca2-depleted mouse cells by wild-type Rad51 expression. *DNA Repair*. 2009 Feb 1;8(2):170–81.
80. Carreira A, Hilario J, Amitani I, Baskin RJ, Shivji MKK, Venkitaraman AR, et al. The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51. *Cell*. 2009 Mar 20;136(6):1032–43.
81. Thorslund T, Esashi F, West SC. Interactions between human BRCA2 protein and the meiosis-specific recombinase DMC1. *EMBO J*. 2007 Jun 20;26(12):2915–22.
82. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thomä NH, et al. BRCA2 Function in DNA Binding and Recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA Structure. *Science*. 2002 Sep 13;297(5588):1837–48.
83. Foulkes WD. Inherited Susceptibility to Common Cancers. *N Engl J Med*. 2008 Nov 13;359(20):2143–53.
84. Smith P, McGuffog L, Easton DF, Mann GJ, Pupo GM, Newman B, et al. A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Jul;45(7):646–55.
85. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJ, et al., editors. *GeneReviews*(®) [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2017 May 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>

86. Lim W, Olschwang S, Keller JJ, Westerman AM, Menko FH, Boardman LA, et al. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. *Gastroenterology*. 2004 Jun;126(7):1788–94.
87. Maxwell KN, Hart SN, Vijai J, Schrader KA, Slavin TP, Thomas T, et al. Evaluation of ACMG-Guideline-Based Variant Classification of Cancer Susceptibility and Non-Cancer-Associated Genes in Families Affected by Breast Cancer. *Am J Hum Genet*. 2016 May 5;98(5):801–17.
88. Schroeder C, Faust U, Sturm M, Hackmann K, Grundmann K, Harmuth F, et al. HBOC multi-gene panel testing: comparison of two sequencing centers. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Jul 1;152(1):129–36.
89. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Polley EC, Na J, et al. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol* [Internet]. 2017 Apr 13 [cited 2017 Jun 11]; Available from: <http://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2618073>
90. Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, Danesi R, Arcangeli V, Ravegnani M, et al. Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Apr 3 [cited 2017 Jun 11];5(0). Available from: [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=16791&pubmed-linkout=1](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=16791&pubmed-linkout=1)
91. Cock-Rada AM, Ossa CA, Garcia HI, Gomez LR. A multi-gene panel study in hereditary breast and ovarian cancer in Colombia. *Fam Cancer*. 2017 May 20;1–8.
92. Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R, Vogel Postula KJ, Weissman SM, Yackowski L, et al. Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med*. 2016 Aug;18(8):823–32.
93. Kwong A, Shin VY, Au CH, Law FBF, Ho DN, Ip BK, et al. Detection of Germline Mutation in Hereditary Breast and/or Ovarian Cancers by Next-Generation Sequencing on a Four-Gene Panel. *J Mol Diagn JMD*. 2016 Jul;18(4):580–94.
94. Li J, Meeks H, Feng B-J, Healey S, Thorne H, Makunin I, et al. Targeted massively parallel sequencing of a panel of putative breast cancer susceptibility genes in a large cohort of multiple-case breast and ovarian cancer families. *J Med Genet*. 2016 Jan 1;53(1):34–42.
95. Kraus C, Hoyer J, Vasileiou G, Wunderle M, Lux MP, Fasching PA, et al. Gene panel sequencing in familial breast/ovarian cancer patients identifies multiple novel mutations also in genes others than BRCA1/2. *Int J Cancer*. 2017 Jan 1;140(1):95–102.
96. Mannan AU, Singh J, Lakshmikeshava R, Thota N, Singh S, Sowmya TS, et al. Detection of high frequency of mutations in a breast and/or ovarian cancer cohort: implications of embracing a multi-gene panel in molecular diagnosis in India. *J Hum Genet*. 2016 Jun;61(6):515–22.
97. Lin P-H, Kuo W-H, Huang A-C, Lu Y-S, Lin C-H, Kuo S-H, et al. Multiple gene sequencing for risk assessment in patients with early-onset or familial breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Feb 16;7(7):8310–20.

98. Tung N, Battelli C, Allen B, Kaldate R, Bhatnagar S, Bowles K, et al. Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer*. 2015 Jan 1;121(1):25–33.
99. Lincoln SE, Kobayashi Y, Anderson MJ, Yang S, Desmond AJ, Mills MA, et al. A Systematic Comparison of Traditional and Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Genes in More Than 1000 Patients. *J Mol Diagn*. 2015 Sep 1;17(5):533–44.
100. Desmond A, Kurian AW, Gabree M, Mills MA, Anderson MJ, Kobayashi Y, et al. Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment. *JAMA Oncol*. 2015 Oct 1;1(7):943–51.
101. Hirotsu Y, Nakagomi H, Sakamoto I, Amemiya K, Oyama T, Mochizuki H, et al. Multigene panel analysis identified germline mutations of DNA repair genes in breast and ovarian cancer. *Mol Genet Genomic Med*. 2015 Sep 1;3(5):459–66.
102. Vaca-Paniagua F, Alvarez-Gomez RM, Fragoso-Ontiveros V, Vidal-Millan S, Herrera LA, Cantú D, et al. Full-exon pyrosequencing screening of BRCA germline mutations in Mexican women with inherited breast and ovarian cancer. *PLoS One*. 2012;7(5):e37432.
103. Torres-Mejía G, Royer R, Llacuachaqui M, Akbari MR, Giuliano AR, Martínez-Matsushita L, et al. Recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexican women with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2015 Mar;24(3):498–505.
104. Weitzel JN, Lagos VI, Herzog JS, Judkins T, Hendrickson B, Ho JS, et al. Evidence for common ancestral origin of a recurring BRCA1 genomic rearrangement identified in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2007 Aug;16(8):1615–20.
105. Villarreal-Garza C, Alvarez-Gómez RM, Pérez-Plasencia C, Herrera LA, Herzog J, Castillo D, et al. Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. *Cancer*. 2014 Sep 18;
106. PAVLOPOULOU A, SPANDIDOS DA, MICHALOPOULOS I. Human cancer databases (Review). *Oncol Rep*. 2015 Jan;33(1):3–18.
107. Zhang J, Baran J, Cros A, Guberman JM, Haider S, Hsu J, et al. International Cancer Genome Consortium Data Portal—a one-stop shop for cancer genomics data. *Database J Biol Databases Curation* [Internet]. 2011 Sep 16 [cited 2015 Jan 23];2011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3263593/>
108. Dowhan DH. Purification and Concentration of Nucleic Acids. In: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2008 [cited 2017 Jun 11]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470089941.et0502s06/abstract>
109. Morris R. Spectrophotometry. In: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2008 [cited 2017 Jun 11]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470089941.et0201s06/abstract>

110. Qubit 3.0 Fluorometer | Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cited 2017 Jun 11]. Available from: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-fluorometer.html>
111. bwa.1 [Internet]. [cited 2017 Jun 11]. Available from: <http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml>
112. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010 Sep 1;38(16):e164–e164.
113. Kinome-wide Decoding of Network-Attacking Mutations Rewiring Cancer Signaling [Internet]. [cited 2017 May 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4644236/>
114. Calling copy number gains and losses — CNVkit 0.8.5 documentation [Internet]. [cited 2017 Jun 11]. Available from: <https://cnvkit.readthedocs.io/en/stable/calling.html>
115. Sims D, Sudbery I, Iltis NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet.* 2014 Feb;15(2):121–32.
116. Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian SV, Nathanson KL, et al. Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *N Engl J Med.* 2015 Jun 4;372(23):2243–57.
117. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov.* 2012 May 1;2(5):401–4.
118. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013 Apr 2;6(269):pl1.
119. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007 Apr 10;25(11):1329–33.
120. Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet.* 2008 Jan;40(1):17–22.
121. Lavin MF, Kozlov S, Gatei M, Kijas AW. ATM-Dependent Phosphorylation of All Three Members of the MRN Complex: From Sensor to Adaptor. *Biomolecules.* 2015 Oct 23;5(4):2877–902.
122. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Apr 1;7(4):a016600.
123. Paull TT. Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:711–38.
124. CHEK2 checkpoint kinase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2017 Jun 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11200>
125. Desrichard A, Bidet Y, Uhrhammer N, Bignon Y-J. CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCAfamilies. *Breast Cancer Res.* 2011;13:R119.

126. Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 2001 Apr 12;410(6830):842–7.
127. Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*. 2000 Mar 9;404(6774):201–4.
128. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Jun 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617473?dopt=Abstract>
129. Miller CW, Ikezoe T, Krug U, Hofmann W-K, Tavor S, Vegesna V, et al. Mutations of the CHK2 gene are found in some osteosarcomas, but are rare in breast, lung, and ovarian tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Jan;33(1):17–21.
130. Emi M, Asaoka H, Matsumoto A, Itakura H, Kurihara Y, Wada Y, et al. Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene. *J Biol Chem*. 1993 Jan 25;268(3):2120–5.
131. Maier C, Vesovic Z, Bachmann N, Herkommer K, Braun AK, Surowy HM, et al. Germline mutations of the MSR1 gene in prostate cancer families from Germany. *Hum Mutat*. 2006 Jan;27(1):98–102.
132. Orloff M, Peterson C, He X, Ganapathi S, Heald B, Yang Y, et al. Germline mutations in MSR1, ASCC1, and CTHRC1 in patients with Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *JAMA*. 2011 Jul 27;306(4):410–9.
133. Pathak A, Stewart DR, Faucz FR, Xekouki P, Bass S, Vogt A, et al. Rare inactivating PDE11A variants associated with testicular germ cell tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Dec;22(6):909–17.
134. Kaname T, Yanagi K, Chinen Y, Makita Y, Okamoto N, Maehara H, et al. Mutations in CD96, a Member of the Immunoglobulin Superfamily, Cause a Form of the C (Opitz Trigonoccephaly) Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2007 Oct;81(4):835–41.
135. Altmann T, Gennery AR. DNA ligase IV syndrome; a review. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2016 Oct 7 [cited 2017 May 24];11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5055698/>
136. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, MacLeod PM, Hayashi A, Monaghan KG, et al. Early Gastric Cancer in Young, Asymptomatic Carriers of Germ-Line E-Cadherin Mutations. *N Engl J Med*. 2001 Jun 21;344:1904–9.
137. Seminog OO, Goldacre MJ. Age-specific risk of breast cancer in women with neurofibromatosis type 1. *Br J Cancer*. 2015 Apr 28;112(9):1546–8.
138. Gupta R, Liu AY, Glazer PM, Wajapeyee N. LKB1 preserves genome integrity by stimulating BRCA1 expression. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan 9;43(1):259–71.
139. Formosa R, Vassallo J. Aryl Hydrocarbon Receptor-Interacting Protein (AIP) N-Terminus Gene Mutations Identified in Pituitary Adenoma Patients Alter Protein Stability and Function. *Horm Cancer*. 2017 Jun;8(3):174–84.

