

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
PROGRAMA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA-MÉDICA E INMUNOLOGÍA



**PREVALENCIA DE MUTACIONES
PATÓGENICAS DE LOS GENES
BRCA1 Y *BRCA2* EN PACIENTES CON
CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO**

**PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE CRIBADO
BASADO EN EL ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE
FUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN**

**Memoria de Tesis para optar al Grado de Doctor por la Universidad
de Valencia presentada por Inmaculada de Juan Jiménez**

Dirigida por el Dr. Pascual Bolufer y la Dra. Sarai Palanca,

Valencia, Octubre de 2015

D. PASCUAL BOLUFER GILABERT, Doctor en Medicina y Cirugía, y Jefe de Sección del Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

INFORMA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada:

“PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGENICAS DE LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2* EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO. PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE CRIBADO BASADO EN EL ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE FUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN”

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Farmacia, Dña. Inmaculada de Juan Jiménez.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a quince de Octubre de dos mil quince.

Fdo: Dr. Pascual Bolufer Gilabert

Dña. SARAI PALANCA SUELA, Doctora por la Universidad de Valencia, y facultativo adjunto del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

INFORMA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada:

“PREVALENCIA DE MUTACIONES PATOGÉNICAS DE LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2* EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO. PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE CRIBADO BASADO EN EL ANÁLISIS DE LAS CURVAS DE FUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN”

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Farmacia, Dña. Inmaculada de Juan Jiménez.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a quince de Octubre de dos mil quince.

Fdo: Dra. Sarai Palanca Suela

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento solo tengo palabras de agradecimiento al equipo del Dr. Bolufer por la oportunidad que me brindó, hace ya mucho tiempo, para realizar esta tesis y, llegado este momento, el verla, por fin escrita me parece un sueño.

En primer lugar agradecer al Dr. Pascual Bolufer su acogida en el laboratorio y el haberme formado en este bonito campo que es la Biología Molecular. Muchas gracias Pascual por todos tus consejos, tu paciencia y correcciones, de las cuales tanto he aprendido.

A la Dra. Sarai Palanca, por confiar en mí desde el primer momento y por transmitirme toda tu ilusión y motivación por la investigación. Muchas gracias por tu apoyo, has sido mi referencia dentro del laboratorio, eres una excelente profesional y amiga.

A la Dra. Eva Barragán, por su gran profesionalidad y amistad. Estar estos años a tu lado, codo con codo, ha sido un gran honor y tranquilidad. Muchas gracias Eva por todos tus consejos profesionales y personales.

A Marta y a Rosa, compañeras de escritura y de sufrimientos. Creo que sois un pilar fundamental en nuestro laboratorio. ¡No cambiéis!

A todos los compañeros y amigos del laboratorio de Biología Molecular, en especial a Virginia por su gran trabajo en la línea de cáncer de mama. A Gema, Nuria, Amparo, Andrés y, por supuesto los que se han ido marchando pero fueron un apoyo muy importante

durante mis días de bancada como son Jorge, Enrique, Esperanza, María y Teresa. ¡Gracias a todos por transmitirme vuestros conocimientos!

A todos los adjuntos y residentes del servicio de Análisis Clínicos del HUIP La Fe por acogerme como a una más dentro de este servicio; y como no, a todos los adjuntos y compañeros residentes del servicio de Análisis Clínicos del H. U. Dr. Peset donde realicé mi residencia y me formé como facultativo; en especial a *“las peseteras”*: Nuria, Rosa, Mireya, Sonia, María y Katty, con quien he compartido ratos estupendos.

A la Dra. Victoria Castell y al grupo de Investigación Clínica y Traslacional en Cáncer por acogerme en él y ayudarme en todo lo que ha estado en su mano. Gracias Victoria por apoyarme siempre que lo he necesitado.

A la Dra. Ana Santaballa y al Dr. Vicente Guillem por su buena disposición, interés y GRAN colaboración en el envío de muestras para este proyecto. Sin vuestra ayuda y, por supuesto la colaboración de todas las pacientes, este trabajo no hubiese sido posible. Y como no, una mención especial a la Dra. Blanca Munárriz.

A todos los miembros del Programa de Consejo Genético en Cáncer Hereditario de la Comunidad Valenciana: facultativos, enfermeras y administrativas por vuestra gran labor asistencial. En especial, a la Dra. Salas por confiar en mí y a Beatriz por estar siempre dispuesta a participar en cualquier proyecto. ¡Gracias por tu aportación a esta tesis!

A TODA MI FAMILIA... A mis padres por su cariño, por estar a mi lado siempre que los necesito y por esforzarse en nuestra educación inculcándonos valores como son la responsabilidad, dedicación y esfuerzo. A mis hermanas, por su apoyo, comprensión y amistad, a mis abuelos, tíos y primos... Gracias a todos.

Y por último, a Rafa por estar siempre ahí, por su apoyo en todos los momentos difíciles, por animarme a seguir cuando me flaqueaban las fuerzas y, como no, por TODO SU TIEMPO CEDIDO A ESTA TESIS sin el cual no hubiera sido posible su redacción.

A todos, muchísimas gracias.

La presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las ayudas prestadas por las siguientes instituciones:

- El **Instituto de Investigación Sanitaria del HUIP La Fe**, por concederme un contrato de Investigación de post-residente (2007-2010) para el desarrollo del proyecto de investigación cuyos resultados se recogen en esta tesis.
- El **Instituto de Salud Carlos III**, por haber financiado el proyecto de investigación PI060505 (2006-2009): “Estudio de las mutaciones patogénicas de la población española en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en el cáncer de mama y ovario esporádico. Desarrollo de métodos moleculares de alto rendimiento de electroforesis capilar y micro-array para la detección de esas mutaciones” que ha sido la base para el desarrollo de esta tesis.
- La **Consellería de Sanitat** (Generalitat Valenciana), por la financiación del proyecto de investigación AP-042/07 (2007-2008): “Detección de las mutaciones prevalentes en la Comunidad Valenciana en los genes *BRCA1* y *BRCA2* mediante el método de curvas de fusión de alta resolución” relacionado con la tesis que se presenta.

**"El éxito consiste en obtener lo que se desea.
La felicidad en disfrutar lo que se obtiene"**
Ralph Waldo Emerson

Para Rafa por su apoyo incondicional y paciencia

Para Álvaro y Carlos con todo mi cariño

ÍNDICE

ÍNDICE	I
RELACIÓN DE ABREVIATURAS	VII
INTRODUCCIÓN	1
1. EL CÁNCER DE MAMA	3
1.1. Relevancia sanitaria del cáncer de mama	3
1.2. Etiopatogénesis del cáncer de mama	4
1.3. Clasificación del cáncer de mama	5
2. EL CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO Y HEREDITARIO	8
2.1. Mecanismos de carcinogénesis en el cáncer de mama esporádico y hereditario	9
2.2. Alelos implicados en el riesgo de desarrollar cáncer de mama hereditario	12
2.3. Diferencias clínico-patológicas y de perfil genético entre el cáncer de mama esporádico y hereditario	15
3. LOS GENES <i>BRCA1</i> Y <i>BRCA2</i>	16
3.1. Funciones de los genes <i>BRCA1/2</i>	18
3.2. Variaciones genéticas detectadas en los genes <i>BRCA1/2</i> y sus implicaciones biológicas.....	19
3.3. Métodos de estudio de las mutaciones en <i>BRCA1/2</i>	21
4. HIGH RESOLUTION MELTING	27

4.1. Características	27
4.2. Fundamento	28
4.3. Aplicaciones clínicas	29

5. PREVALENCIA MUTACIONAL DE *BRCA1/2* EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO..... 31

5.1. Prevalencia de mutaciones en CME en la población española.....	33
---	----

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 37

MATERIAL Y MÉTODOS 43

1. MATERIAL 45

1.1. Pacientes	45
1.2. Muestras.....	47

2. MÉTODOS 48

2.1. Extracción de ADN.....	48
2.2. Cuantificación y calidad del ADN	48
2.3. Cribado de mutaciones mediante electroforesis en geles sensibles a cambios de conformación.....	48
2.4. Cribado de mutaciones mediante el análisis de curvas de fusión de alta resolución	49
2.5. Comparación de los métodos de HRM y CSGE	58
2.6. Procedimiento general para el estudio de los CME mediante HRM.....	59
2.7. Secuenciación.....	61

2.8. Nomenclatura	62
2.9. Análisis Estadístico	63
RESULTADOS	65
1. PUESTA A PUNTO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE ALTO RENDIMIENTO “HIGH RESOLUTION MELTING”	67
1.2. Selección de los cebadores	67
1.3. Optimización de las concentraciones de cebadores y MgCl ₂ ..	67
1.4. Optimización del programa de PCR	69
1.5. Análisis de los productos de PCR	70
1.6. Precisión, sensibilidad y especificidad del HRM para la detección de las mutaciones españolas.....	71
1.7. Confirmación de los resultados por secuenciación	75
2. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE HRM Y CSGE	76
2.1. Variantes detectadas en <i>BRCA1</i>	76
2.2. Variantes detectadas en <i>BRCA2</i>	79
2.3. Coste-efectividad de los métodos CSGE y HRM	81
3. CRIBADO DE LAS MUTACIONES ESPAÑOLAS EN <i>BRCA1/2</i> EN LAS PACIENTES CON CME MEDIANTE HRM	82
3.1. Mutaciones	84
3.2. Variantes de Efecto Desconocido	90
3.3. Polimorfismos	94
DISCUSIÓN	97

1. CRIBADO DE MUTACIONES EN LOS GENES <i>BRCA1/2</i> MEDIANTE EL MÉTODO DE “HIGH RESOLUTION MELTING”	99
1.1. Precisión del método de HRM	100
1.2. Sensibilidad del método de HRM.....	101
1.3. Capacidad discriminante del método de HRM	103
2. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CRIBADO DE HRM Y CSGE... 104	
2.1. Comparación de los métodos de HRM y CSGE	104
2.2. Comparación del coste-efectividad de los métodos de CSGE y HRM	105
3. PREVALENCIA DE MUTACIONES <i>BRCA1/2</i> EN PACIENTES CON CME	107
3.1. Mutaciones patogénicas en pacientes con CME.....	108
3.2. Variantes de efecto desconocido en pacientes con CME	110
3.3. Polimorfismos detectados en pacientes con CME.....	111
4. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES CON CME	112
5. IMPORTANCIA DEL CRIBADO DE <i>BRCA1/2</i>. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	114
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>117</u>
<u>DOCUMENTOS ANEXOS</u>	<u>121</u>
1. ÍNDICE DE TABLAS.....	123
2. MUTACIONES ESPAÑOLAS EN <i>BRCA1/2</i> ESTUDIADAS	125

3. CEBADORES Y CONDICIONES EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES DE <i>BRCA1/2</i> POR CSGE:	129
4. CEBADORES, CONDICIONES EMPLEADAS Y GRÁFICAS DIFERENCIALES OBTENIDAS PARA CADA FRAGMENTO MEDIANTE HRM.....	133
5. INSTRUMENTACIÓN	141
6. REACTIVOS EMPLEADOS	142
7. PROGRAMAS INFORMÁTICOS	143
8. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	144
8.1. Publicaciones derivadas de la tesis:.....	144
8.2. Publicaciones derivadas del trabajo en la línea de cáncer de mama.....	150
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>153</u>

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

- A: Adenina
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ASO: Allele-specific oligonucleotide hybridization
- BIC: Breast Cancer Information Core
- BRC: Breast cancer domain
- *BRCA1*: Breast Cancer Susceptibility Gene 1
- *BRCA2*: Breast Cancer Susceptibility Gene 2
- *BRCA1/2*: BRCA1 y BRCA2
- *BRCAness*: Pérdida de funcionalidad o una deficiencia de los genes *BRCA1/2*
- *BRCAx*: CM sin mutación en *BRCA1/2*
- BRCT: BRCA1 Carboxi terminus
- C: Citosina/Centígrado
- C+: controles positivos
- CDI: Carcinoma ductal infiltrante
- CK: Citoqueratinas
- CM: Cáncer de mama
- CME: Cáncer de mama esporádico
- CMOH: Cáncer de mama y ovario hereditario

- CMTN: Cáncer de mama triple negativo
- CO: Cáncer de ovario
- CP: Células progenitoras
- Cp: Crossing point
- CSF: Cryptic splice finder
- CSGE: Conformation-sensitive gel electrophoresis
- DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis
- DHPLC: Denaturing high performance liquid chromatography
- DMSO: Dimetil sulfóxido
- DP: Difference plot
- DSBs: Double-stranded DNA breaks
- EC: Electroforesis capilar
- EDTA: Ácido K₃-etilendiaminotetracético
- ESE: Exonic splicing enhancers
- F: Forward
- G: Guanina
- GWAS: Genome-wide association studies
- HE: Heteroduplex
- Het: Heterocigoto o heterocigosis
- HGVS: Human genome variation society

- HO: Homoduplex
- Homo: Homocigoto o homocigosis
- HRM: High Resolution Melting
- IC: Intervalo de confianza
- IF: Intensidad de fluorescencia
- IHQ: Inmunohistoquímica
- Kb: kilobase
- LC 480: Light Cycler 480®
- LGR: Large genomic rearrangement
- LOH: Loss of heterozigosity
- LOVD: Leiden open variation database
- Min: Minutos
- mM: Milimolar
- MP: Mutaciones puntuales
- ng: Nanogramo
- NGS: Next Generation Sequencing
- NHEJ: Non-homologous end-joining
- NLS: Nuclear localization signal
- OB: Oligonucleotide binding
- PARP: Poli-ADP-ribosa polimerasa

- pb: Pares de bases
- PCGC: Programa de consejo genético en cáncer
- PCGCHCV: Programa de consejo genético en cáncer hereditario de la Comunidad Valenciana
- PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa
- PTT: Protein truncation test
- R: Reverse
- RE: Receptores de estrógeno
- RFM: RING finger motif
- RH: Recombinación homóloga
- RP: Receptores de progesterona
- SC: Stem cell
- SNPdb: Single nucleotide polymorphism database
- SNPs: Single nucleotide polymorphisms
- SSCP: Single-strand conformation polymorphism
- ssDNA: Single strand DNA break
- T: Timina
- T^a: Temperatura
- TIE: Tasa de incidencia estimada
- TM: Tasa de mortalidad

- T_m: Temperatura de fusión o *melting*
- UMD: Universal mutation database
- UF: Unidades de fluorescencia
- URF: Unidades relativas de fluorescencia
- VED: Variante de efecto desconocido
- WT: Wild-type
- μL : Microlitro
- μM : Micromolar



INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) se describe por vez primera en el Caso 45 del Papiro de Edwin Smith (Egipto \cong año 3.000 a. C.), titulado *“Instrucciones concernientes a tumores en su pecho”*¹. Desde entonces, son muchos los esfuerzos que se han realizado para profundizar en el conocimiento de esta enfermedad, su diagnóstico precoz y la búsqueda de tratamientos específicos para los diferentes subtipos inmunohistoquímicos (IHQ) y/o moleculares. Esta tesis pretende contribuir a mejorar la metodología de cribado de las alteraciones genéticas implicadas en la etiopatogénesis del CM.

1. EL CÁNCER DE MAMA

El CM es la neoplasia maligna más común entre las mujeres de los países desarrollados². La proliferación acelerada e incontrolada de las células del epitelio glandular mamario conduce al desarrollo del mencionado tumor. Entre los factores que predisponen al CM solo la edad³, la densidad mamaria y el número de familiares afectados de primer grado se han asociado con el riesgo de desarrollar esta neoplasia⁴. Los factores genéticos, hormonales y reproductivos también juegan un papel importante en su predisposición⁵.

1.1. RELEVANCIA SANITARIA DEL CÁNCER DE MAMA

El CM es el tumor más frecuente en la población femenina afectando a un millón de mujeres en el mundo al año⁶. Estos datos

justifican el desarrollo de una investigación oncológica que incluya la histopatología, inmunohistoquímica y desordenes genéticos⁷.

En el año 2.012, la tasa de incidencia estimada (TIE) y tasa de mortalidad (TM) de CM a nivel mundial⁶, fue de 42/100.000 y 15,4/100.000 mujeres, respectivamente. La TIE en población española y Comunidad Valenciana para ese mismo año fue de 67,3/100.000⁸ y 90/100.000^{9,10}, con TM de 11,9/100.000⁸ y 17,8/100.000¹¹ mujeres, respectivamente.

En los últimos 20 años, la TIE en la Comunidad Valenciana se ha incrementado, a la vez que la TM se ha reducido⁹. Esto se debe principalmente a la implementación de una medicina personalizada con el empleo de fármacos específicos, y a la detección precoz del CM gracias a la implantación de programas de cribado como el que se contempla en el “Plan Oncológico de la Comunidad Valenciana”⁹.

1.2. ETIOPATOGÉNESIS DEL CÁNCER DE MAMA

El CM se origina por la transformación maligna de las *células madre* (“*stem cells*”, SC) o de las *células progenitoras* (CP), provocada por la desregulación de sus vías de auto-renovación¹². Alteraciones genéticas como el silenciamiento de *BRCA1*, la amplificación de *HER2* o la expresión anómala de citoqueratinas (CK) son alguno de los eventos implicados en la promoción tumoral¹³. El subtipo de CM que se desarrolle dependerá del tipo celular que se malignice¹⁴ (Figura 1).

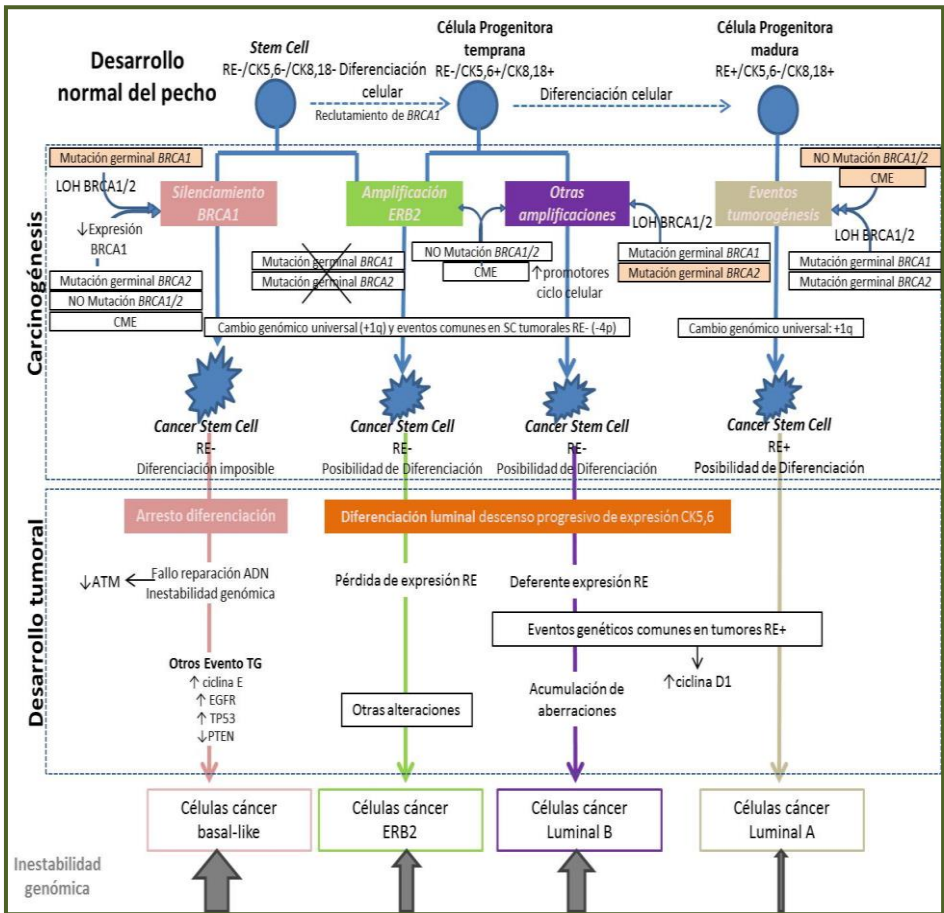


Figura 1: Esquema de las diferentes vías de desregulación y los subtipos de CM originados en cada una de ellas¹³

1.3. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

Tradicionalmente, el CM se ha clasificado atendiendo a las características clínico-patológicas¹⁵ del tumor, TNM, tipo¹⁶ y grado histológicos^{17,18}. Posteriormente, se han incorporado los receptores hormonales de estrógeno (RE) y progesterona (RP), y la expresión de HER2/neu por su implicación terapéutica.

Los tumores **RE/RP (+)**, que representan el 75-80% de los CM, responden a los tratamientos de supresión hormonal como es el tamoxifeno¹⁹ y, generalmente, confieren un comportamiento evolutivo favorable²⁰. En los tumores **RE/RP (-)** adquiere importancia el estado de HER2/neu. Los tumores **HER2 (+)**, que suponen el 15-20% de los CM, suelen ser más agresivos y han mostrado peor pronóstico, aunque el tratamiento con el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin)²¹ ha conseguido mejorar el pronóstico y supervivencia de estas pacientes de manera significativa²². Por su parte, el CM **RE/RP/HER2 (-)** o **CM triple negativo (CMTN)**, que representa el 10-15% restante, es un tumor muy agresivo para el que no se dispone tratamiento específico²³. Actualmente se está ensayando, en estos tumores, el papel de los inhibidores de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP)²⁴.

En la actualidad, los marcadores IHQ y perfiles de expresión genética²⁵ han permitido la subclasificación del CM en cinco nuevos subtipos con implicaciones pronósticas y terapéuticas distintas^{26,27}: *basal-like*, luminal A, luminal B, ERBB2/ HER2-neu y *normal-like*^{28,29} (Tabla 1).

- Los CM ***basal-like*** se originan a partir de “SC RE-negativas”, tienen silenciado *BRCA1*, no expresan receptores hormonales, ni HER2-neu y presentan un elevado GH (Figura 1 y Tabla 1).
- Los CM **ERBB2/HER2** se originan de células “SC RE-negativas” o células más diferenciadas como son las “CP RE-negativas”; no suelen presentar mutaciones en los genes *BRCA1* y

BRCA2 (BRCA1/2), expresan niveles elevados de HER2-neu y bajos de RE (Figura 1 y Tabla 1).

- Los CM **luminales**, se caracterizan por ser receptores hormonales positivos y HER2 negativos; expresar CK de bajo peso molecular¹³ y poder presentar alteraciones en los genes *BRCA1/2* (Figura 1 y Tabla 1). Los tumores luminal A y B se diferencian en el nivel de expresión de Ki-67 y RP; el subtipo A expresa un 14% menos de células positivas para Ki-67 y un 20% más de RP que el subtipo B^{15, 13}.
- Los CM **normal-like** o normales comparten características del tejido mamario normal y no expresan receptores hormonales, ni CK (Tabla 1).

Tabla 1: Características diferenciales de los fenotipos inmunohistoquímicos de CM:

Subtipo CM	Célula carcinogénica	Alteraciones <i>BRCA1/2</i>	Perfil IHQ
Basal-like	SC RE-negativa	Silenciamiento <i>BRCA1</i>	GH alto; RE-, RP-, HER2-, BCL2-CK5/6+, CK8/18-, CK14+, p63+ y EGFR+
ERBB2	SC o CP RE-negativa	No mutaciones <i>BRCA1/2</i>	RE-, RP-, HER2+, CK5/6+, CK8/18+/-
Luminal A	CP RE-positiva	Indiferente	RE+, RP+/-, HER2 +/-, CK8/18+, Ciclina D1+
Luminal B	CP RE-negativa	Indiferente	GH alto/medio, RE+, RP+/-, HER2-, CK8/18+
Normal-like			RE-, RP-, HER2-, CK5/6-, CK14-, p63-, EGFR-

SC: Stem cells; RE: Receptores estrógeno; GH: Grado histológico; CP: células progenitoras; CK: citoqueratinas; (+): Expresión; (-): No expresión

2. EL CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO Y HEREDITARIO

El 85-95% de los CM son esporádicos (CME)^{30,31}; provocados por un cúmulo de alteraciones genéticas y/o epigenéticas en las células somáticas sin afectar a la línea germinal. Estas alteraciones se producen por el efecto de factores ambientales, hormonales, xenobióticos, etc^{32,33}. La inactivación de *BRCA1/2* en los CME se produce principalmente por la metilación del promotor de *BRCA1*⁶², que se presenta en un 30% de CMTN³⁴; si bien, en el 3,5% de los CME se debe a mutaciones en *BRCA1*³⁵.

En el 5-15% restante de CM se observa una agregación familiar³⁶ (Figura 2). La carga familiar de CM o cáncer de ovario (CO) es un indicador del riesgo de desarrollar CM/CO. Los estudios del análisis de ligamiento en familias con alta carga tumoral permitieron identificar a los dos genes de alta susceptibilidad al CM, *BRCA1* y *BRCA2* (*Breast Cancer Susceptibility Gene 1* y *2*), en 1990^{37,38} y 1994³⁹, respectivamente. Se ha demostrado que un 60-70% de las pacientes con mutaciones en estos genes (*BRCA1/2*) presentaban CM y/o CO antes de los 60 años⁴⁰.

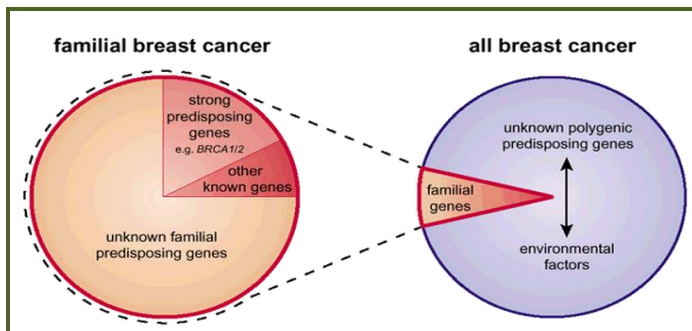


Figura 2: Genes implicados en el CM familiar⁶⁹

2.1. MECANISMOS DE CARCINOGENESIS EN EL CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO Y HEREDITARIO

La carcinogénesis mamaria es un proceso que requiere múltiples acontecimientos genéticos que básicamente consisten en la inactivación de genes supresores (*caretakers*), la activación de oncogenes y/o la modificación de la expresión de genes reguladores del ADN (*gatekeepers*)⁴¹. *BRCA1/2* juegan un papel relevante al ser simultáneamente *caretakers* y *gatekeepers*. Los CME y CMH poseen mecanismos carcinogénicos diferentes⁴².

2.1.1. Carcinogénesis en el CME

En los CME, según Weinstat (1995)⁴³, es necesaria la concurrencia de al menos tres eventos en las células somáticas del epitelio mamario para que el tumor progrese. Esta acumulación gradual de alteraciones somáticas adquiridas, podría estar ocasionada por la activación mutacional de oncogenes como *MYC*, *CCND1*, *HER2/neu*, etc; junto con la inactivación no mutacional de genes supresores de tumores. Estas alteraciones tempranas, van seguidas de mutaciones en otros genes (*Rb1*, *Tp53*, etc)⁶¹. Los CME no suelen presentar mutaciones en genes supresores de tumores⁴⁴, sin embargo, en más de un 25% de CME se ha descrito la pérdida de funcionalidad o haploinsuficiencia de los genes *BRCA1/2* (*BRCAness*), principalmente provocada por la metilación de su promotor^{45,46} o por inactivación de uno de estos genes a nivel somático^{47,50}. Asimismo, se ha descrito que la amplificación de *EMSY*, en

los CME, podría explicar la inactivación de *BRCA2*⁴⁸ por suprimir su actividad⁴⁹.

Los pacientes con CM *BRCAness*, presentan una deficiencia en el mecanismo de reparación basado en la recombinación homóloga (RH)⁵⁰, tendiendo a reparar los daños en el ADN por mecanismos alternativos. La ruptura de una sola hebra de ADN (*single strand DNA break, ssDNA*)⁵¹ se repara mediante el mecanismo de recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos (*non-homologous end-joining; NHEJ*), mecanismos alternativos que favorecen la acumulación de errores⁵², la inestabilidad cromosómica⁹² y promueven la carcinogénesis.

Los inhibidores del PARP, como Olaparib, inducen letalidad sintética en tejidos con daños en los genes *BRCA1/2*⁵³. Los CME *BRCAness* son susceptibles de ser tratados con inhibidores del PARP, ya que este fármaco inhibe la única vía de reparación activa aumentando el número de errores en estas células y por tanto, induciendo la apoptosis (Figura 3, línea morada). Además, la combinación de los inhibidores del PARP con la quimioterapia convencional aumenta la supervivencia libre de enfermedad sin aumentar los efectos adversos de la quimioterapia^{54,55}. Esto convierte al estudio de mutaciones *BRCA1/2* no solo en una indicación de riesgo genético de padecer cáncer hereditario sino también para la predicción de respuesta a tratamientos específicos en los pacientes que desarrollen el cáncer.

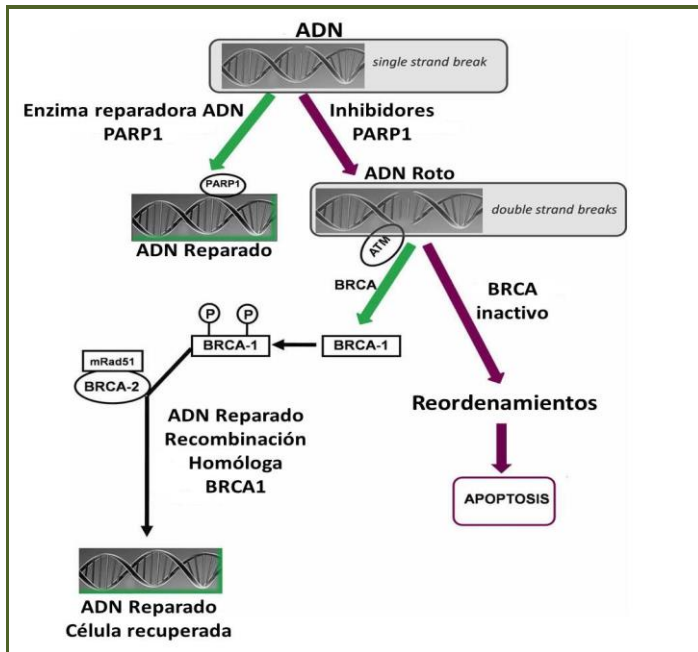


Figura 3: Mecanismos de reparación del ADN por RH (verde) y de actuación de los inhibidores del PARP (morado)¹⁵

2.1.2. Carcinogénesis en el CMH

La predisposición hereditaria al cáncer está inducida por mutaciones en genes supresores que causan la pérdida de función de uno de los alelos. En el CMH, el mecanismo más frecuente de inactivación del alelo sano es la pérdida de heterocigosidad (*Loss of heterozygosity*, LOH)⁵⁶. Este mecanismo carcinogénico sigue la hipótesis de Knudson (1971)⁵⁷ que postula que el desarrollo tumoral requiere dos eventos (“two-hits”); el primero, la presencia de una mutación patogénica de *BRCA1/2* en las células germinales; y el segundo, la LOH del alelo sano del gen portador de la mutación⁵⁸. Cuando ocurre esto, la mayoría de las células mueren por apoptosis. Sin embargo, en tejidos como la mama y el ovario, las células escapan a la apoptosis

acumulando aberraciones que al no ser reparadas, favorecen la proliferación celular desordenada, inestabilidad genómica y carcinogénesis^{84,92} (Figura 4).

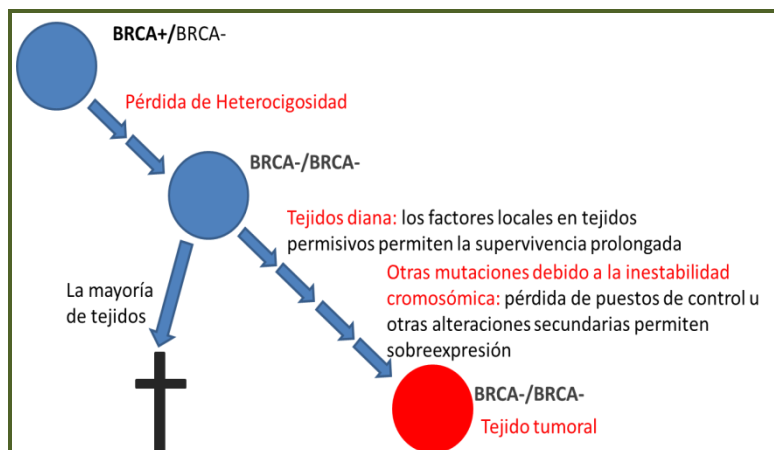


Figura 4: Modelo de la carcinogénesis asociada con mutaciones *BRCA1/2* según la especificidad de tejido [92]

La deficiencia de proteínas *BRCA1/2* tiene repercusión en la mayoría de tejidos y órganos; especialmente en tejidos proliferativos estrógeno-dependientes como son la glándula mamaria y el ovario. La activación del ciclo celular⁵⁹ y los daños oxidativos⁶⁰ producidos requieren de la RH para subsanar los errores inducidos en estos procesos. La insuficiencia de RH, provoca la acumulación de daños en el ADN⁶¹ favoreciendo el desarrollo tumoral en estos tejidos⁸⁴.

2.2. ALELOS IMPLICADOS EN EL RIESGO DE DESARROLLAR CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

Además de los genes de alta penetrancia *BRCA1/2*, existen otros genes que también predisponen al CM. La prevalencia y el riesgo de

desarrollar un CM a lo largo de la vida depende del gen afecto; en base a lo cual los genes se clasifican como de alta, moderada y baja penetrancia^{62,63} (Figura 5).

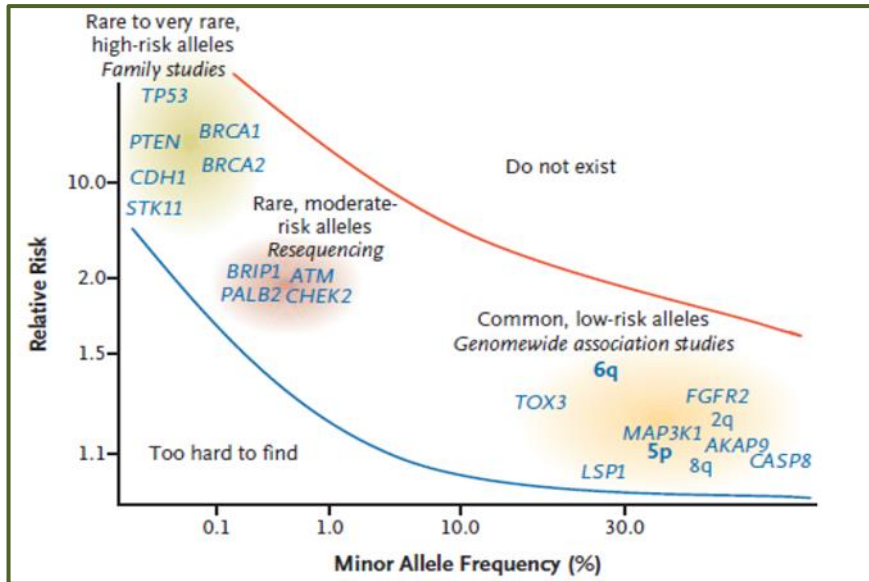


Figura 5 : Frecuencia y distribución del riesgo relativo de los alelos susceptibles de desarrollar CM⁶³

Los estudios de ligamiento y clonación posicional han permitido identificar los **genes de alta penetrancia** tales como *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*,... (Figura 5), en familias con múltiples casos de CM y/o CO. Las mutaciones en estos genes presentan una prevalencia poblacional baja (<0,1%), si bien confieren un riesgo de desarrollar CM entre 10-20 veces superior al de la población general. Las mutaciones en *BRCA1/2* se asocian con el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (CMOH), presente en el 20% de las familias de alto riesgo⁶⁴. En conjunto, los genes de elevada penetrancia sólo explican el 20-25% de las agregaciones familiares de CM.

Las alteraciones en los **genes de moderada penetrancia** presentan una prevalencia poblacional del 0,6% y confieren un riesgo de desarrollar CM entre 2-4 veces superior al de la población normal^{65,66}. Entre estos genes figuran *PTEN*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1*,...⁶². Un 5% de las pacientes con CM familiar presentan mutaciones en *CHEK2*⁶⁴. El estudio de estos genes en las pacientes *BRCA1/2* negativas ha empezado a realizarse, gracias al desarrollo de metodologías de alto rendimiento como es la secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*, NGS), permitiendo aumentar el porcentaje de familias diagnosticadas de CMOH^{67,68}. Aun así, solo en el 25-30% de los CM familiares se identifican mutaciones en genes de alta o moderada penetrancia, permaneciendo un 70-75% de CM familiares sin identificar la causa genética que explique su síndrome^{36,69} (Figura 2).

Los estudios de asociación genómica (*Genome-wide association studies*, GWAS) junto con *arrays* de cambios de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs), efectuados en estudios caso-control con series muy numerosas^{62,63}, han permitido identificar perfiles genéticos que aumentan el riesgo de CM. Estos polimorfismos de **baja penetrancia** o SNPs tienen una frecuencia poblacional elevada (5-50%) y su presencia confiere un riesgo bajo de CM, inferior a dos veces el de la población general⁶³ (Figura 5).

2.2.1. Riesgo asociado a las mutaciones en los genes *BRCA1/2*

Las mutaciones de *BRCA1/2* se transmiten siguiendo un patrón de herencia autosómica dominante⁴² con penetrancia incompleta⁷⁰.

Las mutaciones en el gen *BRCA1* confieren un riesgo medio acumulado de desarrollar CM a lo largo de la vida del 65% (rango: 44-78%) y un riesgo de CO del 39% (rango: 18-54%). Asimismo, en menor medida, las mutaciones en este gen aumentan el riesgo de cáncer de cérvix uterino, cuerpo uterino y cáncer de páncreas³.

La presencia de mutaciones en *BRCA2* confiere un riesgo acumulado de desarrollar CM de un 45% (rango: 31-56%) y de un 11% para el CO (rango: 2,4-19%)⁷¹. Señalar que las mutaciones en este gen se asocian con el CM en el varón⁷². Asimismo, las mutaciones en este gen incrementan el riesgo de cáncer de próstata y de páncreas 20 y 10 veces, respectivamente⁸⁴. También confieren un riesgo menor, de desarrollar otros tumores como de vías biliares, gástrico y melanoma⁷³.

2.3. DIFERENCIAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y DE PERFIL GENÉTICO ENTRE EL CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO Y HEREDITARIO

Una de las diferencias entre el CME y el CMH es la edad de aparición del tumor. Los CME presentan una edad de diagnóstico más avanzada (mediana de edad de 64 años) que los CMH [mediana de 42 años en los CMH *BRCA1* (+)]^{74,75}.

Los CME presentan un perfil clínico-patológico diferente al de los CMH portadores de mutación en *BRCA1/2*. Así, los CME están más diferenciados (G1 vs G2-3)^{76,77}, presentan un índice mitótico menor⁷⁸, mayor formación de túbulos (4% vs 0%)⁷⁴, menor grado de pleomorfismo y un fenotipo menos agresivo que los CMH. Sin embargo, no se han detectado diferencias significativas en el tamaño tumoral ni

en el tipo histológico de CM⁷⁹, siendo la mayoría de CME y CMH adenomas ductales invasivos (76% vs. 74%, respectivamente)^{74,79,80}.

Los estudios de expresión génica revelan que el 60-80% de los **CMH BRCA1 (+)** son CMTN y suelen presentar el subtipo basal^{12,81}. Los **CMH BRCA2 (+)** suelen pertenecer al subtipo luminal⁷⁰, principalmente el luminal A⁴¹. Los CM con agregación familiar sin mutación en *BRCA1/2* (**BRCAX**), aunque presentan una gran variedad de perfiles, suelen pertenecer al subtipo luminal. Los **CME** pueden pertenecer a cualquier subtipo aunque predominan los luminales, siendo difícil de diferenciar de los tumores *BRCAX*¹².

3. LOS GENES *BRCA1* Y *BRCA2*

BRCA1 (AY273801.1) fue descrito por Mikie *et al* en 1994³⁷. Se localiza en el *locus* q21.31 del cromosoma 17 y está compuesto por 24 exones, de los cuales 22 son codificantes. Todos sus exones tienen un tamaño similar de ≈200 pares de bases (pb) excepto el exón 11 que tiene 3,4 Kb (kilobase) y representa el 61% de la región codificante. *BRCA1*, de 7,9 Kb, codifica un ARN mensajero que puede presentar diferentes isoformas. La forma mayoritaria o completa (*BRCA1a*) consta 1.863 aminoácidos y tiene un peso molecular de 220 kDa³⁷.

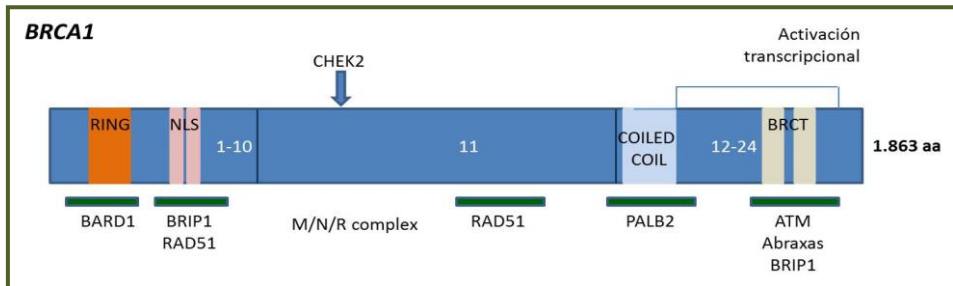


Figura 6: Esquema de los principales dominios de BRCA1 y lugares de unión a otras proteínas

El gen *BRCA1* codifica una proteína nuclear formada por varios dominios (Figura 6): el dominio de *anillo en dedos de zinc* (*RING Finger Motif*, RFM)⁸² responsable de la actividad E3 ubiquitina ligasa e implicado en la ubiquitinización⁸³; el dominio de *señales de localización nuclear* (*Nuclear localization signal*; NLS); el dominio *Coiled Coil* al que se unen PALB2 y BRCA2⁸⁴ y el dominio de activación transcripcional *BRCA1 Carboxi terminus* (BRCT) formado por dos copias en tándem⁸⁵.

BRCA2 (AY436640.1) fue identificado en la región q12.3^{39,86} del cromosoma 13 por Wooster *et al* en 1.994⁸⁷. El gen está formado por 27 exones de los cuales 26 codifican a la proteína BRCA2. El 53% de la región codificante de este gen está formada por los exones 10 y 11 que constan de 1,12 Kb y 4,93 Kb, respectivamente. El ARN mensajero codificado por el gen se traduce en una proteína de 3.418 aminoácidos y 384,22 kDa de peso molecular.

La proteína BRCA2 consta de cuatro dominios (Figura 7), el dominio *amino-terminal*; el dominio de CM (*Breast cancer domain*, BRC)⁸⁸; el dominio de unión a oligonucleótidos (*oligonucleotide binding*, OB)⁸⁹; y las señales de localización nuclear (*Nuclear localization signal*, NLS).

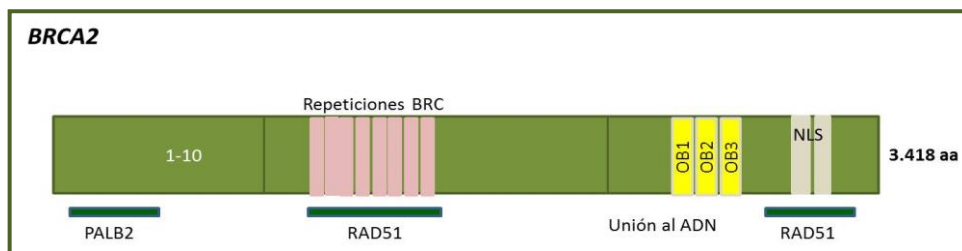


Figura 7: Esquema de los principales dominios de BRCA2 y las proteínas con las que interactúa¹⁰⁵

3.1. FUNCIONES DE LOS GENES *BRCA1/2*

BRCA1/2 pertenecen a la familia de genes supresores de tumores^{90,91} que regulan el ciclo celular y evitan la proliferación incontrolada. Las proteínas codificadas por estos genes juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica y están implicadas en la reparación de la ruptura de la doble cadena de ADN (*double-stranded DNA breaks, DSBs*)⁹².

Entre las funciones de los *BRCA1/2* cabe destacar, como función principal de ambos genes, la reparación de las DSBs mediante el mecanismo de RH⁹³. Para ello, BRCA1 se une a BARD1 a través del dominio RING y forma el complejo BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*) con otras proteínas señalizando y/o reparando el daño en el ADN^{94,92}. BRCA2 participa directamente en la RH mediante la interacción con RAD51^{97,95}. Otras funciones de estos genes son el mantenimiento de la integridad genómica y cromosómica^{96,97}; la regulación transcripcional de genes reparadores, donde BRCA1 participa en la remodelación del ADN dañado asociándose con la ARN pol II⁹⁸; el control del ciclo celular^{96,93} y la actividad ubiquitina E3 ligasa⁹⁹ del

dímero BRCA1-BARD1^{100,101,102}. Si bien, la función de BRCA2 en estos procesos no está totalmente esclarecida⁹⁶.

3.2. VARIACIONES GENÉTICAS DETECTADAS EN LOS GENES *BRCA1/2* Y SUS IMPLICACIONES BIOLÓGICAS

Las variaciones genéticas detectadas en los genes *BRCA1/2* se clasifican como patogénicas, variantes de efecto desconocido (VEDs) y neutras o polimorfismos atendiendo a su repercusión biológica. La mayoría de las variaciones genéticas de *BRCA1/2* se recogen en bases de datos tales como el “*Breast Cancer Information Core*” (BIC)¹⁰³, “*Human Genome Variation Society*” (HGVS)¹⁰⁴, “*Universal Mutation Database*” (UMD)¹⁰⁵, “*Leiden Open Variation Database*” (LOVD)¹⁰⁶, BREast CAncer genes Database (HCI-BRCA)¹⁰⁷ o “*Single Nucleotide Polymorphism database*” (SNPdb)¹¹⁵.

3.2.1. Mutaciones Patogénicas

Las variaciones patogénicas son aquellas que generan una proteína carente de actividad biológica¹⁰⁸. Estas pueden ser de dos tipos, mutaciones puntuales (MP) o grandes reordenamientos (*Large genomic rearrangements*, LGRs).

Las **MP** afectan un número reducido de nucleótidos y pueden ser de varios tipos. Las más frecuentes (64%) se tratan de pequeñas inserciones o deleciones (< 100 nt) que causan un desplazamiento en el marco de lectura (*frame-shift*). El 36% restante son cambios puntuales de un nucleótido que originan un codón de parada (*nonsense*; 23%),

alteraciones en la zona de unión intrón-exón del ARNm (*splicing*; 11%), o el cambio de un aminoácido por otro (*missense*; 2%).

Los **LGRs** son inserciones, deleciones, duplicaciones, inserciones Alu y reordenamientos de un fragmento del gen entre 0,2-500 Kb. Representan alrededor del 8-10% de las mutaciones descritas en estos genes^{109,110}. La mayoría de los LGRs son deleciones¹¹⁰, y en menor proporción aumentos del número de copias de una secuencia del gen¹⁰⁹.

3.2.2. Variantes de efecto desconocido

Las VEDs son variaciones genéticas de las que su potencial patogénico se desconoce. En el BIC¹⁰³ y “*Single Nucleotide Polymorphism database*” (SNPdb)¹¹⁵ se recogen alrededor de 2.000 VEDs siendo la mayoría del tipo *missense*. Estas variantes se detectan en el 10-15% de los individuos de población caucásica^{108,111} y en aproximadamente un 22% de hispanos¹¹².

Los estudios funcionales son necesarios para dilucidar el papel patogénico de estas variantes. Una buena ayuda para evaluar la patogenicidad de las VEDs son los estudios de cosegregación familiar, programas informáticos y analizar el grado de conservación filogenética del aminoácido entre especies (*Homo sapiens*, *Gallus gallus*, *Ratus norvegicus*, *Mus musculus*, *Canis familiaris* y *Pan troglodytes*). Los estudios “*in silico*” ayudan a pronosticar la patogenicidad de estas variantes; así el programa ESEfinder v3.0^{113,114} predice la implicación del cambio de nucleótido en las zonas de unión exón-intron (“*exonic*

splicing enhancers”, ESE) y permite predecir si la alteración genera un *splicing* críptico (“*Cryptic splice finder*”, CSF).

3.2.3. Polimorfismos o Variantes Neutras

En los genes *BRCA1/2* se han descrito una gran cantidad de variantes en la secuencia del ADN que se presentan en la población general con una frecuencia mayor al 1%. Muchas de estas variantes neutras o polimorfismos se recogen en bases de datos como SNPdb¹¹⁵ o HapMap¹¹⁶. En el BIC se recogen 54 variantes sin efecto clínico en *BRCA1* y 83 en *BRCA2*¹⁰³.

La mayoría de estos polimorfismos son variantes sinónimas, cambios intrónicos en las regiones UTR y mutaciones *missense* que no se han visto asociadas con el cáncer ni parecen repercutir en la funcionalidad y estructura de la proteína.

3.3. MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS MUTACIONES EN *BRCA1/2*

El estudio molecular de los genes *BRCA1/2* precisa del rastreo completo de la secuencia exónica e intrónica colindante al no presentar zonas calientes de mutación (*hot-spot*). Para la detección de variaciones en *BRCA1/2* se han empleado métodos de secuenciación directa que, en breve, serán sustituidos por los de secuenciación masiva, y métodos indirectos entre los que cabe destacar la detección de heteroduplex (HE) (Tabla 2).

Tabla 2: Principales características de los métodos empleados en el estudio de mutaciones en los *BRCA1/2*:

Técnicas	Caracterización directa	Características técnicas	Inconvenientes	Sensibilidad (%)	Coste
Secuenciación directa	Sí	Largo análisis costoso	Análisis tedioso, personal cualificado	100	↑
ASO	Sí	Empleo de sondas	Detección parcial	100	↑
SNapShot	Sí	Empleo de cebadores marcados	Detección parcial	100	↑
Pirosecuenciación	Sí	Varias etapas Met. Laboriosa	No detección pequeñas ins/del	95	↑
PTT	No	Varias etapas	No detección cambios nt	75-92	↓
SSCP	No	Varias etapas poco reproducible	Met. Laboriosa, poco reproducible	60-80	↓
DGGE	No	Varias etapas	Met. Laboriosa		↓
CSGE	No	Varias etapas	Met. Laboriosa	76-95	↓
F-CSGE	No	Varias etapas Automatizable	Laborioso	95-100	↑
DHPLC	No	Varias etapas Automatizable	Personal cualificado	100	↓
HRM	No	Única etapa automatizable	Personal cualificado	100	↓

Met: metodología; ins/del: inserciones/delecciones; nt: nucleótido; ↑: caro; ↓: barato

3.3.1. Métodos Directos

Entre los métodos que permiten detectar, identificar y caracterizar en un sólo paso la alteración presente en *BRCA1/2* están:

- **Secuenciación Directa;** método de referencia o “*gold standard*” para la identificación de variaciones específicas^{117,118}. Presenta la desventaja de su elevado coste tanto económico como laboral y de requerir personal cualificado.
- **Sondas de hibridación alelo-específicas (*Allele-specific oligonucleotide hybridization, ASO*);** emplea pequeños

oligonucleótidos que detectan selectivamente la alteración concreta contra la que se han diseñado¹¹⁹. Se han empleado en la detección de las mutaciones fundacionales en población judía¹²⁰ o para la detección de mutaciones recurrentes¹²¹. Los *arrays* de sondas se han utilizado para la detección de mutaciones heterocigotas en el exón 11 de *BRCA1*¹²² y en el cribado completo de *BRCA1*¹²³.

➤ **Multiplex SNaPshot;** método de genotipado basado en la extensión de una sola base que combina la secuenciación con el análisis de fragmentos. Detecta solo aquellas alteraciones para las que se han diseñado las sondas¹²⁴.

➤ **Secuenciación masiva (Next Generation Sequencing, NGS);** tecnología novedosa, rápida, directa y asequible que permite secuenciar un elevado número de bases con mayor sensibilidad. No obstante, tiene las limitaciones de requerir equipamiento y personal cualificado y la preparación de las librerías es larga y tediosa. El procedimiento de detección varía en función de la plataforma empleada; puede basarse en la reacción de Sanger (Illumina), pirosecuenciación (GS Junior)¹²⁵ o en la tecnología de semiconductores (Ion Torrent)¹²⁶, basada en la medición de pH. La secuenciación masiva requiere procesar gran cantidad de información, siendo necesario el empleo de programas informáticos sofisticados para su interpretación. Estas tecnologías se han aplicado en el estudio de *BRCA1*¹²⁷, *BRCA1/2*^{128,129} e incluso se han extendido a otros genes de

moderada penetrancia¹³⁰ o al estudio del exoma completo para los casos *BRCA*¹³¹.

3.3.2. Métodos indirectos

Debido al gran tamaño de los genes *BRCA1/2* y ausencia de zonas calientes, los métodos de cribado han sido los procedimientos de elección para la detección de mutaciones de los genes *BRCA1/2*.

Estos métodos permiten diferenciar las muestras que presentan alteraciones en la secuencia de nucleótidos respecto del ADN normal (*wild-type*; WT). La secuenciación de estas muestras permite tipificar y caracterizar las alteraciones presentes. Los procedimientos empleados se pueden agrupar en tres tipos:

- **Test de la proteína truncada (*protein truncation test, PTT*)¹³²**; metodología que fue aplicada a principios de los 90 para el estudio de los *BRCA1/2*¹³³. Detecta las mutaciones causantes de la interrupción de la transcripción del ADN (mutaciones *frame-shift* y *nonsense*); sin embargo, no identifica los cambios puntuales. El método requiere la detección de la proteína BRCA1 en los linfocitos de sangre periférica mediante western. Es un procedimiento complejo y poco reproducible, hoy día en desuso.
- **Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (*Single-strand conformation polymorphism, SSCP*)¹³⁴**; permite detectar los cambios de una o unas pocas bases en una cadena de ADN en base a la diferente movilidad electroforética respecto a la

hebra normal en el ADN desnaturizado del producto de la PCR¹³⁵. La sensibilidad del procedimiento es limitada (60-80%)¹³³. El método posteriormente se ha automatizado mediante electroforesis capilar (EC) aumentando su rendimiento y sensibilidad; la SSCP-EC ha sido empleada para el cribado de los *BRCA1/2*^{136,137}.

➤ **Métodos de cribado basados en la detección de HE;** los métodos de cribado más extendidos se fundamentan en la formación de HE y en su posterior detección empleando distintas metodologías. La formación de HE consiste en la desnaturalización de los fragmentos formados durante la PCR y su posterior renaturalización que da lugar a la formación de dos homoduplex (HO) (alelo normal y mutado) y dos HE (de hebras no complementarias) en la muestras con una alteración heterocigota (Het) (Figura 8). El no emparejamiento de los nucleótidos (*mismatch*) facilita la diferenciación entre las muestras que los presentan y las que no¹³⁸.

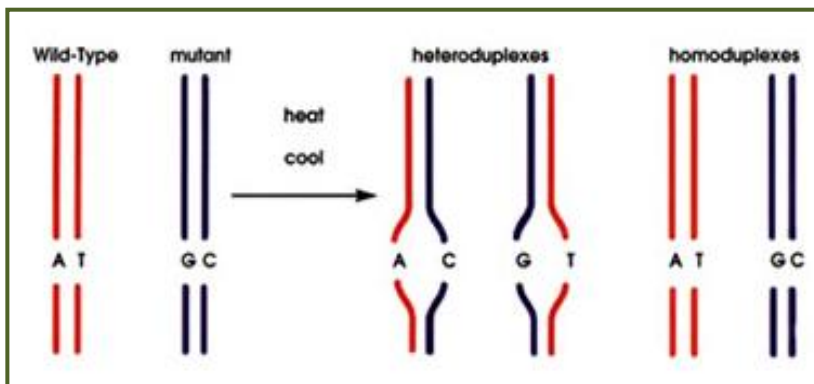


Figura 8: Esquema de formación de los heteroduplex a partir de una muestra heterocigota

En la detección de HE se han empleado los siguientes métodos de cribado:

a. **Electroforesis;** permite detectar los cambios en la conformación del ADN. Existen varios tipos, como son la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (*Denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE)^{139,140} o la variante, electroforesis en geles sensibles a los cambios de conformación (*conformation-sensitive gel electrophoresis*, CSGE)¹⁴¹, donde se observan diferencias en la migración de los fragmentos con HE y HO^{138, 142}. La sensibilidad de método dependerá de las condiciones empleadas en el gel y del fragmento estudiado (longitud y composición). Tanto la DGGE como CSGE han sido ampliamente empleadas en el cribado de los *BRCA1/2* a nivel asistencial^{143,144,145}. El desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido mejorar la CSGE utilizando la EC. El empleo de cebadores marcados con fluorescencia permite la separación de los fragmentos previamente amplificados y la detección de HE gracias a la obtención de patrones electroforéticos diferentes del WT¹⁴⁶. La EC presenta un mayor rendimiento, automatización y reproducibilidad que la CSGE, aunque su sensibilidad varía dependiendo de las condiciones empleadas y del fragmento de ADN a detectar¹⁴⁷. Este procedimiento se ha empleado en el cribado de los *BRCA1/2*^{148, 149}.

b. **Cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography, DHPLC*);** basada en el tiempo de retención y el diferente perfil de elución de los fragmentos con HE¹⁵⁰. Es un método sensible, reproducible, y rápido, que requiere de equipos específicos y personal cualificado. Su aplicación para el cribado de los *BRCA1/2* otorga una sensibilidad próxima al 100%^{151,152,153}.

c. **Análisis de curvas de fusión de alta resolución (*High Resolution Melting, HRM*);** metodología de alto rendimiento que se detalla a continuación (Introducción: apartado 4).

4. HIGH RESOLUTION MELTING

El análisis de las curvas de fusión de productos de PCR se introdujo a finales de los noventa^{154,155}, aunque su aplicación clínica no se extendió hasta la aparición de los intercalantes de nueva generación que permitieron saturar la doble hebra de ADN sin inhibir la actividad de la enzima, aumentando así la sensibilidad del método¹⁶¹.

4.1. CARACTERÍSTICAS

El método tiene la ventaja de identificar, en menos de dos horas, las alteraciones que presenten las muestras de ADN amplificadas por PCR¹⁵⁶, con una elevada sensibilidad (99.3%) y especificidad (98.8%)¹⁵⁷, a un coste reducido. Además, al realizar todas las etapas del análisis en un

pocillo cerrado de la placa, reduce la manipulación post-PCR y por tanto, los problemas de contaminación; y al ser un método no destructivo, la muestra puede ser reanalizada o utilizada en otras técnicas como la secuenciación¹⁵⁸.

El HRM por ser un método de cribado de variaciones genéticas requiere la caracterización de las variantes detectadas¹⁵⁹. Los fragmentos de PCR amplificados por esta metodología deben tener tamaños reducidos (<350-400 pb) para que el método tenga la sensibilidad requerida. El punto débil del HRM es la detección de Homo, debido a la similitud entre las curvas de las muestras normales y Homo; se estima que identifica entre el 40-70% de Homo¹⁵⁷. Este inconveniente puede mitigarse diluyendo la muestra Homo con otra WT¹⁶⁰.

4.2. FUNDAMENTO

El HRM realiza, en un único equipo de PCR en tiempo real, la PCR, la formación de HE, la curva de desnaturalización y el análisis de la misma. El análisis de las curvas detecta los HE formados en función de la diferencia de temperaturas de fusión (T^o *melting*, T_m) de la secuencia los productos de PCR (Figura 9).

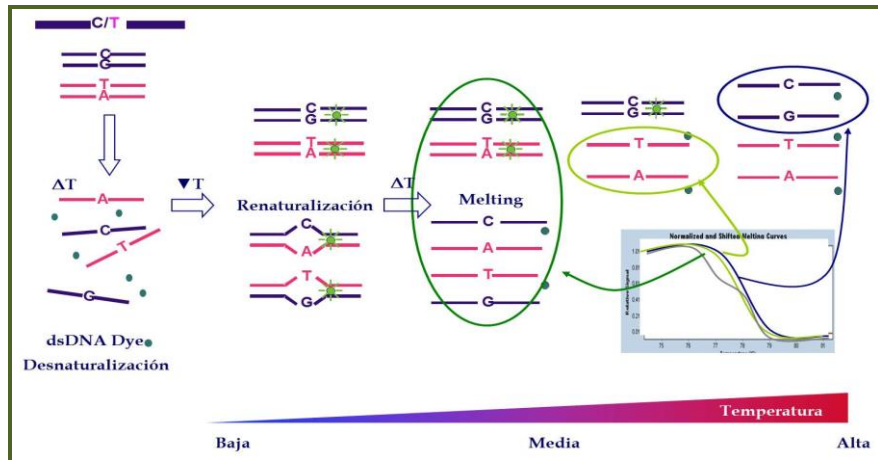


Figura 9: Formación de los HE y detección mediante HRM. 1ª columna: incremento de la T^a y disociación las hebras de ADN en presencia del intercalante. 2ª columna: descenso lento de la T^a y renaturalización e inclusión del intercalante en la doble hebra de ADN. En función de que la muestra de partida sea homocigota o heterocigota se forman los homoduplex y/o heteroduplex. 3ª columna: al incrementar la T^a las hebras se disocian liberando el intercalante y dejando de emitir fluorescencia. Las muestras heterocigotas (verde oscuro) presentan una curva de melting diferente al de las muestras homocigotas (verde claro y azul) presentan curvas similares entre sí.

4.3. APLICACIONES CLÍNICAS

Desde que se introdujo por primera vez para el genotipado en 2003¹⁶¹ hasta el momento, las aplicaciones del HRM han sido diversas, desde el cribado de mutaciones^{162,163}, la combinación de cribado y genotipado^{164, 165}, el genotipado combinado con sondas¹⁶⁶, la detección simultánea de mutaciones puntuales y grandes reordenamientos combinando el HRM con qPCR¹⁶⁷, hasta la realización de estudios de metilación¹⁶⁸.

El HRM se ha empleado para la mejora genética de especies vegetales¹⁶⁹, detección de alérgenos alimentarios¹⁷⁰, etc. En un contexto clínico, esta metodología se ha empleado para la detección de

alteraciones genéticas causantes de resistencia a antibióticos¹⁷¹, en el cribado de variaciones genéticas en genes de gran tamaño (>1 Kb) como *CFTR*, *TP53*, *BRCA1* o *BRCA2*^{172,173}; detección de variantes genéticas puntuales, como son las mutaciones C282Y y H63D del gen *HFE* en la hemocromatosis hereditaria¹⁷⁴ o los polimorfismos p.Gly1691Ala del Factor V Leiden¹⁷⁵ y 20210G>A de la protrombina, que inducen trombofilia¹⁷⁶. Asimismo, la elevada sensibilidad del HRM justifica su empleo en la detección de mutaciones somáticas tumorales implicadas en la respuesta a agentes antineoplásicos, tales como son las descritas en los exones 18-21 de *EGFR* en cáncer de pulmón no microcítico^{177,178}; en los codones 12 y 13 del gen *KRAS* en carcinomas colo-rectales^{179,180} o la mutación V600E de *BRAF* en melanomas¹⁸¹.

En lo que respecta al estudio de los genes *BRCA1/2*, este método se ha empleado en el cribado de parte de las mutaciones de estos genes^{182,183}, en el cribado completo de *BRCA1*¹⁸⁴ e incluso de *BRCA1* y *BRCA2*^{185, 186}.

Existen gran cantidad de metodologías empleadas para la identificación de mutaciones en los genes *BRCA1/2*. No obstante, los resultados de estudios comparativos^{187,188} permiten concluir que aunque la secuenciación directa es el “*gold standard*” para la detección de mutaciones en *BRCA1/2* en pacientes con CMOE, objeto de la presente tesis, cuando el número de pacientes a estudiar es elevado es preferible el empleo de un método de cribado de alto rendimiento, rápido y económico, como puede ser el HRM.

5. PREVALENCIA MUTACIONAL DE *BRCA1/2* EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO

Desde el descubrimiento de los genes *BRCA1/2*, muchos han sido los estudios de mutaciones realizados en población de riesgo o con antecedentes familiares. Si bien, la prevalencia de mutaciones en población general se desconoce, se estima que puede estar entre 0,05-0,26% para *BRCA1* y entre 0,08-0,34% para *BRCA2*^{189,190,191}.

Los escasos estudios existentes en CME indican que las mutaciones patogénicas en los genes *BRCA1/2* presentan una prevalencia entre 3,0-5,7%^{64,193-215}, aumentando al 10-14% en los CMTN¹⁹². No obstante, es necesario destacar que la mayoría de las series reportadas son muy heterogéneas. Muchos de estos trabajos se han realizado en población asiática²⁰⁸⁻²¹⁵ otros incluyen casos de CM de aparición temprana^{204,208} o pacientes con historia familiar de CM y/o CO^{199,201} (Tabla 3).

Tabla 3: Prevalencia de mutaciones encontradas en los genes *BRCA1/2* en pacientes con CME

Referencia	País	N muestras	Edad Dx	<i>BRCA1</i> (%)	<i>BRCA2</i> (%)	Total (%)
Europa						
Thorlacius ¹⁹³ (1997)	Islandia	632	Todas	-	7,7	-
García-Patiño ¹⁹⁴ (1998)	España	105	Todas	5,7	-	-
De San José ¹⁹⁵ (2003)	España	136	<46	0,7	5,9	6,6
Martínez-Ferrandis ¹⁹⁶ (2003)	España	124	<41	0,8	4,8	5,6
Bonadona ¹⁹⁷ (2005)	Francia	232	<46	6,5	2,6	9,1
Peto ¹⁹⁰ (1999)	G. Bretaña	254	<36	3,5	2,4	5,9
Anglian ¹⁹⁸ (2000)	G. Bretaña	1.435	<55	0,7	1,3	2,0
Van der Looij ¹⁹⁹ (2000)	Hungría	500	Todas	3,4	0,2	3,6
Papelard ²⁰⁰ (2000)	Hungría	642	27-91	1,6	-	-
Syrjakoski ²⁰¹ (2000)	Finlandia	1.035	Todas	0,4	1,5	1,8
Loman ²⁰² (2001)	Suecia	234	<41	6,8	2,1	9,0
Foster ²⁰³ (1996)*	Caucásicas	50		-	4,0	-
América						
Malone ²⁰⁴ (2000)	EE UU	203	<35	5,9	3,4	9,4
Tonin ²⁰⁵ (2001)	Canadá	61	<40	6,6	6,6	13,2
Malone ²⁰⁶ (2006)	EE UU	1.628	35-65	2,4	2,3	4,7
Australia						
Hopper ²⁰⁷ (1999)	Australia	388	<40	2,3	2,3	4,6
Asia						
Katagiri ²⁰⁸ (1996)	Japón	103	<35	3,9	-	-
Emi ²⁰⁹ (1998)	Japón	1.000	Todas	0,8	-	-
De Leon ²¹⁰ (2002)	Filipinas	294	25-64	1,0	4,1	5,1
Liede ²¹¹ (2002)	Paquistán	341	Todas	4,4	2,3	6,7
Han ²¹² (2006)	Corea	793		-	-	2,5
Seo ²¹³ (2004)	Corea	97	35-73	2,0	1,0	3,0
Kim ²¹⁴ (2005)*	Corea	37		2,7	0	1,35
Choi ²¹⁵ (2004)	Corea	60	<40	10	8,3	15

N: número; **Dx:** Diagnóstico; *****: estudios realizados en pacientes con cáncer de ovario

La prevalencia media de mutaciones detectada en los genes *BRCA1/2* en pacientes con CMOE varía desde el 1,35% en pacientes con CO esporádico²¹⁴ hasta el 15% en coreanas con CME²¹⁵. Destacar el estudio realizado por Han *et al*²¹² en 793 coreanas con CME sin antecedentes familiares donde la prevalencia de mutaciones detectada fue de 2,5%. La prevalencia media aumenta al 8,2% (rango: 4,6-15,0%) en las series que incluyen CM de aparición temprana (<46 años)¹⁹⁵⁻

^{197,190,202,207,208,215}. Cuando se consideran todos los CMs de las pacientes de todas las series estudiadas sin tener en cuenta la edad al diagnóstico, el porcentaje de mutaciones se reduce al 4,3% ^{193, 194, 199, 201, 209-211, 213}. La mayoría de estos estudios adolecen de no excluir a las pacientes con historia familiar de CM/CO, lo que limita el valor de sus resultados. Si se excluyen las pacientes con CM precoz, diagnosticado antes de los 35 años, la prevalencia de mutaciones en CME se aproximaría a un 3%.

Dos grandes estudios realizados en cohortes de población europea, como son el de Anglian BCSG¹⁹⁸ en una serie de 1.435 CME de población inglesa y el de Syrjakoski *et al*²⁰¹ efectuado en 1.035 finlandesas, han estimado la prevalencia de mutaciones *BRCA1/2* en pacientes con CME en 2% y 1,8%, respectivamente. No obstante, la prevalencia neta de ambos estudios es claramente inferior cuando se excluyen las pacientes con CM diagnosticadas antes de 35 años. Así, en el primero el porcentaje de mutaciones se reduce del 2% a 1,37%. En el segundo estudio²⁰¹ cuando se eliminan los CM diagnosticados a edad temprana y pacientes con antecedentes familiares, la prevalencia queda en un 0,5%.

5.1. PREVALENCIA DE MUTACIONES EN CME EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA

Las cifras de prevalencia aportadas no son comparables con las de nuestro estudio ya que no incluyen población caucásica y menos aún española. Los estudios realizados en otras poblaciones solo son orientativos de lo que puede suceder en nuestra población, ya que la

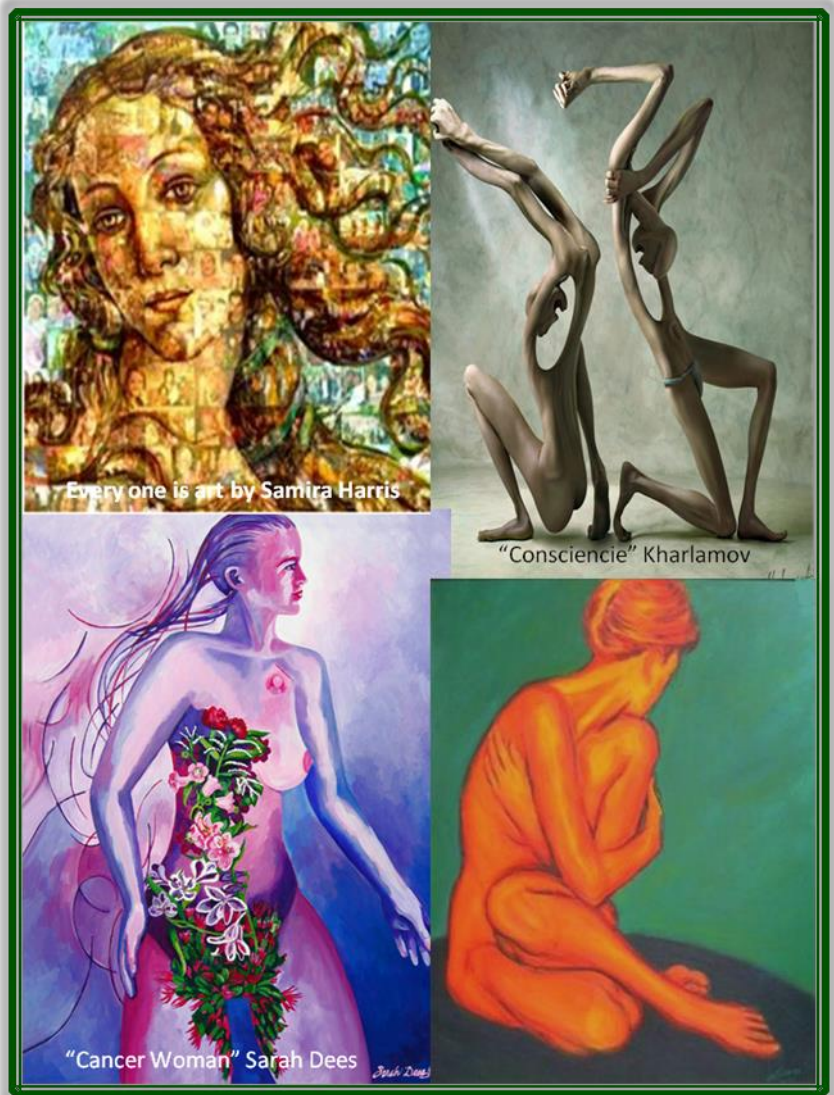
prevalencia y el espectro de mutaciones varían en gran medida con el grupo étnico y área geográfica estudiada^{216,217}.

De los estudios realizados en población española¹⁹⁴⁻¹⁹⁶, la prevalencia media de mutaciones es de casi un 6%, si bien hay que señalar que los estudios se realizaron en mujeres jóvenes y en uno de ellos sólo se incluyó el rastreo de mutaciones en *BRCA1*. El espectro de mutaciones dentro de España también varía entre las Comunidades²¹⁸, donde cabe destacar la existencia de una mutación fundacional gallega (330A>G)²¹⁹. Así, la mutación fundacional 187_188delAG presenta una gran prevalencia en el área de Levante mientras que no se detecta en Castilla-León²²⁰ y la mutación 9254_9258del de *BRCA2* tiene una recurrencia mayor en la Comunidad Valenciana y Cataluña que en otras Comunidades²²¹.

El estudio de mutaciones en *BRCA1/2* ya no tiene relevancia genética por el mayor riesgo a desarrollar CM y/o CO que confiere la presencia de la mutación, sino que ahora cobra importancia porque las pacientes²²² o CO²²³ portadoras de mutación tienen una mayor sensibilidad al tratamiento con los inhibidores del PARP. Actualmente, hay otros agentes inhibidores de PI3K, de AKT y de mTOR en desarrollo clínico^{224,225}. Aunque estas moléculas bloquean diferentes elementos dentro de la vía de señalización celular PI3K/Akt, su diferente selectividad puede tener distinto impacto terapéutico en pacientes con CM.

En la actualidad, los estudios de estas mutaciones en todos los CM y CO no resultan asumibles dada la extensión y complejidad de las

determinaciones. No obstante, la incorporación de nuevos métodos de alto rendimiento, como es el HRM o la NGS, que permitan reducir el tiempo de análisis y los costes, podrían permitir el estudio mutacional de *BRCA1* y *BRCA2* en un mayor número de pacientes con CM y/o CO.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El CM es la neoplasia más frecuente en la mujer, con una incidencia mundial de 1.384.155 casos nuevos al año. En España, se diagnostican aproximadamente 14.900 nuevos casos de CM anuales y representan el 30% de los cánceres en la mujer^{6,8}. En la Comunidad Valenciana, se diagnostican alrededor de 1.920 CM anuales. Entre 85-95% de los CM son esporádicos, lo que supone aproximadamente 13.000 nuevos casos de CME al año en España y 1.700 CME en nuestra comunidad⁹.

La prevalencia de mutaciones en los genes *BRCA1/2* en las pacientes con CME hasta ahora descrita varía dependiendo del grupo étnico y su localización geográfica, oscilando entre el 3,0-5,7%¹⁹³⁻²²¹. Los escasos estudios realizados al respecto no presentan uniformidad en la aplicación de los criterios para la selección de familias incluyendo con frecuencia, pacientes con CM de aparición temprana, antecedentes familiares de CM o procedentes de poblaciones no caucásicas¹⁹³⁻²¹⁵.

La prevalencia de mutaciones en los genes *BRCA1/2* en las pacientes españolas con CME se desconoce, siendo necesarios nuevos estudios que evalúen la prevalencia real de estas mutaciones en el CM carente de antecedentes familiares en nuestra población. De confirmarse una prevalencia similar a la descrita para otras poblaciones (5%)¹⁹³⁻²¹⁵, se estima que unas 650 mujeres con CM serían portadoras de mutaciones en *BRCA1/2* en la población española, de las cuales entre 51-100 pacientes pertenecerían a la Comunidad Valenciana. El número

de portadoras de mutación en los genes *BRCA1/2* detectadas en los pacientes con CME podría ser similar al de las mutaciones detectadas anualmente en pacientes con historia familiar de CM/CO en el Programa de Consejo Genético en Cáncer Hereditario de la Comunidad Valenciana (PCGCHCV)^{9,10}.

Las pacientes portadoras de mutación *BRCA1/2* detectadas en los CME pasarían a engrosar el número de casos de CMOH del PCGCHCV. La inclusión de estas pacientes en el PCGCHCV implica la identificación de portadores de mutaciones en sus familiares y con ello la ventaja de la detección precoz del CM en los mismos; además del beneficio del empleo de tratamientos específicos con inhibidores del PARP en las pacientes con CO y mutación en *BRCA1/2*.

La presente tesis pretende evaluar la prevalencia de las mutaciones en los genes *BRCA1/2* en un amplio grupo de pacientes con CME de la Comunidad Valenciana. Este propósito exige el desarrollo y la aplicación de nuevas tecnologías de alto rendimiento que permitan detectar de manera rápida y sencilla las variaciones genéticas y en concreto, las mutaciones de *BRCA1/2* de un gran número de muestras. El método de cribado de HRM aplicado en este estudio reúne las características adecuadas para el procesamiento de un gran número de muestras en un corto intervalo de tiempo.

2. OBJETIVOS

Los objetivos que se plantean y se pretenden alcanzar en esta tesis son los siguientes:

1. Estudio de la prevalencia y espectro de mutaciones de los genes *BRCA1/2* en 513 pacientes con CME de la Comunidad Valenciana.
2. Desarrollo de un método de HRM eficaz para el cribado de mutaciones puntuales descritas en la población española en los genes *BRCA1/2*, y capaz de analizar un elevado número de pacientes en el mismo ensayo.
3. Estudio comparativo entre los resultados obtenidos con el nuevo método de HRM y los obtenidos con el convencional, CSGE, en un grupo de pacientes con CMOH en términos de precisión, sensibilidad, capacidad discriminante, tiempo y coste. Las discrepancias entre los métodos de cribado se solventarán aplicando el método de referencia, la secuenciación de Sanger¹¹⁷.
4. Correlación de las características clínico-patológicas de las pacientes con los hallazgos moleculares detectados en los genes *BRCA1/2*.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. PACIENTES

El grupo de estudio incluye un total de 513 pacientes con CME reclutadas desde enero del 2007 hasta septiembre del 2012. Se han considerado como CME las pacientes que no cumplan los criterios de inclusión establecidos en el PCGCHCV⁹ (Tabla 4).

Tabla 4: Criterios de inclusión familiar establecidos en el PCGCHCV para estudio de mutaciones en *BRCA1/2*

Familias con un único caso de CM:

- CM diagnosticado antes de los 30 años
- CM bilateral diagnosticado antes de los 40 años
- CM y CO en la misma paciente

Familias con dos casos de CM en familiares de primer grado:

- Dos CM diagnosticados, al menos uno antes de los 40 años o bilateral
- Dos o más casos de CO
- Un CM y un CO en dos familiares, o
- Un CM en mujer y otro CM en un varón

Familias con tres o más casos de CM, y al menos dos en familiares de primer grado.

Familiar de primer grado: madre, hija o hermana

Todas las pacientes que participaron en este proyecto fueron informadas del estudio y firmaron el consentimiento informado aprobado por el comité ético del HUIP La Fe. El reclutamiento de estas pacientes se ha realizado en las consultas de Cirugía del HUIP La Fe y del Instituto valenciano de Oncología (IVO) de Valencia; así como de los Servicios de Oncología Médica del HUIP La Fe, IVO, Hospital 9 de Octubre de Valencia, Hospital Lluís Alcanyís de Xàtiva y Hospital General de Elche.

De cada paciente se han recopilado los datos demográficos, la función ovárica, las características anatómo-patológicas del tumor (TNM, tipo y grado histológico), histopatología, y los marcadores IHQ (RE, RP, HER-2/NEU) (Tabla 5).

Tabla 5: Características demográficas y anatómo-patológicas de las pacientes con CME

Parámetro	Mediana	Rango	
Edad	54	30-87	
Parámetros	Tipos	N. casos	Porcentaje (%)
Función Ovárica	Premenopáusica	167	34,6
	Menopáusica	71	14,7
	Posmenopáusica	244	50,6
Histopatología	CDI	376	73,2
	CLI	45	8,8
	CM bilateral	41	8,0
	CO	15	2,9
	CTI	5	1,0
	CM+CO	3	0,6
	Otros CM	29	5,6
T	0	3	0,6
	1	284	60,7
	2	136	29,1
	>2	45	9,7
N	Neg	266	57,8
	Pos	194	42,2
M	Neg	449	95,1
	Pos	23	4,9
GD	I	121	31,6
	II	169	44,1
	III	93	24,3
RE	Neg	119	25,7
	Pos	344	74,3
RP	Neg	155	34,0
	Pos	301	66,0
HER2	Neg	198	46,0
	Pos	232	54,0

CDI: carcinoma ductal infiltrante; CLI: carcinoma lobulillar infiltrante; CM: cáncer de mama; CO: cáncer de ovario; CTI: carcinoma tubular infiltrante; T: Tamaño; N: Nº de ganglios; M: presencia de metástasis; GD: Grado histológico; RE: Receptores de estrógenos; RP: Receptores de progesterona; Neg: Negativo; Pos: Positivo

1.2. MUESTRAS

Los estudios moleculares de las 513 pacientes con CME se han realizado a partir de ADN aislado de las muestras de sangre venosa extraída en los hospitales de origen de cada paciente, que se remitieron al laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Análisis Clínicos del HUIP La Fe de Valencia.

Asimismo, se han empleado 99 controles positivos (C+) de ADN de portadores de mutación en los genes *BRCA1/2* (46 en *BRCA1* y 53 en *BRCA2*), que cubren la práctica totalidad del espectro de mutaciones (99 de 110; 90%) descrito en población española^{145,226,227,228,229,230,231} (Documentos Anexos: apartado 2). Los C+ provienen de los siguientes laboratorios implicados en programas de consejo genético en cáncer (PCGC): Hospital San Pau de Barcelona, Centro Nacional de Investigación Oncológica de Madrid, Instituto de Biología y Genética Molecular de Valladolid, Hospital Clínico de Madrid, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica de Galicia y Hospital Universitario de Salamanca y nuestro laboratorio, Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario La Fe. La mutación presente en todos los C+ empleados en este estudio se ha confirmado mediante secuenciación¹¹⁷ en el Laboratorio de Biología Molecular.

También se ha incluido una colección de 52 muestras de pacientes con CMOH que habían sido estudiadas en nuestro laboratorio mediante CSGE y han sido reprocesadas con la nueva metodología de HRM desarrollada.

2. MÉTODOS

2.1. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se ha realizado a partir de sangre venosa anticoagulada con ácido K₃-etilendiaminotetracético (EDTA) empleando el kit comercial *“UltraClean® Blood DNA Isolation Kit”* (Tio MolBiol) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se trata de un procedimiento manual que aísla el ADN por precipitación.

2.2. CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN

La cantidad y calidad del ADN obtenido se ha cuantificado mediante espectrofotometría en el NanoDrop ND-1000, considerando como muestras de calidad aceptable aquellas con ratio 260/280 entre 1,8 y 2,0. Valores < 1,8 indican contaminación proteica y valores > 2,0 indican contaminaciones con fenol. Los ADN cuantificados se han diluido a una concentración final de 20 nanogramos (ng) ADN/microlitro (μL) y se han almacenado a -20°C hasta el momento de la determinación.

2.3. CRIBADO DE MUTACIONES MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES SENSIBLES A CAMBIOS DE CONFORMACIÓN

La CSGE es una metodología de mediano rendimiento fundamentada en la diferente movilidad electroforética que presentan los HE y/o HO frente a las muestras WT en una electroforesis vertical empleando geles medianamente desnaturalizantes^{138,144}. El método requiere una primera etapa de PCRs múltiples (Documentos Anexos:

apartado 3, Tablas A.3 y A.4) para la obtención de los amplicones. Después se procede a la desnaturalización de los productos de PCR para promover la formación de HE/HO y su separación mediante CSGE^{138,232}.

Se han empleado 66 parejas de cebadores para el cribado completo de los genes *BRCA1/2*, 28 para *BRCA1* y 38 para *BRCA2*. Los cebadores y condiciones utilizadas para las PCRs múltiples son las descritas por Esteban *et al*^{144,232} (Documentos Anexos: apartado 3).

Para la formación de los HE/HO, los amplicones de PCR se someten a un gradiente de temperaturas. El programa empleado contempla una desnaturalización seguida de una lenta renaturalización (Documentos Anexos: apartado 3, Tabla A.6). A continuación, se ha realizado la CSGE (Documentos Anexos: apartado 3, Tabla A.7). Finalizada la electroforesis se efectúa la tinción argéntica del gel para visualizar los patrones de bandas de cada muestra. El patrón alterado de una muestra se identifica comparándolo con el patrón de una muestra WT. La caracterización del patrón anómalo se realiza mediante la secuenciación del producto de PCR en el que se detectan los HE.

2.4. CRIBADO DE MUTACIONES MEDIANTE EL ANÁLISIS DE CURVAS DE FUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN

El método de cribado basado en el análisis de las curvas de fusión de alta resolución, HRM, es un método de elevada sensibilidad, rapidez y rendimiento¹⁶⁴.

2.4.1. Fundamento del High Resolution Melting

El HRM se fundamenta en la realización, en un único paso y sin manipulación de la muestra, de la PCR a tiempo real seguida de una etapa de formación de los HE/HO y de un aumento progresivo de la T^a hasta la total desnaturalización del fragmento amplificado^{161,164} (Figura 10). En este proceso se incluye un intercalante de nueva generación, *ResoLight* (Roche), que satura la hebra de ADN sin afectar la actividad de la Taq polimerasa. Estas propiedades del intercalante permiten detectar pequeñas variaciones en la T_m de los fragmentos amplificados y, consecuentemente, identificar la presencia de variaciones moleculares en las muestras estudiadas.

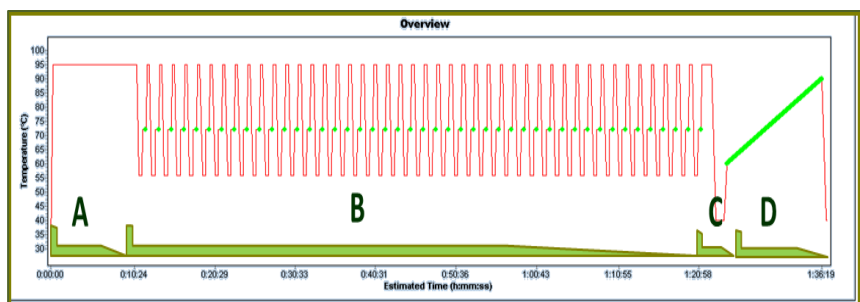


Figura 10: Etapas del HRM: A) Activación de la enzima. B) Ciclos del PCR. C) Formación de HE/HO. D) Aumento de la T^a hasta la desnaturalización completa del amplicón (curva de *melting*)

2.4.2. Diseño de los cebadores

El diseño de los cebadores para el estudio de las mutaciones descritas en la población española en *BRCA1/2* se ha realizado aplicando el *software* Primer3²³³. Los criterios establecidos para la selección de las parejas de cebadores han sido que el tamaño del fragmento amplificado fuera menor de 350 pb, la T^a de hibridación estuviera alrededor de 56°C

y que los programas *meltsim*²³⁴ y *poland*²³⁵ estimaran que el número máximo de picos de *melting* no sobrepasara de dos. Adicionalmente, los cebadores seleccionados han sido testados en el programa BLAST²³⁶ para confirmar la especificidad de los mismos. Las secuencias de oligonucleótidos han sido sintetizadas por Tib MolBiol (Alemania) con una calidad molecular estándar.

Los tamaños y las condiciones de amplificación de los 49 fragmentos (23 para *BRCA1* y 26 para *BRCA2*) se detallan en los Documentos Anexos: apartado 4, Tablas A.8 y A.9.

2.4.3. Equipos y reactivos empleados en el método de HRM

a. Equipos

La dispensación de reactivos y muestras, en placas de 96 o de 384 pocillos, se ha realizado empleando el robot EpMotion 5070 (Eppendorf).

El HRM se ha efectuado en la plataforma de PCR en tiempo real LightCycler 480® (LC 480) v.1.5 (Roche Life Science).

b. Reactivos

El reactivo empleado, "***LightCycler® 480 High Resolution Melting Master Mix***" (Roche Life Science) x2, contiene la Taq ADN polimerasa *Fast Start* y el intercalante de alta resolución, *ResoLight*, en un tampón de reacción que no contiene MgCl₂. Este reactivo es compatible con la adición de dimetil sulfóxido (DMSO), empleado para mejorar la

amplificación de secuencias ricas en CG. Además contiene una solución madre de MgCl_2 a 25 milimolar (mM), que permite optimizar fácilmente la concentración de Mg^{2+} cuando se requiere.

En la optimización del HRM además “**LightCycler® 480 High Resolution Melting Master Mix**”, también se evaluó el reactivo “**MeltDoctor™ HRM Master Mix**” (Life Technologies) que contiene el intercalante de alta resolución *SYTO9*.

El resto de equipos y reactivos empleados se describen en Documentos Anexos: apartados 3 y 4.

c. Condiciones de la mezcla de reactivos

El volumen final de reacción establecido varía dependiendo de la placa empleada, 10 μL para placas de 96 pocillos y 7 μL para las de 384 pocillos. Se ha seleccionado la concentración mínima de cebador para obtener un producto de PCR óptimo y la concentración mínima de MgCl_2 necesaria para prevenir la formación de picos de *melting* inespecíficos realizando ensayos seriados a distintas concentraciones de cebadores y MgCl_2 . Para la amplificación de todos los fragmentos se han empleado dos concentraciones de cebadores y MgCl_2 diferentes: 0,2 micromoles (μM) de cebadores y 2,5 milimoles (mM) de MgCl_2 o 0,3 μM de cebadores y 3,0 mM de MgCl_2 (Tabla 6). Además, con el fin de evitar la formación de picos múltiples e inespecíficos en la curva de *melting* se ha adicionado un 5% de DMSO en la mezcla de reactivos en los productos de PCR que presentaban estos problemas.

Tabla 6: Mezclas de reactivos y concentraciones empleadas:

Reactivos	Concentraciones	Volumen (μL) placa 96	Volumen (μL) placa 384
LightCycler® 480 HRM x 2	1x	5	3,5
Cebador Forwad (8 μM)	0,2/0,3 μM	0,25/0,38	0,17/0,26
Cebador Reverse (8 μM)	0,2/0,3 μM	0,25/0,38	0,17/0,26
MgCl ₂ (25mM)	2,5/3 mM	1/1,2	0,8/0,96
H2O		1,5/1,05	0,36/0,02
Volúmen mix reactivos/pocillo		8	5
ADN (15-20 ng/ μL)		2	2

d. Muestras procesadas

En cada ensayo de PCR se ha incluido un blanco de reactivo, 40 ng de ADN de la muestra WT, C+ correspondientes y muestras a ensayar.

Para la puesta a punto y optimización del método (ADN WT y C+) y en el procesado de las primeras 100 muestras de CME los ensayos se han realizado por triplicado. La buena reproducibilidad de los resultados obtenidos ha permitido efectuar los ensayos restantes, comparación de los métodos de HRM y CSGE y procesado de las 413 muestras de CME restantes, por duplicado.

e. Programa de PCR

Se ha empleado un único programa de PCR para la amplificación de todos los fragmentos. El programa consta de cuatro etapas: 1) etapa de activación de la enzima [10 minutos (min)]; 2) etapa de amplificación, con T^a de hibridación constante (56°C) y medida de fluorescencia en la etapa de elongación de cada ciclo. 3) Etapa de formación de los HE y

curva de desnaturalización de alta resolución (65°C → 90°C) con una medida continua de la fluorescencia (25 adquisiciones/°C). 4) etapa de enfriamiento de la placa (Tabla 7).

Las lecturas de la luz emitida se han efectuado a 533 nm, correspondiente con la longitud de onda emitida por el *ResoLight*.

Tabla 7: Programa de PCR común para la amplificación de todos los fragmentos de *BRCA1* y *BRCA2*

Parámetros	Etapa 1	Etapa 2			Etapa 3				Etapa 4
Denominación	Activación	Amplificación			HE + Fusión				Enfriamiento
Nº Ciclos	1	45			1				1
Temperatura [°C]	95	95	56	72	95	40	65	90	40
Tiempo [s]	600	10	13	14	60	60	1		10
Adquisición F	-	-	-	Puntual	-	-	-	continua	-
Ramp rate [°C/s]	4,4	4,4	2,2	4,4	4,4	1,5	1	0,04	1,5
Adquisiciones por °C					25				

2.4.4. Análisis de los resultados:

Los datos obtenidos se han analizado empleando tres módulos informáticos incorporados en el programa LC 480 v.1.5 y se detallan a continuación:

1. **Cuantificación Absoluta:** Calcula el *Crossing point* (Cp) de cada una de las muestras y estima la media y desviación estándar de los duplicados. A este respecto se ha considerado que el producto de PCR presenta un crecimiento óptimo y valorable cuando Cp ≈ 20-30 ciclos y la intensidad de fluorescencia (IF) > 20 unidades de fluorescencia (UF) (Figura 11A).

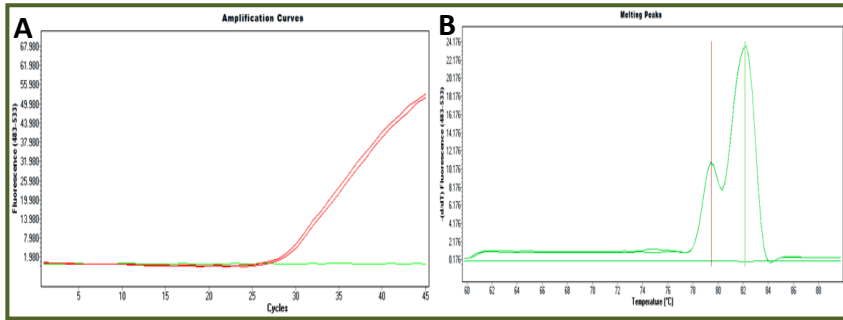


Figura 11: A) Curva de amplificación ($C_p=28$ e $IF=50$) y B) Picos de melting ($T_m1: 79,5^{\circ}C$ y $T_m2= 82^{\circ}C$) del fragmento 11c de *BRCA1*

2. ***T_m Calling***: Estima la T_m de cada una de las muestras a partir de la primera derivada de la curva de disociación. Se ha considerado que la amplificación es adecuada cuando el fragmento presenta un único pico de *melting*, simétrico o no, y, excepcionalmente, dos picos (Figura 11B).

3. ***Gene Scanning***: Estima la diferencia de T^{Δ} (*Difference plot*, DP) entre los puntos de la curva de disociación tomando una de las muestras como referencia o línea base respecto a cada una de las muestras restantes. Las muestras similares presentan curvas muy similares, mientras que las que presenten alguna alteración, mostraran una forma o perfil diferente a la línea base. El programa permite la agrupación o clasificación de las muestras de acuerdo con el perfil de las curvas de fusión. El módulo informático del *Gene Scanning* consta de tres etapas:

3.1. **Normalización** de los valores de fluorescencia en la curva de fusión, antes y después del *melting*. Consiste en ajustar a 100% la fluorescencia emitida antes del *melting* y a

0% la observada tras la desnaturalización completa de las hebras de ADN (Figura 12).

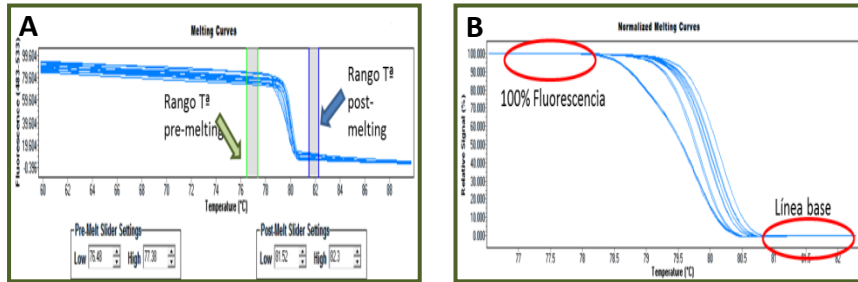


Figura 12: A) Normalización de la curva de *melting* estableciendo el rango pre y post-melting con las barras verticales verdes y azules, respectivamente. B) Resultado de la primera normalización.

3.2. **Desplazamiento de T^a**, establece una línea de corte por debajo de la cual la fluorescencia emitida pasa a considerarse como residual o ruido de fondo. Permite aumentar las diferencias de pendiente entre las curvas con un perfil distinto y disminuir las diferencias entre las curvas de fusión similares (Figura 13).

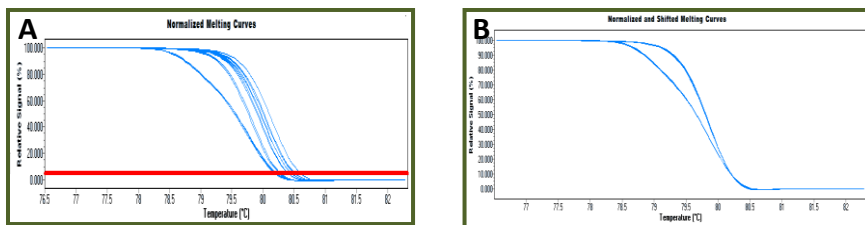


Figura 13: A) Curva de *melting* (Figura 12 B) en la que se establece la línea de corte de fluorescencia. B) Curva resultante tras la segunda normalización.

3.3. **Gráfica diferencial**, tras la normalización el programa toma una de las muestras como línea base y sustrae, al resto, la fluorescencia de ésta en todos los puntos de la curva,

obteniéndose una gráfica con las muestras agrupadas en función de sus alteraciones (Figura 14).

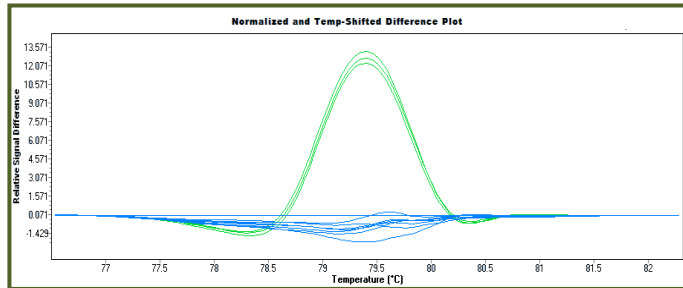


Figura 14: Grafica diferencial: azul: muestras WT; verde: muestras con variación de secuencia respecto al WT

En este estudio se ha considerado que dos muestras son diferentes cuando el DP ≥ 5 unidades relativas de fluorescencia (URF) o cuando los perfiles de las curvas son muy diferentes a pesar de tener un DP < 5 .

2.4.5. Precisión, sensibilidad y capacidad discriminante

La calidad del método se ha establecido evaluando su precisión, sensibilidad y capacidad discriminante.

- **Precisión o repetitividad**, la precisión *intra-ensayo* se ha establecido como la capacidad de reproducir el perfil de los replicados de una muestra en la gráfica diferencial (Figura 15). La precisión *inter-ensayo* se ha considerado como la reproducibilidad del perfil de la curva de una muestra con una variante dada en ensayos diferentes.

- **Sensibilidad**, se ha considerado la capacidad del método para detectar una muestra que presenta una variante genética del ADN WT.
- **Capacidad discriminante**; entendida como la potencialidad del método para distinguir las muestras que presentan diferentes variaciones de secuencia en el mismo fragmento de ADN (Figura 15).

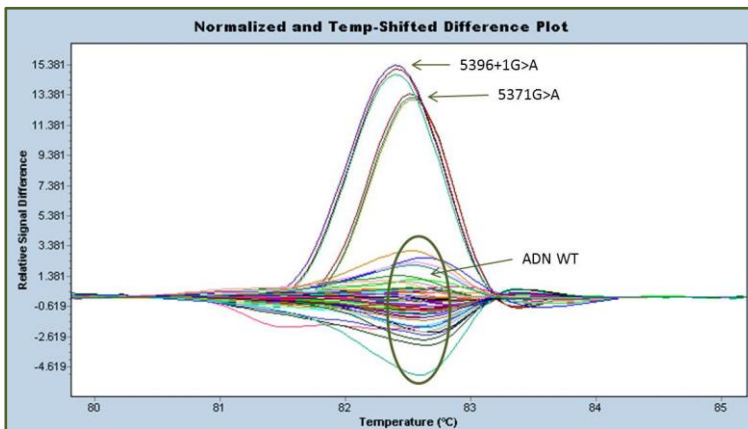


Figura 15: Gráfica diferencial del exón 20 de *BRCA1*. Esta curva muestra la precisión intra-ensayo evidenciada porque todos los replicados presentan curvas superponibles. Así como la sensibilidad del método que permite diferenciar las muestras con variante del ADN WT; y su capacidad discriminante, que permite diferenciar los perfiles de las curvas de dos muestras que presentan variantes diferentes, el C+ con la mutación 5396+1G>A y la P01 que presenta la variante 5371G>A.

2.5. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE HRM Y CSGE

La comparación de los resultados del cribado de mutaciones puntuales en los genes *BRCA1/2* analizados con los métodos de HRM y CSGE se ha realizado en 52 pacientes con CMOH (49 para *BRCA1* y 52 para *BRCA2*) que habían sido estudiados en nuestro laboratorio con CSGE.

Se trata de un estudio retrospectivo y ciego sobre muestras seleccionadas por un colaborador externo que no conocía los resultados previos. El estudio analiza tanto la correspondencia de resultados entre ambos métodos como la relación coste-efectividad de cada uno de ellos. Las discrepancias encontradas entre métodos se han dirimido mediante la secuenciación directa.

2.6. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL ESTUDIO DE LOS CME MEDIANTE HRM

El cribado de mutaciones españolas en los genes *BRCA1/2* se ha realizado en 513 pacientes con CME. El flujo de trabajo ha consistido en la preparación de las mezclas de reactivos a emplear. Las muestras de ADN previamente extraídas se han colocado en el soporte del robot Epmotion 5750, así como las mezclas de reactivos a dispensar y la placa de PCR. Este robot dispensa de las mezclas de reactivos y muestras en la placa de PCR. A continuación, se ha realizado la PCR en el LC 480. Aquellas muestras que tras ser analizadas han presentado un perfil distinto al del ADN WT han sido secuenciadas para tipificar la variación genética presente en las mismas (Figura 16).

La relevancia clínica de las variantes encontradas se ha consultado en las bases de datos¹⁰³⁻¹⁰⁷. Para las VEDs se han aplicado procedimientos *in silico* empleando los programas informáticos que se detallan en Documentos Anexos: apartado 7.

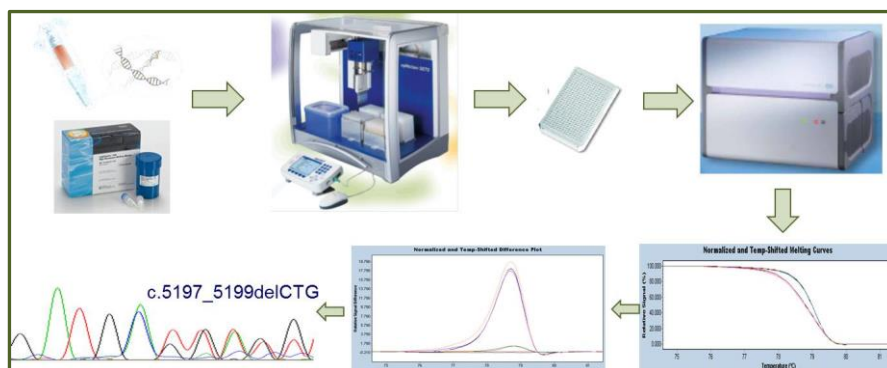


Figura 16: Flujo de trabajo para los pacientes con CME empleando el HRM. Desde la extracción manual del ADN y preparación de las mezclas de reactivos, hasta la secuenciación de la muestra con perfil diferente al del ADN WT.

2.6.1. Detección de la mutación c.1961delA mediante el empleo de sondas de hibridación

La mutación c.1961delA y los polimorfismos c.2077G>A y c.2082C>T ubicados en el exón 11 de *BRCA1* presentan problemas para diferenciarse entre sí. Para solventar este inconveniente se ha diseñado un método basado en el empleo una sonda de hibridación específica de la mutación que permite diferenciarla del polimorfismo (Figura 17, A).

Para ello se han empleado las siguientes sondas de hibridación, la *anchor*, 640-TCACTGCTAGAACAACTATCAATTTGCA, específica de la mutación y la *sensor* TGGTTGTA CTTTTTTTTCTTTATCTC-FL contigua a la *anchor* y propia de la secuencia normal. Tras la realización del HRM y el análisis *Gene Scanning*, se adiciona la pareja de sondas, a una concentración 0,5uM, en los pocillos de la placa que presentan un perfil DP distinto al del WT. A continuación, se realiza un nuevo *melting* específico de las sondas que permite diferenciar las muestras con mutación ($T_m=52,5^{\circ}\text{C}$) de las portadoras del polimorfismo ($T_m=56,5^{\circ}\text{C}$) (Figura 17, B).

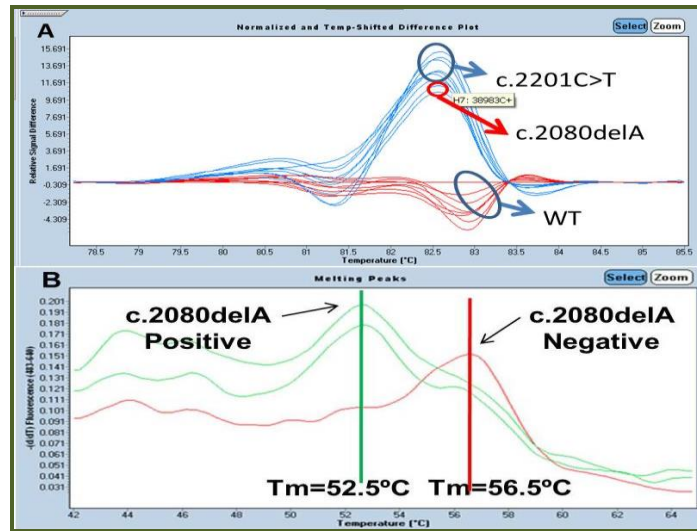


Figura 17: A) Gráfica diferencial del fragmento 11-6 de *BRCA1* la forma de las curvas de la mutación (2080delA) y del polimorfismo es similar entre sí aunque diferentes de la forma del WT. B) Curvas de *melting* de las mismas muestras tras el empleo de sondas de hibridación. Las muestras con mutación presentaron un pico a $T_m=52,5^{\circ}\text{C}$ mientras que la T_m de las muestras sin mutación fue de $56,5^{\circ}\text{C}$

2.7. SECUENCIACIÓN

Se han secuenciado todos los productos de PCR en los que el procedimiento de cribado, CSGE o HRM, ha detectado variaciones genéticas que se diferencian del ADN WT. La secuenciación empleada se basa en el método de Sanger¹¹⁷, que incorpora aleatoriamente los nucleótidos terminadores o dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos diferentes, y efectúa una electroforesis capilar para su identificación. El procedimiento de secuenciación requiere la purificación del producto de PCR empleando el reactivo “*ExoSAP-IT*” (GE Healthcare), que elimina los restos de cebadores del producto de PCR.

A continuación, se ha realizado la reacción de secuenciación empleando el reactivo “*Abi Prism Big Dye Terminator v1.1 cycle*

sequencing kit" (Applied Biosystems) basado en el método de Sanger¹¹⁷. El producto de secuenciación se purifica empleando las columnas "***Performa DTR Gel Filtration Cartridges***" (EdgeBio) y finalmente, ha sido desnaturalizado (96°C, 5 min) y secuenciado.

La reacción de secuenciación se realiza en el secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) con capilares de 50 centímetros empleando los parámetros de carrera que se detallan en Documentos Anexos Tabla A.8. Los datos obtenidos se han analizado con el programa Sequencing Analyzer v.5.2.

2.8. NOMENCLATURA

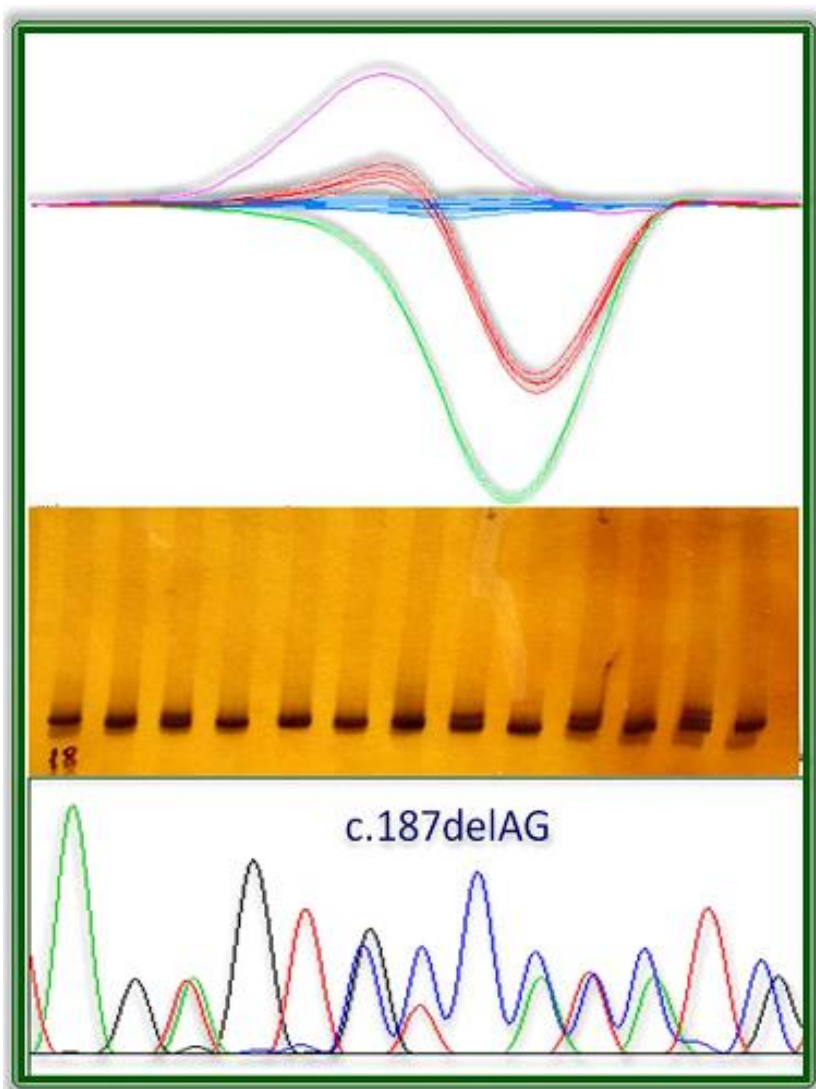
Para la nomenclatura de las alteraciones moleculares se han aplicado las recomendaciones establecidas por den Dunen and Antonarakis²³⁷ y por la HGVS¹⁰⁴ (contabilizando como la primera base la A del codón de iniciación ATG). Las secuencias de referencia empleadas han sido *BRCA1* (NM_007294.3; GI: 237757283) y *BRCA2* (NM_000059.3; GI: 119395733).

2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se han aplicado los siguientes test estadísticos:

- Tablas de contingencia y test Chi-cuadrado (χ^2), se han aplicado para analizar la asociación entre variables cualitativas como son la función ovárica, el tamaño tumoral, etc; con la presencia o no de mutación.
- Coeficiente de correlación bivariado de Spearman se ha empleado para determinar la correlación entre variables categóricas como es la prevalencia de polimorfismos.
- El modelo de regresión logística, se ha aplicado para relacionar las presencia de mutaciones con las características clinico-patológicas de las pacientes tales como la presencia de historia familiar de CM, la edad al momento del diagnóstico, el tamaño del tumor (T1/T>1), etc.

Todos los test han sido de 2 colas estableciendo como límite de significación estadística los valores de p inferiores a 0,05. Los datos se han analizado empleando el paquete estadístico SPSS versión 17.0. (Chicago, IL, USA).



RESULTADOS

1. PUESTA A PUNTO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE ALTO RENDIMIENTO “HIGH RESOLUTION MELTING”

En el presente trabajo de tesis se ha puesto a punto y optimizado el método de HRM de cribado de mutaciones en los genes *BRCA1/2* que permite detectar de la mayoría mutaciones descritas en la población española (90%; 99 de 110). Como se verá en los resultados que siguen, se trata de un método robusto, sencillo, rápido y de alto rendimiento.

1.2. SELECCIÓN DE LOS CEBADORES

El cribado de las 99 mutaciones españolas referidas en *BRCA1/2* requirió la optimización de 49 PCRs (23 para el gen *BRCA1* y 26 para el gen *BRCA2*). Los cebadores seleccionados generaron fragmentos de PCR con un tamaño medio de 191,3 pb (rango: 95-280 pb), libres de dímeros de cebadores y una elevada especificidad. La secuencia y condiciones empleadas para cada uno de estos cebadores se detalla en Documentos Anexos: apartado 4, Tablas A.8 y A.9.

1.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE CEBADORES Y

MgCl₂

Ensayos seriados permitieron seleccionar la concentración mínima de cebador y de MgCl₂ necesarios para obtener un producto de PCR óptimo (Figura 18 A) y para prevenir la formación de picos de *melting* inespecíficos (Figura 18 B y C). Las concentraciones de cebadores y MgCl₂ seleccionadas para la amplificación de los 49 fragmentos fueron 0,2 μM de cebadores con 2,5 mM de MgCl₂ en 32 de los 49 PCRs o 0,3

μM de cebadores con 3,0 mM de MgCl_2 en las 17 PCRs restantes (Documentos Anexos: apartado 4, Tablas A.8 y A.9).

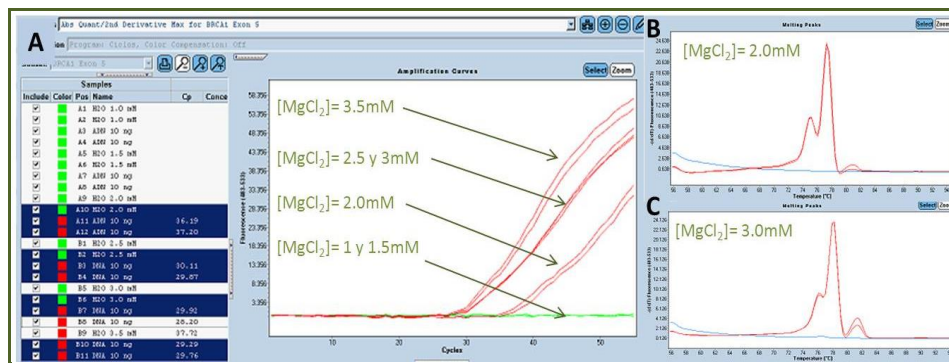


Figura 18: A) Curva de crecimiento del exón 5 de *BRCA1* a diferentes concentraciones de MgCl_2 ; el producto no amplifica a $[\text{MgCl}_2] < 2\text{mM}$; el aumento progresivo de la $[\text{MgCl}_2]$ permite una detección más temprana del producto de PCR. B) Curva con un pico doblete de *melting* para $[\text{MgCl}_2] = 2\text{mM}$. C) Formación de productos inespecíficos consecuencia de un excesivo aumento de la $[\text{MgCl}_2]$, con la consecuente aparición de un segundo pico de *melting* para la $[\text{MgCl}_2] = 3\text{mM}$.

Treinta y dos parejas de cebadores (21 de *BRCA1* y 11 de *BRCA2*) presentaron un crecimiento óptimo del amplicón empleando una concentración de 0,2 μM de cebadores y 2,5 mM de MgCl_2 . Sin embargo, los fragmentos de los exones 5, 12, 19 y 21 de *BRCA1* y el 10-4 de *BRCA2* precisaron la adición de un 5% de DMSO en la mezcla de reactivos con el fin de corregir la formación de picos múltiples e inespecíficos en la curva *melting* (Figura 19).

Las 17 parejas de cebadores restantes (3 de *BRCA1* y 14 de *BRCA2*) alcanzaron un crecimiento óptimo empleando la concentración de 0,3 μM de cebador y de 3,0 mM de MgCl_2 (Documentos Anexos: apartado 4, Tablas A.8 y A.9).

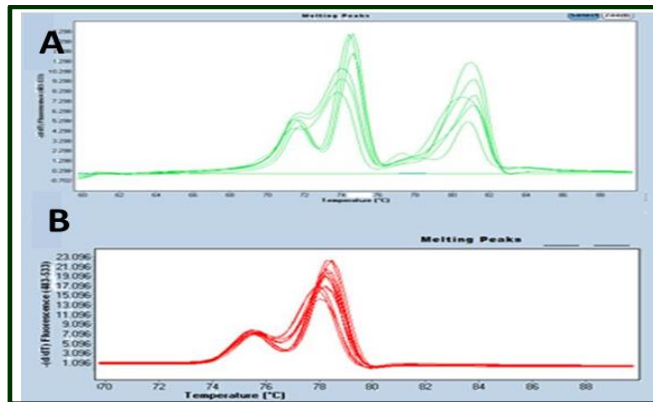


Figura 19: A) Picos de *melting* del exón 5 de *BRCA1* donde se observa el doble pico esperado y un pico inespecífico a una T_m mayor de 85°C. B) Modificación de las curvas y desaparición del pico inespecífico del exón 5 de *BRCA1* tras la adición de DMSO.

En general, bajo las condiciones seleccionadas, las curvas obtenidas para los triplicados de cada muestra fueron reproducibles en todos los fragmentos de PCR, tanto en la curva de crecimiento (Figura 18), presentando valores de C_p similares y desviaciones estándar bajas, como en el T_m del pico (Figura 19).

1.4. OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE PCR

Todos los fragmentos de *BRCA1/2* fueron amplificados aplicando un programa de PCR común. La optimización del programa de PCR supuso modificaciones en el número de ciclos de la amplificación y programa de *melting*. Acortamientos en la fase de *plateau* de 5 ciclos (50→45 ciclos) y en el programa de *melting* de 10°C (60→95°C) permitieron reducir la formación de fragmentos inespecíficos y eliminar artefactos en las curvas de *melting*, favoreciendo el análisis posterior.

1.5. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Se analizaron los 49 productos de PCR empleando los siguientes módulos informáticos de plataforma LC480:

1. **Cuantificación absoluta:** todos los fragmentos optimizados presentaron un valor promedio de $C_p = 24$ ciclos (rango: 20-30 ciclos) y una IF superior a 20 UF (rango: 20-130 UF) (Figura 20).

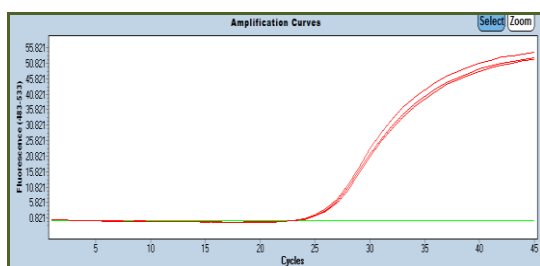


Figura 20: Curva de cuantificación absoluta del exón 8 de *BRCA1* con un $C_p = 26$ y una IF de 55.

2. ***Tm* Calling:** los productos de PCR mostraron una T_m media de $80,7^{\circ}\text{C}$ (rango: $72,3-85,1^{\circ}\text{C}$). La mayoría presentaron un único pico de *melting* simétrico, aunque en quince casos se observó un pico asimétrico, desdoblado o doblete y, excepcionalmente dos picos, ocasionados por la asimétrica distribución de los nucleótidos G/T en el fragmento de PCR (Figura 21).

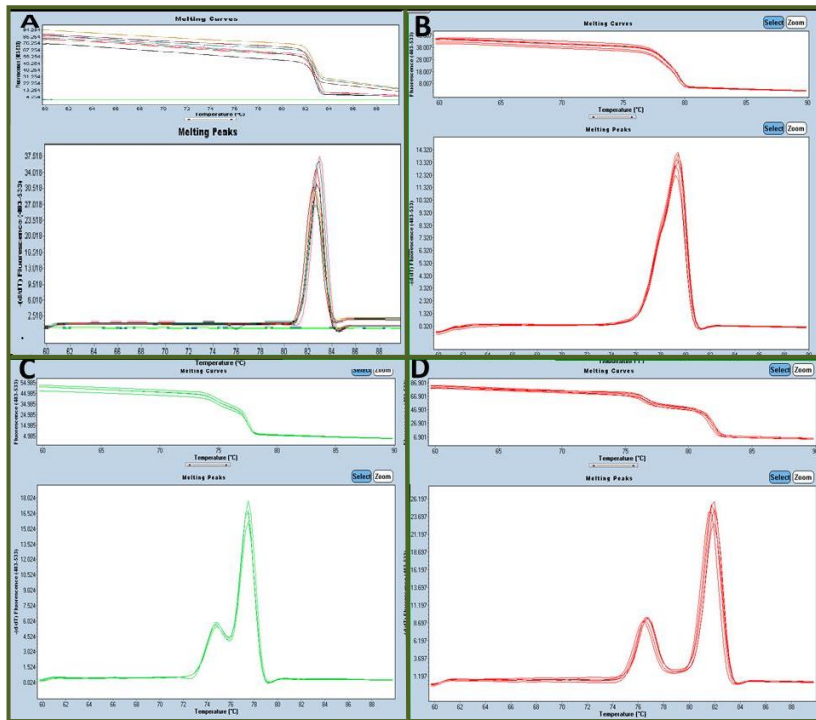


Figura 21: Diferentes perfiles de las curvas y picos de *melting*. A) Curva del exón 8 de *BRCA1* con un dominio de *melting* y pico simétrico con $T_m=83^\circ\text{C}$. B) Curva del exón 7 de *BRCA1* con un dominio y pico asimétrico con $T_m=78,8^\circ\text{C}$. C) Curva del exón 13 de *BRCA2* con dos dominios y pico doblete de *melting* con $T_m=74,5^\circ\text{C}$ y $T_m=77,8^\circ\text{C}$. D) Curva del exón 21 de *BRCA2* con dos dominios y dos picos de *melting* con $T_m=76,5^\circ\text{C}$ y $T_m=82^\circ\text{C}$.

3. **Gene Scanning:** las gráficas diferenciales obtenidas permitieron diferenciar los 99 C+ procesados de las muestras de ADN WT tomadas como línea base (Documentos Anexos: apartado 4, Figuras A.1 y A.2).

1.6. PRECISIÓN, SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL HRM PARA LA DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES ESPAÑOLAS

La optimización del método de HRM permitió alcanzar los niveles de precisión, sensibilidad y especificidad requeridos.

1.6.1. Precisión del HRM

En todos los experimentos, los replicados de una misma muestra presentaron curvas superponibles entre sí obteniéndose una buena precisión intra-ensayo (Figura 22 y Figura 23). Asimismo, el perfil de la gráfica DP para las muestras con una variante determinada se reprodujo con fidelidad en experimentos diferentes, confirmando la buena precisión inter-ensayo.

1.6.2. Sensibilidad del HRM

Se ensayaron dos intercalantes diferentes, el ResoLight (Roche) y el SYTO9 (Life Technologies) seleccionando finalmente el ResoLight por mostrar mejor sensibilidad (datos no presentados).

Para el gen *BRCA1*, el método de cribado de HRM permitió diferenciar las 46 mutaciones estudiadas (Figura 22). El 87% (40/46) de estas mutaciones mostraron curvas con perfiles claramente diferentes al del ADN WT, con $DP > 5$. Las seis mutaciones restantes (c.1672delA, c.1912delG, c.2241delC, c.2389_2390delAG, c.4195_4196delAC y c.5154+5G>A), aunque con una resolución inferior, presentaron un perfil de curvas DP que permitió diferenciarlas de las muestras de ADN WT (Documentos Anexos: apartado 4, Figura A.1, PCRs 8, 9, 10, 11, 17 y 18).

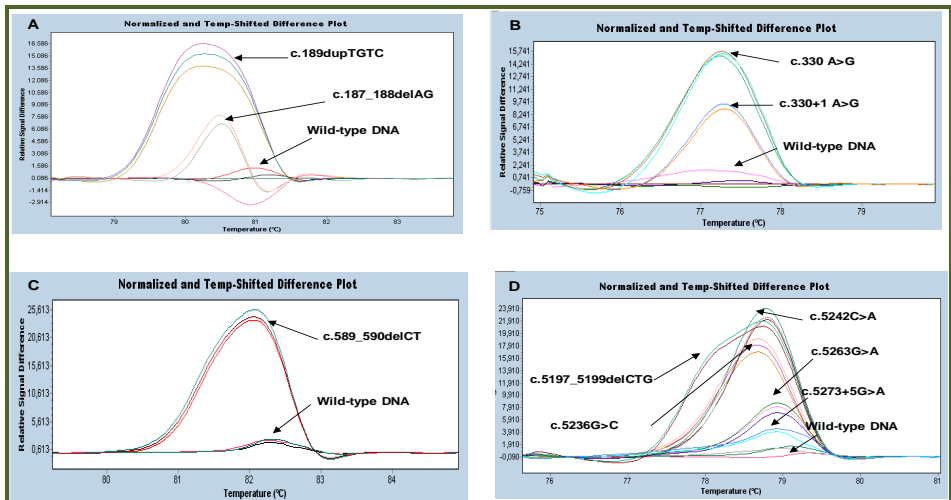


Figura 22: Difference plots de las mutaciones españolas más frecuentes en *BRCA1*. A) Exón 2; B) exón 5; C) exón 8 y D) exón 18, en el que se visualizan los distintos perfiles de curva que presentan cinco C+ diferentes respecto del ADN WT. En estas gráficas se denota la precisión intra-ensayo del HRM, los replicados de las muestras presentan curvas superponibles entre sí. Así como la capacidad discriminante del mismo, muestras con cambios diferentes presentan perfiles de curvas distintos (A, B y C).

Para el gen *BRCA2*, la sensibilidad obtenida para el HRM también permitió la identificación de las 53 mutaciones españolas estudiadas. Todas ellas presentaron DP diferentes a los del ADN WT (Figura 23). El 90,6% (48/53) de estas mutaciones presentaron DP>5. Las cinco mutaciones restantes (c.3146delA, c.3264_3265insT, c.5851_c.5854delAGTT, c.6629_6630delAA y c.7171_7172insA) presentaron un DP<5, aunque sus DP permitieron diferenciarlas de los del ADN WT (Documento Anexos: apartado 5, Figura A.2, PCRs 10,16 y 18).

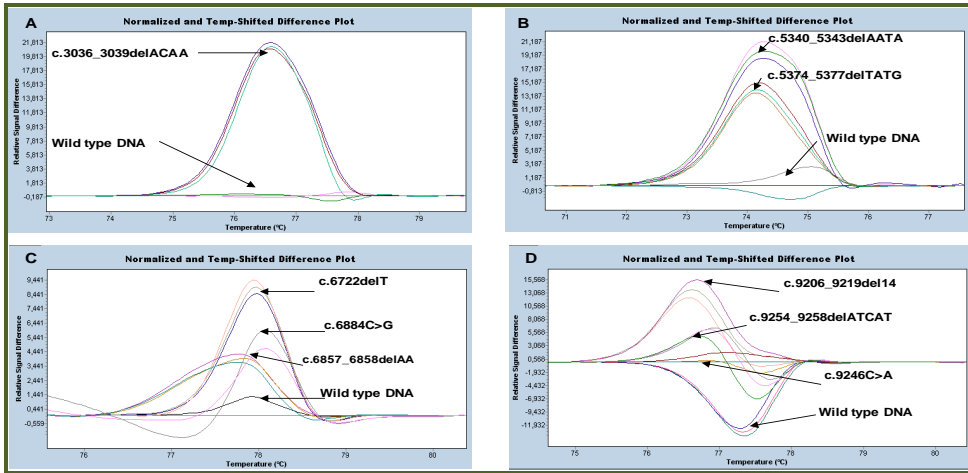


Figura 23: *Difference plots* de las mutaciones españolas más frecuentes de *BRCA2*. A, B y C) Mutaciones españolas del exón 11 (PCR 9, 13 y 18); D) Mutaciones españolas del exón 23.

1.6.3. Capacidad discriminante del HRM

La capacidad discriminante del HRM para *BRCA1* fue adecuada para el 80,6% (25/31) de los C+ localizados en los mismos fragmentos de PCR ya que se distinguieron entre sí exhibiendo DP diferentes (Figura 6 y Documentos Anexos: apartado 4, Figura A.1). Sólo las mutaciones c.1912delG y c.1953_1956del4 en el exón 11, c.4161_4162delTC y c.4167_4168insAG en el exón 12 y c.5117G>A y c.5154+5G>A en el exón 18, presentaron IF y DP similares entre sí, aunque diferentes a las de la curva del ADN WT (Documentos Anexos: Figura A.1, PCRs 10, 16 y 19). Las mutaciones c.4287C>A y c.4305_4306delCT del exón 13, aunque mostraron valores de IF similares, sus DP se diferenciaron fácilmente debido a que sus picos diferían en más de 1°C (Documentos Anexos: apartado 4, Figura A.1, PCR 17).

La capacidad discriminante del HRM para *BRCA2* diferenció el 90,7% (39/43) de las mutaciones presentes en los fragmentos de PCR que albergaron más de una mutación, presentando DP>5. Las curvas de las mutaciones c.6629_6630delAA y c.6656C>G del exón 11, presentaron un DP<5 aunque se diferenciaron por presentar perfiles distintos (Documento Anexos: apartado 5, Figura A.2, PCR 18). Únicamente las mutaciones c.1310_1313delAAGA y c.1448_1449delAGinsTTAC del exón 10 y, c.8032_8033insGA y c.8042_8043delAC del exón 18, presentaron curvas DP no diferenciables entre sí, con perfiles e IF similares, aunque claramente diferentes de las del ADN WT (Documento Anexos: apartado 5, Figura A.2, PCRs 5 y 21).

1.7. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS POR SECUENCIACIÓN

Los estudios de secuenciación, realizados en todas las muestras con curvas de fusión diferentes a las del ADN WT, confirmaron la presencia de la alteración esperada en todos los C+ y la ausencia de variaciones en los ADN WT (Figura 24).

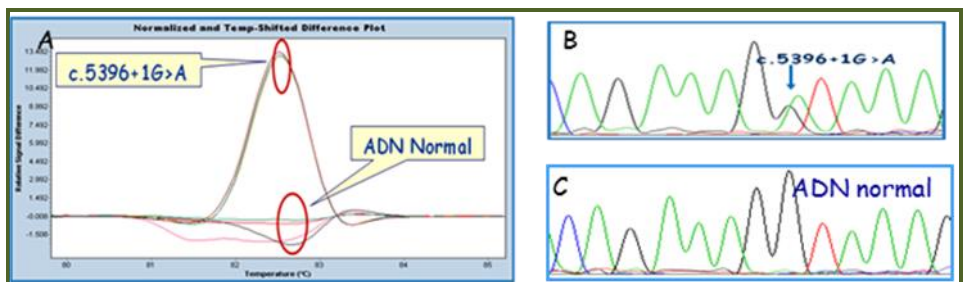


Figura 24: A) *Difference plot* exón 20 *BRCA1*. B y C) Secuencias del exón 20 con mutación española y del ADN *wild-type*, respectivamente.

2. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE HRM Y CSGE

Los resultados de la comparación de los métodos de cribado, CSGE y HRM, reflejan que el HRM tiene una clara superioridad sobre la CSGE tanto en la sensibilidad para detectar variantes genéticas como en el rendimiento global. Así, la CSGE detectó correctamente las variantes genéticas en el 54,4% (315/578) de los productos de PCR amplificados presentando un 45,6% de falsos negativos, en comparación con el 92,9% (537/578) de variantes detectadas y el 7,1% de falsos negativos del HRM.

2.1. VARIANTES DETECTADAS EN *BRCA1*

En los 49 pacientes estudiados para *BRCA1*, se identificaron 23 variantes genéticas: cinco mutaciones patogénicas, dos VEDs y 16 polimorfismos (Tabla 8).

Tabla 8: Variantes genéticas detectadas en *BRCA1* por los métodos de cribado CSGE y HRM

Exón	Variante Genética	Cambio Proteico	Tipo	CSGE		HRM	
				N Het*	N Homo*	N Het*	N Homo*
2	c.68_69delAG	p.Glu23ValfsX17	M	1		1	
6	c.213-12A>G	IVS	M	0		1	
7	c.441+41[C(T) ₆] ₂	IVS	Pol	19		18	
	c.441+41[C(T) ₁₀] ₁	IVS	Pol	19		0	
	c.441+41[C(T) ₅] ₁	IVS	Pol	8		23	
8	c.442-34C>T	IVS	Pol	0		11	
9	c.548-58delT	IVS	Pol	22		24	
10	c.594-52C>T	IVS	Pol	0		1	

Tabla 8: Continuación

Exón	Variante genética	Cambio proteico	Tipo	CSGE Nº &	HRM Nº &		
	c.1067A>G	p.Gln356Arg	Pol	2		3	
	c.1961delA	p.Lys654SerfsX47	M	2		0	
	c.2077G>A	p.Asp693Asn	Pol	4	0	5	1
	c.2082C>T	p.Ser694Ser	Pol	0	0	37	10
	c.2311T>C	p.Leu771Leu	Pol	21		21	
11	c.2611C>T	p.Pro871Leu	Pol	21	0	47	8
	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	Pol	22		23	
	c.3257T>G	p.Leu1086X	M	2		2	
	c.3296C>T	p.Pro1099Leu	VED	1		1	
	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	Pol	1	0	21	7
	c.3640G>A	p.Glu1214Lys	VED	1		1	
13	c.4308T>C	p.Ser1436Ser	Pol	21	2	21	5
16	c.4837A>G	p.Ser1613Gly	Pol	41	21	41	4
17	c.5075-53C>T	IVS	Pol	2		2	
19	c.5154G>A	p.Trp1718X	M	1		1	

(*) Número de muestras con variantes genéticas detectadas por cada método. N Het: número de heterocigotos; N Homo: número de homocigotos; Pol: polimorfismo; M: mutación patogénica; VED: variante de efecto desconocido. En negrita las mutaciones patogénicas. Se hace referencia a la detección de variantes en Het y Homo en aquellos casos que se identifican ambas. Cuando no se especifica el carácter Het/Homo de la variante es porque solo se ha identificado en Het.

Tres de las cinco **mutaciones patogénicas** descritas (c.68_69delAG, c.3257T>G y c.5154G>A) fueron detectadas por ambos métodos. Sin embargo, la mutación c.213-12A>G que fue identificada mediante HRM no se detectó con CSGE. La mutación c.1961delA (p.Lys654SerfsX47), presente en dos pacientes, fue detectada con CSGE y el método de HRM la diferenció del ADN WT, aunque no la pudo distinguir del polimorfismo c.2082C>T presente en ese fragmento del gen (Figura 25, A). En este fragmento además de esta mutación concurren dos polimorfismos muy frecuentes. Sin embargo, la combinación del HRM con una sonda de hibridación específica para la mutación c.1961delA permitió su diferenciación del polimorfismo

c.2082C>T en todos los casos incluidos en el estudio. Las muestras con la mutación se diferenciaron de las que solo presentaron el polimorfismo por las diferencias en sus T_m , que son de 52,5°C para la mutación y 56,5°C para el polimorfismo (Figura 25, B).

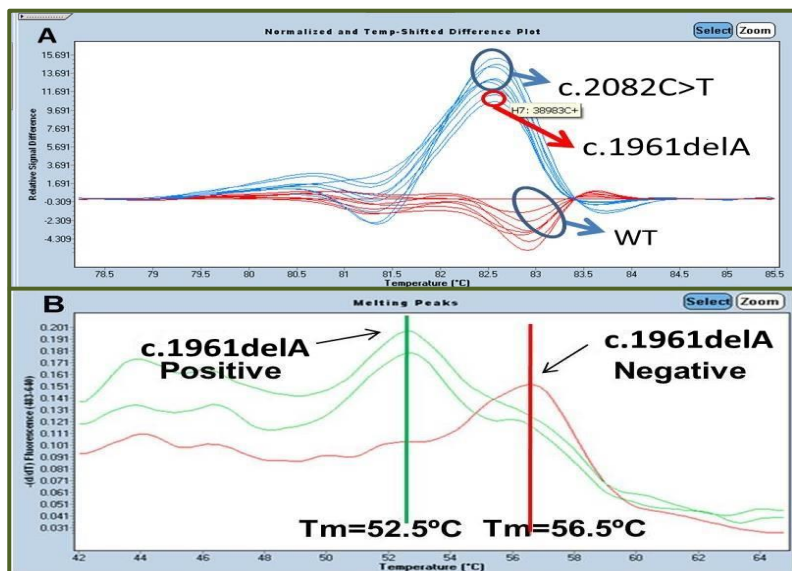


Figura 25: A) Gráfica diferencial del fragmento 11-6 de *BRCA1*; las formas de las curvas de la mutación (c.1961delA) y del polimorfismo (c.2082C>T) son similares entre sí aunque diferentes de la forma del control WT. B) Curvas de *melting* de las mismas variantes tras el empleo de sondas de hibridación. Las muestras con mutación presentaron un pico a $T_m=52,5^\circ\text{C}$ mientras que la T_m de las muestras sin mutación fue de $56,5^\circ\text{C}$

Las dos **VEDs**, c.3296C>T y c.3640G>A (Tabla 8) fueron identificadas por ambos métodos en las dos pacientes portadoras de las mismas.

Se detectaron 16 **polimorfismos**, seis de ellos identificados tanto en Het como en Homo. Los polimorfismos c.442-34C>T, c.594-52C>T, c.2077G>A en Homo, c.2082C>T en Het y Homo, c.2612C>T en Homo y c.3548A>G en Homo solo se detectaron con HRM (Tabla 8). Los 10

polimorfismos restantes fueron detectados por ambos métodos, aunque para los polimorfismos c.441+41[C(T)5]₁, c.548-58delT, c.1067A>G, c.2077G>A, c.2612C>T, c.3113A>G y c.3548A>G el HRM identificó su presencia en un mayor número de pacientes que la CSGE. El c.4837A>G en Homo fue el único polimorfismo que no fue detectado por HRM en todos los casos (Tabla 8).

2.2. VARIANTES DETECTADAS EN BRCA2

En los 52 pacientes estudiados para el gen *BRCA2*, se identificaron 40 variantes genéticas: cuatro mutaciones patogénicas, 13 VEDs y 23 polimorfismos (Tabla 9). El HRM identificó variantes genéticas en todas las muestras, mientras que la GSGE solo las detectó en 45 de las 52 muestras analizadas.

Tabla 9: Variantes genéticas detectadas en *BRCA2* por los métodos de cribado CSGE y HRM

Exón	Variante genética	Cambio proteico	Tipo	CSGE		HRM	
				Het*	Homo*	Het*	Homo*
2	c.-25G>A	5'UTR	Pol	19	2	19	0
3	c.125G>A	p.Tyr42Cys	Pol	1		1	
	c.165_167delCAA	p.Asn56del	VED	1		1	
I-4	c.425+67A>C	IVS	Pol	0		3	
I-6	c.516+14C>T	IVS	VED	2		2	
I-8	c.681+56C>T	IVS	Pol	18	0	19	2
9	c.754G>A	p.Asp252Asn	VED	1		1	
10	c.865A>C	p.Asn289His	Pol	6	0	10	1
	c.1114A>C	p.His372Asn	Pol	0	0	19	2
	c.1365A>G	p.Ser455Ser	Pol	0	0	12	1
	c.1792A>G	p.Thr598Ala	Pol	1		1	
	c.1909+12delT	IVS	VED	0		2	

Tabla 9: Continuación

Exón	Variante genética	Cambio proteico	Tipo	CSGE Nº &	HRM Nº &		
	c.2229T>C	p.His743His	Pol	0	0	6	1
	c.2464T>C	p.Cys822Arg	VED	1		1	
	c.2808_2811delACAA	p.Lys936fs	M	1		1	
	c.2971A>G	p.Asn991Asp	Pol	5	0	5	1
	c.3055C>G	p.Leu1019Val	Pol	1		1	
	c.3170_3174delAGAAA	p.Lys1057fs	M	1		1	
	c.3264_3265insT	p.Pro1088fs	M	2		2	
11	c.3396A>G	p.Lys1132Lys	Pol	0	0	29	3
	c.3807C>T	p.Val1269Val	Pol	0	0	22	2
	c.4068G>A	p.Leu1356Leu	Pol	0		1	
	c.5744C>T	p.Thr1915Met	Pol	1		1	
	c.6220C>A	p.His2074Asn	VED	1		1	
	c.6275_6276delTT	p.Leu2092fs	M	2		2	
	c.6323G>A	p.Arg2108His	Pol	2		2	
	c.6698C>T	p.Ala2233Asp	VED	1		1	
14	c.7242A>G	p.Ser2414Ser	Pol	0		20	
15	c.7601C>T	p.Ala2534Val	VED	1		1	
I-16	c.7806-14C>T	IVS	Pol	0	0	24	11
18	c.7994A>G	p.Asp2665Gly	VED	1		1	
I-18	c.8332-65_67delTGA	IVS	VED	1		1	
22	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	Pol	2		2	
I-23	c.9117+9C>T	IVS	VED	0		1	
I-24	c.9257-16T>C	IVS	Pol	4		4	
I-26	c.9639-115T>G	IVS	VED	0		1	
	c.9889G>A	p.Ala3297Thr	VED	0		1	
27	c.9976A>T	p.Lys3326X	Pol	3		4	
	c.10110G>A	p.Arg3370Arg	Pol	0		1	
	c.10234A>G	p.Ile3412Val	Pol	1		1	

(*) Número de muestras con variantes genéticas detectadas por cada método. N Het: número de heterocigotos; N Homo: número de homocigotos; Pol: polimorfismo; M: mutación patogénica. En negrita las mutaciones patogénicas. Se hace referencia a la detección de variantes en Het y Homo en aquellos casos que se identifican ambas. Cuando no se especifica el carácter Het/Homo de la variante es porque solo se ha identificado en Het.

Ambos métodos detectaron las cuatro **mutaciones patogénicas** diferentes presentes en seis pacientes (Tabla 9).

Nueve de las **VEDs** fueron detectadas por ambos métodos, mientras que las cuatro restantes (c.1909+12delT, c.9117+9C>T, c.9639-115T>G y c.9889G>A) solo fueron identificadas con HRM (Tabla 9).

De los 23 **polimorfismos** identificados en estas pacientes, diez se detectaron tanto en Het como en Homo. Trece polimorfismos se identificaron por HRM y no fueron referidos por CSGE (Tabla 9). Asimismo, los polimorfismos c.681+56C>T, c.865A>C y c.9976A>T aunque detectados por ambos métodos, fueron identificados por HRM en un mayor número de pacientes. Únicamente el polimorfismo c.-25G>A en Homo escapó a la detección con el método de HRM (Tabla 9).

2.3. COSTE-EFECTIVIDAD DE LOS MÉTODOS CSGE Y HRM

El coste por paciente del estudio de los genes *BRCA1/2* mediante CSGE se estimó en 442€, 278€ en gastos de personal (63%) y 164€ en fungible (37%) (Tabla 10). En cuanto al rendimiento, el método de CSGE permitió realizar 22 estudios mensuales de ambos genes contando con una plantilla de un facultativo y dos técnicos de laboratorio.

El coste por paciente del estudio completo por HRM de los genes *BRCA1/2* ascendió a 512€, un 15% más elevado que el CSGE, 191€ en gastos de personal (37%) y 320€ en fungible (63%) (Tabla 10). Si bien, en cuanto al rendimiento, el método de HRM permitió efectuar 30 estudios completos al mes, frente a los 22 de la CSGE, con la misma plantilla de personal.

Tabla 10: Comparación de los gastos y el tiempo empleado en el cribado de los genes *BRCA1/2* por CSGE y HRM

Desglose del gasto	CSGE	HRM	CSGE	HRM
	Coste de 52 muestras (€)		Coste por muestra (€)	
Reactivos				
Reactivos específicos*	8.016	15.588	154,16	299,77
Otros gastos (limpieza, luz, mantenimiento)	520	1.092	10,01	21,00
Subtotal (%)	8.536	16.680	164,17 (37%)	320,77 (63%)
Personal				
Tiempo del estudio	2,2 meses	1,5 meses	31,2 h	26,4 h
2 Técnicos (1800€/mes)	7.920	5.400	164,25	91,35
Facultativo especialista (2500€/mes)	5.500	3.750	114,1	100,27
Subtotal (%)	13.420	9.150	278,35 (63%)	191,62 (37%)
Coste TOTAL <i>BRCA1/2</i>	21.956	25.830	442,52	512,39

* Reactivos específicos CSGE: enzimas Taq, cebadores, SequaGel MD, tinción argéntica, el coste de secuenciación, fungible no específico (puntas pipeta, placas,...). Reactivos específicos HRM: LightCycler 480 HRM Master mix, los cebadores, el coste de la secuenciación, material fungible desechable (puntas pipeta, placas,...).

3. CRIBADO DE LAS MUTACIONES ESPAÑOLAS EN *BRCA1/2* EN LAS PACIENTES CON CME MEDIANTE HRM

En los 513 CME estudiados se identificaron 55 variantes diferentes: 29 en *BRCA1* (Tabla 11) y 26 en *BRCA2* (Tabla 12): nueve mutaciones patológicas, 20 VEDs y 26 polimorfismos.

Tabla 11: Variantes detectadas en *BRCA1* en las pacientes con CME, su prevalencia y repercusión biológica

Exón	Variante Genética	Cambio proteico	Prevalencia (%)		Repercusión biológica
			Het*	Homo*	
I-1	c.1-115T>C	IVS	0,80		Neutra
I-2	c.81-14C>T	IVS	0,20		Neutra
5	c.199G>T	p.Asp67Tyr	0,40		Neutra
	c.211A>G	p.Arg71Gly	0,20		Mutación
7	c.398G>A	p.Arg133His	0,20		VED
I-7	c.442-34C>T	IVS	33,33		Neutra
11a2	c.1067A>G	p.Gln356Arg	12,92	0,80	Neutra
11f1	c.1242C>T	p.Asp414Asp	0,40		Neutra
11f2	c.1534C>T	p.Leu512Phe	0,20		VED/Casi neutra
11e2	c.1866G>A	p.Ala622Ala	0,20		VED
11c1	c.1926T>C	p.Asp642Asp	0,20		VED (No BD)
	c.2311T>C	p.Leu771Leu	39,76	0,60	Neutra
11c2	c.2634A>G	p.AlaA878Ala	0,20		VED
	c.2666C>T	p.Ser889Phe	0,20		VED
11d1	c.2733A>G	p.Gly911Gly	0,20		Neutra (No BD)
	c.3302G>A	p.Ser1101Asn	0,20		Neutra
11d2	c.3418A>G	p.Ser1140Gly	0,20		Neutra
	c.3457C>T	p.Leu1153Leu	0,20		VED (No BD)
11g	c.3481_3491del	p.Glu1161PhefsX3	0,20		Mutación
	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	45,25	13,13	Neutra
11g	c.3848A>G	p.His1283Arg	0,20		VED
12	c.4113G>A	p.Gly1371Gly	0,20		Casi Neutra
13	c.4308T>C	p.Ser1436Ser	46,06	5,25	Neutra
I-17	c.5074+23A>G	IVS	0,20		Neutra (No BD)
18	c.5117G>C	p.Gly1706Ala	0,20		VED/ Mutación
19	c.5158A>G	p.Thr1720Ala	0,60		VED/Neutra
	c.5175A>G	p.Glu1725Glu	0,20		Casi Neutra
20	c.5252G>A	p.Arg1751Gln	0,20		Casi Neutra
	c.5266_5267insC	p.Ser1755SerfsX74	0,20		Mutación

Het: variantes detectadas en heterocigosis; Homo: variantes detectadas en homocigosis; VED: variante de efecto desconocido; BD: bases de datos (BIC, UMD, LODV, HCI-BRCA)

Tabla 12: Variaciones detectadas en *BRCA2* en las pacientes con CME, su prevalencia y repercusión biológica

Exón	Variante genética	Cambio proteico	Prevalencia (%)		Tipo alteración
			Het*	Homo*	
2	c.-25G>A	5'UTR	39,19	5,45	Neutra
3	c.223G>C	p.Ala75Pro	0,40		Neutra
I-4	c.426-89T>C	IVS	6,63		Neutra
10	c.1114A>C	p.His372Asn	33,90		Neutra
	c.1151C>T	p.Ser384Phe	0,40		Neutra
	c.1365A>G	p.Ser455Ser	6,80		Neutra
	c.1792A>G	p.Thr598Ala	0,20		Neutra
I-10	c.1909+12delT	IVS	0,40		Neutra
11	c.2803G>A	p.Asp935Asn	0,20		Neutra
	c.3198T>C	p.Asn1066Ser	0,20		VED
	c.3264_3265insT	p.Gln1089SerfsX10	0,40		Mutación
	c.3885A>G	p.Gln1295Gln	0,20		VED
	c.4936_4939delGAAA	p.Glu1646GlnfsX23	0,20		Mutación
	c.5720_5723delCTCT	p.Ser1907X	0,20		Mutación
	c.5905G>A	p.Val1969Ile	0,20		VED (no BD)
	c.6513C>G	p.Val2171Val	0,20		Neutra
14	c.6613G>A	p.Val2205Met	0,20		VED
	c.7242A>G	p.Ser2414Ser	33,93	4,04	Neutra
17	c.7317A>G	p.Gly2439Gly	0,60		VED (no BD)
	c.7820C>T	p.Thr2607Ile	0,20		VED
18	c.7994A>G	p.Asp2665Gly	0,20		Neutra
	c.8978_8991del	p.Ser2993PhefsX20	0,20		Mutación
	c.9018C>A	p.Tyr3006X	0,20		Mutación
	c.9038C>T	p.Thr3013Ile	0,20		Neutra
23	c.9052_9057delAGTAAA	p.3014_3015delSK	0,20		VED (no BD)
	I-24	c.9256+58A>T	IVS	0,60	VED/Casi neutra

Het: variantes detectadas en heterocigosis; Homo: variantes detectadas en homocigosis; VED: variante de efecto desconocido; BD: bases de datos (BIC, UMD, LODV, HCI-BRCA)

3.1. MUTACIONES

La prevalencia de mutaciones detectada en las pacientes analizadas fue de 1,95% (10/513). Se identificaron nueve mutaciones diferentes, cuatro en *BRCA1* (c.211A>G, c.3481_3491del, c.5117G>C y c.5266_5267insC) y cinco en *BRCA2* (c.3264_3265insT, c.4936_4939del,

c.5720_5723del, c.8978_8991del y c.9018C>A); detectándose la c.3264_3265insT en dos pacientes (Tabla 13). Todas las mutaciones patogénicas identificadas habían sido descritas en la población española²²⁶⁻²³² y están incluidas en las bases de datos consultadas¹⁰³⁻¹⁰⁷.

Destacar que la alteración **c.5117G>C** detectada en una paciente con CME se sitúa en una región muy conservada del ADN y aunque está catalogada de VED en el BIC¹⁰³, la base UMD¹⁰⁵ la cataloga como “probablemente patogénica” con una probabilidad de 71/100.

Tabla 13: Mutaciones detectadas en *BRCA1/2* en las pacientes con CM estudiadas

ID	Edad Dx	Gen mutado	Mutación	Cambio proteico	Historia familiar CM
P087	37	<i>BRCA2</i>	c.3264_3265insT	p.Gln1089SerfsX10	NO
P100	45	<i>BRCA2</i>	c.8978_8991del	p.Ser2993PhefsX20	SI
P163	43	<i>BRCA1</i>	c.5117G>C	p.Gly1706Ala	NO
P303	34	<i>BRCA2</i>	c.3264_3265insT	p.Gln1089SerfsX10	SI
P310	36	<i>BRCA1</i>	c.3481_3491del	p.Glu1161PhefsX3	SI
P323	58	<i>BRCA1</i>	c.5266_5267insC	p.Ser1755SerfsX74	NO
P337	50	<i>BRCA2</i>	c.9018C>A	p.Tyr3006X	NO
P438	38	<i>BRCA2</i>	c.4936_4939delGAAA	p.Glu1646GlnfsX23	NO
P479	47	<i>BRCA2</i>	c.5720_5723delCTCT	p.Ser1907X	NO
P488	67	<i>BRCA1</i>	c.211A>G	p.Arg71Gly	SI

ID: Nº identificación; Dx: Diagnóstico; CM: cáncer de mama

3.1.1. Mutaciones detectadas en las pacientes con CME y características anatómo-patológicas

La prevalencia real de mutaciones españolas en los genes *BRCA1/2* en pacientes con CME, carentes de cualquier tipo de historia familiar de CM, fue del 1,3% (6/462). Estas pacientes (P087, P163, P323, P337, P438, P479) eran portadoras de las mutaciones c.5117G>C y c.5266_5267insC en el gen *BRCA1* y c.3264_3265insT,

c.4936_4939delGAAA, c.5720_5723delCTCT y c.9018C>A en el gen *BRCA2* (Tabla 13).

La edad media de diagnóstico del CM en las pacientes portadoras de mutación fue de 45 años, diez años inferior a la media de edad de presentación en las n=456 pacientes carentes de mutaciones de *BRCA1/2* (Media de edad = 55 años; $p<0,05$; Tabla 14).

Las seis pacientes con CME portadoras de mutación patogénica presentaron carcinoma ductal infiltrante (CDI), mientras que las no portadoras de mutación presentaron una amplia heterogeneidad tumoral, siendo también el tipo predominante el CDI. Las portadoras de mutación desarrollaron CM de mayor tamaño tumoral, observándose una mayor proporción de $T\geq 2$ entre las portadoras de mutación que en las no portadoras (66,6% vs 37,3%; $p=0<0,05$; Tabla 14). El resto de los parámetros estudiados, afectación ganglionar, grado histológico, RE, RP y HER2/neu no presentaron asociación alguna con la presencia de mutaciones. No obstante, se observó una mayor proporción de CM RE (-) entre las portadoras de mutación que en las no portadoras, aunque la diferencia no alcanzó significado estadístico debido al limitado número de casos (33,3% vs 23,5%; Tabla 14).

La regresión logística binaria de la presencia de mutaciones patogénicas con el perfil clínico patológico (edad de presentación, tamaño tumoral, etc.) seleccionó la edad en el momento del diagnóstico como única variable independiente ($p=0,008$; intervalo de confianza (IC) del 95%: 0,76-0,99) asociada con la presencia de mutaciones.

Tabla 14: Características anatómo-patológicas de las pacientes con CME

Características	Descripción	Sin mutación N (%)	Con mutación N (%)	P
Casos (%)		456 (100)	6 (100)	
Edad (Rango)		55,3 (35-87)	45,5 (37-58)	<0,05
Función ovárica	Premenopáusica	148 (32,6)	4 (66,6)	n.s.
	Menopáusica	68 (15,0)	1 (16,6)	
	Postmenopáusica	238 (52,4)	1 (16,6)	
	Desconocido	2		
Tipo de tumor	CDI	363 (79,6)	6 (100)	n.s.
	CLI	40 (8,8)		
	CO	13 (2,9)		
	CDIS	15 (3,3)		
	Otros	25 (5,5)		
T	1	278 (62,7)	2 (33,3)	<0,05
	2	124 (28,0)	3 (50,0)	
	>2	41 (9,3)	1 (16,6)	
	Desconocido	13		
N	No	259 (58,9)	1 (16,6)	n.s.
	Si	181 (41,1)	5 (83,3)	
	Desconocido	16	0	
M	No	435 (97,3)	6 (100)	n.s.
	Si	12 (2,7)	0	
	Desconocido	9		
GH	I	123 (32,1)	1 (16,6)	n.s.
	II	166 (43,3)	1 (16,6)	
	III/IV	94 (24,6)	2 (33,3)	
	Desconocido	73	2 (33,3)	
RE	Positivo	332 (76,5)	4 (66,6)	n.s.
	Negativo	102 (23,5)	2 (33,3)	
	Desconocido	22		
RP	Positivo	292 (68,2)	5 (83,3)	n.s.
	Negativo	136 (31,8)	1 (16,6)	
	Desconocido	28		
HER-2/neu	Positivo	224 (55,2)	2 (33,3)	n.s.
	Negativo	182 (44,8)	4 (66,6)	
	Desconocido	50		

CDI: carcinoma ductal infiltrante; CLI: carcinoma lobulillar infiltrante; CO: cáncer de ovario; CDIS: carcinoma ductal in situ; T: Tamaño tumoral; GH: Grado histológico; RE: receptores de estradiol; RP: receptores de progesterona, n.s.: no significativa

3.1.2. Mutaciones en las pacientes con cáncer de mama familiar

Se detectaron 4 mutaciones patogénicas en las 51 pacientes (7,8%) en las que se detectó historia de cáncer de mama (30 con antecedentes familiares y 21 diagnosticadas antes de 35 años) en el transcurso del proyecto. Estas pacientes (P100, P303, P310, P488; Tabla 13) eran portadoras de las mutaciones c.211A>G y c.3481_3491del en el gen *BRCA1* y, c.3264_3265insT y c.8978_8991del en el gen *BRCA2*. La paciente P488, portadora de la mutación c.211A>G, tenía una fuerte carga familiar de CM (una hermana y sus tres hijas con CM). En los tres casos restantes la carga familiar venía por la línea paterna y, además, la P100, portadora de la mutación c.3264_3265insT, había sido diagnosticada antes de los 35 años.

3.1.3. Estudios familiares en los CM portadores de mutaciones

El estudio familiar se realizó en dos de las diez familias portadoras de mutación, la P087 (sin antecedentes familiares) y la P100 (con historia de CM familiar). La familia de la P087, portadora de la mutación c.3264_3265insT, presenta una carga hereditaria transmitida por la línea materna (Figura 26); y la familia de la P100, portadora de la mutación c.8978_8991del, la transmisión de la mutación procede de la línea paterna (Figura 27).

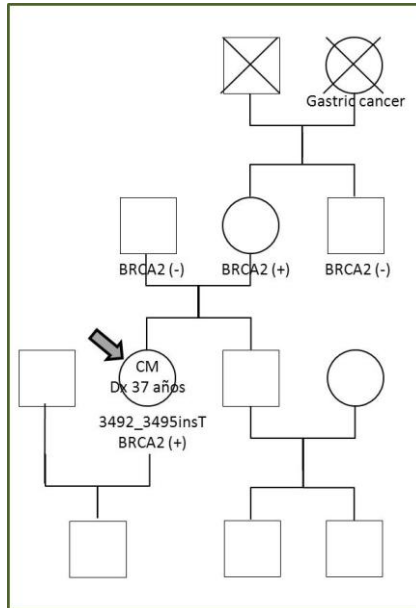


Figura 26: Árbol familiar de la P087 portadora de la mutación 3492_3493insT Exón 11 de *BRCA2*. La mutación se hereda por vía materna; su madre es portadora de la mutación. Los abuelos maternos están fallecidos y su tío no porta la alteración.

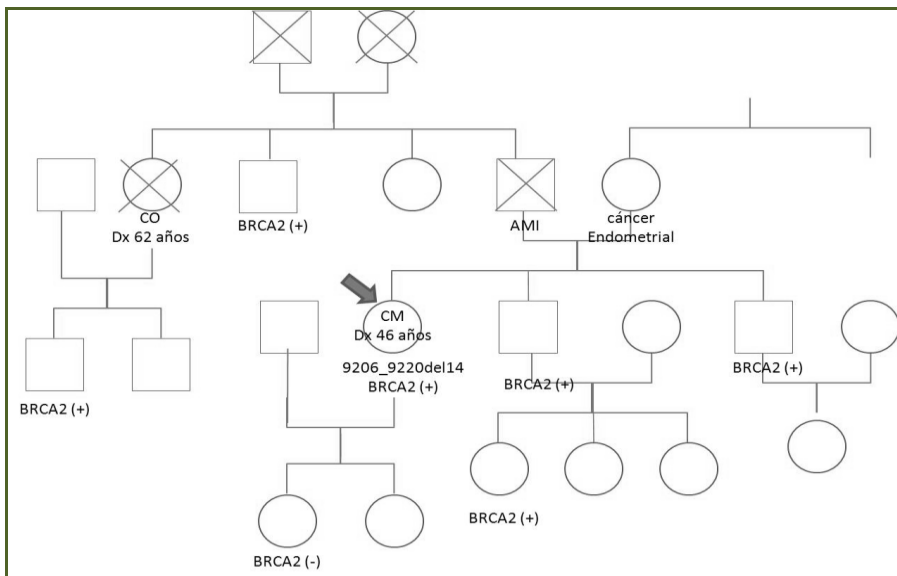


Figura 27: Árbol familiar de la P100. La mutación se hereda del padre: la paciente es portadora de la mutación 9206_9220del14 en el Exón 23 de *BRCA2*. Se realizó el estudio en su tío paterno que fue portador de la mutación, así como en su primo, hijo de su tía fallecida por CO.

3.2. VARIANTES DE EFECTO DESCONOCIDO

Se detectaron veinte VEDs diferentes en las 462 pacientes con CME, 12 en *BRCA1* y ocho en *BRCA2* (Tabla 11 y Tabla 12). Tres de estas variantes (c.5175A>G y c.5252G>A en *BRCA1* y c.9256+58A>T en *BRCA2*) la base UMD las considera como “casi neutras”¹⁰⁵ y siete no constan en ninguna de las base de datos consultadas (BIC, UMD ni LODV)¹⁰³⁻¹⁰⁶; (Tabla 11 y Tabla 12). Las diez restantes se describen como VEDs en las bases de datos¹⁰³⁻¹⁰⁶.

3.2.1. VEDs detectadas en *BRCA1*

Doce VEDs fueron identificadas en *BRCA1*. Todas ellas fueron detectadas en una sola paciente excepto la c.5158A>G que se identificó en tres (Tabla 15).

Tabla 15: Variantes de efecto desconocido detectadas en *BRCA1* en nuestra serie

Exón	Variante Genética	Cambio proteico	Prevalencia (%)	Repercusión biológica
7	c.398G>A	p.Arg133His	0,20	VED
11f2	c.1534C>T	p.Leu512Phe	0,20	VED/Casi Neutra
11e2	c.1866G>A	p.Ala622Ala	0,20	VED/Casi Neutra
11c2	c.1926T>C	p.Asp642Asp	0,20	VED (No BD)
	c.2634A>G	p.Ala878Ala	0,20	VED
11c2	c.2666C>T	p.Ser889Phe	0,20	VED
11d2	c.3457C>T	p.Leu1153Leu	0,20	VED (No BD)
11g	c.3848A>G	p.His1283Arg	0,20	VED
12	c.4113G>A	p.Gly1371Gly	0,20	Casi Neutra
19	c.5158A>G	p.Thr1720Ala	0,60	VED/Neutra
	c.5175A>G	p.Glu1725Glu	0,20	Casi Neutra
20	c.5252G>A	p.Arg1751Gln	0,20	Casi Neutra

Het: variantes detectadas en heterocigosis; VED: variante de efecto desconocido; Pat: probablemente patogénica; BD: bases de datos (BIC, UMD, LODV, HCI-BRCA)

La variante **c.398G>A** (p.Arg133His) detectada en el exón 7, causa el cambio del aminoácido Arginina por Histidina en el codón 133 de la proteína catalogado “de efecto desconocido” en las bases BIC¹⁰³ y UMD¹⁰⁵ y de baja o nula probabilidad patogénica en la HCI-BRCA¹⁰⁷.

La variante *missense* **c.1534C>T** (p.Leu512Phe) considerada como VED en el BIC¹⁰³ y de “casi neutra” en la UMD¹⁰⁵ provoca la eliminación de dos motivos de unión, uno en SF2/ASF (calificación 2,59) y el otro en SF2/ASF (IgM-BRCA1) (puntuación de 1,98). La variante sinónima **c.1926T>C**, no recogida en las bases de datos¹⁰³⁻¹⁰⁷, genera un nuevo sitio de unión para SRp40 (puntuación de 3,12; por encima del umbral de 2,67) según el programa ESEfinder²³⁸.

La VED **c.2666C>T** provoca el cambio de serina por fenilalanina (p.Ser889Phe) en una región poco conservada entre especies, (ausente en *Gallus gallus*, *Canis lupus familiaris* y *Pan troglodites*). Según los programas *in silico* ESEfinder²³⁸ y Berkeley Drosophila Genome Project²³⁹, esta VED genera un nuevo sitio de unión para motivos SF2/ASF (calificación 2,39), sustitución de un motivo de unión de SF2/ASF (IgM-BRCA1) por uno nuevo (calificación 2,94) y eliminación de dos sitios de unión para SRp40 (puntuaciones 3,03463; 3,98178).

Las ocho VEDs restantes, detectadas en *BRCA1*, de las que cinco son sinónimas, (Tabla 15) no modifican ni generan motivos de unión para SR según el programa ESEfinder²³⁸.

3.2.2. VEDs detectadas en BRCA2

Ocho VEDs fueron identificadas en *BRCA2*. Todas ellas fueron detectadas en una sola paciente excepto la c.7317A>G y la c.9256+58A>T que se encontraron en tres pacientes cada una. Tres VEDs no constan en las bases de datos consultadas¹⁰³⁻¹⁰⁷ (Tabla 16).

Tabla 16: Variantes de efecto desconocido detectadas en *BRCA2* en nuestra serie

Exón	Variante Genética	Cambio proteico	Prevalencia Het (%)	Repercusión biológica
11	c.3198T>C	p.Asn1066Ser	0,20	VED
	c.3885A>G	p.Gln1295Gln	0,20	VED
	c.5905G>A	p.Val1969Ile	0,20	VED (no BD)
	c.6613G>A	p.Val2205Met	0,20	VED
14	c.7317A>G	p.Gly2439Gly	0,60	VED (no BD)
17	c.7820C>T	p.Thr2607Ile	0,20	VED
23	c.9052_9057delAGTAAA	p.3014_3015delISK	0,20	VED (no BD)
24	c.9256+57T>A	IVS	0,60	VED

Het: variantes detectadas en heterocigosis; **VED:** variante de efecto desconocido; **BD:** bases de datos (BIC, UMD, LODV, HCI-BRCA)

Tres de las VEDs, c.3198T>C, c.3885A>G y c.7820C>T, afectan a motivos de unión de proteínas SR y/o a sitios de empalme según los programas *in silico* ESEfinder²³⁸ y Berkeley Drosophila Genome Project²³⁹. La variante **c.3198T>C** (p.Asn1066Ser) genera dos nuevos motivos de unión en SF2/ASF (IgM-BRCA1) y SC35 y elimina un motivo de unión de SRp40. La **c.3885A>G** (p.Gln1295Gln) origina dos nuevos sitios de unión para proteínas SC35 y SRp55. Este cambio de aminoácido se produce en una región conservada de la proteína BRCA2. La variante **c.7820C>T** (p.Thr2607Ile) provoca la eliminación de cinco motivos en una región conservada del ADN, dos para SF2/ASF (IgM-BRCA1), uno para SC35 y los otros para SRp40; uno de ellos con una puntuación de 3,88 en el programa ESEfinder²³⁸. Además, según las predicciones

bioinformáticas de la UMD¹⁰⁵ y el HCI-BRCA¹⁰⁷, la probabilidad de patogenicidad es elevada.

Las VEDs **c.5905G>A** (p.Val1969Ile) y **c.6613G>A** (p.Val2205Met) provocan cambios de aminoácido en regiones mal conservadas de BRCA2 y no modifican los sitios naturales de unión a proteínas SR según las predicciones del programa ESEfinder²³⁸. Asimismo para la variante sinónima **c.7317A>G**, situada en una región no conservada del ADN, los programas *in silico* no detectan efectos sobre las proteínas SRE^{238,239}.

La VED **c.9052_9057delAGTAAA** detectada en *BRCA2* es una deleción *in-frame* nueva, no descrita en las bases de datos consultadas, que origina la supresión de dos codones de la proteína BRCA2 (p.3014_3015delSK). Esta región de la proteína no parece ser una región altamente conservada, puesto que está ausente en *Canis familiaris* y muestra otra secuencia de aminoácidos en *Gallus gallus*. Además, el paciente no tenía antecedentes familiares de CM. Si bien, según el programa ESEfinder²³⁸, esta supresión afecta a la posición de casi todos los motivos de unión de proteínas SR, tanto de cambios (SF2/ASF, SF2/ASF (IgM - BRCA1) y SRp55 y SRp40) como la creación de un nuevo motivo de unión para SCR35 y SRp40, con puntuación de 3,01.

La variante intrónica **c.9256+57T>A** aunque no modifica ni crea nuevos sitios de empalme, según la predicción del programa *Berkeley Drosophila Genoma Project30*²³⁹; provoca la aparición de un motivo SRp55 y la eliminación del motivo SC35, según el programa ESEfinder²³⁸.

3.3. POLIMORFISMOS

En nuestra serie de CME se identificaron 26 polimorfismos distintos, 13 en *BRCA1* y 13 en *BRCA2* (Tabla 17). La incidencia de polimorfismos detectados fue similar a la descrita en el Hap-Map-CEU para la población caucásica europea¹¹⁵, a excepción del c.442-34C>T (rs799923) de *BRCA1* y del c.1114A>C (rs144848) de *BRCA2*, para los cuales la incidencia encontrada en nuestra población fue más elevada que la reportada para la raza caucásica (33,33 vs 14,2%; $p < 0,01$ y 33,9 vs 44,4%; $p < 0,05$; respectivamente) (Tabla 17).

Los polimorfismos de *BRCA1* detectados con mayor frecuencia en nuestra población fueron c.3548A>G (rs16942), c.4308T>C (rs1060915), c.2311T>C (rs16940), c.442-34C>T (rs799923) y c.1067A>G (rs1799950); presentando prevalencias del 56,57%, 51,31%, 40,52%, 33,33% y 12,60%, respectivamente (Tabla 17).

Los polimorfismos de *BRCA2* más frecuentes en nuestra serie fueron c.-25G>A (rs1799943), c.1114A>C (rs144848), c.1365A>G (rs1801439) y IVS4-89T>C (rs3783265), que expresaron prevalencias de 42,56%; 33,90%, 6,82% y 6,40%, respectivamente.

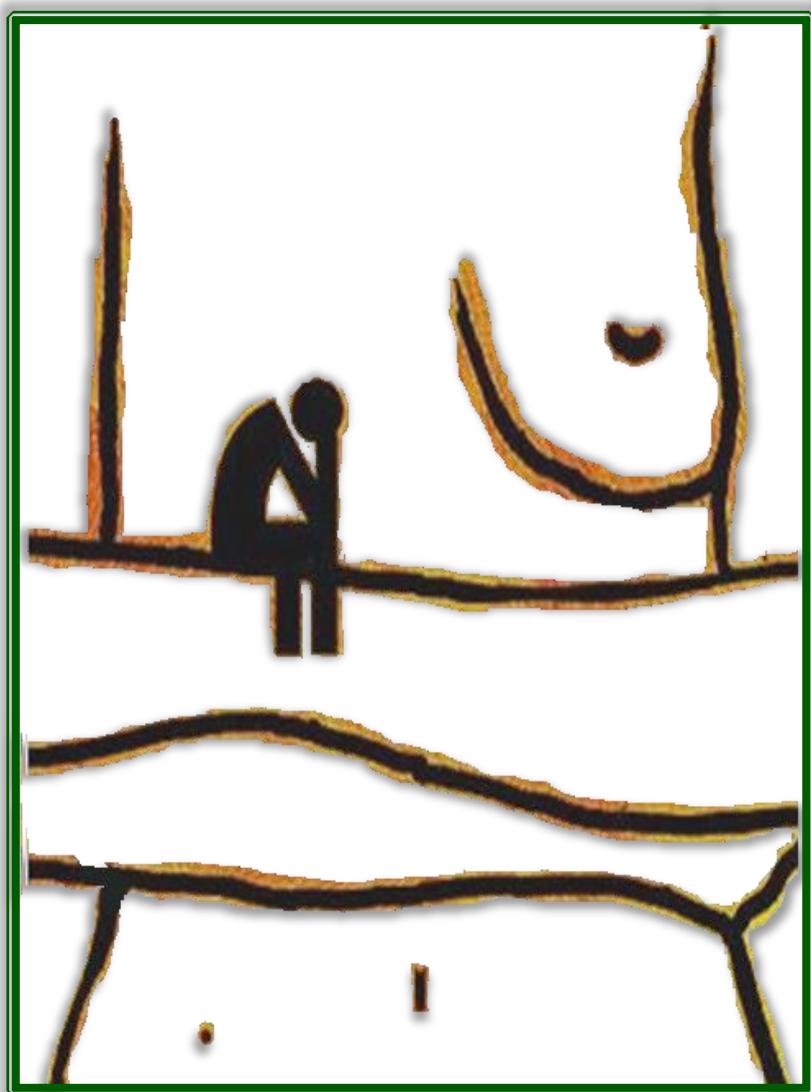
En *BRCA1*, se comprueba una fuerte correlación entre el polimorfismo c.4308T>C (rs1060915) y los polimorfismos c.2311T>C (rs16940) y c.3548A>G (rs16942) (coeficiente de correlación de Spearman= 0,65 y 0,57, respectivamente; $p < 0,001$ para ambos). También se observó una correlación entre los polimorfismos, rs16942 y rs16940 (coeficiente de correlación de Spearman= 0,41; $p < 0,001$).

En *BRCA2*, se encontró una fuerte correlación entre la presencia del polimorfismo c.-25G>A (rs1799943) y c.7242A>G (rs1799955) (coeficiente de correlación de Spearman= 0,648; p<0,001).

Tabla 17: Polimorfismos detectados en las pacientes con CME

Gen	Exón	Mutación	Tipo	SNPs	Prevalencia (%)		
					CME	(HapMap-CEU)	C.Ev.
<i>BRCA1</i> U14680.1	I-1	c.1-115T>C	I		0,8		
	I-2	c.81-14C>T	I	rs80358006	0,21	No Data	
	5	318G>T	M	rs80357102	0,41	No Data	PC
	I-7	c.442-34C>T	I	rs799923	33,33	14,2*	
		c.1067A>G	M	rs1799950	12,60	8,30	PC
		c.1242C>T	S	ND	0,21	-	
		c.2311T>C	S	rs16940	40,52	43,30	
	11	c.2733A>G	S	rs1800740	1,03	0,00	
		c.3302G>A	M	rs41293447	0,41	No Data	PC
		c.3418A>G	M	rs2227945	0,21	0,00	PC
		c.3548A>G	M	rs16942	56,57	55,70	PC
	13	c.4308T>C	S	rs1060915	51,31	56,60	
	17	c.5074+23A>G	I	ND	0,21	-	
<i>BRCA2</i> U43746.1	2	c.-25G>A	5'UTR	rs1799943	42,56	45,80	
	3	c.223G>C	M	rs28897701	0,41	0,00	MC
	I-4	c.426-89T>C	I	rs3783265	6,40	5,00	
		c.1114A>C	M	rs144848	33,90	44,4**	PC
	10	c.1151C>T	M	rs41293475	0,41	No Data	PC
		c.1365A>G	S	rs1801439	6,82	5,00	
		c.1792A>G	M	rs28897710	0,21	0,2	
	I-10	c.1909+12delT	I	ND	0,41	-	
	11	c.2803G>A	M	rs28897716	0,21	0,00	MC
		c.6513C>G	S	rs206076	0,21	0,00	
	14	c.7242A>G	S	rs1799955	36,98	34,40	
	18	c.7994A>G	M	rs28897745	0,21	0,00	MC
	23	c.9038C>T	M	rs28897755	0,21	1,70	PC

C.Ev.: Conservación evolutiva entre especies; I: intrónica; M: missense; S: splicing; PC: posición poco conservada entre especies; MC: posición muy conservada entre especies; * SC_12_C Europeanpopulation; **SC_95_C population



DISCUSIÓN

1. CRIBADO DE MUTACIONES EN LOS GENES *BRCA1/2* MEDIANTE EL MÉTODO DE “*HIGH RESOLUTION MELTING*”

El análisis de las curvas de fusión de alta resolución del ADN o HRM es un método¹⁶¹ que permite detectar las variaciones genéticas presentes en los productos de PCR. El método se caracteriza por su rapidez, sensibilidad, alto rendimiento y ausencia de manipulación post-PCR. Por todo ello, resulta particularmente apropiado para el cribado de variaciones genéticas y/o mutaciones en genes de gran tamaño y baja incidencia, tal como es el caso de las mutaciones en los genes *BRCA1/2*^{185,186}. Las aplicaciones de esta metodología son múltiples y muy variadas¹⁵⁹⁻¹⁶⁴.

Aunque la secuenciación directa de exones y zonas flanqueantes es la metodología de referencia o *gold standard* en la detección de mutaciones en los genes *BRCA1/2*, el gran tamaño de estos genes (>5 Kb) y la laboriosidad del método de secuenciación dificultan su aplicación cuando el número de muestras a procesar es elevado. Este hecho, combinado con la baja prevalencia de mutaciones en la población de riesgo, entre 18-20%⁶², justifica la implantación de técnicas de cribado que reduzcan el trabajo y acorten los tiempos de análisis¹⁸³. No obstante, el principal inconveniente de la mayoría de los métodos alternativos hasta ahora aplicados (CSGE¹³⁴⁻¹³⁶, EC^{146,147}, DHPLC¹⁵¹,...) es la manipulación post-PCR y, con ello, el riesgo de contaminación de los amplicones generados¹⁷⁵, inconvenientes que evita el método HRM.

En esta tesis doctoral se ha puesto a punto un método de cribado de mutaciones para los genes *BRCA1/2*. El método desarrollado detecta el 90% (99 de 110) de las mutaciones patogénicas descritas en población española con historia familiar de CM/CO²²⁶⁻²³¹ con solo 49 PCRs.

1.1. PRECISIÓN DEL MÉTODO DE HRM

La precisión *intra-ensayo* se ha valorado efectuando ensayos de cada muestra por triplicado (Material y Métodos: apartado 1.5.1). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los replicados de una misma muestra presentan perfiles similares en las curvas DP. El empleo en cada ensayo de C+ con variaciones genéticas conocidas confirma la repetitividad en los perfiles de las curvas DP de los C+ en ensayos diferentes. La elevada precisión *intra* e *inter-ensayo* obtenida coincide con las reportadas por Reed *et al*¹⁶³ y Norambuena *et al*²⁴⁰.

Los factores que más afectan a la precisión son el equipo y los reactivos. Así, Seipp *et al*²⁴¹ señalan que las variaciones en el tipo de intercalante, tampón o equipo de PCR, pueden modificar la curva de *melting* de una variante genética determinada. Farrar *et al*²⁴² describen variaciones en la eficiencia de los diferentes intercalantes. A este respecto, entre los dos intercalantes ensayados, *SYTO9* (Life Technologies) y *ResoLight* (Roche), se observó que el primero mostraba menor capacidad resolutive (datos no incluidos).

La buena precisión del método ha permitido su aplicación en los estudios de segregación. La inclusión del ADN del caso índice (C+) en el

ensayo permite la rápida identificación de los familiares portadores de mutación²⁴³.

1.2. SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DE HRM

El HRM ha permitido diferenciar todos los C+ de los ADN WT. Según nuestros resultados, el método muestra una buena resolución (DP>5) para la mayoría de C+ estudiados (88,9%; 88/99). Solo un 11% (11/99) de los controles presentaron una menor resolución (DP<5) aunque estas muestras se diferenciaron del ADN WT por presentar diferente DP (Resultados: apartado 1.5.2).

Las mutaciones más difíciles de diferenciar son las ins/del de uno o dos nucleótidos. A este respecto, autores como Reed *et al*¹⁷⁵ han reportado dificultades para distinguir las ins/del de uno o dos nucleótidos en regiones homopoliméricas, que pudieron solventar aumentando la sensibilidad de la detección en el programa de análisis *Gene Scanning*. A este respecto señalar que en el presente estudio ocho de las 11 mutaciones con menor sensibilidad (DP<5) fueron variaciones ins/del de uno o dos nucleótidos. No obstante, la sensibilidad obtenida en este trabajo es similar a las reportadas por Norambuena *et al*²⁴⁰ y Reed *et al*¹⁶³.

Asimismo, la sensibilidad del HRM varía dependiendo del carácter Het/Homo de la variación genética, tamaño del fragmento, secuencia nucleotídica específica o cambio nucleotídico en mutaciones puntuales. Nuestros resultados, al igual que los de Reed *et al*¹⁶³, indican que las variaciones en Het se detectan mejor que las que están en Homo

(Resultados: apartado 2). Esto también lo corroboran los resultados reportados en la detección de la mutación H63D en pacientes con hemocromatosis hereditaria²⁴⁴. No obstante, en el presente estudio, la falta de detección de variantes genéticas Homo no afectaría a la detección de las mutaciones patogénicas de los genes *BRCA1/2*, ya que se presentan en Het²⁴⁵.

La longitud del fragmento amplificado también influye en la sensibilidad del método. El tamaño óptimo recomendado para los amplicones de HRM es de unos 150 pb²⁴⁶; aunque se pueden detectar variaciones genéticas en fragmentos de hasta 400 pb²⁴⁷. En el método de HRM puesto a punto en este estudio el tamaño medio de los amplicones ha sido de 191 pb con rango entre 95 y 280 pb, muy similares a los de otras publicaciones en este campo^{246,250}.

El tipo de variación genética es otro factor que repercute en la sensibilidad al afectar a la temperatura de desnaturalización de la doble hebra de ADN. En este sentido, Liew *et al*²⁴⁸ y Gundry *et al*²⁴⁹ encuentran mayor dificultad del HRM para diferenciar los cambios transversionales (A>T o de G>C) y Witwer *et al*²⁵⁰ señala la dificultad para detectar variaciones genéticas en las regiones ricas en GCs. Estos resultados confieren mayor importancia a la secuencia nucleotídica que al tamaño del fragmento para la detección de variantes, como sugieren Reed *et al*¹⁶³.

1.3. CAPACIDAD DISCRIMINANTE DEL MÉTODO DE HRM

El 55% (27/49) de los fragmentos de PCR amplificados en este estudio presentaron más de una mutación patogénica y/o variante genética en el mismo fragmento de PCR. Por ello, se hace necesario confirmar que el HRM posea capacidad discriminante suficiente para diferenciar las mutaciones patogénicas que recaen en el mismo amplicón. En nuestra serie, el 86% (62/72) de los C+ que recayeron en estos 27 amplicones se diferencian con claridad del resto de mutaciones situadas en el mismo fragmento.

Los genes *BRCA1/2* se caracterizan por albergar un elevado número de polimorfismos. La presencia de estos polimorfismos puede enmascarar alguna mutación patogénica por presentar curvas DP similares²⁵¹ esto obligaría a secuenciar todas las muestras con este problema^{240,252}. Para solventar este inconveniente De Leeneer *et al*²⁵⁴ y Mckinney *et al*²⁴⁷ proponen el empleo de sondas no marcadas complementarias a los polimorfismos, realizando el escaneo y genotipado en un único paso²⁵². De hecho nosotros en este estudio hemos aplicado este procedimiento para diferenciar la mutación c.1961delA del polimorfismo c.2082C>T²⁵³, tal como se menciona en el epígrafe que sigue.

2. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CRIBADO DE HRM Y CSGE

2.1. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE HRM Y CSGE

Los resultados obtenidos de la comparación del GSGE y HRM ponen en evidencia la mayor sensibilidad del HRM para identificar las variantes genéticas (92,9% vs 54,4%)²⁵³; permitiendo identificar la mutación c.213-12A>G en una paciente y 24 variantes que pasaron desapercibidas para la CSGE (Resultados: apartado 2). Si bien, el HRM no tuvo capacidad discriminante suficiente para diferenciar la mutación c.1961delA del polimorfismo c.2082C>T²⁵³; para solventar este problema se siguieron las recomendaciones reportadas en otros estudios^{254,247}. El diseño de una sonda de hibridación específica para la mutación evita secuenciar las muestras con curvas similares a la del polimorfismo, con la consiguiente reducción del coste y tiempo de análisis. Asimismo, de los polimorfismos detectados por ambos métodos, el HRM los identificó en un mayor número de muestras. La única variante no detectada por HRM fue la c.-25G>A en Homo. Nuestros resultados concuerdan con los de Martino *et al*²⁵⁵, que señalan una sensibilidad global del 92,5% para el HRM que es un poco más reducida para la detección de las variantes en Homo. Asimismo, Graham *et al*²⁵¹ ya señalaron que las diferencias de temperatura entre el ADN WT y una variante en Homo son estrechas, oscilando entre 0,0-1,3°C. Otros autores indican que la detección de Homo mejora al aumentar el tamaño. No obstante, como se ha comentado anteriormente, la

limitación de la detección de variantes en Homo no es un problema para la detección de mutaciones patogénicas en los genes *BRCA1/2*²⁴⁵.

La limitación principal del método de HRM aquí presentado es que solo cubre las mutaciones descritas en población española y no incluye el rastreo completo de ambos genes, condición necesaria para poder aplicarse en la rutina asistencial. Por esta razón, una vez comprobada la capacidad y rapidez de este método para el estudio de mutaciones en los genes *BRCA1/2* en población española, nuestro laboratorio ha puesto a punto el método para el rastreo completo de ambos genes, siguiendo los métodos de De Leener *et al*¹⁸⁵ y Hondow *et al*¹⁸⁶.

En nuestro laboratorio se ha sustituido el método de cribado de mutaciones de *BRCA1/2* anterior, basado en la CSGE, por el de HRM automatizando la dispensación de los reactivos y muestras en las placas de 384 pocillos con el empleo del robot Epmotion 5070 (Eppendorf). La combinación del HRM con la robotización ha aumentado el rendimiento permitiendo procesar simultáneamente un gran número de muestras.

2.2. COMPARACIÓN DEL COSTE-EFECTIVIDAD DE LOS MÉTODOS DE CSGE Y

HRM

Aunque el coste del estudio completo de los genes *BRCA1/2* por CSGE es más económico que por HRM (442€ vs 512€)²⁵³, el rendimiento del HRM es claramente superior al de la CSGE tal como se ha demostrado (Resultados: apartado 2.3). El HRM, contando con una plantilla de facultativo y dos técnicos de laboratorio, permite efectuar más de 30 estudios completos de mutaciones en los genes *BRCA1/2* al

mes, mientras que con CSGE solo se alcanzan los 22 estudios mensuales. Nuestras estimaciones de coste-efectividad concuerdan con las de De Leeneer *et al*¹⁸⁵ o Graham *et al*²⁵¹, que evidencian las ventajas del HRM frente a otros métodos de cribado y, por supuesto, con el método de referencia de secuenciación directa. Sevilla *et al*¹⁸⁷ realizaron el estudio comparativo del coste-efectividad de los principales métodos empleadas en el análisis de *BRCA1* (secuenciación directa, PTT, DGGE, DHPLC, etc.) y concluyeron que las técnicas de cribado tienen un coste entre un 30-90% inferior al de la secuenciación directa y que reducen el tiempo de análisis, aunque tienen el inconveniente de tener menor sensibilidad que la secuenciación directa y requieren de la caracterización de la alteración detectada.

Finalmente, destacar la mejora que supone en el coste-efectividad la robotización del procedimiento de dispensación de reactivos y muestras. A este respecto señalar que en nuestro laboratorio esta automatización permite efectuar hasta tres ensayos en la misma jornada (1.152 PCRs). La combinación del HRM con la robotización de la dispensación de muestras y reactivos convierte este método de cribado en un procedimiento de alto rendimiento. Esta optimización ha permitido incrementar el rendimiento del personal disponible, mejorar la calidad de los resultados a la vez que reducir el plazo de entrega de los mismos, que ha pasado de los 4-5 meses requeridos con el método de CSGE al mes y medio con HRM.

3. PREVALENCIA DE MUTACIONES *BRCA1/2* EN PACIENTES CON CME

La prevalencia real de mutaciones españolas detectada en nuestra serie, excluyendo aquellas en las que se detectó la presencia de criterios de CM familiar en el curso del estudio, es de 1,3% (6/462), menor que el 3,5% de las expectativas iniciales. Esta prevalencia es inferior al 5,7 y 5,6% reportado por García-Patiño *et al*¹⁹⁴ y Martínez-Ferrandis *et al*¹⁹⁶, respectivamente, en estudios efectuados en población española. A este respecto sorprende, la elevada prevalencia de mutaciones detectada en el trabajo de García-Patiño *et al*¹⁹⁴ a pesar de haber estudiado únicamente las mutaciones del gen *BRCA1* en un reducido grupo de 105 pacientes. No obstante, si de este estudio excluyeran las 15 pacientes que presentan historia familiar, la prevalencia de mutaciones quedaría reducida a un 3,3% (3/90). El estudio de Martínez-Ferrandis *et al*¹⁹⁶ realiza el cribado de mutaciones en *BRCA1/2* en una serie de 124 CM de aparición temprana (<41 años). En este trabajo, seis de las siete pacientes portadoras de mutación tenían antecedentes familiares de CM/CO, por lo que la prevalencia real de mutaciones en el CME sería inferior al 1%, similar a los resultados aportados en nuestro estudio.

La baja prevalencia de mutaciones detectada en nuestro estudio (1,3%) podría deberse a que únicamente se rastrean las regiones de los genes *BRCA1/2* en donde recaen las mutaciones descritas en la población española. La región estudiada representa el 69% de las mutaciones prevalentes descritas en la población española^{221,145} cubriendo el 75% de la secuencia de *BRCA1* (4.311/5.711pb) y el 46% de

la de *BRCA2* (5.064/10.986pb). En todo caso, la baja prevalencia obtenida no justificaría que el PCGC incluyera los estudios de mutaciones en los genes *BRCA1/2* en todas las pacientes con CM o CO. No obstante en la mayoría de PCGC se está empezando a indicar los estudios de mutaciones en los *BRCA1/2* en pacientes con CMTN y COE, en los que se ha detectado una prevalencia de mutaciones en los genes de alrededor del 15%²⁷⁰⁻²⁷⁸.

3.1. MUTACIONES PATOGENICAS EN PACIENTES CON CME

Las nueve mutaciones detectadas en este estudio, cuatro en *BRCA1* y cinco en *BRCA2*, ya descritas en la población española^{221,145} (Resultados: Tabla 13).

Entre las mutaciones detectadas en *BRCA1* cabe destacar la mutación c.5266_5267insC, localizada en el exón 20 del gen *BRCA1*, por ser una de las mutaciones fundacionales de origen asquenazi. Esta mutación causa el truncamiento prematuro de la proteína BRCA1 en el codón 1829 y se detecta con una prevalencia del 1,2% en el CMH²²¹. La c.210A>G²⁵⁶, es una mutación fundacional gallega, que se detecta con frecuencia en nuestra población¹⁴⁵. La c.3481_3491del es una mutación reportada en las bases de datos^{103,105} detectada en población española¹⁴⁵ y es una mutación recurrente en la población del noreste de Francia²⁵⁷. En cuanto a la variante c.5117G>C (p.Gly1706Ala), localizada en el dominio BRCT en el exón 18 de *BRCA1*, región muy conservada del ADN, existe controversia respecto a su potencial patogénico. Así, mientras en las bases de datos BIC¹⁰³ y UMD¹⁰⁵ está considerada como

un VED, la UMD¹⁰⁵ la describe de “*Probably pathogenous*”. En los estudios moleculares Campos *et al*²⁵⁸ no encuentran repercusiones de esta mutación a nivel de RNA, no obstante no descartan “*un papel patogénico para p.Gly1706Ala hasta que se lleven a cabo ensayos funcionales*”, debido a su localización en una región altamente conservada. Phelan *et al*²⁵⁹ realizan estudios funcionales de esta variante, encontrando una actividad reducida en células de mamífero y una segregación familiar parcial con la enfermedad. Estos resultados no concluyentes les llevan a clasificar a esta variante como de *riesgo moderado*. No obstante, Osorio *et al*²⁶⁰ la clasifican de patogénica basándose en estudios de LOH.

Entre las mutaciones detectadas en *BRCA2*, dos de las cinco encontradas, c.3264_3265insT y c.8978_8991del, son frecuentes en nuestra población, presentando una prevalencia en pacientes con CMOH del 14,2% y 7,7%, respectivamente^{221,145}. Se trata de mutaciones *frame-shift* causantes del truncamiento prematuro de la proteína *BRCA2* en los codones 1089 y 2993, respectivamente. Las tres mutaciones restantes también han sido descritas en población española con CMOH, aunque presentan una menor prevalencia^{221,145}.

El presente estudio cubre un 69% de las mutaciones más prevalentes de la población española, 70% en *BRCA1* y 68% en *BRCA2*²²¹. Sin embargo, desde que finalizó este estudio en el año 2012 hasta la actualidad, se han descrito nuevas mutaciones en población española tales como c.4256A>T, c.4433C>T, c.4556+1G>A y c.4691C>T en *BRCA1* y

c.3265_3266delAG, c.3381delT, c.6129delA, c.8954-5A>G en *BRCA2*, con prevalencias entre 0,64- 1,29%, que no se incluyeron en este trabajo²²¹.

3.2. VARIANTES DE EFECTO DESCONOCIDO EN PACIENTES CON CME

Se han identificado 20 VEDs diferentes, 12 en *BRCA1* y ocho en *BRCA2*, de las cuales dos variantes de *BRCA1* la base UMD¹⁰⁵ las cataloga de “casi neutras”. Cinco de las VEDs encontradas no consta que se hayan reportado previamente (Resultados: apartado 3).

Los programas “*in silico*” han predicho la creación, eliminación o modificación de los sitios de unión SR para tres VEDs de *BRCA1* y tres de *BRCA2* (Resultados: apartado 3.2). No obstante, la presencia de un motivo de alta puntuación en una secuencia no implica necesariamente que ese sitio sea un ESE funcional, y, en general, no existe una estricta correlación cuantitativa entre las puntuaciones numéricas y la actividad ESE. Por el contrario, la falta de un motivo de alta puntuación no implica que no hayan ESEs²⁶¹. De todas estas VEDs, destacar la variante c.7820C>T de *BRCA2* por su posible potencial patogénico, detectado en base a la variación de los sitios de empalme como por las predicciones de las bases de datos consultadas^{105,107}. El resto de VEDs al no tener repercusión sobre las proteínas SR, según los programas “*in silico*” su probable patogéneidad es baja o nula¹⁰⁷. No obstante, hay que tener presente que la predicción “*in silico*” únicamente ofrece una orientación de la potencialidad patogénica de una variante, siendo necesario realizar análisis de segregación y completarlos con estudios funcionales para evaluar el significado biológico real de estas VEDs²⁶¹.

Hemos observado que no existe concordancia en cuanto al significado clínico de muchas de las variantes detectadas entre las bases consultadas. Así, existen variantes clasificadas como neutras en las bases UMD¹⁰⁵, LODV¹⁰⁶ o HCI-BRCA¹⁰⁷ que el BIC¹⁰³ las cataloga de significado desconocido. Esta discordancia demanda la necesidad de disponer de una base de datos extensa que recoja el máximo número de variantes y mutaciones identificadas, con actualizaciones frecuentes y que esté conectada con otras bases de datos genéticos existentes. En este sentido, a nivel internacional, el consorcio ENIGMA²⁶² se ha centrado en determinar la importancia clínica de variantes en *BRCA1/2*. A nivel nacional, el Instituto de Salud Carlos III, en colaboración con la Asociación Española de Genética Humana y la sección de cáncer hereditario de la Sociedad Española de Oncología Médica ha puesto en marcha el proyecto “*Spain Mutation Data Base*” (Spain MDB)²⁶³, que pretende recoger las mutaciones germinales que afectan a la población española²⁶⁴.

3.3. POLIMORFISMOS DETECTADOS EN PACIENTES CON CME

La prevalencia de los polimorfismos detectados en *BRCA1* oscila entre 0,2% (1/495) y 56,57% (161/495), siendo las prevalencias para la mayoría de polimorfismos similares a las recogidas en el HapMap¹¹⁶ para población caucásica. La mayoría de polimorfismos, particularmente los de mayor prevalencia, han sido reportados tanto en CMH^{226,231} como en CME^{212,265}. Únicamente señalar que hemos observado que el polimorfismo c.442-34C>T (rs799923) presenta una prevalencia

significativamente superior en nuestra población que la asignada en el HapMap para la población caucásica (33,33 vs 14,2%).

La prevalencia de los polimorfismos detectados en *BRCA2* oscila entre 0,2% (1/462) y 42,8% (212/495) siendo similar a la referida en el HapMap para población caucásica. Los polimorfismos c.1114A>C (rs144848) y c.9038C>T (rs28897755) presentan prevalencias de 33,9 y 0,21%, respectivamente, que son significativamente inferiores a las referidas en el HapMap de 44,4 y 1,7%, respectivamente. Señalar que estos polimorfismos también se han reportado población caucásica con CMH^{266,147} y en CME²¹².

La prevalencia similar observa en en HapMap para la mayoría de los polimorfismos en población caucásica sana y en nuestra serie de pacientes con CME descarta que tengan alguna implicación con la carcinogénesis.

4. CARACTERÍSTICAS ANATOMO-PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES CON CME

En nuestra serie se observa que las pacientes portadoras de mutación presentan el CM a una edad más temprana que las no portadoras (45 vs 55 años). Esto está en consonancia con el hecho de que la presencia de mutaciones hereditarias adelanta la edad de presentación del CM^{74,75,267}. Sin embargo, resulta contradictorio que en la serie de García-Patiño *et al*¹⁹⁴ ocurriera lo contrario, y que fueran las

portadoras de mutación las que presentaran el tumor a una edad más avanzada (54 vs 48 años).

Respecto al tipo histológico, el presente estudio, al igual que la mayoría de los reportados en este campo^{79,80}, confirma que la mayoría de CM son del tipo ductal infiltrante, sin que se observen diferencias entre los tipos histológicos de los CMH y CME.

En cuanto al TNM y GH no se han encontrado diferencias significativas entre los CMH y CME. Sin embargo, se observa que en las portadoras de mutación predominan los CM de mayor tamaño y afectación ganglionar en comparación con las no portadoras (66,6 vs 37,3% y 83,3 vs 41,1%, respectivamente). Esto concuerda con la mayor velocidad de crecimiento y comportamiento más agresivo de los CMH⁷⁴⁻⁷⁸.

Asimismo, hemos observado un mayor porcentaje de RE negativos en las portadoras de mutación que las no portadoras (33,3% vs 23,5%). Esta mayor proporción de RE negativos se asocia con las mutaciones en *BRCA1*²⁶⁸, que suele acompañarse de CM con fenotipo TN²⁶⁹. No obstante, el escaso número de portadoras de mutación de nuestro estudio no ha permitido constatarlo.

5. IMPORTANCIA DEL CRIBADO DE *BRCA1/2*. PERSPECTIVAS FUTURAS

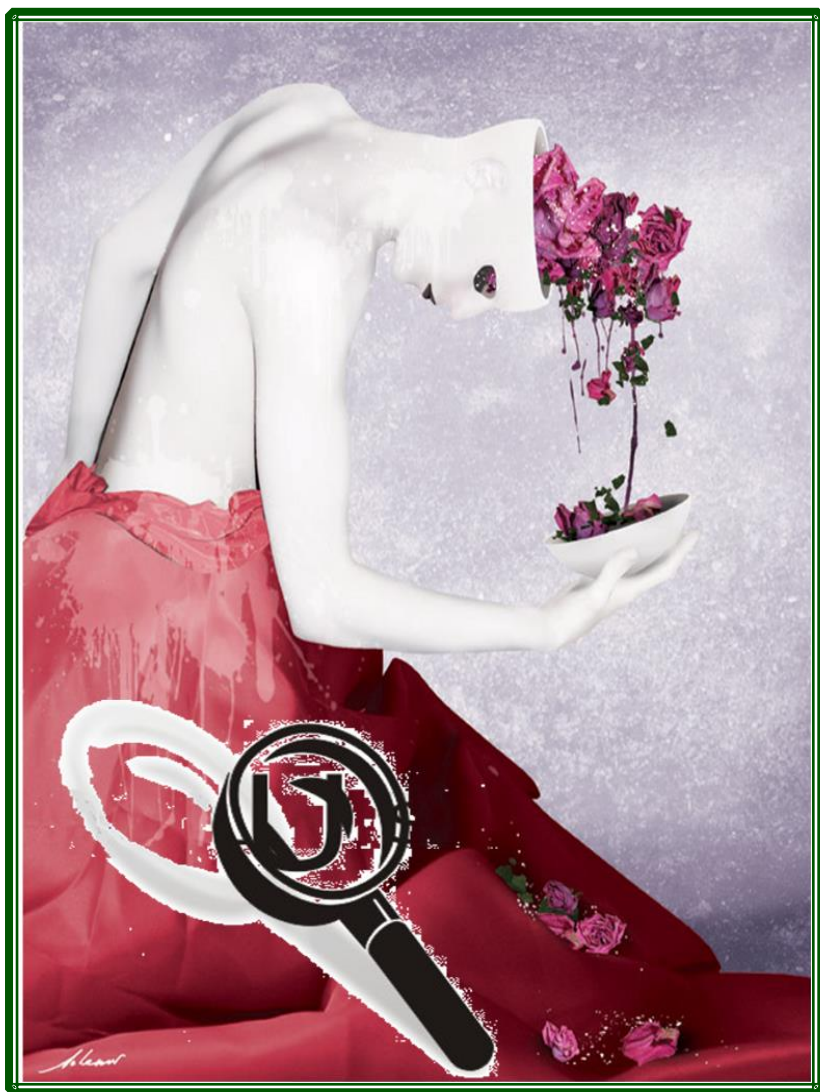
Hasta el momento, los criterios para indicar el estudio de mutaciones en los genes *BRCA1/2*, en la mayoría de PCGC y, en particular, en el PCGCHCV⁹, se ha centrado básicamente en la agregación familiar de casos de CM y/o de CO (Material y métodos: apartado 1, Tabla 4). Sin embargo, la última versión de la Guía de Cáncer Hereditario que se publicará a finales del 2015 la Consellería de Sanidad de la Comunidad Valenciana, ha hecho extensivo el estudio de las mutaciones en los genes *BRCA1/2* a todos los CMTN < 50 años^{270,271} y CO epiteliales (COE) de alto grado^{272,273}, con independencia de que exista historia familiar. Ello se fundamenta en las recomendaciones recientemente realizadas por el *National Comprehensive Cancer Network Guidelines v.2.2014*²⁷⁴ y en la elevada prevalencia de mutaciones de *BRCA1/2*²⁷⁵ en los CMTN situada entre el 15 y 18%^{276,277}, que puede llegar al 27% en CMTN < 50 años²⁷⁷. Asimismo, se ha comprobado una prevalencia de mutaciones en los genes *BRCA1/2* entre 8-13% en pacientes con COE²⁷⁸, que en su mayoría carece de historia familiar alguna.

Actualmente, el estudio de mutaciones en los genes *BRCA1/2* no solo tiene valor para la identificación de familias con riesgo de CMOH, sino que también adquiere importancia gracias a los avances terapéuticos recientes. Así, la implantación de nuevas terapias dirigidas contra dianas moleculares, como los inhibidores del *PARP*²⁷⁹, puede

beneficiar a las pacientes con déficits en la RH como son las pacientes con COE portadoras de mutación en los genes *BRCA1/2*²²³.

Aunque las mutaciones en los genes *BRCA1/2* son las principales responsables de la predisposición hereditaria al CM y CO existen otros genes de penetrancia intermedia (*TP53*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* y, recientemente, el *RECQL*²⁸⁰) cuyas mutaciones representan entre el 4-15% del CM familiar¹³⁰. Los CM familiares no valorables en el estudio de mutaciones de los genes *BRCA1/2*⁶⁷ se podría completar con el estudio de estas nuevas mutaciones, aumentando el porcentaje de detección, si existieran métodos de cribado de alto rendimiento aplicables a la rutina asistencial.

La demanda creciente de estudios genéticos ha supuesto un gran aumento de la carga asistencial, solo asumible con metodologías de alto rendimiento como puede ser el cribado con HRM aquí expuesto. No obstante, en un futuro inmediato cuando la implantación de las nuevas metodologías de NGS en el laboratorio asistencial consiga reducir los costes será factible incorporar en la práctica clínica, el testado simultáneo de los genes de moderada penetrancia^{67,68,272}, y extender los estudios de mutaciones a un mayor número de pacientes con CM y/o CO.



CONCLUSIONES

El objetivo principal de esta tesis es conocer la prevalencia de mutaciones en los genes *BRCA1/2* detectadas en una serie de 462 pacientes españolas con CME. Esto ha requerido la puesta a punto de un método de cribado de alto rendimiento basado en el análisis de las curvas de fusión de alta resolución o *High Resolution Melting*. Los resultados de este estudio han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. El método de cribado de HRM optimizado permite la detección de las 99 mutaciones españolas estudiadas en los genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario, *BRCA1* y *BRCA2*.
2. Los resultados del estudio comparativo de los métodos CSGE y HRM realizado en 52 pacientes con CMOH confirman que el método de HRM presenta claras ventajas sobre la CSGE por su mayor sensibilidad, elevado rendimiento, posibilidad de automatización y buena relación coste/beneficio.
3. La baja prevalencia de mutaciones detectada en los genes *BRCA1/2* en nuestra serie de pacientes con CME (1,3%) podría deberse al rastreo parcial de estos genes.

4. La presencia de mutaciones en las pacientes con CME se asocia con diagnósticos más tempranos y tumores de fenotipo más agresivo, con mayor TNM, GH más avanzado y mayor proporción de RE negativos.

5. La realización de esta tesis ha permitido la puesta a punto y validación de la técnica de HRM que, combinada con su robotización, ha conferido al método un mayor rendimiento y calidad; permitiendo su implantación en el cribado de mutaciones en los genes *BRCA1/2* de todos los pacientes con CMOH incluidos en el PCGCHCV.

Actualmente, si la implantación de las nuevas tecnologías de NGS permite reducir los costes y automatizar el proceso, los estudios de mutaciones en los genes *BRCA1/2* podrían extenderse a un mayor número de pacientes con CM y/o CO incorporando, incluso, el testado simultáneo de genes de moderada penetrancia en la práctica clínica. La incorporación del testado de mutaciones en los genes *BRCA1/2* en los pacientes con CMTN y CO es hoy día de gran interés ya que este grupo de pacientes carece de un tratamiento específico y la detección de mutaciones en los genes *BRCA1/2* abre la posibilidad al tratamiento con los inhibidores del PARP.



DOCUMENTOS ANEXOS

1. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características diferenciales de los fenotipos inmunohistoquímicos de CM:....	7
Tabla 2: Principales características de los métodos empleados en el estudio de mutaciones en los <i>BRCA1/2</i> :.....	22
Tabla 3: Prevalencia de mutaciones encontradas en los genes <i>BRCA1/2</i> en pacientes con CME.....	32
Tabla 4: Criterios de inclusión familiar establecidos en el PCGCHCV para estudio de mutaciones en <i>BRCA1/2</i>	45
Tabla 5: Características demográficas y anatómo-patológicas de las pacientes con CME	46
Tabla 6: Mezclas de reactivos y concentraciones empleadas:	53
Tabla 7: Programa de PCR común para la amplificación de todos los fragmentos de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	54
Tabla 8: Variantes genéticas detectadas en <i>BRCA1</i> por los métodos de cribado CSGE y HRM	76
Tabla 9: Variantes genéticas detectadas en <i>BRCA2</i> por los métodos de cribado CSGE y HRM	79
Tabla 10: Comparación de los gastos y el tiempo empleado en el cribado de los genes <i>BRCA1/2</i> por CSGE y HRM.....	82
Tabla 11: Variantes detectadas en <i>BRCA1</i> en las pacientes con CME, su prevalencia y repercusión biológica.....	83
Tabla 12: Variaciones detectadas en <i>BRCA2</i> en las pacientes con CME, su prevalencia y repercusión biológica.....	84

Tabla 13: Mutaciones detectadas en <i>BRCA1/2</i> en las pacientes con CM estudiadas	85
Tabla 14: Características anatómo-patológicas de las pacientes con CME.....	87
Tabla 15: Variantes de efecto desconocido detectadas en <i>BRCA1</i> en nuestra serie	90
Tabla 16: Variantes de efecto desconocido detectadas en <i>BRCA2</i> en nuestra serie	92
Tabla 17: Polimorfismos detectados en las pacientes con CME	95

2. MUTACIONES ESPAÑOLAS EN *BRCA1/2* ESTUDIADAS

Tabla A.1: Mutaciones españolas en *BRCA1* incluidas en el presente estudio:

	Exón	Mutación	Tipo de mutación *	Procedencia
1	2	c.68_69delAG	FS	Valencia
2	2	c.70_73dupTGTC	FS	San Pau
3	3	c.117_118delTG	FS	CNIO
4	3	c.124delA	FS	San Pau
5	5	c.211A>G	M	IBGM
6	I-5	c.212+1G>A	Sp	IBGM
7	I-6	c.302-1G>A	Sp	Valencia
8	7	c.324insA	FS	Valencia
9	8	c.470_471delCT	FS	H. Clínico
10	11	c.791_794delGTTC	FS	Galicia
11	11	c.1016_1017insA	FS	IBGM
12	11	c.1121_1123delCACinsT	FS	San Pau
13	11	c.1333G>T	N	San Pau
14	11	c.1504_1508delTTAAA	FS	Valencia
15	11	c.1570delG	FS	Valencia
16	11	c.1672delA	FS	Valencia
17	11	c.1687C>T	N	Salamanca
18	11	c.1912delG	FS	San Pau, Salamanca
19	11	c.1953_1956del4	FS	Valencia
20	11	c.1961delA	FS	Valencia
21	11	c.2241deC	FS	IBGM
22	11	c.2292_2311dup19	FS	IBGM
23	11	c.2389_2390delGA	FS	IBGM
24	11	c.2683_2687del5	FS	IBGM
25	11	c.2728C>T	N	Valencia
26	11	c.3331_3334delCAAG	FS	Valencia
27	11	c.3481_3491del11	FS	Valencia
28	11	c.3581delC	FS	Valencia
29	11	c.3770_3771delAG	FS	Valencia
30	11	c.3785C>A	N	Valencia

Tabla A.1: (Continuación)

	Exón	Mutación	Tipo de mutación *	Procedencia
31	11	c.3839delCTCAinsAGGC	FS	IBGM
32	12	c.4111_4112insATCT	FS	H. Clínico
33	12	c.4161_4162delTC	FS	Valencia
34	12	c.4167_4168insAG	FS	Valencia
35	13	c.4195_4196delAC	FS	San Pau
36	13	c.4287C>A	N	Valencia
37	13	c.4305_4306delCT	FS	Valencia
38	17	c.5030_5033delCTAA	FS	Valencia
39	18	c.5078_5080delCTG	FS	San Pau
40	18	c.5080G>T	N	IBGM
41	18	c.5095C>A	M	Valencia
42	18	c.5117G>C	M	Valencia, San Pau
43	18	c.5117G>A	M	IBGM
44	18	c.5123C>A	M	Valencia
45	18	c.5144G>A	M	San Pau
46	18	c.5154+5G>A	Sp	Valencia
47	I-18	c.5155-1G>C	Sp	H. Clínico
48	I-18	c.5155-1G>A	Sp	IBGM
49	I-20	c.5277+1G>A	Sp	IBGM
50	I-20	c.5278-1G>C	Sp	H. Clínico
51	21	c.5311_5334del23	FS	Valencia
52	21	c.5332G>T	M	IBGM
53	23	c.5419delA	FS	San Pau
54	24	c.5506G>T	N	San Pau

Las mutaciones patogénicas impresas en rojo son mutaciones españolas no incluidas en nuestro estudio al no disponer de ADN. * FS: *Frame-shift*, Sp: *Splicing*, N: *Nonsense*, M: *Missense*.

Tabla A.2: Mutaciones españolas en *BRCA2* incluidas en el presente estudio:

	Exón	Mutación	Tipo de mutación*	Procedencia
1	I-2	c.67+2T>C	Sp	Valencia
2	3	c.145G>T	N	Valencia
3	3	c.261_262delCT	Fs	Valencia
4	5	c.439C>T	N	IBGM
5	10	c.1126delT	Fs	Valencia
6	10	c.1310_1313delAAGA	Fs	IBGM
7	10	c.1448_1449delAGinsTTAC	Fs	Valencia
8	10	c.1597delA	Fs	San Pau
9	10	c.1607_1608insT	Fs	Valencia
10	10	c.1645_1648delAGGA	Fs	Valencia
11	10	c.1763A>G	M	IBGM
12	10	c.1842_1843dupT	Fs	Valencia
13	11	c.2376C>A	N	Valencia
14	11	c.2455C>T	N	IBGM
15	11	c.2808_2811delACAA	Fs	Valencia
16	11	c.3146delA	Fs	San Pau
17	11	c.3264_3265insT	Fs	Valencia
18	11	c.3847_3848delGT	Fs	Valencia
19	11	c.3854delA	Fs	San Pau
20	11	c.3922G>T	N	Valencia
21	11	c.4797delT	Fs	Valencia
22	11	c.4936_4939delGAAA	Fs	IBGM
23	11	c.5112_5115delAATA	Fs	IBGM
24	11	c.5146_5149delTATG	Fs	IBGM
25	11	c.5350_5351delAA	Fs	IBGM
26	11	c.5579_5582delTTAA	Fs	Valencia, H. Clínico, IBGM
27	11	c.5718_5721delCTCT	Fs	Valencia
28	11	c.5851_5854delAGTT	Fs	San Pau
29	11	c.5890delA	Fs	Valencia
30	11	c.5898delT	Fs	IBGM
31	11	c.5980C>T	N	Valencia
32	11	c.6275_6276delTT	Fs	Valencia
33	11	c.6494delT	Fs	Valencia
34	11	c.6629_6630delAA	Fs	San Pau

Tabla A.2: (Continuación)

	Exón	Mutación	Tipo de mutación*	Procedencia
35	11	c.6644_6647delACTC	Fs	Valencia
36	11	c.6656C>G	N	IBGM
37	14	c.7060C>T	N	IBGM
38	14	c.7109_7110delAA	Fs	CNIO
39	14	c.7171_7172insA	Fs	Valencia
40	14	c.7234_7235insG	Fs	Valencia
41	17	c.7863T>A	N	Valencia
42	I-17	c.7977-1G>C	Sp	Valencia
43	18	c.8012_8035del23	Fs	H. Clínico
44	18	c.8032_8033insGA	Fs	IBGM
45	18	c.8042_8043delAC	Fs	Valencia
46	18	c.8065_8066insTT	Fs	H. Clínico
47	18	c.8070_8071insTT	Fs	San Pau
48	21	c.8646_8649delACCA	Fs	Salamanca
49	23	c.8978_8992del14	Fs	Valencia
50	23	c.8988_8990delATAinsT	Fs	Valencia
51	23	c.9018C>A	N	Valencia
52	23	c.9026_9030delATCAT	Fs	Valencia
53	24	c.9247A>T	N	IBGM
54	25	c.9286G>T	N	San Pau
55	25	c.9310_9311delAA	Fs	CNIO, IBGM
56	25	c.9466C>T	N	Valencia

Las mutaciones patogénicas impresas en rojo son mutaciones españolas no incluidas en nuestro estudio al no disponer de ADN. * FS: *Frame-shift*, Sp: *Splicing*, N: *Nonsense*, M: *Missense*.

3. CEBADORES Y CONDICIONES EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE MUTACIONES PUNTUALES DE *BRCA1/2* POR CSGE:

Tabla A.3: Cebadores empleados para la amplificación de *BRCA1* y condiciones de las PCR múltiples:

PCR múltiple	Exón	Primers Forward/Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Primer/ MgCl ₂	Tª hibridación	Enzima
A1	2	F:GACGTTGTCATTAGTCTTTGG R:GGTCAATTCTGTTCAATTGC	310	0,2/1,5	56°C	Taq Gold (5U/uL)
	11a	F:AGTTGGTTGATTTCCACCTC R:AGCCTCATGAGGATCACTGG	739	0,32/3,7		
	11g	F:AGGGGCCAAGAAATTAGAGT R:GTGCTCCCAAAGCATAAA	564	0,32/3,7		
	20	F:ATATGACGTGTCTGCTCCAC R:TGCAAAGGGGAGTGGAATAC	229	0,13/3,7		
B1	11b	F:ATTTGCTCCGTTTTCAAATC R:CGGCTAATTGTGCTCACTGT	476	0,32/3,5	56°C	Taq Gold (5U/uL)
	11c	F:CTGAAGTTAACAAATGCACCTGG R:TTCTTTAAGGACCCAGAGTGG	584	0,32/3,5		
	11d	F:TCCAAGTACAGTGAGCACAATTA R:AACAAGTGTGGAAGCAGGG	633	0,32/3,5		
	11e	F:TTTGGCAGTTCAAAAGACTCC R:CTCTTGGGAGGCTAGGATTGA	620	0,32/3,0		
C1	11f	F:GCCAAAGTAGCTGATGTATTGG R:ATTCATCACTTGACCATTCTGC	423	0,32/3,0	56°C	Taq Gold (5U/uL)
	5	F:CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG R:ATGGTTTTATAGGAACGCTATG	278	0,64/3,0		
D1	12	F:GCGTTTTATAGTCTGCTTTTACA R:TGTCAGCAAACCTAAGAATGT	227	0,32/3,0	54°C	Taq Gold (5U/uL)
	16	F:AATTCTTAACAGAGACCAGAAC R:AAAACCTCTTCCAGAATGTTGT	450	0,35/3,0		
	10	F:GATCTTGGTCATTTGACAGTTC R:CCCAAATGGTCTTCAGAATA	240	0,26/3,0		
E1	21	F:AAGCTCTTCTTTTTGAAAGTC R:GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT	298	0,16/3,0	54°C	Taq Gold (5U/uL)
	22	F:AGTGTAGGGTAGAGGGCCTG R:AGTCTTGCTCACAGGAGAGA	207	0,16/3,0		
	17	F:AGCTGTGTGCTAGAGGTAACCTC R:GTGGTTTTATGCAGCAGATG	190	0,16/2,7		
F1	18	F:ATCCAGATTGATCTTGGGAG R:CTCAGACTCAAGCATCAGC	312	0,32/2,7	54°C	Taq Gold (5U/uL)
	13	F:AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA R:TGTTGGAGCTAGGTCTTAC	319	0,16/3,0		
G1	15	F:CAGACTTCTAGGCTGTCTTGC R:GTGTTTGTCCAATACAGCAG	378	0,16/3,0	54°C	Taq Gold (5U/uL)
	19	F:ATCTCCGTGAAAAAGAGC R:CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC	208	0,16/3,0		

Tabla A.3: (Continuación)

PCR múltiple	Exón	Primers Forward/Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Primer/MgCl ₂	T ^a hibridación	Enzima
H1	3	F:AACGAACTTGAGGCCTTATG R:TTGGATTTTCGTTCTCACTT	308	0,32/3,0	54°C	Taq Gold (5U/uL)
	6	F:CTTATTTTAGTGTCTCTAAAAGG R:GGTCTTATCACCACGTCATAG	251	0,22/3,0		
	14	F:TTTGTGTATCATAGATTGATGC R:AACAAAAGAAGTATCCTAGAGC	387	0,38/3,0		
I1	8	F:GGTGCAAGTTTCTCTTCAGG R:AACCCAGCAATTATTATAAATAC	230	0,13/3,0	54°C	Taq Gold (5U/uL)
	9	F:GAATATCTGTTTTCAACAAGTACA R:TCTATGAAGCTGGTATTTTCTA	127	0,42/3,0		
J1	23	F:CAGAGCAAGACCCGTCTC R:ACTGTGCTACTCAAGCACCA	255	0,64/3,0	56°C	Taq Gold (5U/uL)
	24	F:ATGAATTGACACTAATCTCTGC R:GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA	280	0,32/3,0		
Exon7	7	F: CAC AAC AAA GAG CAT ACA TAG GG R: AGG AGG ACT GCT TCT AGC CTG	353	0,16/3,0	62°C	Taq No Gold (5U/uL)

Tabla A.4: Cebadores empleados para la amplificación de *BRCA2* y condiciones de las PCR múltiples:

PCR múltiple	Exón	Primers Forward/Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Primer/MgCl ₂	T ^a hibridación	Enzima
A2	3	F: TCTGGGTCACAAATTTGTCTGTCA R:TTCTAGTTTTGTAGTTCTCCCAGTC	296	0,06/3,0	60-50°C	Taq Gold (5U/uL)
	20	F: CACTGTGCCTGGCCTGATAC R: ATGTTAAATTCAAAGTCTCTA	356	0,64/3,0		
	23-24	F: ACTTCTCCATTGCATCTTTCTCA R: AGTCCAATAATCATAAGA	520	0,32/3,0		
B2	8	F: AATAGTAGATGTGCTTTTTCA R: ACATATAGGACCAGGTTTAGAGAC	285	0,08/3,0	60-50°C	Taq No Gold (5U/uL)
	15	F: GGCCAGGGGTTGTGCTTTTT R: AGGATACTAGTTAATGAAATA	314	0,64/3,0		
	27a	F:TAGGAGTTAGGGGAGGGAGACTGTGT R:TTTTTAAATGGAGTCATCTGAGGAGA	462	0,10/3,0		
C2	12	F: AGGTCATATTTGTTGTAAG R: AGTGGCTCATGTCTGTAAT	358	0,38/2,5	60-50°C	Taq Gold (5U/uL)
	14	F: ATGTAGCAAATGAGGGTCTG R: CAAAGGGGGAAAACCATCAG	609	0,70/3,0		
	27b	F:AAGGCATTTTCAGCCACCAAGGAGT R:GTGGTTTGAAATTATATTCAGTCTT	450	0,35 / 3,0		
D2	9	F:CTAGTGATTTTAAACTATAATTTTTG R: GTTCAACTAACAGAGGACT	164	0,25/3,0	52°C	Taq No Gold (5U/uL)
	13	F: TAAAGCCTATAATTGTCTCA R: CTTCTTAACGTTAGTGTCAAT	271	0,58/3,0		
	19	F: AAGTGAATATTTTTAAGGCAGTT R: TATATGGTAAGTTTCAAGAAT	296	0,32/3,0		

Tabla A.4: (Continuación)

PCR múltiple	Exón	Primers Forward/Reverse (5'→3')	Tamaño (pb)	Primer/MgCl ₂	T ^a hibridación	Enzima
E2	11EF	F: TTCAAAAATAACTGTCAATCC R: CTGAAGCTACCTCCAAAACCTGTG	430	0,25/3,0	60-50°C	Taq No Gold (5U/uL)
	11MO	F: TTTATGAAGGAGGGAAAACACTCA R: CATTGATGGCTAAAACCTGGTG	575	0,25/3,0		
	17	F: CAGAGAATAGTTGTAGTTGTTGAA R: AGAAACCTTAACCCATACTGC	306	0,35/3,0		
F2	5-7	F: AACAAATTTATATGAATGAGAATC R: AACAGAAGTATTAGAGATGAC	686	0,32/3,0	52°C	Taq No Gold (5U/uL)
	16	F: TTTGGTAAATTCAGTTTTGGTTT R: AACACACAATCTTTTTGCATAGA	299	0,32/3,0		
	26	F: AAGGAAATACTTTTTGGAAACATAA R: TTTACTAGGTATACACAGAA	330	0,32/3,0		
G2	2	F: CTCAGTCACATAATAAGGAAT R: AACTGTGACGTAAGGGTTTT	256	0,16/3,5	60-50°C	Taq No Gold (5U/uL)
	18	F: ATTCAGTTTTTATTCTCAGTTATTC R: TTTAACTGAATCAATGACTG	568	0,8/3,5		
	21	F: GGGTGTATGCTTGGTTCT R: CATTTCACATATTCCTCTCTG	304	0,32/3,0		
H2	4	F: AGAATGCAAATTTATAATCCAGAGTA R: AATCAGATTCATCTTTATAGAACAAA	249	0,20/3,0	60-50°C	Taq No Gold (5U/uL)
	22	F: TTTTGTCTGATTGCTTTTTTATTC R: AATCATTTTGTAGTAAGGTCAT	314	0,32/3,0		
	25	F: TAAATTCATCTAACACATCTAT R: ATTTCCCATTCCTCCATCT	450	0,32/3,0		
I2	11AB	F: GATGGTACTTTAATTTTGTCACTTTG R: TTTCATGATCATATAAAAGACT	425	0,48/3,0	52°C	Taq Gold (5U/uL)
	11D	F: TCTAGAGCAAGAATCATA R: TCATTGTCTGAGAAAAGTTC	305	0,16/3,0		
J2	11C	F: CAAAAGTGGAATACAGTGATAC R: ATAATTTTCATTTAAAGCACATACAT	254	0,22/3,2	60-50°C	Taq No Gold (5U/uL)
	11GH	F: ACAAATGGGCAGGACTCTTAGG R: GCTGCTGTCTACCTGACCAA	566	0,25/3,2		
	11IL	F: GATGCTGATCTTCATGTCATAA R: AAAAAGTTAAATCTGACAAATCT	688	0,64/3,2		
K2	10A	F: TATAAAATATTAATGTGCTTCTGTT R: AAAGGGCTTCTGATTGCTAG	374	0,25 / 3,2	55-45°C	Taq No Gold (5U/uL)
	10E	F: TATGTCCAAATTAATTGATAAT R: AAACACAGAAGGAATCGTCATC	320	0,16 / 3,2		
	11ST	F: AACCAGAAAAGATAAAACT R: ATTTTGTATTTATCTTCGTTGTT	550	0,64/3,2		
L2	10BD	F: ATCTGAAGTGAACCAAATGATAC R: GTGGATATTAACCTGCATTCTCAA	681	0,32 / 3,2	60-50°C	Taq No Gold (5U/uL)
	11UV	F: AAGACATATTTACAGACAGT R: TTGGGATATTAATGTTCTGGAGTA	539	0,32/3,2		
	11YZ	F: TTCAACAAGACAACAACAGT R: AGCATACCAAGTCTACTGAATAAAC	443	0,32/3,2		
LL2	11PQ	F: TCATACAGCTAGCGGGAAAAA R: AATGACTGAATAAGGGGACTGAT	468	0,32/3,2	60-50°C	Taq No Gold (5U/uL)
	11R	F: GTCCTGCAACTTGTTACAC R: GATTTTTGTCAATTTTCAGC	243	0,32/3,2		
	11WX	F: AAAGTAACGAACATTCAGACCA R: GTGAGACTTTGGTTCCTAAT	421	0,32/3,2		

Tabla A.5: Programas de PCR múltiples:

AmpliQaq Gold					
Parámetros	Programa 1	Programa 2			Programa 3
Denominación	Desnaturalización	Amplificación			Elongación
Nº Ciclos	1	30			1
Temperatura [°C]	95	94	54, 56, 60-50	72	72
Tiempo [min]	10	1	1	2	10

Las T^a de hibridación varía en cada PCR múltiple (54, 56 o 60-50)

AmpliQaq NO Gold					
Parámetros	Programa 1	Programa 2			Programa 3
Denominación	Desnaturalización	Amplificación			Elongación
Nº Ciclos	1	30			1
Temperatura [°C]	95	94	52, 54, 55-45, 60-50	72	72
Tiempo [min]	2	0,45	1	1	5

Las T^a de hibridación varía en cada PCR múltiple (52, 54, 55-45 o 60-50)

Tabla A.6: Programa de formación de los heteroduplex:

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización	98	5
	90	5
	80	5
Renaturalización	75	10
	40	20
	25	30

Tabla A.7: Condiciones de la electroforesis en geles verticales:

Parámetro	Condiciones
Temperatura de carrera	20-25°C
Voltaje de carrera	230 voltios
Tiempo de carrera	900 min
Gel	Prona Sec y formamida
Buffer de electroforesis	TBEx1
Muestras	1-4 µl PCR múltiple + 1-4 µl de 6x Loading Dye Solution (Vf = 15 µl)

4. CEBADORES, CONDICIONES EMPLEADAS Y GRÁFICAS DIFERENCIALES OBTENIDAS PARA CADA FRAGMENTO MEDIANTE HRM

Tabla A.8: Cebadores y condiciones para cada PCR de las mutaciones patogénicas descritas en la población española en *BRCA1*

Exón	Primers F/R (5'→3')	Tamaño (pb)	Primer/MgCl ₂	Mutación en DNA	DP (R)*
2	GACGTTGTCATTAGTCTTTGG/ GGTCAATTCTGTTCAATTGC	140	0,2/ 2,5	c.68_69delAG	7.31
				c.70_73dupTGTC	14.91
3	GCCTCATTTATTTCTTTTTCTCC/ ATGGAGCCACATAACACATTCA	123	0,2/ 2,5	c.117_118delTG	17.73
				c.124delA	8.43
5	TTCATGGCTATTTGCCTTTG / GTGGTTGCTTCCAACCTAGC	199	0,2/ 2,5 + 5%DMSO	c.211A>G	15
				c.212+1G>A	9
7	TTTCCTTGATTTTACAGATGC/ CAAATGGTTTTACCAAGGAAGG	187	0,3/3,0	c.302-1G>A	0
				c.324insA	7.3
8	GGTGTCAAGTTTCTCTTCAGG/ AATCCAGCAATTATTATAAATA	230	0,2/ 2,5	c.470_471delCT	24.37
	AGCTGAGAGGCATCCAGAAA/ GCTGTAATGAGCTGGCATGA	95	0,2/ 2,5	c.791_794delGTTC	14.2
	ATAGGCGGACTCCCAGCAC/ TCACTTCTGGAAAACCACTCA	181	0,2/ 2,5	c.1016insA	7.96
				c.1121_1123delCACinsT	71.3
	TCAAATGCCAAAGTAGCTGATG/ TTCCGATAGGTTTTCCCAA	188	0,2/ 2,5	c.1333G>T	51.92
	AGAGCGTCCCCTCACAAATA/ CCGTTTGGTTAGTTCCCTGA	137	0,2/ 2,5	c.1504_1508delITAAA	22
				c.1570delG	16.45
	GGAACAAACAAACGGAGCA/ CGCATGAATATGCCTGGTAG	264	0,2/ 2,5	c.1672delA	3.02
				c.1687C>T	---
	GAAAGCTGAACCTATAAGCAGCA GTTTCTGCTGTGCCTGACTG	249	0,2/ 2,5	c.1912delG	3.81
				c.1953_1956del4	6.81
11	TTTGTCAATCCTAGCCTTCCA/ GTCCCTGGGGTTTTCAAAT	280	0,2/ 2,5	c.1961delA	15.81
				c.2241deC	4
	CCAGTCATTTGCTCCGTTTT/ CTGACCAACCACAGGAAAGC	205	0,2/ 2,5	c.2292_2311dup19	---
				c.2389_2390delGA	3.78
	TAGGGGTTTTGCAACCTGAG/ GAACAAACCTGAGATGCATGA	184	0,2/ 2,5	c.2683_2687del5	5.47
				c.2728C>T	4.28
	TGCATCTCAGGTTTGTCTGA/ CCCTCTCGTAACCTGA	193	0,2/ 2,5	c.3331_3334delCAAG	25
				c.3481_3491del11	---
	CGTTGCTACCGAGTGTCTGT/ GAAAGGATCCTGGGTGTTTG	210	0,2/ 2,5	c.3581delC	22.43
				c.3770_3771delAG	30
				c.3785C>A	19
				c.3839delCTCAinsAGGC	36
				c.4111_4112insATCT	---

Tabla A.8: (Continuación)

Exón	Primers F/R (5'→3')	Tamaño (pb)	Primer/ MgCl ₂	Mutación en DNA	DP (R)*
12	CTGCTTTTACATCTGAACCTCTG/ GCACACACACACACGCTTTT	150	0,2/ 2,5 + 5%DMSO	c.4161_4162delTC	21.93
				c.4167_4168insAG	17.93
13	TTTTCTGGTGCCATTTATCG/ TTGTTCTGGATTTTCGAGGT	186	0,2/ 2,5	c.4195_4196delAC	3.41
				c.4287C>A	6.59
				c.4305_4306delCT	6.59
17	AGCTGTGTGCTAGAGGTAATC/ CATCTGCTGCATAAAACCACA	190	0,2/ 2,5	c.5030_5033delCTAA	18.7
				c.5078_5080delCTG	19.9
18	GCACTTCTGATTTTGTTC/TTCTGAGGTGTTAAAGGGAGGA	180	0,2/ 2,5	c.5080G>T	---
				c.5095C>A	20.5
				c.5117G>C	16
				c.5117G>A	---
				c.5123C>A	21.9
				c.5144G>A	6.2
				c.5154+5G>A	3.2
19	GCTCTTTTGTGAATCGCTGA/ TTACCTCATTTCAGATTTTCTT	135	0,3/3,0 + 5%DMSO	c.5155-1G>C	5.8
				c.5155-1G>A	19
20	ATATGACGTGTCTGCTCCAC/ TGCAAAGGGGAGTGAATAC	231	0,2/ 2,5	c.5277+1G>A	12
21	TTCCCCTGTCCCTCTCTT/ CCATCGTGGGATCTTGCTTA	173	0,2/ 2,5 + 5%DMSO	c.5278-1G>C	9
				c.5311_5334del23	44.6
				c.5332G>T	---
23				c.5419delA	---
24				c.5506G>T	---

Tabla A.9: Cebadores y características para cada PCR de las mutaciones patogénicas descritas en la población española en *BRCA2*

Exón	Primers F/R (5'→3')	Tamaño (pb)	Primer/ MgCl ₂	Mutación en DNA	DP (R)*
2	TGGTCTTCTGTTTTGCAGACTT	199	0,3/3,0	c.67+2T>C	-8.7
	TGGGTTTTTAGCAAGCATTTTT				
3	TTCTTCAGAAGCTCCACCCTA	189	0,25/2,5	c.145G>T c.261_262delCT	-34.2 10.5
	AATCTTTTTACAGGAGATTGGTACA				
5	AATGCTTCATGAGAGATTTACTTTTT	212	0,3/3,0	c.439C>T	-15.8
	CCTGACTTATCTCTTTGTGGTGT				
10	GGAACCAAATGATACTGATCCA	189	0,25/2,5	c.1126delT	13.1
	TGGTCACATGAAGAAATATGCAA	248	0,25/2,5	c.1310_1313delAAGA	17.1
	TGCATATTTCTTCATGTGACCA			c.1448_1449delAGinsT TAC	11.5
	AGAAGCCACTGGAGAAGTTCC	146	0,25/2,5	c.1597delA	8.5
	CAATGCAAGTTTTTCAGGTCA			c.1607_1608insT	14.7
	CTGGCCAGCTTCCATTATCA	175	0,25/2,5+ 5%DMSO	c.1645_1648delAGGA	17.7
CAGCCACCACCACACAGA	c.1763A>G			-12.5	
GCTTCAAACCTGGGCTGAACA	195	0,3/3,0	c.1842_1843dupT	14.1	
11	CCAAGGATGTTCTGTCAAACC	195	0,3/3,0	c.2376C>A c.2455C>T	14.7 6.9
	TGTATTTTTCAGGTGGCAACA				
	GACTTGTTAAACGAACCCATT	120	0,25/2,5	c.2808_2811delACAA	21.5
	TCCTCTGCAAGAACATAAACCA	244	0,3/3,0	c.3146delA	-2.3
TCTCTGAACATAACATTAAGAAGAG CA/ TTTGAATTAATACTCTGCTTGA	c.3264_3265insT			3.2	
	TTCAAGTAAATGTCATGATTCTGTTG	199	0,3/3,0	c.3847_3848delGT	9.6
	GGCAGCAGTATATTTGTTATCTTCA			c.3854delA	5.9
	ACAGCTGCCCCAAAGTGTA	231	0,3/3,0	c.3922G>T	10.9
	TGAATAAGGGGACTGATTTGTG			c.4797delT	5.5
	TGGCTTAGAGAAGGAATATTTGATG	129	0,3/3,0	c.4936_4939delGAAA	10.7
	TTGGGAGAGATGATTTTTGTCA			c.5112_5115delAATA	20.1
	TTGATTCTGGTATTGAGCCAGT	140	0,3/3,0	c.5146_5149delTATG	13.1
	CACAAGTTCCTCAACGCAAA			c.5350_5351delAA	-9.8
11	GGCCACCTGCATTTAGGATA	242	0,25/2,5	c.5579_5582delTTAA	20.4
	AACCTTATGTGAATGCGTGCT	241	0,3/3,0	c.5718_5721delCTCT	12.4
CAAAATATGTCTGGATTGGAGAAA	c.5851_5854delAGTT			3.7	
	CTTTGAAAAGACTTGCTTGG	167	0,25/2,5	c.5890delA	11.2
	TGAAAAGCAAGTTTCCATTTT CACAGTGCTCTGGGTTTCTCT			c.5898delT	17.7
	CCATATCTCTCAATTTCAACAAGA	236	0,3/3,0	c.5980C>T	---
	GCAATTTCTACTGCTTCTGTTTCA			c.6275_6276delTT	15.9
14-1	GAACGTCAAGAGATACAGAATCCA	197	0,3/3,0	c.6494delT	9.2
	ACTTTGGTTGGTCTGCCTGT			c.6629_6630delAA	4.1
		236	0,3/3,0	c.6644_6647delACTC	4.9
				c.6656C>G	5.4
		197	0,3/3,0	c.7060C>T	26.9
				c.7109_7110delAA	19.9
				c.7171_7172insA	4.6

Tabla A.7: (Continuación)

Exón	Primers F/R (5'→3')	Tamaño (pb)	Primer/MgCl ₂	Mutación en DNA	DP (R)*
14-2	ACAGGCAGACCAACCAAAGT AGCTGCTGCTTGATTGGAGT	207	0,25/2,5	c.7234_7235insG	6.5
17	TTTGTTTCAGGGCTCTGTGTG TGAAGAAGCACCCCTTCTGG	168	0,3/3,0	c.7863T>A	9.2
18	TGAATTCTAGAGTCACACTTCTA A TTCAGATATATTTGCGCTCAATG	183	0,3/3,0	c.7977-1G>C	7.3
				c.8012_8035del23	31.5
				c.8032_8033insGA	22.6
				c.8042_8043delAC	19.6
				c.8065_8066insTT	--
c.8070_8071insTT	13.5				
21	TGGGTG TTTTATGCTT GGTTT TGCTGCATTCTTCACTGCTT	187	0,25/2,5	c.8646_8649delACCA	19.9
23	GCATCTTTCTCATCTTTCTCCAA GGTTTGTACCGGTAGTTGTTGA	200	0,25/2,5	c.8978_8992del14	27.4
				c.8988_8990delATAins T	8.5
				c.9018C>A	12.1
				c.9026_9030delATCAT	17.6
24	TCAGCCATCTTGTCTGAGG TGCCAACCTGGTAGCTCCAAC	156	0,3/3,0	c.9247A>T	7.1
25	CCTTTCTGCATCTTAAAATTCATCT CCTTACCTCAACAGTATTTTCATT	264	0,25/2,5	c.9286G>T	8.7
				c.9310_9311delAA c.9466C>T	--- -3.9

Tabla A.8: Parámetros empleados en el ABI Prism 3130 para la reacción de secuencia:

Parámetro	Condiciones
Temperatura de carrera	60°C
Voltaje de inyección	1,6 kV
Tiempo de inyección	10 seg
Voltaje de carrera	13,4 kV
Tiempo de carrera	1.500 seg (PCR HRM) o 2.800 seg (PCR convencional)
polímero GeneScan	POP7
Buffer de electroforesis	TBE x1
Muestras	PCR purificada + 15 µL de formamida Hi-Di

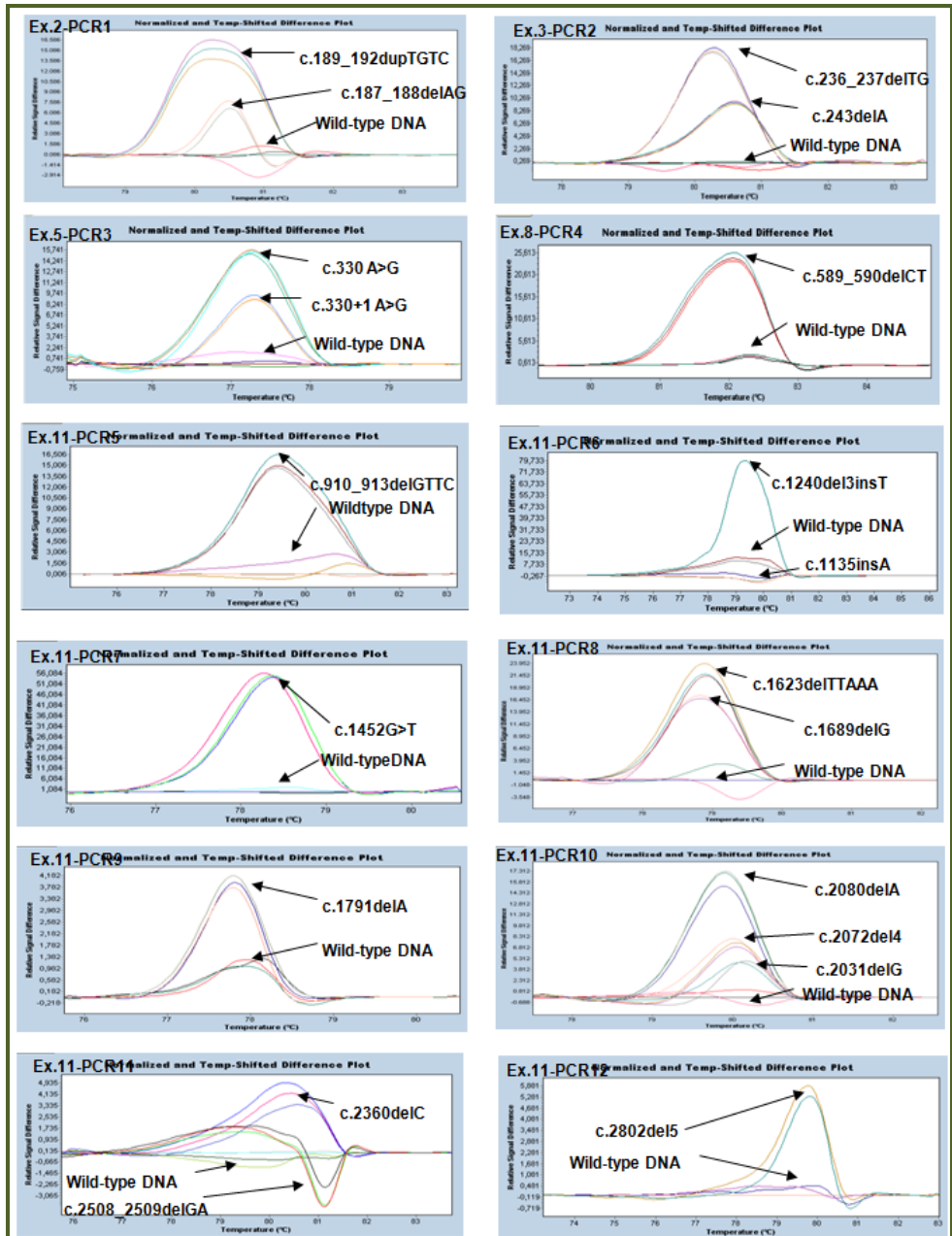
Fig. A.1: Mutaciones patogénicas descritas en la población española en *BRCA1*

Fig. A.1: Continuación

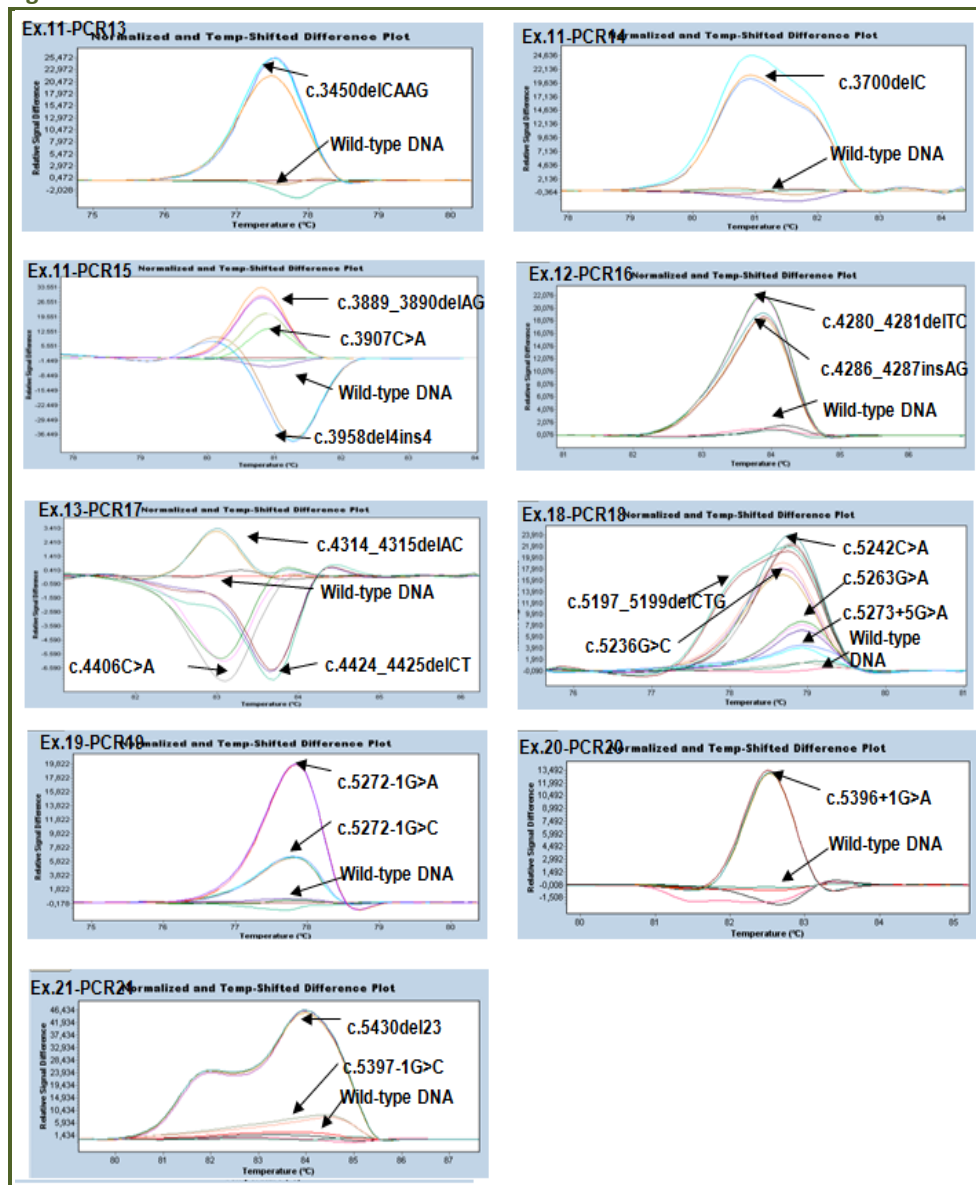


Fig. A.2: Mutaciones patogénicas descritas en la población española en *BRCA2*

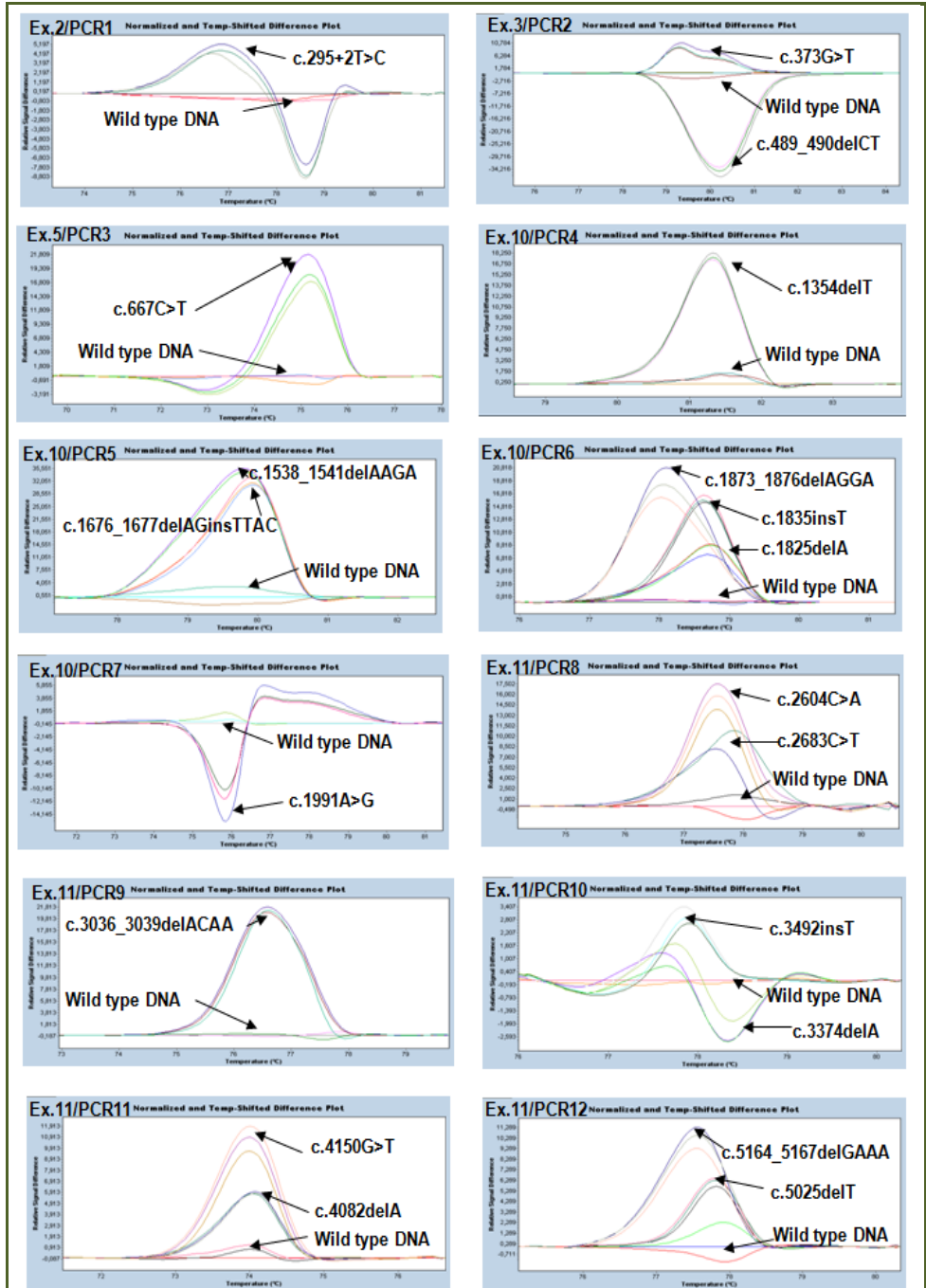
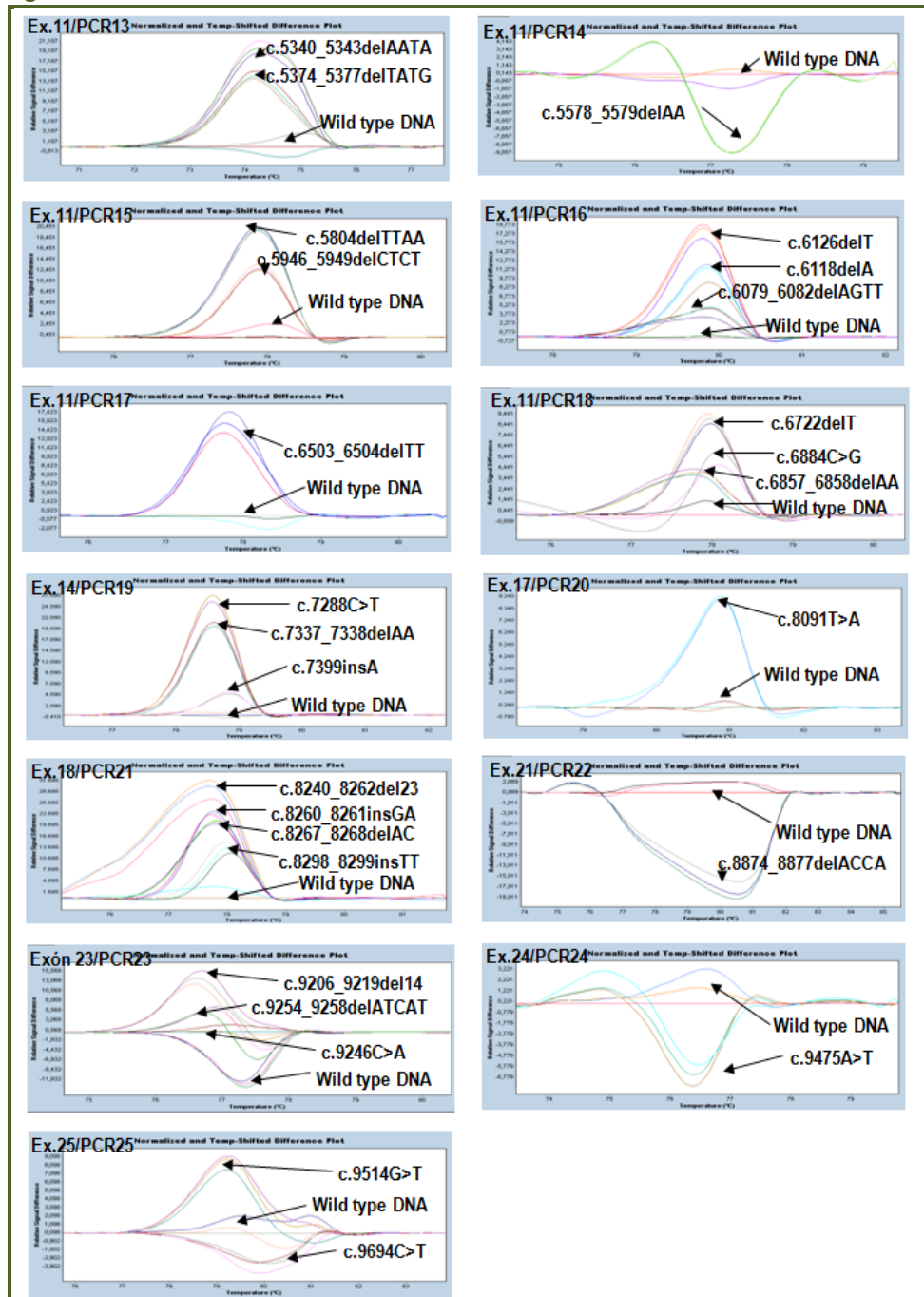


Fig. A.2: Continuación



5. INSTRUMENTACIÓN

- **LightCycler 480®:** Plataforma de PCR en tiempo real (Reference Catalog # 04640268001, Roche Diagnostics; Roche Instrument Center AG, Forrenstrasse, CH-6343 Rotkreuz, Switzerland) que presenta dos bloques, uno para placa de 96 pocillos y otro para placa de 384 pocillos. En la presente tesis se han empleado ambos bloques.
- **Robot EpEmotion 5070:** Plataforma que permite automatizar la dispensación de reactivos y transferencia muestras de tubos a las placas. Debido a su excelente precisión, el epMotion 5070 (Eppendorf) es muy útil para el pipeteo automatizado y la puesta a punto de PCRs en tiempo real, ya que permite montajes con menos volumen de reactivos y excelente reproducibilidad.
- **ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer:** Secuenciador ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA) de cuatro capilares con el cual se ha realizado la electroforesis capilar de aquellos fragmentos de PCR que presentaron una variación en la curva o en el patrón de bandas con la finalidad de caracterizar la secuencia de nucleótidos de la misma.
- **Termociclador convencional:** Se han empleado dos modelos diferentes de termocicladores para la realización de las PCRs múltiples y la formación de HE de los fragmentos previamente amplificados: el Mastercycler personal (Eppendorf) con capacidad para 25 tubos y el GeneAmp PCR System 2700

(Applied Biosystem) con capacidad para 96 tubos o una placa de 96 pocillos. Los programas empleados para las PCR múltiples y formación de HE, se describen en las Tablas A.5 y A.6.

6. REACTIVOS EMPLEADOS

Además de los reactivos específicos ya mencionados, se han empleado reactivos de uso habitual en Biología Molecular, como son:

- **PCRs:** dNTPs (Pharmacia), Enzimas AmpliTaq Taq Gold y no Gold (Applied Biosystems) y DMSO (Sigma-Aldrich).
- **Electroforesis en gel:** Agarosa MP, Agarosa Nusive, tampón TBE, 6x Loading Dye Solution (Fermentas).
- **Marcadores de pesos moleculares:** Φ X174DNA Hinf I digest (MBI Fermentas) como marcador empleado en la electroforesis en gel.
- **Electroforesis en gel sensible a los cambios de conformación:** Prona sec MDx1, Formamida al 15%, Etilenglicol al 10%, TEMED, Persulfato sódico y TBE x 0,6. El polímero Prona Sec MD (Pronisa), mejora la resolución entre los HO y los HE de ADN¹³⁸.
- **Polímeros empleados en el ABI PRISM 3130:** polímero para secuenciar POP7 (Applied Biosystems).

7. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- **Primer 3 v.0.4.0**²³³: programa empleado para el diseño de cebadores. Permite indicar la región de obligada inclusión dentro del fragmento de PCR.
- **MeltSim**²³⁴ y **Poland**²³⁵: programas estadísticos que predicen la curva de fusión del ADN. Pronostican las formas empíricas de las curvas de fusión de los fragmentos de PCR diseñados.
- **Gene Scanning v.1.5**: Programa incluido en el módulo de análisis del LC 480 específico para el análisis HRM. Clasifica las muestras en grupos en función de la similitud que presentan en su secuencia.
- **Sequencing Analyzer v.5.2**: Programa de Applied Biosystem empleado para la conversión de los datos obtenidos en el secuenciador durante la EC. Integra las señales y tras el análisis genera los electroferogramas de los fragmentos analizados.
- **Programas de predicción de VEDs**: La relevancia de las VEDs *missense* se ha determinado analizando el grado de conservación de aminoácidos entre las especies *Gallus gallus*, *Ratus norvegicus*, *Mus musculus*, *Canis familiaris* y *Pan troglodytes*. Los estudios sobre los efectos de la VEDs en los sitios de empalme dador-aceptor se realizaron aplicando el programa de Berkeley Drosophila Genome Project²³⁹. La repercusión de los cambios nucleotídicos en los exones sobre los potenciadores de empalme exónico (ESE) se analizaron mediante el programa ESEfinder²³⁸ que

detecta los motivos de unión de proteínas serina/ricos en arginina (SR), (SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55).

Los polimorfismos se han buscado en la base de datos “*Single Nucleotide Polymorphisms*”¹¹⁵ del NCBI y sus frecuencias se han comparado con las referidas en el HapMap para población caucasica¹¹⁶.

8. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

8.1. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS:

El trabajo realizado en el período de la tesis doctoral ha permitido la elaboración de las siguientes publicaciones:

- de Juan I, Esteban E, Palanca S, Barragan E *et al.* High-resolution melting analysis for rapid screening of BRCA1 and BRCA2 Spanish mutations. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 115:405-14.

- de Juan I, Esteban E, Palanca S *et al.* Advantages of the high resolution melting in the detection of *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers. *Clinical Biochemistry.* 2009; 42:1572-6.

- de Juan I, Esteban E, Palanca S, Barragan E *et al.* Advantage of high resolution melting curve analysis over conformation sensitive gel electrophoresis for mutational screening of genes BRCA1 and BRCA2. Clin Chim Acta. 2011; 412:578-82.

- de Juan I, Esteban E, Palanca S, Barragan E *et al.* Low prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in the sporadic breast cancer of Spanish population. Familial Cancer. 2012;11(1):49-56.

High-resolution melting analysis for rapid screening of *BRCA1* and *BRCA2* Spanish mutations

Inmaculada de Juan · Eva Esteban ·
Sarai Palanca · Eva Barragán · Pascual Bolufer

Received: 25 March 2008 / Accepted: 19 May 2008 / Published online: 5 June 2008
© Springer Science+Business Media, LLC. 2008

Abstract The majority of *BRCA1* and *BRCA2* mutation detection procedures include screening methods, all of which are time-consuming. High-resolution melting (HRM) is a promising pre-screening method of gene scanning that combines simplicity and rapid identification of genetic variants. We evaluated HRM in the screening of *BRCA1/2* Spanish mutations. We studied 40 *BRCA1* and 47 *BRCA2* DNA samples with different Spanish mutations. We included a group of 20 unknown DNAs from patients with sporadic breast cancer (BC). The assay was performed with the LightCycler® 480 Instrument (Roche). The HRM discriminates all the *BRCA1/2* Spanish mutations studied from wild-type DNA. Besides, 54 out of 87 mutations were clearly differentiated from each other. In sporadic BC 11 polymorphisms and three unclassified variants were found in both genes. HRM is a valuable method for rapid screening of *BRCA1/2* Spanish mutations and is capable of differentiating new genetic variants in PCR products.

Keywords Hereditary breast and ovarian cancer · *BRCA1* · *BRCA2* · Screening · Mutations · High-resolution melting

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10549-008-0073-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. de Juan · E. Esteban · S. Palanca · E. Barragán ·
P. Bolufer (✉)
Laboratory of Molecular Biology, University Hospital La Fe,
Avd. Campanar 21, Valencia 46009, Spain
e-mail: bolufer_pas@gva.es

Introduction

BRCA1 (OMIM#113705) [1] and *BRCA2* (OMIM#600185) [2] are the two major genes responsible for hereditary breast (BC) and/or ovarian cancer (OC). In particular, *BRCA1* accounts for 52% of hereditary breast cancer families, especially those with OC, and *BRCA2* represents an additional 32%, including male BC [3]. Females with *BRCA1/2* deleterious mutations have a lifetime risk of 37–85% and 15–41% for BC and OC, respectively [3, 4].

In the Spanish population 51 different pathogenic mutations have been identified in *BRCA1* and 50 in *BRCA2* [5–8].

In our laboratory, the *BRCA1* and *BRCA2* mutations were detected using the polymerase chain reaction (PCR) by amplifying the exons of both genes and the exon-intron boundaries, using the primer pairs and PCR conditions reported in the Breast Cancer Information Core (BIC) [9]. Mutational screening was carried out by the pre-screening of heteroduplex formed in the PCR products by conformation sensitive gel electrophoresis [10]. However, this method requires post-PCR treatment prior to gel electrophoresis, being time-consuming and expensive.

High resolution melting (HRM) analysis is a new and attractive gene scan tool that quickly performs the PCR and identifies sequence alterations without requiring post-PCR treatment [11, 12]. Several HRM methods for mutation detection of human genetic diseases [13–17] and polymorphisms [18–20] have been further reported.

With regard to *BRCA1* and *BRCA2* mutations the only reports on HRM thus far were that of Dufrense et al [21] and Takano et al [22] who proved the utility of HRM for the detection of the three common Ashkenazi founder mutations, 187_189delAG and 5382insC in *BRCA1* and 6174delT in *BRCA2*. Therefore, there is a lack of



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Clinical Biochemistry 42 (2009) 1572–1576

CLINICAL
BIOCHEMISTRY

Advantages of the high resolution melting in the detection of *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers

Inmaculada de Juan Jiménez, Eva Esteban Cardeñosa, Sarai Palanca Suela,
Eva Barragán González, Pascual Bolufer Gilabert *
on behalf of the Group of Cancer Genetic Counselling Program of Valencia Community

Laboratory of Molecular Biology, Service of Clinical Analysis, University Hospital La Fe, Valencia, Spain

Received 4 March 2009; received in revised form 24 June 2009; accepted 5 July 2009

Available online 17 July 2009

Abstract

Objective: The aim of the study is to explore the reliability of the high resolution melting (HRM) analysis for the identification of *BRCA1/BRCA2* mutation carriers among the family members of index patient (IP) and for distinguishing the presence of two or more genetic variants within the same amplicon.

Design and methods: We studied 27 different *BRCA1/BRCA2* pathogenic mutations detected in 35 families with 194 subjects. HRM was performed in the LightCycler 480 (Roche).

Results: HRM method detected 110 *BRCA1/BRCA2* mutations among the 192 relatives studied (57%). No false negative results were observed in any of the family members and all of them were in agreement with sequencing analysis, therefore the method might help to avoid unnecessary sequencing of wild type (WT) genotypes. The HRM method also allows the detection of other alterations that we initially had not searched (three unclassified variants and several polymorphisms). Furthermore, HRM has also been capable of distinguishing the presence of two or more genetic variants in the same amplicon of the same sample.

Conclusions: HRM is a rapid, sensitive, specific, cost-effective and reliable screening method that in less than 2 h allows the easy identification of *BRCA1* and *BRCA2* genetic variations and also avoids the unnecessary sequencing of WT genotypes. Furthermore the method is also capable of detecting new genetic variants and allows the simultaneous detection of the presence of more than one genetic variant.

© 2009 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *BRCA1*; *BRCA2*; Breast cancer; Familiar study; Genetic variations; High resolution melting analysis (HRM); Mutations

Introduction

Nowadays, the screening of genetic variations is a frequent discipline used in the study of many human diseases. Conventional methods used for the screening of genetic variations, based on the heteroduplex detection, such as high pressure liquid chromatography (HPLC), conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) or capillary electrophoresis (CE), although faster and cheaper than direct sequencing, are

time consuming and require post-PCR manipulations. For this reason, the recent introduction of high resolution melting (HRM) platforms seems to be very attractive, since HRM allows heteroduplex detection in amplicons, hence showing considerable advantages over the conventional methods; it is a closed-tube, very fast and cost-effective gene scanning method in which only two PCR primers and one fluorescent DNA binding dye are used, and no sample processing after PCR amplification is required [1]. HRM apart from being a rapid screening method which could identify different genetic variants also might avoid the unnecessary sequencing of wild type (WT) DNA. The great interest awakened by HRM methods explains its rapid expansion to cope with broad spectrum of human genetic mutations [2,3] and polymorphisms [4].

* Corresponding author. Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Enfermería 7ª planta, Hospital Universitario La Fe, Avd. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain.

E-mail address: bolufer_pas@gva.es (P.B. Gilabert).



Advantage of high-resolution melting curve analysis over conformation-sensitive gel electrophoresis for mutational screening of *BRCA1* and *BRCA2* genes

Inmaculada de Juan Jiménez ^{a,1}, Eva Esteban Cardenosa ^{a,1}, Sarai Palanca Suela ^{a,1}, Eva Barragán González ^{a,1}, Dolores Salas Trejo ^{b,1}, Oscar Fuster Lluch ^{a,1}, Pascual Bolufer Gilibert ^{a,*,1}

^a Laboratory of Molecular Biology, Clinical Analysis Service, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

^b Oficina del Plan del Cáncer, Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Comunidad Valenciana, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2010

Received in revised form 3 December 2010

Accepted 4 December 2010

Available online 11 December 2010

Keywords:

BRCA1

BRCA2

Mutational screening methods

High-resolution melting analysis (HRMA)

Conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE)

Hereditary breast and ovarian cancer

ABSTRACT

Background: Mutation screening of *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA*s) genes is a time-consuming and costly procedure that demands faster and cheaper alternative methods for routine diagnostics. The present study is aimed at comparing the results obtained with screening mutations methods, conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) and high-resolution melting analysis (HRMA), for *BRCA*s attending to their specificity, sensitivity, reliability and cost-efficiency.

Methods: We included 52 DNA samples of index patients from high-risk families. The mutational screening was performed by CSGE according to the Garguly (1993) method and HRMA according to a modified De Leener (2008) method. The assays were performed in 384 well plates in the LightCycler 480 (Roche). All PCR products showing altered patterns were confirmed by sequencing.

Results: The results obtained with the mutational study of *BRCA*s genes showed that HRMA exhibited higher sensitivity than CSGE as it was able to detect a wide mutational spectra of genetic variants in a larger number of samples. Additionally, the combination of HRMA with hybridization probes in a second step of the assay allows the specific confirmation of mutations. Furthermore, HRMA use less time, allowing the reduction of analysis time.

Conclusions: HRMA offers clear advantages over CSGE for the mutation screening of *BRCA*s genes as it has greater sensitivity and higher efficiency and it is less time-consuming.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

About 5–10% of breast or ovarian cancers (BC/OC) are caused by germline mutations in the breast cancer genes *BRCA1* (OMIM 113705) or *BRCA2* (OMIM 600185) [1]. After the *BRCA1* and *BRCA2* genes (*BRCA*s) were identified by Miki et al. (1994) [2] and Wooster et al. (1995) [3] genetic testing became available and is now routinely offered to women from high-risk families. Accordingly, since the implantation of the Program of Genetic Counselling in Cancer in the Valencian Community (Spain) in 2005 [4] the genetic studies of *BRCA*s mutations were performed in individuals with a strong familial history of BC or OC.

A wide variety of methods have been used for the screening of these genes [5]. Direct sequencing allows the characterization of the alteration sequence and is considered the gold standard method.

However, the direct sequencing of *BRCA*s, due to its large size and absence of hot-spots, is a time-consuming and costly procedure [6]. Therefore, there is a need for faster and less expensive alternative methods for *BRCA*s routine diagnostics with comparable accuracy. The most widely used methods are the denaturing high-pressure liquid chromatography (DHPLC), conformation-sensitive gel electrophoresis (CSGE) and fluorescence-based conformation-sensitive gel electrophoresis (F-CSGE) [5].

In our laboratory, the main reference laboratory for *BRCA*s mutation studies in the Valencian Community (Spain), mutational pre-screening was carried out by the heteroduplex screening of the PCR products by CSGE [7]. However, this method requires post-PCR treatment including gel electrophoresis, being time-consuming and an expensive procedure.

High-resolution melting analysis (HRMA) is a new and attractive gene scan tool that quickly performs PCR and identifies sequence alterations without requiring post-PCR treatment [8]. For *BRCA*s mutations there are several reports that support the utility of HRMA as a fast high-throughput method for the scanning of these genes [9–12]. The most comprehensive report is that written by De Leener et al. (2008) [12], which scans the entire coding regions and flanking boundaries of both genes.

* Corresponding author. Laboratory of Molecular Biology, Clinical Analysis Service, Escuela de Enfermería 7ª Planta, Hospital Universitario La Fe, Avd. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. Tel.: +34 961 973351.

E-mail address: bolufer_pao@vsa.es (P.B. Gilibert).

¹ On behalf of the Group for Assessment of Hereditary Cancer of Valencia Community.

Low prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in the sporadic breast cancer of Spanish population

Inmaculada de Juan Jiménez · Eva Esteban Cardoñosa · Sarai Palanca Suela · Eva Barragán González · Ismael Aznar Carretero · Blanca Munárriz Gandía · Ana Santaballa Bertran · María Dolores Torregrosa Maicas · Carmen Guillén Ponce · Ana Beatriz Sánchez Heras · Ana Bayón Lara · Oscar Fuster Lluich · Pascual Bolufer Gilabert

© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract The true prevalence of *BRCA1/BRCA2* (*BRCA*s) germline mutations in sporadic breast or ovarian cancer (SBC/SOC) in Caucasian population is not well established. The aim of the study is to establish the prevalence of *BRCA*s mutations in SBC to ponder its relevance in the programs of genetic counseling in cancer and to explore the genotype-phenotype relationship of these particular breast cancers. The study was performed in 495 SBC. We sought 46 *BRCA1* and

53 *BRCA2* pathogenic mutations reported in the Spanish population. We followed a high resolution melting method performed in the LightCycler 480 (Roche Diagnostics) for the screening of these Spanish mutations using 49 primer pairs. Eight different deleterious mutations, one of them novel, were detected in nine patients, five without family history of BC/OC, what yields a true prevalence of 1.05% for *BRCA*s mutations in SBC. Furthermore, we found 18 unknown variants. Larger tumour size ($T > 1$) and earlier presentation are the independent parameters associated with the presence of *BRCA*s pathogenic mutations in SBC ($P < 0.01$) and the *BRCA1* mutations carriers develop steroid—receptors negative tumors. Our results indicate that the true prevalence of *BRCA*s germline deleterious mutations in SBC of Spaniards is low. However, this does not lessen its relevance since the presence of *BRCA*s mutations in SBC could represent circa 16% of total *BRCA*s mutations detected in BC. SBCs of *BRCA*s mutation carriers have phenotype more aggressiveness than SBC without *BRCA*s mutation.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10689-011-9481-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. de Juan Jiménez · E. Esteban Cardoñosa · S. Palanca Suela · E. Barragán González · O. Fuster Lluich · P. Bolufer Gilabert (✉)
 Laboratory of Molecular Biology, Clinical Analysis Service,
 Escuela de Enfermería 7ª planta, Hospital Universitario La Fe,
 Avd. Campanar, 21, 46009 Valencia, Spain
 e-mail: bolufer_pas@vra.es

I. Aznar Carretero
 Service of Surgery, Hospital Universitario La Fe,
 Valencia, Spain

B. Munárriz Gandía · A. Santaballa Bertran
 Service of Medical Oncology, Hospital Universitario La Fe,
 Valencia, Spain

M. D. Torregrosa Maicas
 Service of Medical Oncology, Hospital Luis Alcáñiz,
 Jativa, Spain

C. Guillén Ponce · A. B. Sánchez Heras
 Unit of Genetic Counselling in Cancer, Hospital General de
 Elche, Alicante, Spain

A. Bayón Lara
 Service of Surgery, Instituto Oncológico Valenciano (IVO),
 Valencia, Spain

Keywords *BRCA1* · *BRCA2* · Sporadic breast cancer · Spanish mutations · High resolution melting (HRM)

Abbreviations

BC	Breast cancer
OC	Ovarian cancer
<i>BRCA</i> s	<i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i>
SBC	Sporadic breast cancer
PGCCVC	Program of genetic counseling in cancer of the Valencian community
HRM	High resolution melting
UVs	Unknown variants
ESE	Exonic splicing enhancers
PESRs	Putative exonic splicing regulatory elements
SRE	Splicing regulatory elements

Published online: 15 September 2011

 Springer

8.2. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO EN LA LÍNEA DE CÁNCER DE MAMA

El trabajo realizado en de la línea de cáncer mama ha permitido mi participación en las siguientes publicaciones:

- Palanca S, Esteban E, Barragan E, Oltra S, de Juan I *et al.* Identification of a novel *BRCA1* large genomic rearrangement in a Spanish breast/ovarian cancer family. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 112:63-7.

- Palanca S, Esteban E, Barragan E, de Juan I *et al.* CASP8 D302H polymorphism delays the age of onset of breast cancer in *BRCA1* and *BRCA2* carriers. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 119:87-93.

- Esteban E, Bolufer P, de Juan I, Palanca S *et al.* Broad *BRCA1* and *BRCA2* mutational spectrum and high incidence of recurrent and novel mutations in the eastern Spain population. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 121:257-60.

- Esteban E, Bolufer P, de Juan I, Palanca S *et al.* Relationship of *BRCA1* and *BRCA2* mutations with cancer burden in the family and tumor incidence. *Familial Cancer.* 2010; 9:291-5.

- Palanca S, de Juan I, Perez-Simó G, Barragán E *et al.* The deletion of exons 3-5 of *BRCA1* is the first founder rearrangement

identified in breast and/or ovarian cancer Spanish families. *Familial Cancer*. 2013; 12(1):119-23

- Esteban Cardeñosa E, de Juan Jiménez I, Palanca Suela S, Chirivella González I et al. Low penetrance alleles as risk modifiers in familial and sporadic breast cancer. *Familial Cancer*. 2012; 11(4): 629-36.

- de Juan Jiménez I, García Casado Z, Palanca Suela S et al. Novel and recurrent BRCA1/BRCA2 mutations in early onset and familial breast and ovarian cancer detected in the Program of Genetic Counseling in Cancer of Valencian Community (eastern Spain). Relationship of family phenotypes with mutation prevalence. *Fam Cancer*. 2013; 12(4):767-77. doi: 10.1007/s10689-013-9622-2.

- Murria Estal R, Palanca Suela S, de Juan Jiménez I, Egoavil Rojas C et al. MicroRNA signatures in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;142(1):19-30

- Murria R, Palanca S, de Juan I, Egoavil C et al. Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2014 Dec 15; 5(1):375-85. eCollection 2015

- de Juan I, Palanca S, Domenech A, Feliubadaló L et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in males with familial breast and ovarian cancer syndrome. Results of a Spanish multicenter study. Fam Cancer. 2015 May 31. [Epub ahead of print]



BIBLIOGRAFÍA

- ¹ González Fisher RF, Flores Shaw PL. El Papiro quirúrgico de Edwin Smith. *An Med (Mexón)*. 2005;50:43-48
- ² Ferlay J, Bray F, Sankila R, et al. EUCAN: CANCER Incidence, mortality and prevalence in the European Union 1997, version 4.0. IARC Cancer Base nº 4. Lyon, IARC Press, 1999
- ³ Thompson D, Easton DF. Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:1358-1365
- ⁴ Barlow WE, White E, Ballard-Barbash R, et al. Prospective breast cancer risk prediction model for women undergoing screening mammography. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:1204-1214
- ⁵ Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev*. 1993;15:17-35
- ⁶ Globocan 2012: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
- ⁷ Bouchalova K1, Cizkova M, Cwiertka K, et al. Triple negative breast cancer--current status and prospective targeted treatment based on HER1 (EGFR), TOP2A and C-MYC gene assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2009; 153(1):13-7
- ⁸ Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC
- ⁹ Conselleria de Sanidad. "Plan oncológico de la Comunidad Valenciana 2011-2014" (2012) Generalitat Valenciana. ISBN : 978-84-482-5683-8
- ¹⁰ Plan Oncológico de la Comunidad Valenciana (Orden de 29 de enero de 2004 de la Conselleria de Sanitat. DOGV 4691 de 13/02/2004
- ¹¹ Salas D, Moya C, Herranz C, et al. Programa de prevención del cáncer de mama en la Comunidad Valenciana. Resultados 1992-1993. *Rev San Hig Púb*. 1995;69:1:59-69
- ¹² Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest*. 2007;117:3155-3163
- ¹³ Melchor L y Benítez J. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis*. 2008; 29:1475-1482
- ¹⁴ Stingl J, Raouf A, Emerman JT, Eaves CJ. Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10:49-59
- ¹⁵ Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, et al. Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research *Cancer Treatment Reviews*. 2010;36:206-215
- ¹⁶ Manual de Merck, Professional Edition, cap. 253 : Cáncer de mama
- ¹⁷ Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19: 403-410
- ¹⁸ Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957; 11:359-377
- ¹⁹ Walwer KJ, et al. Influence of the antiestrogen on normal breast tissue. *Br J Cancer* 1991;64:764

- ²⁰ Bland KI, Copeland EM. La mama Tomo 1: Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. Ed. Médica Panamericana, 2007 Cap 70:1456-57
- ²¹ Gabriel N. Hortobagyi, M.D. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1734-1736
- ²² Smith, Ian et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2007; 369(9555):29-36
- ²³ Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol*. 2007;8(3):235-44.
- ²⁴ Seong MW1, Kim KH, Chung IY, et al. A multi-institutional study on the association between BRCA1/BRCA2 mutational status and triple-negative breast cancer in familial breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;146(1):63-69
- ²⁵ Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-752
- ²⁶ Khosravi P, Pérez-Manga G. La aplicación de la tecnología de los Microarrays en la Oncología clínica. *An Med Interna (Madrid)* 2006; 23: 255-6
- ²⁷ The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70. doi: 10.1038/ 412
- ²⁸ Zhiyuan Hu, Cheng Fan, Daniel S Oh, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:96. doi:10.1186/1471-2164-7-96
- ²⁹ Sørlie T, Wang Y, Xiao C, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:127. PMID: 16729877
- ³⁰ Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*. 2006; 25:5898-5905
- ³¹ Melchor L, Benítez J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet*. 2013; 132:845-863. doi: 10.1007/s00439-013-1299-y
- ³² Rebbeck TR. Inherited genetic predisposition in breast cancer. A population-based perspective. *Cancer*. 1999;86:2493-2501
- ³³ Weber F, Shen L, Fukino K et al. Total-genome analysis of *BRCA1/2*-related invasive carcinomas of the breast identifies tumor stroma as potential landscaper for neoplastic initiation. *Am. J. Hum. Genet*. 2006;78(6):961-72
- ³⁴ Veeck J, Ropero S, Setien F, et al. BRCA1 CpG Island Hypermethylation Predicts Sensitivity to Poly (Adenosine Diphosphate)-Ribose Polymerase Inhibitors. *J Clin Oncol*. 2010; 28(29):e563-4; author reply e565-6. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1010
- ³⁵ Min Zhang , Vosotros Xu , Ouyang Tao, et al. Somatic mutations in the BRCA1 gene in Chinese women with sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012;132:335-40
- ³⁶ Balmain A, Gray J & Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nature Genetics*. 2003;33:238-244
- ³⁷ Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266:66-71

- ³⁸ Hall J, Lee M, Newman B et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. 1990;250:1684-1689
- ³⁹ Wooster R, Neuhausen S, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994;265:2088-2090
- ⁴⁰ Easton DF. How many more breast cancer predisposition genes are there? *Breast Cancer Research*. 1999;1:14-17
- ⁴¹ Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RHM. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*. 2004; 49:34-43
- ⁴² Tamura K, Utsunomiya J, Iwama T et al. Mechanism of carcinogenesis in familial tumors. *Int J Clin Oncol*. 2004;9:232-245
- ⁴³ Weinstat-Saslow D, Merino MJ, Manrow RE et al. Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions. *Nat Med*. 1995;194:1257-1260
- ⁴⁴ Lerebous F, Lidereau R. Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;44:121-141
- ⁴⁵ Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in breast cancer. *Cancer Res*. 1997;57:3347-3350
- ⁴⁶ Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, et al. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res Treat*. 1997;91:179-186
- ⁴⁷ Turner NC, Reis-Filho. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*. 2006; 25:5846-5853
- ⁴⁸ Wilkerson PM, Dedes KJ, Wetterskog D, et al. Functional characterization of EMSY gene amplification in human cancers. *J Pathol*. 2011; 225(1):29-42. doi: 10.1002/path.2944
- ⁴⁹ Hughes-Davies L, Huntsman D, Ruas M et al. EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. *Cell*. 2003; 115:523-535
- ⁵⁰ Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of BRCAness in sporadic cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:814-819
- ⁵¹ Imyanitov EN, Moiseyenko VM. Drug therapy for hereditary cancers. *Hereditary cancer in clinical practice*. 2011; 9:5
- ⁵² Yarden R, Pardo-Reoyo S, Sgagias M et al. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet*. 2002; 30:285-289
- ⁵³ Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 2010; 376(9737):235-244
- ⁵⁴ Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers. *N. Engl. J. Med*. 2009;361:123-34
- ⁵⁵ Plummer R. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: a new direction for BRCA and triple-negative breast cancer? *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):218.
- ⁵⁶ Esteller M, Fraga MF, Guo M, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet*. 2001; 10(26):3001-7
- ⁵⁷ Knudson Jr AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Prac Natl Acad Sci USA*. 1971;68:820-823

- ⁵⁸ Comings DA. A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Cancer Inst.* 1973;70:3324-3328
- ⁵⁹ Lierh JG. Dual role of oestrogens as hormones and pro-carcinogenesis: tumor initiation by metabolic activation of oestrogen. *Eur J Cancer Prev.* 1997; 93:5925-5930
- ⁶⁰ Hamada J, Nakata D, Nakae D, et al. Increased oxidative damage in mammary tumor cells by continuous epidermal growth factor stimulation. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93:214-219
- ⁶¹ Kenemans P, Bosman A. Breast cancer and post-menopausal hormone therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003; 17:123-137
- ⁶² Stratton M and Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature Genetics.* 2008;40:17-22
- ⁶³ Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med.* 2008; 359(20):2143-53. doi: 10.1056/NEJMra0802968.
- ⁶⁴ Wooster R and Weber B. Breast and Ovarian cancer. *New Engl J Med.* 2003;348:2339-2347
- ⁶⁵ Seitz S, Rohde K, Bender E, et al. Deletion mapping and linkage analysis provide strong indication for the involvement of the human chromosome region 8p12-p22 in breast carcinogenesis. *Br J Cancer.* 1997;76:983-91
- ⁶⁶ Rahman N, Teare MD, Seal S, et al. Absence of evidence for a familial breast cancer susceptibility gene at chromosome 8p12-p22. *Oncogene.* 2000;19:4170-4173
- ⁶⁷ Snape K, Ruark E, Tarpey P, et al. Predisposition gene identification in common cancers by exome sequencing: insights from familial breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 134:429–433
- ⁶⁸ Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, et al. Whole Exome Sequencing Suggests Much of Non-BRCA1/BRCA2 Familial Breast Cancer Is Due to Moderate and Low Penetrance Susceptibility Alleles. *PLoS ONE.* 2013; 8(2): e55681. doi:10.1371/journal.pone.0055681
- ⁶⁹ Ponder B. Cancer genetics. *Nature.* 2001;411:336-341
- ⁷⁰ van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ. Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol.* 2011; 34:71–88
- ⁷¹ Antoniou A, Pharoah P, Narod S, 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; 72:1117-1130
- ⁷² Easton DF, Steele L, Fields P, et al. Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet.* 1997; 61:120-128
- ⁷³ Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91:1310-1316
- ⁷⁴ van der Groep P, Bouter A, van der Zanden R, et al. Distinction between hereditary and sporadic breast cancer on the basis of clinicopathological data. *J Clin Pathol.* 2006; 59:611–617
- ⁷⁵ Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including

- 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 2001; 358(9291):1389-99
- ⁷⁶ Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Easton DF. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20:2310–2318
- ⁷⁷ Honrado E, Osorio A, Milne RL. Immunohistochemical classification of non-*BRCA1/2* tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCA families. *Mod. Pathol.* 2007;20:1298–1306
- ⁷⁸ van der Groep P, Bouter A, Menko FH, et al. High frequency of HIF-1alpha overexpression in BRCA1 related breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 111:475–480
- ⁷⁹ Breast Cancer Linkage Consortium. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. *Lancet*. 1997; 349:1505–1510
- ⁸⁰ Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, B.A. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J.Natl. Cancer Inst.* 1998; 90:1138–1145
- ⁸¹ Palacios J, Honrado E, Osorio A, et al. Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. *Breast Cancer Res. Treat.* 2005; 90:5–14
- ⁸² Ruffner H, Joazeiro CA, Hemmati D, Hunter T, Verma IM. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98:5134–5139
- ⁸³ 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. USA.* 1999; 96:11364–11369
- ⁸⁴ Roy R, chun J and Powell SN. BRCA1 and BRCA2. Different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer.* 2012;12:68-78
- ⁸⁵ Callebaut I, Mornon JP. From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett.* 1997; 400:25–30
- ⁸⁶ Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 1995; 378:789-792
- ⁸⁷ Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet.* 1996; 12:333-337
- ⁸⁸ Bignell G, Micklem G, Stratton MR, Ashworth A, Wooster R. The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. *Hum Mol Genet.* 1997;6:53-58
- ⁸⁹ Yang HJ, Jeffrey PD, Miller J, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science.* 2002; 297:1837-1848
- ⁹⁰ Duncan JA, Reeves JR, Cooke TG. BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease. *Molecular pathology.* 1998; 51:237–247
- ⁹¹ Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer science.* 2004; 95:866–871

- ⁹² Venkitaraman AR. Linking the Cellular Functions of BRCA Genes to Cancer Pathogenesis and Treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2009; 4:461-487
- ⁹³ Jiaxue Wu, Lin-Yu Lu, and Xiaochun Yu. The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein Cell*. 2010; 1(2):117-123
- ⁹⁴ Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002; 108:171-182
- ⁹⁵ Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, et al. Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol cellular*. 2001; 7(2):273-282
- ⁹⁶ Gudmundsdottir K and Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 2006; 25: 5864-5874
- ⁹⁷ Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene BRCA2. *J Biol Chem*. 1997; 272:31941-31944
- ⁹⁸ Mullan PB, Quinn JE and Harkin DP. The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene*. 2006; 25(43):5854-63
- ⁹⁹ Baer R, Ludwig T. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complexón with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Opin Genet Dev*. 2002; 12:86-91
- ¹⁰⁰ Starita LM and Parvin JD. The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15:345-350
- ¹⁰¹ Polanowska J, Martin JS, Garcia-Muse T, Mark IR Petalcorin and Boulton SJ. A conserved pathway to activate BRCA1-dependent ubiquitylation at DNA damage sites. *The EMBO Journal*. 2006; 25:2178-2188. doi:10.1038/sj.emboj.7601102
- ¹⁰² Wenwen Wu, Ayaka Koike, Takashi Takeshita and Tomohiko Ohta. The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Division*. 2008; 3:1 doi:10.1186/1747-1028-3-1
- ¹⁰³ BIC: <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>
- ¹⁰⁴ HGVS: <http://www.hgvs.org/>
- ¹⁰⁵ UMD: http://194.167.35.168/UMD_Central/
- ¹⁰⁶ LOVD: <http://brca.iarc.fr/LOVD/home.php>
- ¹⁰⁷ HCI-BRCA database: <http://priors.hci.utah.edu/PRIORS/index.php>
- ¹⁰⁸ Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, et al. Clinical Characteristics of Individuals with germline Mutations in BRCA1 and BRCA2: Analysis of 10,000 Individuals. *JCO*. 2002; 20:1480-1490
- ¹⁰⁹ Palanca S. Identificación y estudio de grandes reordenamientos en los genes BRCA1 Y BRCA2 en familias con cáncer de mama y ovario hereditario. Tesis doctoral de la Universitat de Valencia; 2011
- ¹¹⁰ Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res*. 2003;63:1449-1453
- ¹¹¹ Nanda R, Schumm LP, Cumming S, et al. Genetic Testing in an Ethnically Diverse Cohort of High-Risk Women. A Comparative Analysis of BRCA1 and BRCA2 Mutations in American Families of European and African Ancestry. *JAMA*. 2005; 294: 1925-1933

- ¹¹² Weitzel JN, Lagos V, Blazer KR, et al “Prevalence of BRCA Mutations and Founder Effect in High-Risk Hispanic Families” (2005) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 14: 1666-1671
- ¹¹³ Cartegni L., Wang J., Zhu Z., et al. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acid Research*. 2003;31(13): 3568-3571
- ¹¹⁴ Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, et al. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet*. 2006; 15(16):2490-2508
- ¹¹⁵ Search for dbSNP short genetic variations on NCBI Reference Assembly: the NCBI Single Nucleotide Polymorphisms: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/transNP/transNP.cgi>
- ¹¹⁶ International HapMap Project: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
- ¹¹⁷ Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. 1992;24:104-8.
- ¹¹⁸ Mueller C, Haworth A. Draft best practice guidelines for molecular analysis of hereditary breast and ovarian cancer. (2001) European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) Guidelines for hereditary breast and ovarian cancer
- ¹¹⁹ Richter S, Seth A. One step direct detection of recurrent mutations in the breast cancer susceptibility gene BRCA1. *Int J Oncol*. 1998;12:1263–1267
- ¹²⁰ Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, et al. The Risk of Cancer Associated with Specific Mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 1997; 336:1401-1408
- ¹²¹ Struewing JP, Brody LC, Erdos MR et al. Detection of eight BRCA1 mutations in 10 breast/ovarian cancer families, including 1 family with male breast cancer. *Am J Hum Genet*. 1995; 57:1401-1408
- ¹²² Hacia JG, Brody LC, Chee MS et al. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colours fluorescence analysis. *Nat Genet*. 1996; 14:441-447
- ¹²³ Monaco A, Menolascina F, Zhao Y, et al. “Sequencing-grade” screening for BRCA1 variants by oligo-array. *Journal of translational medicine*. 2008; 6:64-70
- ¹²⁴ Filipini S, Blanco A, Fernández-Marmiesse A et al. Multiplex SNaPshot for detection of *BRCA1/2* common mutations in Spanish and Spanish related breast/ovarian cancer families. *BMC Med Genet*. 2007; 8:40
- ¹²⁵ Lopez-Doriga A, Feliubadaló L, Menéndez M, et al. ICO amplicon NGS data analysis: a Web tool for variant detection in common high-risk hereditary cancer genes analyzed by amplicon GS Junior next-generation sequencing. *Hum Mutat*. 2014; 35(3):271-277
- ¹²⁶ Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011; 475, 348–352
- ¹²⁷ Summerer D, Wu H, Haase B, et al. Microarray-based multicycle-enrichment of genomic subsets for targeted next-generation sequencing. *Genome Res*. 2009; 19: 1616-1621
- ¹²⁸ Schroeder C, Stutzmann F, Weber BH, Riess O, Bonin M. High-throughput resequencing in the diagnosis of *BRCA1/2* mutations using oligonucleotide resequencing microarrays. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 122:287-97

- ¹²⁹ Zhang L, Kirchhoff T, Yee CY, et al. A rapid and realible test for BRCA1 and BRCA2 founder mutation analysis in paraffin tissue using pyrosequencing. *J Mol Diagn*. 2009; 11:176-81
- ¹³⁰ Walsh T, Lee M, Casadei S et al. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *PNAS*. 2012;107:12629-12633
- ¹³¹ Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. *PLoS One*. 2013; 8(2):e55681.
- ¹³² Hogervorst FBL, Cornelis RS, Bout M, et al. Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet*. 1995; 10:208-212
- ¹³³ Geisler JP, Hatterman-Zogg MA, Rathe JA, et al. Ovarian Cancer BRCA1 Mutation Detection: Protein Truncation Test (PTT) Outperforms Single Strand Conformation Polymorphism Analysis (SSCP). *Human Mutation*. 2001; 18:337-344
- ¹³⁴ Markoff A, Savov A, Vladimirov V, et al. Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. *Clin Chem*. 1997; 43:30-33
- ¹³⁵ Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:2766-2770
- ¹³⁶ Tian H, Jaquins-Gerst A, Munro N et al. Single-strand conformation polymorphism analysis by capillary and microchip electrophoresis: a fast, simple method for detection of commo mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genomics*. 2000; 63: 25-34
- ¹³⁷ Kozlowski P and Krzyzosiak WJ. Combined SSCP/duplex analysis by capillary electrophoresis for more efficient mutation detection. *Nucleic Acids Research*. 2001;29:1-14
- ¹³⁸ Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformational-sensitive gel electrophoresis for rapid of single base differences in double stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bend in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:10325-10329
- ¹³⁹ Fodde R, Losekoot M. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum Mutat*. 1994; 3:83-94
- ¹⁴⁰ De la Hoya M, Díaz-Rubio E, Caldés T. Denaturing Gradient gel electrophoresis-based analysis of loss of heterozygosity distinguishes nonobvious, deleterious BRCA1 variants from nonpathogenic polymorphisms. *Clinical Chemistry*. 1999; 45:2028-2030
- ¹⁴¹ Markoff A, Sormbroen H, Bogdanova N, et al. Comparison of conformation-sensitive gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism analysis for detection of mutations in the BRCA1 gene using optimized conformation analysis protocols. *Europ J Hum Genet*. 1998; 6:145-150
- ¹⁴² Kórkö J, Annunen S, Pihlajamaa T, et al. Conformational sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: Comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:1681-1685

- ¹⁴³ van der Hout AH, van den Ouweland AM, van der Lijst RB et al. A DGGE system for comprehensive mutation screening of BRCA1 and BRCA2; application in a Dutch cancer clinic setting. *Hum Mut.* 2006; 27:654-666
- ¹⁴⁴ Esteban Cardeñosa E, Bolufer Gilabert P, Palanca Suela S et al. Mutaciones de BRCA1 y BRCA2 en familias estudiadas en el Programa de Consejo Genético en el Cáncer de la Comunidad Valenciana. *Med Clin (Barc)*. 2008; 130(4):121-6
- ¹⁴⁵ Esteban E, de Juan I, Bolufer P et al. Broad BRCA1 and BRCA2 mutational spectrum and high incidence of recurrent and novel mutations in the eastern Spain population. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 121:257-60
- ¹⁴⁶ Tian H, Brody LC and LAnders JP. Rapid detection of deletion, insertion and substitution mutations via heteroduplex analysis using capillary and microchip based electrophoresis. *Genome Res.* 2000; 10:1403-1413
- ¹⁴⁷ Velasco E, Infante M, Durán M et al. Rapid mutation detection in complex genes by HE analysis with capillary array electrophoresis. *Electrophoresis.* 2005; 26:1-14
- ¹⁴⁸ Ganguly T, Dhulipala R, Godmilow L, et al. High throughput fluorescence based conformation-sensitive gel electrophoresis (F-CSGE) identifies six unique BRCA2 mutations and an overall low incidence of BRCA2 mutations in high-risk BRCA1-negative breast cancer families. *Hum Genet.* 1998; 102:549-556
- ¹⁴⁹ Blesa JR and Hernández-Yago J. Adaptation of conformation sensitive gel electrophoresis to an ALFexpress™ DNA sequencer to screen BRCA1 mutations. *Biothechniques.* 2000; 28:1019-1025
- ¹⁵⁰ Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, et al. A highly sensitive, fast and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancer. *Human Mut.* 1999; 14:333-339
- ¹⁵¹ Gross E, Arnold N, Goette J, et al. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet.* 1999; 105:72-78
- ¹⁵² Chou LS, Lyon E, Wittwer CT: A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model. *Am J Clin Pathol* 2005, 124:330-338.
- ¹⁵³ Sadr-Nabavi A, Hoffman M, Weilke C, Sun YL, Nevinny-Stickel-Hinzpeter C: Mutation Scanning Using High Resolution Melting or dHPLC: aPerformance Comparison Study. *Biochemica* 2009, 4:30-33
- ¹⁵⁴ Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-131
- ¹⁵⁵ Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154-160
- ¹⁵⁶ Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, et al. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem.* 2006; 52(3):494-503. Epub 2006 Jan 19.
- ¹⁵⁷ Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat.* 2009; 30(6):857-859. doi: 10.1002/humu.20951.

- ¹⁵⁸ Li BS, Wang XY, Ma FL et al. Is high resolution melting analysis (HRMA) accurate for detection of human disease-associated mutations? A meta-analysis. *PLoS One*. 2011; 6(12):e28078. doi: 10.1371/journal.pone.0028078.
- ¹⁵⁹ Vossen, R. H.A.M., Aten, E., Roos, A. and den Dunnen, J. T. High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* 2009; 30: 860–866. doi: 10.1002/humu.21019
- ¹⁶⁰ Palais RA, Liew MA, Wittwer CT. Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping. *Anal Biochem.* 2005; 346(1):167-175.
- ¹⁶¹ Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN et al. High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry.* 2003; 49:853–860
- ¹⁶² Vossen R, Aten E, Roos A and den Dunnen T. High-Resolution Melting Analysis (HRMA) more than just sequence variant screening. *Human Mutation.* 2009; 30:860-866
- ¹⁶³ Reed GH and Wittwer CT. Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. *Clinical Chemistry.* 2004; 50:1748–1754
- ¹⁶⁴ Montgomery J, Wittwer CT, Palais R et al. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols.* 2007; 2:59-66
- ¹⁶⁵ Nguyen-Dumont T, Le Calvez-Kelm F, Forey N et al. Description and Validation of High-Throughput Simultaneous Genotyping and Mutation Scanning by High-Resolution Melting Curve Analysis. *Human Mutation.* 2009; 30:884–890
- ¹⁶⁶ Zhou L, Myers AN, Vandersteen JG et al. Closed-Tube Genotyping with Unlabeled Oligonucleotide Probes and a Saturating DNA Dye. *Clinical Chemistry.* 2004; 50:1328–1335
- ¹⁶⁷ Rouleau E, Lefol C, Bourdon V et al. Quantitative PCR High-Resolution Melting (qPCR-HRM) Curve Analysis, a New Approach to Simultaneously Screen Point Mutations and Large Rearrangements: Application to MLH1 Germline Mutations in Lynch Syndrome. *Human Mutation.* 2009; 30:867–875
- ¹⁶⁸ Wojdacz TK and Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research.* 2007; 35(6):e41. doi: 10.1093/nar/gkm013
- ¹⁶⁹ Chagné D. Application of the high-resolution melting technique for gene mapping and SNP detection in plants. *Methods Mol Biol.* 2015; 1245:151-9.
- ¹⁷⁰ Costa J, Mafra I, Oliveira MB. High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chemistry.* 2012; 133 (3):1062–1069
- ¹⁷¹ Geyer CN, Hanson ND. Multiplex high-resolution melting analysis as a diagnostic tool for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes. *J Clin Microbiol.* 2014 Apr; 52(4):1262-5. doi: 10.1128/JCM.00214-14. Epub 2014 Jan 29.
- ¹⁷² Montgomery J, Wittwer CT, Kent JO, et al. Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis. *Clin Chem.* 2007 Nov; 53(11):1891-8. Epub 2007 Sep 21.

- ¹⁷³ Mitchell G, Ballinger ML, Wong S et al. High frequency of germline TP53 mutations in a prospective adult-onset sarcoma cohort. *PLoS One*. 2013;8(7):e69026. doi: 10.1371/journal.pone.0069026. Print 2013.
- ¹⁷⁴ Santos PC, Soares RA, Krieger JE et al. Genotyping of the hemochromatosis HFE p.H63D and p.C282Y mutations by high-resolution melting with the Rotor-Gene 6000® instrument. *ClinChem Lab Med*. 2011;49(10):1633-6.
- ¹⁷⁵ Reed GH, Kent JO, WittwerCT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007;8(6):597-608.
- ¹⁷⁶ Royo J, Muñoz LM, HuerosG. Robust and efficient genotyping of factor V and prothrombin alleles using amplicon high-resolution melting and synthetic DNA controls: validation of the test with three different commercial chemistries. *ClinBiochem*. 2011;44(12):1025-7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.05.009.
- ¹⁷⁷ Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM et al. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2006;6:295
- ¹⁷⁸ Nomoto K, Tsuta K, Takano T et al. Detection of EGFR mutations in archived cytologic specimens of non-small cell lung cancer using high-resolution melting analysis. *Am J ClinPathol*. 2006;126(4):608-15.
- ¹⁷⁹ Ishige T, Itoga S, Sato K et al. High-throughput screening of extended RAS mutations based on high-resolution melting analysis for prediction of anti-EGFR treatment efficacy in colorectal carcinoma. *ClinBiochem*. 2014;47(18):340-343
- ¹⁸⁰ Simi L, Pratesi N, Vignoli M et al. High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. *Am J ClinPathol*. 2008;130(2):247-53.
- ¹⁸¹ Ihle MA, Fassunke J, König K, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer*. 2014 Jan 10;14:13. doi: 10.1186/1471-2407-14-13.
- ¹⁸² Dufresne SD, Belloni DR, Wells WA, et al. BRCA1 and BRCA2 Mutation Screening Using SmartCycler II High-Resolution Melt Curve Analysis. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130:185-187
- ¹⁸³ Takano E, Mitchell G, Fox S, Alexander Dobrovic. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis. *BMC Cancer*. 2008; 8:59
- ¹⁸⁴ van der Stoep N, van Paridon C, Janssens T. Diagnostic Guidelines for High-Resolution Melting Curve (HRM) Analysis: An Interlaboratory Validation of BRCA1 Mutation Scanning Using the 96-Well LightScanner. *Human Mutation*. 2009; 30:899-909
- ¹⁸⁵ De Leeneer K, Coene I, Poppe B, et al. Rapid and sensitive detection of *BRCA1/2* mutations in a diagnostic setting: comparison of two high-resolution melting platforms. *Clin Chem*. 2008; 54:982-989
- ¹⁸⁶ Hondow HL, Fox SB, Mitchell G. A high-throughput protocol for mutation scanning of the BRCA1 and BRCA2 genes. *BMC Cancer*. 2011; 11:265
- ¹⁸⁷ Sevilla C, Moatti JP, Julian-Reynier C, et al. Testing for BRCA1 mutations: a cost-effectiveness analysis. *European Journal of Human Genetics*. 2002; 10:599-606

- ¹⁸⁸ Grehardus A, Schleberger H, Schlogelberger B et al. Diagnostic accuracy of methods for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations: a systematic review. *European Journal of Human Genetics*. 2007;15:619-627
- ¹⁸⁹ Ford D, Easton D and Peto. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet*. 1995; 57:1457-62
- ¹⁹⁰ Peto J, Collins N, Barfoot R et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Patients With Early-Onset Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999; 91:943-949
- ¹⁹¹ Antoniou AC, Gayther SA, Stratton JF et al. Risk models for familial ovarian and breast cancer. *Genet Epidemiol*. 2000; 18:173-190
- ¹⁹² Seong MW, Kim KH, Chung IY et al. A multi-institutional study on the association between BRCA1/BRCA2 mutational status and triple-negative breast cancer in familial breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 146(1):63-69
- ¹⁹³ Thorlacius S, Sigurdsson S, Bjarnadottir H et al. Study of a Single BRCA2 Mutation with High Carrier Frequency in a Small Population. *Am. J. Hum. Genet*. 1997; 60:1079-1084
- ¹⁹⁴ Garcia-Patiño E, Gomendio B, Provencio M et al. Germ-line BRCA1 mutations in women with sporadic breast cancer: clinical correlations. *J Clin Oncol*. 1998;16(1):115-20
- ¹⁹⁵ de Sanjosé S, Léoné M, Bérez V et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: a population-based study. *Int J Cancer*. 2003; 106:588-593
- ¹⁹⁶ Martínez-Ferrandis JI, Vega A, Chirivella I et al. Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in Mediterranean Spanish women with early-onset breast cancer: identification of three novel pathogenic mutations. *Hum Mutat*. 2003; 22:417-418
- ¹⁹⁷ Bonadona V, Sinilnikova OM, Chopin S et al. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations to the incidence of breast cancer in young women: results from a prospective population-based study in France. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005; 43:404-413
- ¹⁹⁸ Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *British Journal of Cancer*. 2000; 83(10):1301-1308
- ¹⁹⁹ Van Der Looij M, Szabo C, Besznyak I et al. Prevalence of founder BRCA1 and BRCA2 mutations among breast and ovarian cancer patients in Hungary. *Int. J. Cancer*. 2000; 86:737-740
- ²⁰⁰ Pappelard H, de Bock GH, van Eijk R et al. Prevalence of BRCA1 in a hospital-based population of Dutch breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2000; 83:719-724
- ²⁰¹ Syrjäkoski K, Vahteristo P, Eerola H et al. Population-Based Study of BRCA1 and BRCA2 Mutations in 1035 Unselected Finnish Breast Cancer Patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92(18):1529-31
- ²⁰² Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U et al. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93:1215-1223

- ²⁰³ Foster KA, Harrington P, Kerr J et al. Somatic and germline mutations of the BRCA2 gene in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res.* 1996; 56:3622-3625
- ²⁰⁴ Malone KE, Daling JR, Neal C, et al. Frequency of BRCA1/BRCA2 mutations in a population-based sample of young breast carcinoma cases. *Cancer.* 2000; 88(6):1393-402
- ²⁰⁵ Tonin PN, Perret C, Lambert JA et al. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in early-onset French Canadian breast cancer cases unselected for family history. *Int J Cancer.* 2001; 95(3):189-93
- ²⁰⁶ Malone KE, Daling JR, Doody DR et al. Prevalence and predictors of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of breast cancer in white and black American women ages 35 to 64 years. *Cancer Res.* 2006; 66(16):8297-308
- ²⁰⁷ Hopper JL, Southey MC, Dite GS et al. Population-based estimate of the average age-specific cumulative risk of breast cancer for a defined set of protein-truncating mutations in BRCA1 and BRCA2 Australian Breast Cancer Family Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8:741-747
- ²⁰⁸ Katagiri T, Emi M, Ito I, et al. Mutations in the BRCA1 gene in Japanese breast cancer patients. *Hum Mutat.* 1996; 7:334- 339
- ²⁰⁹ Emi M, Matsushima M, Katagiri T, et al. Multiplex mutation screening of the BRCA1 gene in 1000 Japanese breast cancers. *Jpn J Cancer Res.* 1998; 89:12-16
- ²¹⁰ De León-Matsuda ML, Liede A, Kwan E, Mapua CA, Cutiongco EM, Tan A. BRCA1 and BRCA2 mutations among breast cancer patients from the Philippines. *Int J Cancer.* 2002; 98:596-603
- ²¹¹ Liede A, Malik IA, Aziz Z, de los Rios P, Kwan E and Narod SA. Contribution of BRCA1 and BRCA2 Mutations to Breast and Ovarian Cancer in Pakistan. *Am J Hum Genet.* 2002; 71:595–606
- ²¹² Han S-H, Lee K-R, Lee D-G, Kim B-Y, Lee K-E, Chung W-S. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 from 793 Korean patients with sporadic breast cancer. *Clin Genet* 2006; 70:496–501
- ²¹³ Seo J, Cho DY, Ahn SH et al. BRCA1 and BRCA2 Germline Mutations in Korean Patients with Sporadic Breast Cancer. *Hum Mutat.* 2004; 24(4):350
- ²¹⁴ Kim YT, Nam EJ, Yoon BS, et al. Germline mutations of BRCA1 and BRCA2 in Korean sporadic ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005; 99(3):585-590
- ²¹⁵ Choi DH, Lee MH, Bale AE, Carter D, Haffty BG. Incidence of BRCA1 and BRCA2 mutations in young Korean breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2004; 22:1638-45
- ²¹⁶ Janavičius R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J.* 2010;1(3):397-412.
- ²¹⁷ Karami F, Mehdipour P. A Comprehensive Focus on Global Spectrum of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Breast Cancer. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:928562.
- ²¹⁸ Beristain E, Martínez-Bouzas C, Guerra I et al. Differences in the frequency and distribution of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast/ovarian cancer cases from the Basque country with respect to the Spanish population: implications for genetic counselling. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 106(2):255-62. Epub 2007 Jan 30
- ²¹⁹ Vega A, Campos B, Bressac-De-Paillerets B et al. The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum Mutat.* 2001; 17(6):520-1

- ²²⁰ Díez O, Osorio A, Robledo M et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Jewish mutations in Spanish breast cancer patients. *Br J Cancer*. 1999;79:1302–1303
- ²²¹ de Juan Jiménez I, García Casado Z, Palanca Suela S et al. Novel and recurrent BRCA1/BRCA2 mutations in early onset and familial breast and ovarian cancer detected in the Program of Genetic Counseling in Cancer of Valencian Community (eastern Spain). Relationship of family phenotypes with mutation prevalence. *Fam Cancer*. 2013; 12(4):767-77. doi: 10.1007/s10689-013-9622-2.
- ²²² Von Minckwitz G, Müller BM, Loibl S et al. Cytoplasmic poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase expression is predictive and prognostic in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2011;29: 2150–2157
- ²²³ Ledermann J, Harter P, Gourley C et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(8):852-61.
- ²²⁴ Brachmann S, Fritsch C, Maira SM, García-Echeverría C. PI3K and mTOR inhibitors: a new generation of targeted anticancer agents. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(2):194-198
- ²²⁵ O'Brien C, Wallin JJ, Sampath D et al. Predictive biomarkers of sensitivity to the phosphatidylinositol 3' kinase inhibitor GDC-0941 in breast cancer preclinical models. *Clin Cancer Res*. 2010;16(14):3670-83.
- ²²⁶ Díez O, Osorio A, Durán M et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Human Mutation*. 2003; 22: 301–312
- ²²⁷ Bolufer P, Munárriz B, Santaballa A et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in patients with familial breast cancer. *Medicina Clínica (Barc)*. 2005; 124: 10–12
- ²²⁸ Esteban E, Bolufer P, Palanca S, et al. Twenty-three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families of Eastern Spain. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2008; 112: 69-73
- ²²⁹ Salazar R, Cruz-Hernandez JJ, Sanchez-Valdivieso E et al. BRCA1–2 mutations in breast cancer: Identification of nine new variants of BRCA1–2 genes in a population
- ²³⁰ Esteban E, Bolufer P, Palanca S et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in families studied in the program of genetic counselling in cancer of the Valencian community (Spain). *Medicina Clínica (Barc)*. 2008; 130: 121-126
- ²³¹ Infante M, Durán M, Esteban-Cardenosa E. High proportion of novel mutations of BRCA1 and BRCA2 in breast/ovarian cancer patients from Castilla-León (central Spain). *Journal of Human Genetics*. 2006; 51: 611-617
- ²³² Esteban-Cardenosa E, Duran M, Infante M et al. High-Throughput Mutation Detection Method to Scan BRCA1 and BRCA2 Based on Heteroduplex Analysis by Capillary Array Electrophoresis. *Clinical Chemistry*. 2004; 50: 313–320
- ²³³ Primer3: http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi
- ²³⁴ Meltsim: <http://ftp.bioinformatics.org/pub/meltsim/>
- ²³⁵ Poland: <http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/poland.html>
- ²³⁶ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- ²³⁷ den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15:7–12
- ²³⁸ ESEfinder: <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>
- ²³⁹ Berkeley Drosophila Genome Project: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
- ²⁴⁰ Norambuena PA, Copeland JA, Krenková P, et al. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. *ClinBiochem*. 2009;42(12):1308-16. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.04.015. Epub 2009 May 8.
- ²⁴¹ Seipp MT, Durtschi JD, Liew MA et al. Unlabeled oligonucleotides as internal temperature controls for genotyping by amplicon melting. *JMolDiagn*. 2007; 30:867-875
- ²⁴² Farrar JS, Reed GH, Wittwer CT. High resolution melting curve analysis for molecular diagnostics. *Molecular Diagnostics*, 2nd Ed. Burlington: Elsevier. Chapter 15; 229-245
- ²⁴³ de Juan I, Esteban E, Palanca S et al. Advantages of the high resolution melting in the detection of BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Clinical Biochemistry*. 2009; 42:1572-6
- ²⁴⁴ Bollhalder M, Mura C, Landt O, Maly FE. LightCycler PCR Assay for Simultaneous Detection of the H63D and S65C Mutations in the HFE Hemochromatosis Gene Based on Opposite Melting Temperature Shifts. *Clinical Chemistry*. 1999; 45 (12).
- ²⁴⁵ Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, et al. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet*. 2004; 75(4):535-44
- ²⁴⁶ Tindall EA, Petersen DC, Woodbridge P et al. Assessing high resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments. *Hum Mutat*. 2009; 30:876–88
- ²⁴⁷ McKinney J T, Nay LM, Koeyer DD et al. Mutation Scanning and Genotyping in Plants by High-Resolution DNA Melting, in *The Handbook of Plant Mutation Screening: Mining of Natural and Induced Alleles* (eds K. Meksem and G. Kahl), 2010. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. doi: 10.1002/9783527629398.ch9
- ²⁴⁸ Liew M, Pryor R, Palais R et al. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. *ClinChem* 2004; 50: 1156–1164.
- ²⁴⁹ Gundry CN, Dobrowolski SF, Martin YR et al. Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons. *Nucleic Acids Res* 2008;36(10):3401–8
- ²⁵⁰ Wittwer CI. High resolution DNA melting analysis: Advancements and limitations. *Human Mutation*. 2009;30(6):857-9. doi: 10.1002/humu.20951
- ²⁵¹ Graham R, Liew M, Meadows C, et al. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. *Clin Chem*. 2005; 51(7):1295-8
- ²⁵² Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998;8(3):175-85.

- ²⁵³ de Juan I, Esteban E, Palanca S et al. Advantage of high resolution melting curve analysis over conformation sensitive gel electrophoresis for mutational screening of genes BRCA1 and BRCA2. *ClinChim Acta*. 2011; 412:578-82
- ²⁵⁴ De Leeneer K, Coene I, Poppe B, et al. Genotyping of frequent BRCA1/2 SNPs with unlabeled probes. *J Mol Diagn* 2009;11:415–9.
- ²⁵⁵ Martino A, Mancuso T, Rossi AM. Application of High-Resolution Melting to Large-Scale, High-Throughput SNP Genotyping: A Comparison with the TaqMan® Method. *Journal of Biomolecular Screening*. 2010; 15(6):
- ²⁵⁶ Vega A, Campos B, Bressac-De-Paillerets B, et al. The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum Mutat*. 2001;17(6):520-1
- ²⁵⁷ Muller D, Bonaiti-Pellié C, Abecassis J, et al. BRCA1 testing in breast and/or ovarian cancer families from northeastern France identifies two common mutations with a founder effect. *Fam Cancer*. 2004;3(1):15-20.P
- ²⁵⁸ Campos B, Díez O, Domènech M, et al. RNA analysis of eight BRCA1 and BRCA2 unclassified variants identified in breast/ovarian cancer families from Spain. *Hum Mutat*. 2003;22(4):337
- ²⁵⁹ Phelan CM, Dapic V, Tice B, et al. Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance. *J MedGenet*. 2005;42(2):138-46
- ²⁶⁰ Osorio A, Milne RL, Honrado E, et al. Classification of missense variants of unknown significance in BRCA1 based on clinical and tumor information. *Hum Mutat*. 2007;28(5):477-85.
- ²⁶¹ Cartegni L, Wang J, Zhu Z, et al. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31(13):3568-71.
- ²⁶² ENIGMA: Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles. <http://enigmaconsortium.org/>
- ²⁶³ Spain Mutation DataBase: <http://spainmdb.isciii.es>
- ²⁶⁴ Instituto de Salud Carlos III: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-el-instituto/fd-comunicacion/fd-noticias/20_11_2014_SpainMutationDataBase.shtml
- ²⁶⁵ Haitian Z, Yunfei L, Jian Z, et al. Mutation screening of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer in southern Chinese populations. *Breast*. 2008;17(6):563-7.
- ²⁶⁶ De Leeneer K, Coene I, Crombez B, et al. Prevalence of BRCA1/2 mutations in sporadic breast/ovarian cancer patients and identification of a novel de novo BRCA1 mutation in a patient diagnosed with late onset breast and ovarian cancer: implications for genetic testing. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132(1):87-95
- ²⁶⁷ Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *ClinCancer Res*. 2011;17(5):1082-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2560.
- ²⁶⁸ Tuna NM, Villanib G, Onga K, et al. Risk of having BRCA1 mutation in high-risk women with triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *ClinGenet*. 2014;85:43–48
- ²⁶⁹ Murria R, Palanca S, de Juan I, et al. Immunohistochemical, genetic and epigenetic profiles of hereditary and triple negative breast cancers. Relevance in personalized medicine. *Am J Cancer Res*. 2015 Jun 15;5(7):2330-43. eCollection 2015.
- ²⁷⁰ Zugazagoitia J, Pérez-Segura P, Manzano A, et al. Limited family structure and triple-negative breast cancer (TNBC) subtype as predictors of BRCA mutations in a genetic

- counseling cohort of early-onset sporadic breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;148(2):415-21. doi: 10.1007/s10549-014-3167-4
- ²⁷¹ Kwon JS, Gutierrez-Barrera AM, Young D et al. Expanding the Criteria for BRCA Mutation Testing in Breast Cancer Survivors. *J Clin Oncol*, 2010;28:4214-4220
- ²⁷² Song H, Cicek MS, Dicks E et al. The contribution of deleterious germline mutations in BRCA1, BRCA2 and the mismatch repair genes to ovarian cancer in the population. *Hum Mol Genet.* 2014;23(17):4703-9. doi: 10.1093/hmg/ddu172
- ²⁷³ Zhang S, Royer R, Li S et al. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2011;121(2):353-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.01.020
- ²⁷⁴ Breast and /or Ovarian Cancer Genetic Assessment. En el CCN Guidelines Version 2.2014.
- ²⁷⁵ Castéra L, Krieger S, Rousselin A et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22(11):1305-13.
- ²⁷⁶ Sharma P, Klemp JR, Kimler BF et al. Germline BRCA mutation evaluation in a prospective triple-negative breast cancer registry: implications for hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome testing. *Breast Cancer Res Treat.* 2014; 145(3):707-14. doi: 10.1007/s10549-014-2980-0. Epub 2014 May 7.
- ²⁷⁷ Domagala P, Jakubowska A, Jaworska-Bieniek K et al. Prevalence of Germline Mutations in Genes Engaged in DNA Damage Repair by Homologous Recombination in Patients with Triple-Negative and Hereditary Non-Triple-Negative Breast Cancers. *PLoS One.* 2015; 10(6):e0130393.
- ²⁷⁸ Liu G, Yang D, Sun Y et al. Differing clinical impact of BRCA1 and BRCA2 mutations in serous ovarian cancer. *Pharmacogenomics.* 2012; 13(13):1523-35
- ²⁷⁹ Ashworth A. Synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J Clin Oncol* 2008;26:3785-90.
- ²⁸⁰ Cybulski C, Carrot-Zhang J, Kluźniak W et al. Germline RECQL mutations are associated with breast cancer susceptibility. *Nat Genet.* 2015; 47(6):643-6.