

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD DE MEDICINA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL
NUEVAS APORTACIONES A LA BÚSQUEDA DE
GENES DE PREDISPOSICIÓN AL CÁNCER DE
MAMA HEREDITARIO

DANIEL FERNÁNDEZ GARCÍA

2013



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**



EL DR. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y EL DR. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Nuevas aportaciones a la búsqueda de genes de predisposición al cáncer de mama hereditario”, que presenta el Licenciado en Biología Daniel Fernández García, ha sido realizado bajo su dirección en el Laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca, a 28 de Agosto de 2013.

Fdo. Prof. Dr. Rogelio González Sarmiento Fdo. Prof. Dr. Juan Jesús Cruz Hernández

Durante el transcurso de este trabajo, Daniel Fernández García ha sido beneficiario de un contrato predoctoral de Personal Investigador en Formación de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo (Orden EDU/330/2008).

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología del cáncer. Incidencia del cáncer de mama.	3
2. Factores de riesgo del cáncer de mama	5
• Etnia, sexo y edad	7
• Factores hormonales	7
• Historia familiar	8
• Otros factores de riesgo	9
3. Cáncer de mama hereditario	10
4. BRCA1/BRCA2	15
5. Genes de alta penetrancia	16
• BRCA1/BRCA2	17
• TP53	20
• PTEN	22
• SKT11	24
• CDH1	25
6. Genes de penetrancia moderada	26
• PALB2	27
• BRIP1	30
• RAD51C	32
• CHEK2	34
• BARD1	36
• ABRAXAS	38
• ERCC4	40
• ATM	42
• TGFB1	43
• CASP8	45
• NBN y RAD50	46
7. Variantes alélicas de baja penetrancia caracterizadas por GWAS	48
• miR146	49
• FGFR2	50
• Región 8q24	51
• TP53 y MDM2	52

• SNPs de BRCA1	54
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	57
PACIENTES Y MÉTODOS	61
1. Pacientes y controles en estudio	63
2. Manipulación de ácidos nucleicos. Extracción de ADN de sangre periférica	65
3. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR	66
4. Electroforesis en gel de agarosa	74
5. Análisis de los fragmentos amplificados por PCR mediante CSGE (electroforesis en gel sensible a la conformación)	74
6. Análisis de grandes reordenamientos genómicos: MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	76
7. Cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (dHPLC)	82
8. Secuenciación automática	84
9. Discriminación alélica	85
9.1. Mediante sondas TaqMan	85
9.2. Mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	88
10. Análisis estadístico	90
11. Análisis bioinformático	91
• Estudios <i>in silico</i> de la patogenicidad de las mutaciones	91
• Bases de datos	92
RESULTADOS	93
Estudio de genes que predisponen al cáncer de mama familiar	95
1. Análisis del gen TP53	96
2. Análisis del gen ABRAXAS	97
3. Análisis del gen PALB2	100
4. Análisis del gen RAD51C	101
5. Análisis del gen BARD1	102
6. Análisis del gen BRIP1	102
7. Análisis del gen CHEK2	104
8. Análisis del gen ERCC4	105
Estudio de variantes genéticas asociadas con riesgo de cáncer de mama familiar. Modelo poligénico.	110
1. Estudio de la distribución de los fenotipos tumorales en mujeres con cáncer	111

de mama familiar.	
2. Estudio de la distribución de genotipos de polimorfismos de baja penetrancia en mujeres con cáncer de mama en función del fenotipo tumoral	128
3. Estudio de los polimorfismos de los genes BRCA1, TP53, MDM2, FGFR2, miR146 y región cromosómica 8q24 en cáncer de mama familiar	135
4. Estudio de los polimorfismos de los genes BRCA1, TP53, MDM2, FGFR2, miR146 y región cromosómica 8q24 en cáncer de mama familiar en función de la variable edad	160
DISCUSIÓN	185
1. Estudio de genes que predisponen al cáncer de mama familiar. Modelo monogénico	190
1.1. Estudio del gen ABRAXAS	193
1.2. Estudio del gen ERCC4	194
2. Estudio de variantes genéticas asociadas con riesgo de cáncer de mama familiar. Modelo poligénico.	196
2.1. Cáncer de mama familiar y características biológicas de los tumores	196
2.2. Análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos en pacientes con cáncer de mama familiar	197
• Polimorfismos del gen BRCA1	197
• Polimorfismos de los genes MDM2 y TP53	208
• Polimorfismos identificados mediante GWAS	209
2.3. Historia familiar y cáncer de mama	212
CONCLUSIONES	215
ANEXO	219
BIBLIOGRAFÍA	319

- **A:** adenina.
- **ABRAXAS** (ABRCA1, FAM175A o CCDC98, *coiled-coil domain containing 98*): proteína que dimeriza con RAP80 e interacciona con BRCA1.
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- **ANK:** repeticiones de anquirina.
- **APS:** persulfato amónico.
- **ARN:** ácido ribonucleico.
- **ARMm:** ácido ribonucleico mensajero.
- **AT:** ataxia telangiectasia.
- **ATM** (*ataxia-telangiectasia mutated*): quinasa importante en los puntos de control del ciclo celular. Participa en reparación de DNA regulando a diversas proteínas diana como TP53, BRCA1, CHK2...etc.
- **ATP:** adenosín trifosfato.
- **ATPasa:** adenosín trifosfatasa
- **ATR** (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*): quinasa relacionada con ATM que fosforila a BRCA1 y otras dianas en respuesta al daño en el DNA. Mutaciones en este gen se asocian con el síndrome ataxia telangiectasia.
- **BARD1** (*BRCA1 associated RING domain 1*): proteína que forma dímeros con BRCA1 y juntas funcionan como ubiquitina-ligasa.
- **BIC** (*breast cancer information core*): base de datos sobre mutaciones en los genes BRCA.
- **BRCA1** (*breast cancer 1*)
- **BRCA2** (*breast cancer 2; FANCD1, fanconi anemia group D1*).
- **BRCC:** complejo proteico que incluye a RAD51, BRCA2, BRCA1 y BARD1. BRCC36 y BRCC45: subunidades 36 y 45 respectivamente.
- **BRCT** (*breast cancer C-terminal domain*): cada uno de los dominios de BRCA1 en su carboxilo-terminal a los que se unen diversas proteínas. Otras proteínas también portan dominios BRCT.
- **BRIP1** (*BRCA1 interacting protein 1; FANCI, fanconi anemia group J*): proteína que se une al dominio BRCT de BRCA1.
- **C:** citosina.
- **CASP8/CASP10:** proteínas caspasas 8 y 10 respectivamente, implicadas en apoptosis.
- **CDH1:** proteína E-cadherina. Activador de APC. Mutaciones en el gen CDH1 dan lugar al síndrome HDGC.
- **CHEK2** (CHK2,RAD53) *checkpoint homolog*: quinasa que, en respuesta al daño en el DNA y el bloqueo de la replicación, se activa y actúa sobre proteínas diana (BRCA1 entre ellas) promoviendo la parada del ciclo y evitando la entrada en mitosis con el DNA dañado.
- **CIAA:** cloroformo isoamílico.
- **CSGE:** electroforesis en gel sensible a la conformación.
- **CSR** (*class switch recombination*): proceso biológico, que sin variar la especificidad de las inmunoglobulinas por un antígeno concreto, permite interacción con distintas moléculas efectoras.
- **CtBP** (*C-terminal-binding protein*): proteína co-represora transcripcional que interacciona con el dominio C-terminal de BRCA1. Promueve la supervivencia celular reprimiendo la expresión de genes pro-apoptóticos.
- **CtIP** (*C-terminal-binding protein interacting protein*): proteína que dimeriza con CtBP y actúa en el punto de control G2/M del ciclo celular tras el daño al DNA.
- **DBD** (*DNA/DSS1 binding domain*): zona del carboxilo terminal de BRCA2 que se une a la proteína DSS1 y a ssDNA durante la reparación del ADN por recombinación homóloga.
- **DCM1** (*disrupted meiotic cDNA*): proteína implicada en el proceso de recombinación homóloga durante la meiosis. Interacciona entre otras con RAD51.
- **DDB2** (*damage-specific DNA binding protein 2*): proteína de la ruta de reparación GG-NER.
- **dHPLC:** cromatografía líquida de alto rendimiento en condiciones desnaturizantes.
- **DISC** (*death-inducing signalling complex*): complejo apoptótico que engloba los receptores de muerte celular, la proteína adaptadora FADD y las caspasas iniciadoras 8 y 10.
- **DSB(s)** (*double-strand break*): rotura de doble cadena en el DNA.
- **DSS1:** proteína que se une al dominio DBD de BRCA2 y participa en reparación del ADN por recombinación homóloga.
- **dNTPs:** desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
- **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

- **ERCC1** (*excision repair cross-complementation group 4*): enzima de la ruta de reparación NER que forma complejos con ERCC4.
- **ERCC4** (*excision repair cross-complementation group 4*; XPF, *xeroderma pigmentosum group F*): enzima de la ruta de reparación NER que forma complejos con ERCC1. El complejo actúa como endonucleasa específica de estructura.
- **ESE(s)** (*exonic splicing enhancer*): promotor exónico de la maduración del ARNm.
- **FA**: anemia de Fanconi.
- **FADD** (FAS-associated death domain protein): proteína adaptadora del complejo apoptótico.
- **FGFR2** (*fibroblast growth factor receptor 2*): codifica la proteína FGFR2 implicada en el crecimiento de las células tumorales, la capacidad invasiva, motilidad y angiogénesis.
- **G**: guanina.
- **G1**: fase del ciclo en que está la célula cuando no se divide.
- **G2**: fase de crecimiento celular en que la célula se prepara para la mitosis.
- **GWAS**: *genome-wide association study*
- **HDGC**: síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario.
- **ICL** (*interstrand crosslink*): entrecruzamiento de hebras de ADN.
- **Kb**: kilobase.
- **kDa**: kilo Dalton.
- **LD** (*linkage disequilibrium*): desequilibrio de ligamiento
- **LFS**: *Li-Fraumeni Syndrome*
- **LGR** (*large genomic rearrangements*): grandes reordenamientos genéticos.
- **M**: mitosis. Fase del ciclo en que se produce la división celular.
- **MDM2**: oncogén que regula la respuesta de TP53, controla sus niveles y actividad.
- **MERIT40** (*mediator of RAP80 interactions and targeting subunit of 40 kDa*; NBA1, *new component of the BRCA1-A complex*): forma parte de un complejo enzimático con BRCA1, ABRAXAS, RAP80, BRCC36 y BRCC45.
- **miRNA** (micro ARNs): pequeñas moléculas de ARN de cadena sencilla que regulan la expresión de los genes
- **MLPA**: PCR multiplex dependiente de ligación.
- **MRE11** (*mismatch repair endonuclease*): forma parte junto con NBN y RAD50 del complejo MRN.
- **MRN**: complejo con actividad nucleasa que incluye a las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1. Participa en la reparación de ADN por unión de extremos no homólogos (NHEJ), que tiende a cometer errores.
- **NBN** (*nibrin*): forma parte junto con MRE11 y RAD50 del complejo MRN.
- **NBS** (*Nijmegen breakage syndrome*): desorden autosómico recesivo que presenta inestabilidad cromosómica y predisposición a diferentes tumores malignos.
- **NBS1** (*Nijmegen breakage syndrome 1*): proteína codificada por el gen NBN, implicada en procesos de reparación del ADN.
- **NER** (*nucleotide excision repair*): sistema de reparación del ADN por escisión de nucleótidos.
- **NLS**: señal de localización nuclear.
- **PALB2** (*PALB2 partner and localizer of BRCA2*; FANCN, *fanconi anemia group N*): proteína que se une a BRCA2 y participa en la ruta de FA.
- **pb**: pares de bases.
- **PCR** (*polymerase chain reaction*): reacción en cadena de la polimerasa.
- **PTEN** (*phosphatase and tensin homolog*): fosfatasa que funciona inhibiendo diversas dianas y funciona como supresor de tumores. Mutaciones en el gen PTEN dan lugar al Síndrome de Cowden.
- **TP53** (*tumor protein 53*): codifica la proteína p53. Supresor tumoral que regula genes que inducen parada del ciclo celular, apoptosis, senescencia y reparación de DNA. Mutaciones en este gen dan lugar al Síndrome de Li-Fraumeni.
- **RAD50**: forma parte junto con NBN y MRE11 del complejo MRN.
- **RAD51**: recombinasa esencial para el proceso de recombinación homóloga que interacciona con BRCA1 y BRCA2.
- **RAD51C** (*RAD51 paralog C*; FANCO, *fanconi anemia group O*): responsable del desplazamiento de RAD51 al foco de ADN dañado y de la activación de CHEK2 por la proteína ATM.
- **RAP80** (*receptor-associated protein 80*; UIMC1, *ubiquitin interaction motif containing 1*): proteína que forma dímeros

con ABRAXAS y recluta, entre otros factores, a BRCA1-BARD1 hacia los DSBs.

- **RE:** receptor de estrógenos (puede ser α o β).
- **RFLP** (*restriction fragment length polymorphism*): polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.
- **RING** (dominio): dominio de las proteínas BARD1 y BRCA1 que permite la interacción entre ambas.
- **RP:** receptor de progesterona (puede ser A o B).
- **S:** fase del ciclo celular previa a la división en que se produce la duplicación del material genético.
- **SDS:** dodecilsulfato sódico.
- **SNP** (*single nucleotide polymorphism*): variación en la secuencia de DNA que afecta a un solo nucleótido.
- **SP1** (*specificity protein 1*): proteína activadora de la transcripción.
- **STK11** (*serine/threonine kinase 11*; LKB1): quinasa que regula la polaridad celular y funciona como supresor de tumores. Mutaciones en este gen dan lugar al síndrome de Peutz-Jeghers.
- **T:** timina.
- **TEAA:** acetato de trietilamonio.
- **TEMED:** N,N,N,N' Tetrametil-etileno-diamina).
- **TGFB1** (*transforming growth factor, beta 1*): codifica la proteína TGF β 1, que controla la proliferación y diferenciación celular.
- **Tip60 HAT:** histona acetiltransferasa. Se une al dominio FATC de ATM y facilita la activación completa de la proteína.
- **UTR(s)** (*untranslated region*): zonas que flanquean la región codificante de cada gen y no se traducen a proteína.
- **WD-40:** pequeño motivo estructural de 40 aminoácidos, que en muchas ocasiones termina en el dipéptido triptófano-ácido aspártico(W-D). Suelen estar implicados en la interacción proteína-proteína.

Introducción

1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER.

El cáncer es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda causa de muerte en los países en desarrollo (World Health Organization, 2008; Jemal et al., 2011). La incidencia del cáncer está incrementándose en los países en desarrollo como consecuencia del crecimiento y envejecimiento de la población, así como por la adopción de estilos de vida poco saludables, tales como el tabaquismo, la inactividad física y la introducción de dietas “occidentalizadas” (Jemal et al., 2011).

En el año 2008 se estima que se produjeron en todo el mundo cerca de 12.7 millones de nuevos casos y 7.6 millones de muertes por cáncer (Figura 1) (Ferlay et al., 2010), con un 56 % de los casos y un 64 % de las muertes en los países en desarrollo. El cáncer de mama en mujeres y el cáncer de pulmón en hombres (Figuras 2 y 3) son los más frecuentemente diagnosticados y la principal causa de muerte para ambos sexos tanto en países desarrollados como en países en desarrollo (aunque en países desarrollados, el cáncer de próstata es el más frecuentemente diagnosticado en varones) (Jemal et al., 2011).

El cáncer de mama representa un 23 % del total de nuevos casos de cáncer diagnosticado (se estima en 1 millón de nuevos casos cada año) y un 14 % del total de muertes en 2008 (Figura 1) (Jemal et al., 2011). En general, las tasas de incidencia son más altas en el norte y oeste de Europa, en Australia/Nueva Zelanda y en Norteamérica (Figura 2). Juntos, EE.UU. y Europa representan el 16 % de la población mundial y se atribuyen el 60 % del total de incidencia del cáncer de mama a nivel mundial. (Parkin et al., 1999; Parkin, 2004).

La variación en las tasas de incidencia internacional es consecuencia en gran parte, de la disponibilidad de servicios de detección precoz y de las diferencias en los factores reproductivos y hormonales (Jemal et al., 2010; Mackay et al., 2006), entre los que podemos citar la menarquia temprana, la nuliparidad, la terapia hormonal sustitutiva o la ingesta de anticonceptivos orales y la edad tardía de nacimiento del primer hijo (Hulka et al., 2001). El consumo de alcohol también incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama (Baan et al., 2007; Key et al., 2006).

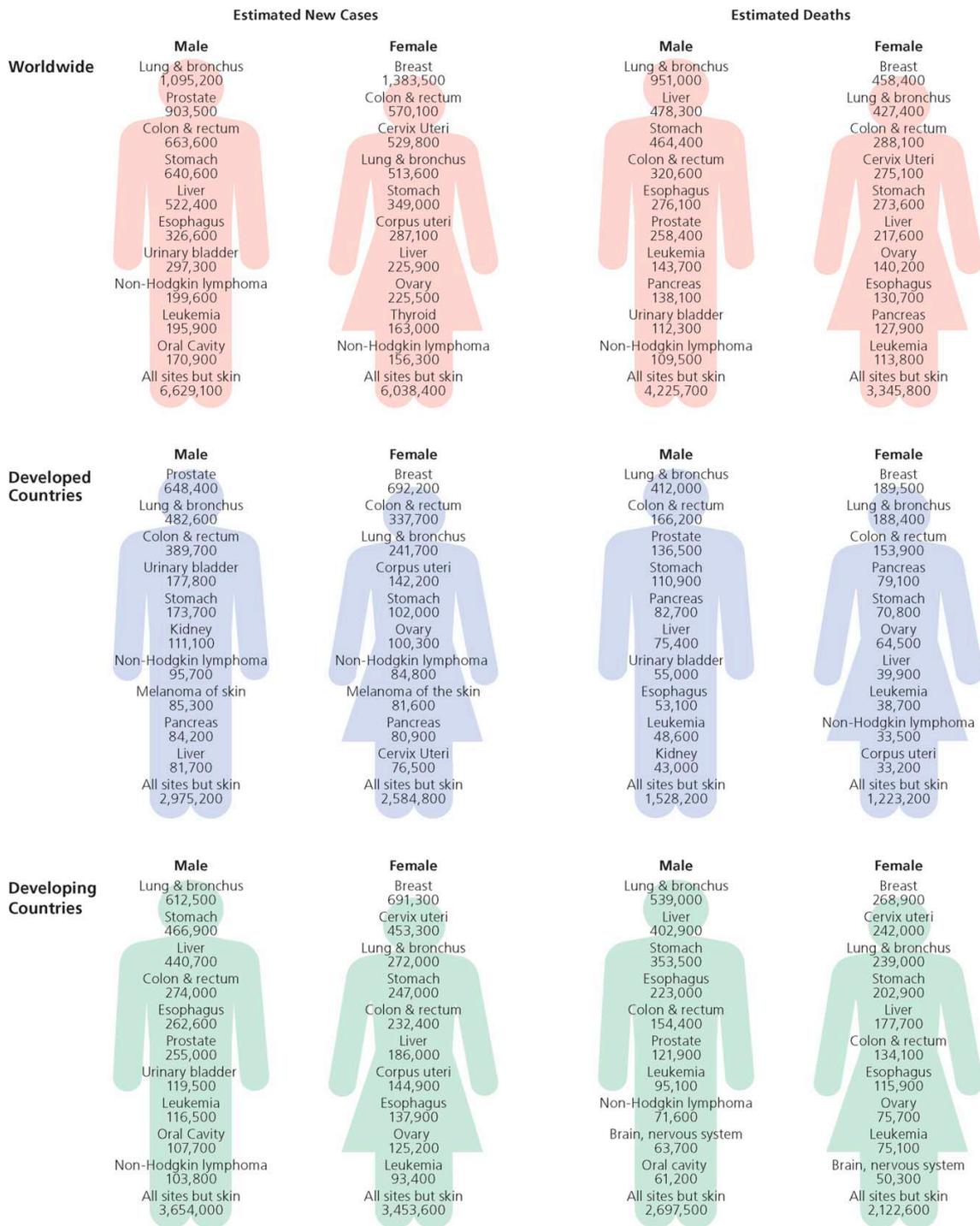


Figura 1. Estimación basada en el nivel de desarrollo económico de los nuevos casos y las muertes ocasionadas en todo el mundo por los distintos tipos de cáncer. Fuente: GLOBOCAN 2008 (Revisado en Jemal et al., 2011).

El incremento de la incidencia de cáncer de mama que se observó en muchos países occidentales a finales de los años 80 y 90, fue consecuencia tanto del cambio en los factores reproductivos (incluyendo el incremento en el uso de la terapia hormonal sustitutiva) como del incremento en los sistemas de detección precoz (Althuis et al.,

2005; Ravdin et al., 2007; Cronin et al., 2009; Edwards et al., 2010; Parkin, 2009; Seradour et al., 2009; Canfell et al., 2008). Por el contrario, la tasa de muerte por cáncer de mama ha ido disminuyendo en Norteamérica y varios países europeos durante los últimos 25 años, en gran parte como resultado de la detección precoz a través de programas de mamografía y la mayor eficacia de los fármacos empleados en el tratamiento de la enfermedad (Jemal et al., 2010; Althuis et al., 2005; Autier et al., 2010).

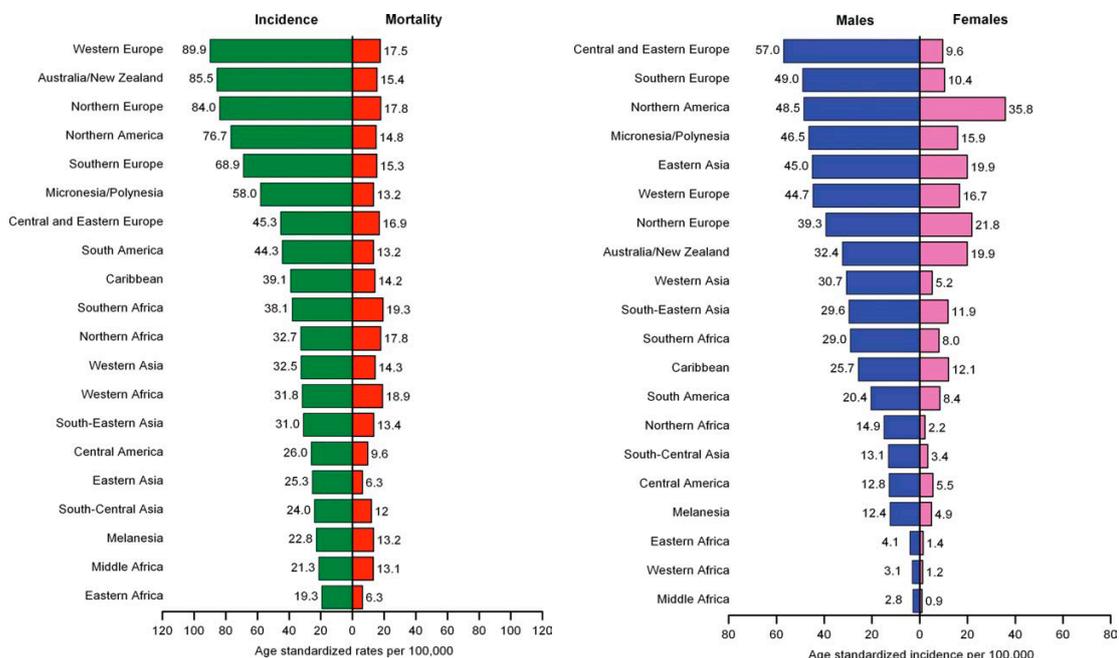


Figura 2. Ratios de incidencia y mortalidad del cáncer de mama en función de la edad en las distintas regiones del mundo. Fuente: GLOBOCAN 2008 (Tomado de Jemal et al., 2011).

Figura 3. Ratios de incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón, clasificado por sexos, en función de la edad en las distintas regiones del mundo. Fuente: GLOBOCAN 2008 (Tomado de Jemal et al., 2011).

2. FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el cáncer mas frecuentemente diagnosticado en mujeres: aproximadamente 1 de cada 10 mujeres occidentales desarrollarán cáncer de mama a lo largo de su vida.

Existen múltiples factores de riesgo que afectan a la incidencia del cáncer de mama, como el nivel hormonal (tanto endógeno como exógeno), el factor reproductivo y la obesidad; sin embargo, el principal factor de riesgo es la historia familiar. El riesgo individual se incrementa con el número de parientes afectados y con el desarrollo temprano del tumor en los parientes afectados (Lalloo et al., 2012). En la tabla 1 mostramos un resumen de los principales factores de riesgo y factores protectores frente al cáncer de mama.

Tabla 1. Resumen de los factores protectores y factores que incrementan el riesgo a padecer cáncer de mama (Modificado de Oldenburg et al., 2007).

Resumen de factores protectores y factores que incrementan el riesgo de cáncer de mama	
FACTORES DE RIESGO PARA EL CÁNCER DE MAMA	
• Constitución genética	Historia familiar de cáncer de mama; familiares de primer o segundo grado con cáncer de mama; portador de una mutación en uno de los genes de susceptibilidad
• Factores demográficos	Región geográfica (países occidentales); sexo femenino; edad; bajo estatus socio económico
• Factores endógenos	Alta edad menopausia (>54); temprana edad de menarquia (<12); no tener hijos o alta edad de primer parto; no lactancia; baja actividad física
• Factores exógenos	Anticonceptivos orales; terapia de reemplazo hormonal; exposición a radiaciones ionizantes a edad temprana
• Características físicas	Obesidad en mujeres post menopausicas; alta estatura; historial de enfermedad de mama benigna (hiperplasia epitelial atípica); elevada densidad mamaria; elevada densidad ósea en mujeres post menopausicas; elevados niveles de factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I)
• Factores de dieta	Alcohol; baja ingesta de folato; alta ingesta de grasas insaturadas y carne muy hecha
FACTORES PROTECTORES	
Región geográfica (Asia y África)	
Edad temprana al nacimiento del primer hijo	
Mayor número de embarazos	
Lactancia	
Menopausia a edad temprana	
Consumo de frutas y vegetales	
Actividad física	
Uso de antiinflamatorios no esteroideos	
Agentes quimiopreventivos	

Mantener un peso corporal saludable, incrementar la actividad física y minimizar la ingesta de alcohol son las mejores estrategias para reducir el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Kushi et al., 2006). La detección precoz a través de la mamografía ha permitido incrementar las opciones de tratamiento y la tasa de supervivencia; sin embargo, su aplicación es económicamente prohibitiva y por lo tanto, no factible, en muchos de los países en desarrollo (Anderson et al., 2006).

- **Etnia, sexo y edad**

La incidencia del cáncer de mama en varones es muy inferior a la incidencia en mujeres: aproximadamente 1 de cada 150 casos ocurren en varones (Hill et al., 2005). En mujeres menores de 25 años se producen alrededor de 10 nuevos casos por cada 100.000 mujeres, pero este ratio aumenta hasta 10 veces alrededor de los 40 años (Hulka et al., 2001). En los EE.UU. la tasa de incidencia es 20-40 % mayor en mujeres blancas que en mujeres afroamericanas (Garfinkel et al., 1994), excepto en mujeres jóvenes, donde el ratio es mayor en mujeres afroamericanas (Bernstein et al., 2003).

- **Factores hormonales**

Las hormonas sexuales, en función del grado y el tiempo de exposición, han sido identificadas como factores de riesgo en muchos estudios epidemiológicos. Esto incluye tanto hormonas sexuales endógenas, como hormonas exógenas derivadas del uso de anticonceptivos orales, terapia hormonal sustitutiva y dieta (Dumitrescu et al., 2005). La hormona o combinación de hormonas específicas responsables del incremento del riesgo no han sido identificadas, pero se cree que los estrógenos son el principal factor hormonal responsable de modificar el riesgo al cáncer de mama (Revisado en Oldenburg et al., 2007).

Una menarquia temprana (menor a 12 años) incrementa el riesgo en 10-20 % (Berkey et al., 1999; Kelsey et al., 1993) y un retraso en la menopausa incrementa el

riesgo en aproximadamente 3 % por cada año de retraso (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996).

La inducción quirúrgica de la menopausia, mediante ovariectomía o histerectomía, antes de los 35 años disminuye el riesgo de cáncer de mama en un 60 % frente a las mujeres que han experimentado una menopausia natural (McPherson et al., 2000).

La obesidad en mujeres postmenopáusicas incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama en un 8 % por cada 5 kg de peso ganados a partir del peso recomendable (Van der Brandt et al. 2000; Huang et al., 2005; Lahmann et al., 2004; Trentham-Dietz et al., 2000), con un riesgo relativo incrementado en 1,1-2,5 veces. Un posible mecanismo por el cual se incrementa el riesgo en mujeres postmenopáusicas podría ser el elevado nivel de estrógenos endógenos en las mujeres obesas, ya que el tejido adiposo es una importante fuente de estrógenos (McTiernan et al., 2000).

Estudios realizados en mujeres postmenopáusicas mostraron que existe una relación entre una mayor densidad ósea y el riesgo a padecer cáncer de mama, con un riesgo relativo entre 2 y 3,5 veces superior (Biglia et al., 2004). Ya que los estrógenos ayudan a mantener la masa ósea, esta relación puede ser explicada por un incremento en la cantidad total de estrógenos endógenos.

La actividad física en la adolescencia y en las primeras etapas de la vida adulta disminuye el riesgo a padecer cáncer de mama en un 20 %. Este efecto puede ser resultado del retraso de la menarquia y de la modificación de los niveles hormonales (Lagerros et al., 2004; Hankinson et al., 2004).

Además, el uso de anti-estrógenos, tales como el tamoxifeno, el embarazo precoz, lactancia y un mayor número de embarazos tienen un efecto protector sobre el cáncer de mama (Revisado en Oldenburg et al., 2007).

- **Historia familiar**

Un historial familiar de cáncer de mama duplica el riesgo de padecer la enfermedad, en relación con la población sin antecedentes familiares (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001).

Este riesgo se incrementa con el número de familiares afectados y es mayor si los familiares desarrollaron la enfermedad a temprana edad, desarrollaron enfermedad bilateral o si existe historial de enfermedad mamaria benigna (McPherson et al., 2000; Thompson et al., 2004). Aproximadamente el 15 % de los pacientes presentan familiares de primer grado con historial de la enfermedad (Robson et al., 2007); en estos casos, el riesgo de cáncer de mama se duplica (Bradbury et al., 2007).

En los países occidentales el riesgo total a lo largo de la vida para una mujer que no tiene familiares afectados es de 7,8 %, cuando tiene un familiar afectado es de 13,3 % y para las que tienen dos familiares afectados es de 21,1 % (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001).

- **Otros factores de riesgo**

- Densidad mamográfica

La densidad mamográfica es un factor de riesgo, tanto en mujeres premenopáusicas como posmenopáusicas (Boyd et al., 1995; Brinton et al., 1995).

Las mujeres con una alta densidad mamaria, superior al 75 %, tienen un riesgo de desarrollar cáncer de mama 5 veces superior al de las mujeres con una densidad inferior al 5 % (Byrne et al., 2001; Boyd et al., 2002). La nuliparidad y la alta densidad mamaria parece que actúan sinérgicamente, ya que el riesgo aumenta hasta 7 veces cuando ambas situaciones se presentan en la misma persona, comparado con mujeres multíparas de baja densidad mamaria (van Gils et al., 2000). Esto podría explicarse por la mayor proliferación celular y con ello un mayor riesgo de mutaciones en el epitelio mamario. (Boyd et al., 2007; Vachon et al., 2007; Martin et al., 2008).

Estudios en gemelos han demostrado que la variación poblacional en el porcentaje de densidad mamaria a una determinada edad, tiene un gran componente hereditario. Los factores genéticos juegan por tanto un importante papel explicando la gran variabilidad observada y la búsqueda de los genes responsables de los fenotipos identificados puede ser muy importante en la comprensión de los factores que conducen al desarrollo del cáncer de mama (Boyd et al., 2002; Stone et al., 2006).

- Enfermedad benigna de mama

Algunas lesiones benignas son factores de riesgo conocidos del cáncer de mama invasivo que se origina en el mismo área de la mama y son, por lo tanto, consideradas lesiones precursoras. Las mujeres con hiperplasia epitelial atípica severa tienen entre 4 y 5 veces más riesgo de desarrollar cáncer de mama que las mujeres que no presentan estos cambios proliferativos en sus pechos. Mujeres con estos cambios e historia familiar de cáncer de mama (familiares de primer grado) tienen un riesgo 9 veces incrementado (McPherson et al., 2000).

- Radiación

La exposición de la glándula mamaria a altas dosis de radiación ionizante se ha demostrado que incrementa el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Revisado en Oldenburg et al., 2007). El riesgo es dependiente de la dosis y disminuye gradualmente con el paso del tiempo (Hulka et al., 2001; Dumitrescu et al., 2003; Biglia et al., 2004).

3. CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

Aproximadamente un 5-10% de los cánceres de mama tienen una predisposición genética hereditaria, debido a la presencia de mutaciones germinales de genes de susceptibilidad, de forma que el aumento del riesgo sobre la población general se transmite a las siguientes generaciones (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995; Ford et al., 1995).

Sin embargo, muchos estudios sugieren que la proporción del cáncer de mama que puede ser atribuida a factores genéticos es mucho mayor, hasta del 30 %. Se estima que aproximadamente el 20-27 % del riesgo se puede explicar por la existencia genes de susceptibilidad al cáncer de mama, correspondiendo hasta un 4-5% del riesgo total a los

dos principales genes de susceptibilidad al cáncer de mama, BRCA1 y BRCA2 (Revisado en Oldenburg et al., 2007; Revisado en Lalloo et al., 2012).

Según esto, es probable que existan otros genes de susceptibilidad aún por descubrir, de forma que los objetivos principales en la lucha contra el cáncer de mama hereditario son la identificación de los genes de susceptibilidad implicados y la determinación de posibles interacciones entre esos genes de susceptibilidad que puedan modificar el riesgo a padecer cáncer de mama (modelo poligénico) (Revisado en Oldenburg et al., 2007).

Los genes de predisposición suelen ser genes supresores de tumores: transmiten continuamente señales de carácter negativo sobre la proliferación celular y su inactivación provoca, por defecto, divisiones descontroladas (Hussain et al., 1998). Heredar una copia dañada del gen aumenta la predisposición al cáncer, pero es necesaria otra mutación para inactivarlo completamente y que se inicie la transformación neoplásica.

En general, está comúnmente aceptado que existen tres clases de genes de susceptibilidad: los genes con variantes alélicas que confieren un alto riesgo individual (genes de alta penetrancia), los genes cuyas variantes alélicas confieren un riesgo moderado (genes de penetrancia intermedia) y los genes cuyas variantes alélicas confieren un riesgo bajo (genes de baja penetrancia).

Entre los primeros encontramos a BRCA1 y BRCA2, que son responsables de un alto porcentaje de los casos hereditarios, y PTEN, TP53, LKB1/STK11 y CDH1. En el segundo grupo se incluyen entre otros: CHEK2, PALB2, BRIP1 y RAD51C (Tabla 2). En el último grupo nos encontramos con SNPs situados en los locus 10q26 (FGFR2), 8q24, 2q35,... (Revisado en Oldenburg et al., 2007; Turnbull et al., 2008; Lalloo et al., 2012).

Tabla 2. Lista de los genes conocidos de susceptibilidad al cáncer de mama de alto o moderado riesgo (Modificado de Oldenburg et al., 2007).

Gen	Localización	Variantes genéticas	Frecuencia	Riesgo de cáncer de mama
BRCA1	17q21	Múltiples	Baja	46-85% a lo largo de la vida
BRCA2	13q12	Múltiples	Baja	43-84% a lo largo de la vida
TP53	17p13.1	Múltiples	Baja	28-56% a los 45 años
PTEN	10q23.3	Múltiples	Baja	25-50% a lo largo de la vida
LKB1/ STK11	19p13.3	Múltiples	Baja	29-54% a lo largo de la vida
CDH1	16q22.1	Múltiples	Baja	20-40% a lo largo de la vida
ATM	11q22-23	Múltiples	Moderada	RR 2,2
TGFβ1	19q13.1	c.-509C>T (promotor) c.29T>C (p.L10P)	Alta (TT) Alta (CC)	OR 1,25 OR 1,21
CASP8	2q33-34	c.1192G>C (p.D302H)	Alta (GC) Moderada (CC)	OR 0,83 OR 0,58
CASP10	2q33-34	c.G1228A (p.V410I)	Alta	OR 0,62
CASP8/ CASP10	2q33-34	V410I+D302H I410I+H302H	Moderada	OR 0,37
CHEK2	22q12.1	c.1100delC	Moderada	RR 2
PALB2	16p12.2	Múltiples	Moderada	OR 2,3
BRIP1	17q22.2	Múltiples	Moderada	OR 2,0
NBN/ RAD50	8q2.1 5q31	c.657del5 c.687delT	Moderada	OR 3 OR 4,3
ERCC4	16p13.12	Múltiples	Moderada	*
ABRAXAS	4q21.23	Múltiples	Moderada	*
RAD51C	17q25.1	Múltiples	Moderada	Frecuencia 1,3% /CMO)
BARD1	2q34-35	Múltiples	Moderada	

Baja: <1% de la población; Moderada: 1-5%; Alta: >5%. OR: odds ratio; RR: riesgo relativo; CMO: cáncer de mama y ovario; *Los OR calculados para estos genes no son muy fiables: para el gen ABRAXAS es un cálculo de riesgo basado en una mutación identificada en una población concreta (p.R136Q; OR 24,3), mientras que para el gen ERCC4 existen valores muy dispares (OR 1,7-8,64).

Sin embargo, muchos de los genes mencionados anteriormente están implicados en otros síndromes de predisposición al cáncer, mucho menos frecuentes pero también asociados a un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de mama y ovario (Tabla 3).

Tabla 3. Genes de susceptibilidad al cáncer de mama y síndromes asociados (Modificado de Campeau et al., 2008).

Gen	Síndrome asociado al gen	Riesgo de cáncer de mama, riesgo relativo (RR) o odds ratio (OR) (95% IC)	Frecuencia de mutaciones en población no fundadora
BRCA1	Cáncer de mama y ovario hereditario	Riesgo acumulado a los 70 años: 65% (51-75%) (Antoniou et al., 2003)	≈1/400 (≈5% de pacientes de cáncer de mama no seleccionados)
BRCA2		Riesgo acumulado a los 70 años: 55% (33-54%) (Antoniou et al., 2003)	
TP53	Síndrome de Li-Fraumeni	RR 18,1 (8,6-33,2) entre 20 y 44 años (Garber et al., 1991)	<1/10.000 (<0,25% de los casos de cáncer de mama no seleccionados) (Borresen et al., 1992; Sidransky et al., 1992)
PTEN	Síndrome de Cowden	Riesgo acumulado a lo largo de la vida: 25-50% (Longy et al., 1996; Starink et al., 1986)	<1/10.000
STK11	Síndrome de Peutz-Jeghers	Riesgo acumulado a los 70 años: 30-50% (Giardiello et al., 2000; Hearle et al., 2006; Lim et al., 2004)	<1/10.000
CDH1	Cáncer gástrico difuso hereditario	RR 6,6 (5,9-7,3) (Pharoah et al., 2001)	<1/10.000
ATM	Ataxia-Telangiectasia	RR 2,37 (1,51-3,78) (Renwick et al., 2006)	1/33-333 (Fitz Gerald et al., 1997; Swift et al., 1986; Thompson et al., 2005)
CHEK2		OR 2,6 (1,3-5,4) para la mutación 1100delC (Meijers-Hejboer et al., 2002)	1/100-200 en determinadas poblaciones (Mehenri et al., 2006; Vahteristo et al., 2002; Weischer et al., 2007)
NBN	Síndrome de rotura Nijmegen	OR 3,1 (1,4-7,0) en población rusa; OR9,7 (1,3-73,2) en población bielorusa (Steffen et al., 2006) para la mutación 657del5.	Probablemente muy poco frecuente en muchas otras poblaciones.
RAD50		OR 4,3 (1,5-12,5) para la mutación 687delT en población finlandesa (Heikkinen et al., 2006)	No observado en otra población
BRIP1	Anemia de Fanconi	RR 2,0 (1,2-3,2) (Seal et al., 2006)	<1/10.000
PALB2		RR 2,3 (1,4-3,9) (Rahman et al., 2007)	<1/10.000
RAD51C		-	1,3% de familias con cáncer de mama y ovario

Debido a que las proteínas codificadas por los genes BRCA1 y BRCA2 están implicados en la reparación del ADN y mutaciones heterocigotas en genes reparadores del ADN como ATM y TP53 están implicados en el incremento del riesgo a padecer cáncer de mama, la búsqueda de nuevos genes de susceptibilidad en familias de alto riesgo se enfocó en los genes implicados en la reparación del ADN, tales como CHEK2, RAD50, BRIP1 o PALB2.

La relación entre los genes reparadores del ADN y la susceptibilidad al cáncer de mama se hizo mas interesante tras el descubrimiento de que mutaciones homocigotas en BRCA2 son responsables de uno de los subtipos de la anemia de Fanconi, denominado FANCD1 (Howlett, 2007; Wang, 2007).

De la misma forma, mutaciones asociadas a un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama en portadores monoalélicos, son responsables de subtipos poco frecuentes de anemia de Fanconi u otros desórdenes autosómicos recesivos muy poco frecuentes en caso de portadores bialélicos (Figura 4).

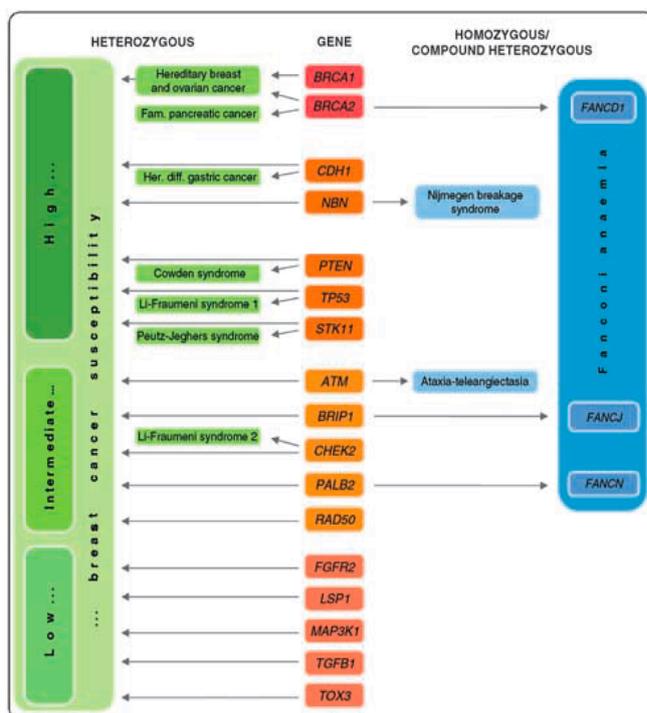


Figura 4. Correlación genotipo-fenotipo de individuos portadores de mutaciones monoalélicas y bialélicas en los genes de predisposición al cáncer de mama y portadores de SNPs de bajo riesgo. Junto a BRCA1 y BRCA2 encontramos tres grupos de genes: aquellos causantes de síndromes de predisposición al cáncer, aquellos genes de susceptibilidad de penetrancia intermedia y aquellos SNPs que modifican la susceptibilidad al cáncer de mama, con una baja penetrancia (Modificado de Ripperger et al., 2009).

4. BRCA1

Después de que los principales genes de susceptibilidad al cáncer de mama, BRCA1 y BRCA2, fueran clonados en 1994 y 1995 respectivamente, se han destinado numerosos esfuerzos a la identificación de otros genes de susceptibilidad en familias de alto riesgo, sin embargo el esperado BRCA3 no ha sido encontrado (Nathanson et al., 2001; Narod et al., 2004; Walsh et al., 2007).

Actualmente está ampliamente aceptado que no existen otros genes de alta penetrancia como BRCA1 y BRCA2, que puedan explicar el gran número de casos de cáncer de mama familiar existente. Se considera por tanto el cáncer de mama como una enfermedad compleja, determinada por la combinación de múltiples variantes genéticas (Easton et al., 2007), en lo que se conoce como modelo poligénico. Dos grupos de factores de susceptibilidad pueden establecerse claramente al enfrentar los valores de frecuencia alélica y el riesgo asociado: mutaciones poco frecuentes en genes de penetrancia intermedia implicados en la reparación del ADN y SNPs de baja penetrancia.

Diversos estudios apoyan la hipótesis de que el riesgo de cáncer de mama en portadores de mutación en BRCA1 y BRCA2 es modificado por éstos factores genéticos (Antoniou et al., 2007) y teniendo en cuenta además, que las mujeres pertenecientes a familias con cáncer de mama familiar y no portadoras de la mutación responsable en BRCA1 o BRCA2 se enfrentan a un riesgo incrementado de padecer cáncer de mama (Smith et al., 2007), es fácil asociar que ese riesgo incrementado pueda ser debido a variantes genéticas hereditarias muy poco frecuentes en genes de penetrancia intermedia o a SNPs muy frecuentes de baja penetrancia, que actúen como modificadores del riesgo tanto en individuos portadores como no portadores de mutación en BRCA1 o BRCA2.

La identificación de nuevos polimorfismos y de su riesgo relativo en estudios de grandes poblaciones es esencial para entender el efecto combinado de estos SNP y poder establecer modelos de predicción de riesgo confiables.

5. GENES DE ALTA PENETRANCIA

El síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario causado por mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 es el desorden autosómico dominante más frecuente asociado con un alto riesgo de padecer cáncer de mama y ovario (Turnbull et al., 2008). Además, existen otros muchos síndromes de predisposición al cáncer, mucho menos frecuentes, y también asociados con un incremento en el riesgo de padecer cáncer mama (Revisado en Ripperger et al., 2009) (Tabla 4).

Tabla 4. Genes de alta penetrancia y síndromes de cáncer hereditarios asociados al cáncer de mama (Modificado de Ripperger et al., 2009).

Gen	Localización	Síndrome	Prevalencia en población	Riesgo de cáncer de mama
BRCA1	17q21.31	Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario	1/1000	63-85% riesgo a los 70 años
BRCA2	13q12.3	Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario	1/750	45-84% riesgo a los 70 años
TP53	17p13.1	Li-Fraumeni	1-9/100000	50-60% riesgo a los 45 años
PTEN	10q23.3	Cowden	1-9/1000000	30-50% riesgo a los 70 años
CDH1	16q22.1	Cáncer gástrico difuso	-	52% riesgo a los 75 años (c.2398delC)
STK11	19p13.3	Peutz-Jeghers	1-9/100000	45% riesgo a los 70 años

- **BRCA1/BRCA2**

El gen BRCA1 (“breast cancer 1”) fue descubierto por Hall y colaboradores en 1990 mediante análisis de ligamiento. Tres años más tarde, Miki y colaboradores lo clonaron y caracterizaron (Hall et al., 1990; Miki et al., 1994).

El gen BRCA1 se localiza en el cromosoma 17q21.31 y consta de 24 exones, de los cuales el primero no es codificante. Codifica una proteína (BRCA1) de 1863

aminoácidos y un peso molecular de 207,72 kDa, que consta de distintos dominios funcionales que le permiten interactuar con otras proteínas y con el ADN (Figura 5).

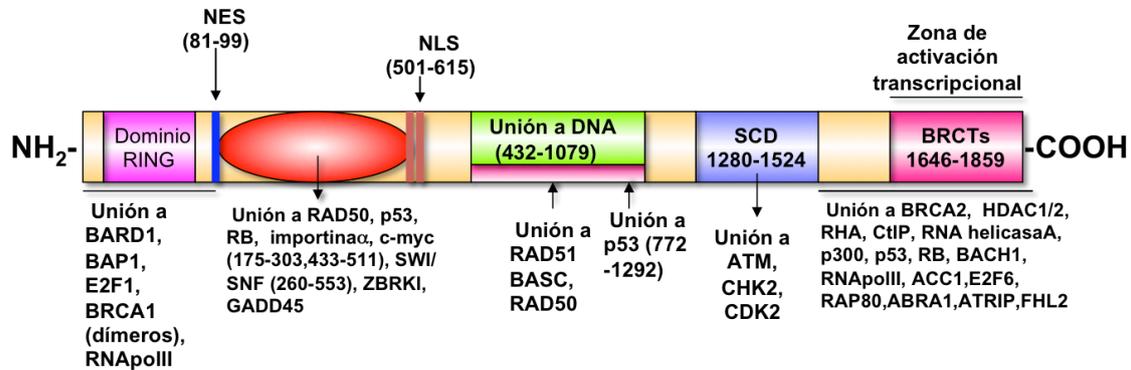


Figura 5. Esquema de los dominios estructurales de BRCA1 y proteínas que se unen a los mismos. NLS: señal de localización nuclear; NES: señal de exportación nuclear.

La búsqueda de un segundo gen que explicara la ausencia de mutaciones en BRCA1 en familias de alto riesgo y con casos de cáncer de mama en varones, permitió clonar y caracterizar el gen BRCA2 (“*breast cancer 2*”) en 1995 (Wooster et al., 1995).

El gen BRCA2 se localiza en el brazo largo del cromosoma 13, en concreto en la posición 13q12.3. Consta de 27 exones de los cuales el primero no es codificante. Codifica una proteína de 3418 aminoácidos y 384,22 kDa de peso molecular con diferentes dominios funcionales (Figura 6).

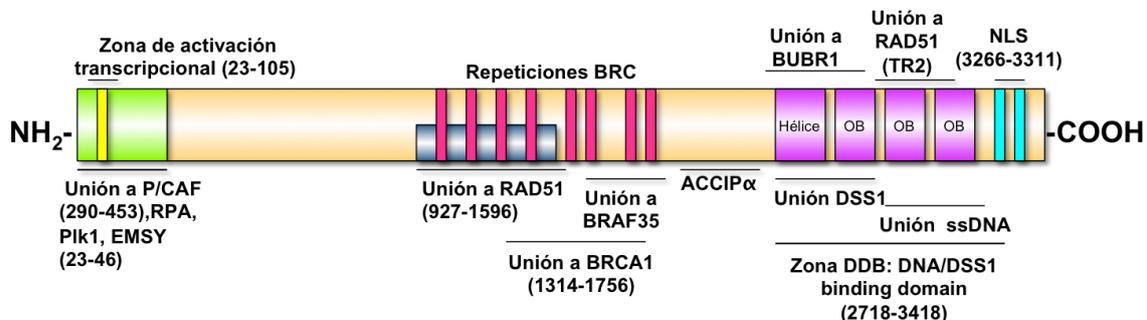


Figura 6. Esquema de los dominios funcionales de BRCA2 y proteínas que se unen a los mismos.

Ambos genes se expresan de forma ubicua en humanos, con altos niveles en testículos, ovario y timo. En contraste con la mayoría de los genes supresores tumorales conocidos, están relativamente poco conservados entre especies, a excepción de unos pocos dominios (Revisado en Oldeburg et al., 2007).

Los genes BRCA actúan como sensores del daño al ADN e intervienen en su reparación. Su inactivación conduce a la acumulación de defectos genéticos y, finalmente, a la inestabilidad genética. (Kinzler et al., 1997; Breivik, 2005).

BRCA1 recluta proteínas al foco de daño al ADN, interviene en la reparación del ADN, en la ubiquitinación de proteínas, la regulación transcripcional, la remodelación de la cromatina y el control del ciclo celular. BRCA1 es importante en el proceso de reparación del ADN dañado por su implicación en la recombinación homóloga y en el sistema de reparación de nucleótidos por escisión (NER) (Campeau et al., 2008).

BRCA2 está implicado en la reparación de las roturas de doble hebra en el ADN a través de la recombinación homóloga (Scully et al., 2000; Venkitaraman, 2002; Venkitaraman, 2004; Narod et al., 2004). También aparece implicado en la recombinación homóloga durante la meiosis (Thorslund et al., 2007a) y en la regulación de las recombinasas RAD51 y DCM1 para la realización de esta función (Thorslund et al., 2007b).

Mutaciones germinales de los genes BRCA1 y BRCA2 son responsables del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario y confieren un elevado riesgo a padecer cáncer de mama y ovario a lo largo de la vida, junto a un pequeño riesgo a padecer otros tipos de cáncer (Thompson et al., 2004; Antoniou et al., 2003). Se ha demostrado que mutaciones en estos genes incrementan entre 10 y 20 veces el riesgo de padecer cáncer de mama (Lalloo et al., 2012).

La prevalencia de mutaciones heterocigotas de alto riesgo en población caucásica se ha estimado en 1 en 1000 para BRCA1, lo que representa aproximadamente el 7-10 % del cáncer de mama familiar total, y 1 en 750 para BRCA2, que representa aproximadamente el 10 % del cáncer de mama familiar total (Antoniou et al 2002; Lalloo et al., 2012).

El riesgo acumulado de padecer cáncer de mama a los 70 años para portadores de mutaciones en BRCA1 y BRCA2 es de hasta 85 % y 84 % respectivamente, y de padecer cáncer de ovario 63 % y 27 % respectivamente (Ford et al., 1998; Antoniou et al., 2003; Chen et al., 2006; Evans et al., 2008). Sin embargo, un meta-análisis basado en 22 estudios poblacionales y hospitalarios muestra que la media del riesgo acumulado para portadores de mutaciones en BRCA1 a la edad de 70 años es de 65 % para cáncer de mama y 39 % para cáncer de ovario; mientras que las correspondientes estimaciones para BRCA2 son de 45 % y 11 % (Oldenburg et al., 2007). En mujeres con cáncer de mama y portadoras de mutación en BRCA1, el riesgo de padecer cáncer de mama contralateral a los 70 años se ve incrementado hasta el 64 % (Antoniou et al., 2003). No obstante, estos valores de riesgo son muy variables en las diferentes poblaciones.

Mutaciones patogénicas en el gen BRCA2 incrementan el riesgo de padecer otros tipos de cáncer. El riesgo de padecer colangiocarcinoma, melanoma o cáncer pancreático está incrementado hasta 4,1 veces y el riesgo de padecer cáncer de próstata está incrementado hasta 6,3 veces sobre la población no portadora de mutaciones en BRCA2 (Moran et al., 2011; van Asperen et al., 2005).

Los varones portadores de mutación en BRCA2 tienen un riesgo incrementado de padecer cáncer de próstata a lo largo de su vida de hasta 20 %, junto con el riesgo incrementado de padecer cáncer de mama. El incremento del riesgo de padecer cáncer de mama asociado a mutaciones en BRCA2 es de hasta 80-100 veces mayor, lo que supone un 10 % del total de casos de cáncer de mama en varón (Basham et al., 2002) e incrementa un 8-10 % el riesgo a desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida del varón portador (Evans et al., 2010).

Los tumores de mama en mujeres portadoras de mutación en BRCA1 a menudo exhiben características clinicopatológicas diferentes a los tumores de mama causados por mutaciones en BRCA2 o esporádicos. Las mutaciones en BRCA1 se asocian con más frecuencia a tumores mamarios de tipo *Basal Like*, sin sobreexpresión de Her2 ni receptores esteroideos (estrógenos y progesterona), lo que conlleva que el pronóstico de estos sea peor que el de los tumores que sobreexpresan Her2 o los receptores esteroideos. Los tumores mamarios asociados a mutaciones en BRCA2 tienen un pronóstico similar a los tumores de tipo esporádico, aunque expresan con más frecuencia receptores de estrógenos (RE) (Lakhani et al., 2005; Lalloo et al., 2012).

- **TP53**

El gen supresor tumoral TP53 está localizado en el cromosoma 17p13.1 y codifica una proteína (p53) (Figura 7) implicada en múltiples rutas celulares que controlan la proliferación celular, el ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN. El gen TP53 es uno de los más extensamente estudiados, desde que su asociación con la tumorigénesis fue demostrada en 1979 (Revisado en Oldenburg et al., 2007).

La expresión del gen TP53 se activa en respuesta a diferentes señales de estrés, incluyendo el daño al ADN. Esta proteína puede inducir tanto, muerte celular como parada del ciclo celular, de forma que, la pérdida de función de TP53 suprime un mecanismo de protección frente a la acumulación de alteraciones genéticas (Pluquet et al., 2001; Aylon et al., 2007).



Figura 7. Estructura de la proteína p53. El gen TP53 está constituido por 11 exones, que codifican una proteína (p53) de 393 aminoácidos.

Las mutaciones germinales del gen TP53 son muy raras; no hay más de 400 familias en todo el mundo portadoras de mutaciones germinales en el gen TP53 y padecen el síndrome de Li-Fraumeni (Bradbury et al., 2007; Garber et al., 1991), un desorden autosómico dominante que predispone al cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos y osteosarcoma, tumores cerebrales, cáncer de las glándulas adrenales, tumor de Wilms y otros tumores menos frecuentes (Strong et al., 1992; Revisado en Oldenburg et al., 2007; Campeau et al., 2008). Las mutaciones en el gen TP53 aparecen aproximadamente en el 70 % de las familias que cumplen los criterios clásicos del síndrome de Li-Fraumeni, pero son poco frecuentes en familias con síndrome de cáncer de mama y ovario, y su prevalencia es muy baja (<0,5 %) entre individuos afectados por cáncer de mama esporádico, independientemente de su edad (Borresen et al., 1992; Varley et al., 1997; Rapakko et al., 2001; de Jong et al., 2002; Evans et al., 2002).

Entre los individuos portadores de mutaciones germinales en el gen TP53, la probabilidad de desarrollar cáncer es de aproximadamente el 50 % a la edad de 30 años y de más del 90 % a los 70 años de edad (Malkin et al., 1990). Uno de los cánceres más frecuentemente desarrollados en las familias Li-Fraumeni es el cáncer de mama, con una penetrancia que oscila entre 28-56 % a los 45 años (Evans et al., 2002; Chompret et al., 2000; Garber et al., 1991).

TP53 es el gen más frecuentemente mutado en los cánceres humanos. Aproximadamente el 30% de los tumores mamarios presentan mutación somática en el gen TP53 y suelen asociarse a tumores mamarios más agresivos y de peor pronóstico (Sorlie et al., 2001; Walerych et al., 2012; Dumay and Feugeas et al., 2013).

Las familias con cáncer de mama sin mutación en BRCA1 o BRCA2 pero con mutación en la línea germinal de TP53 presentan una mayor incidencia de tumores de mama tipo Her2+ que aquellas familias sin mutación en TP53. Los pacientes con cáncer de mama Her2+ presentan una probabilidad hasta 7 veces mayor de presentar una mutación somática en p53 que los pacientes sin sobreexpresión de Her2; sin embargo, esta probabilidad disminuye un 5 % cada año en que se incremente la edad de diagnóstico del paciente (Helhem-Bertrandt et al., 2012).

- **PTEN**

El gen PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) (Li et al., 1997) está localizado en el cromosoma 10q23 y codifica una proteína de 403 aminoácidos (Figura 8).

PTEN actúa como un gen supresor tumoral y regulador del crecimiento, principalmente mediante la regulación de la cascada de transducción de señales PI3K (Guenard et al., 2007; Goberdhan et al., 2003). La cascada de señales PI3K regula la supervivencia celular, la movilidad, la transición epitelio-mesenquima, la angiogénesis, el crecimiento y los flujos metabólicos, que tienen gran importancia en los procesos oncogénicos (DeBerardinis et al., 2008).

PTEN también participa en otras funciones como la migración celular y la auto renovación de células madre (Chow et al., 2006). Recientemente se han descrito funciones adicionales para la proteína PTEN, incluyendo el mantenimiento de la

integridad cromosómica (Shen et al., 2007) y la regulación de la fosfolipasa C y D (Alvarez-Breckenridge et al., 2007). La regulación de la actividad de la proteína PTEN, a través de su degradación o entrada al núcleo, está estrechamente ligada a su nivel de ubiquitinación (Trotman et al., 2007; Wang et al., 2007b).

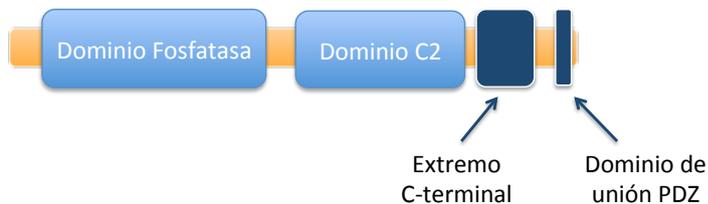


Figura 8. Estructura de la proteína PTEN (403 aminoácidos), constituida por cuatro dominios. Dominio fosfatasa N-terminal, necesario tanto para la función de unión a membrana como para la actividad catalítica de la proteína; Dominio C2, de unión a membrana; extremo C-terminal, desarrolla funciones de regulación de actividad y estabilidad de la molécula; Dominio de unión PDZ, presumiblemente afecta a la localización subcelular de la molécula, que parece tener efectos sobre una serie limitada de funciones celulares (Modificado de Goberdhan et al., 2003).

Las mutaciones germinales del gen PTEN están presentes en aproximadamente el 80 % de las familias con síndrome de Cowden, cuya prevalencia se estima en torno a 1:300.000 individuos (Liaw et al., 1997; Lindor et al., 1998; Mallory, 1995; Schweitzer, 1999). El síndrome de Cowden es un desorden poco común, con un patrón de herencia autosómico dominante, caracterizado por múltiples hamartomas en la piel, mamas, tiroides, tracto gastrointestinal, sistema nervioso central y un alto riesgo de padecer cáncer de mama, útero y de tiroides no medular (Revisado en Oldenburg et al., 2007; Liaw et al., 1997).

Las mujeres portadoras de mutaciones en el gen PTEN presentan un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama a la edad de 70 años de hasta 30-50 % (Revisado en Ripperger et al., 2009). La mayoría de los cánceres de mama relacionados con síndrome de Cowden ocurren en mujeres después de los 30-35 años (Eng, 1998; Starink et al., 1986), mientras que en varones se ha observado cáncer de mama a edades tempranas (Fackenthal et al., 2001). Sin embargo, no se han encontrado mutaciones en el gen PTEN en familias con síndrome de cáncer de mama familiar sin las características típicas del síndrome de Cowden (Chen et al., 1998; Carroll et al., 1999; Guenard et al., 2007).

Una pequeña disminución en los niveles de expresión del gen PTEN pueden incrementar el riesgo a desarrollar cáncer sin necesidad de presentar una mutación inactivante, de igual forma que, la reducción progresiva de los niveles de expresión de PTEN se asocia con la aparición de tumores mamarios mas agresivos y de peor pronóstico. Así, se ha comprobado experimentalmente en ratones que la disminución en un 20 % de la expresión normal del gen PTEN conduce al desarrollo de tumores mamarios sin necesidad de mutaciones adicionales en el gen o pérdida de heterocigosidad de los alelos de PTEN y que los ratones con un nivel de expresión del 50 % desarrollan tumores de mama de tipo *Basal Like* con mayor frecuencia que los ratones con un 80 % de expresión (Saal et al., 2008; Alimonti et al., 2010).

- **STK11**

El gen LKB1/STK11 está localizado en el cromosoma 19p13.3 y da lugar a un transcrito de aproximadamente 1,3 Kb que codifica una serina/treonina quinasa de 434 aminoácidos que actúa como supresor tumoral (Figura 9).



Figura 9. Estructura de la proteína STK11. Contiene dos señales de localización nuclear (NLS; marcadas en verde) y un dominio quinasa que ocupa gran parte de la proteína. Los sitios de fosforilación de la proteína están marcados en rojo y el sitio de prenilación marcado en morado (Tomado de Yoo et al., 2002).

Las mutaciones germinales del gen STK11 causan el síndrome de Peutz-Jeghers, con unas tasas de prevalencia muy controvertidas, que oscilan desde 1:8.900 hasta 1:280.000 individuos (The Johns Hopkins guide for patients and families: Peutz-Jehgers syndrome, 2001; Revisado en Oldenburg et al., 2007). Se trata de un desorden autosómico dominante, caracterizado por el desarrollo de pólipos hamartomosos (pólipos con núcleo muscular) en el tracto gastrointestinal y la aparición de una pigmentación característica en los labios, región perioral, mucosa bucal, dedos y pies. Los pólipos se observan con más frecuencia en el intestino delgado, pero pueden

aparecer en todo el tracto gastrointestinal y otras zonas, como riñones, uréteres, vesícula biliar, bronquios y orificios nasales (Wada et al 1987; Hemminki et al., 1998; Westerman et al 1999; Hearle et al., 2006).

Los pacientes con el síndrome de Peutz-Jehgers presentan un elevado riesgo a desarrollar cáncer de mama, páncreas, ovario, útero, cuello uterino, pulmón y testículos (Giardiello et al., 1987; Spigelman et al., 1989; Boardman et al 1998). La probabilidad de desarrollar un cáncer a los 65 años se estima en un 50 % y la de desarrollar un cáncer de mama en un 29-54 % (Lim et al., 2003; Giardiello et al 2000; Hearle et al., 2006; Lim et al., 2004).

- **CDH1**

El gen CDH1 está localizado en el cromosoma 16q22.1. Codifica una proteína de 882 aminoácidos denominada E-cadherina (Figura 10), perteneciente a la familia de moléculas implicadas en la adhesión célula-célula (Becker et al., 1994) y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la diferenciación celular y la arquitectura normal de los tejidos epiteliales (Revisado en Oldenburg et al., 2007).

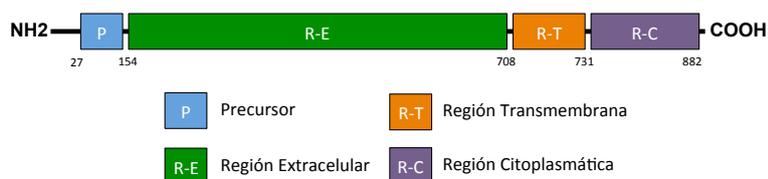


Figura 10. Estructura de la proteína E-Cadherina (882 aminoácidos) y los dominios que la constituyen (Modificado de Brooks-Wilson et al., 2004).

Mutaciones germinales del gen CDH1 se asocian con el síndrome de cáncer gástrico difuso (Kaurah et al., 2007), un desorden que se transmite con un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta. Se estima que los individuos portadores de mutación en el gen CDH1 tienen un riesgo del 20-40 % de desarrollar cáncer a lo largo de su vida y un riesgo del 83 % de padecer un cáncer gástrico difuso a los 80 años (Pharoah et al., 2001; Berx et al., 1996; Chan et al., 2001; Graziano et al., 2003).

Las mutaciones somáticas en el gen CDH1 se encuentran en tumores de mama de tipo lobulillar infiltrante y no en otros subtipos histopatológicos (Becker et al., 1994; Berx et al., 1996; Mastracci et al., 2005; Sarrio et al., 2003; Masciari et al., 2007); sin embargo, la frecuencia de estas mutaciones es muy baja si el individuo no posee historial familiar de cáncer gástrico (Masciari et al., 2007).

Por lo tanto, se ha sugerido que el screening mutacional de CDH1 debe ser realizado en casos de cáncer gástrico difuso en individuos menores de 35 años y familias con múltiples casos de cáncer de mama lobulillar, con historial de cáncer gástrico difuso o tumores gastrointestinales no especificados (Suriano et al., 2005; Keller et al., 1999).

6. GENES DE PENETRANCIA MODERADA

Al igual que las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 son responsables de un incremento en el riesgo a padecer cáncer de mama, se ha discutido acerca de si mutaciones heterocigotas en otros genes reparadores podrían asociarse también con el riesgo a padecer cáncer de mama.

Genes como ATM, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD50 o RAD51C, están efectivamente asociados a un incremento moderado en el riesgo de cáncer de mama (Tabla 2) (Walsh et al., 2007). El incremento del riesgo en individuos portadores de mutaciones heterocigotas en estos genes se incrementa entre 2,0 y 4,3 veces sobre la población no portadora de mutación en función del gen, sin embargo, el conjunto de mutaciones en todos estos genes únicamente representa un 2,3 % del riesgo total de una familia a desarrollar cáncer de mama (Rahman et al, 2007).

Tabla 5. Genes de penetrancia moderada y síndromes de cáncer hereditarios asociados al cáncer de mama (Modificado de Campeau et al., 2008).

Gen	Localización	Síndrome	Prevalencia en pacientes	Riesgo de cáncer de mama
ATM	11q22-23	Ataxia-Telangiectasia	0,5-1 %	RR 2,37
NBN	8q2.1	Síndrome de rotura Nijmegen	Poco frecuente en poblaciones no fundadoras	RR 3,0
PALB2	16p12.2	Anemia de Fanconi	1 %	RR 2,3
BRIP1	17q22.2	Anemia de Fanconi	1 %	RR 2,0
RAD51C	17q25.1	Anemia de Fanconi	1,3 % (CMO)	-
CHEK2	22q12.1	-	1/100-200 (c.1100delC)	OR 2,6 (1,3-5,4)
BARD1	2q34-35	-	Frecuencia moderada <5%	-
ABRAXAS	4q21.23	-	Frecuencia moderada <5%	*
ERCC4	16p13.12	-	Frecuencia moderada <5%	*
TGFB1	19q13.1	-	Mutaciones c.-509C>T y c.29T>C frecuencia >5%	OR 1,2
CASP8	2q33-34	-	Mutación p.D302H frecuencia alta (≈ 5%)	OR 0,58-0,83
RAD50	5q31	-	Mutación c.687delT sólo en población finlandesa.	OR 4,3 (1,5-12,5)

*Los OR calculados para estos genes no son muy fiables: para el gen ABRAXAS, se realizó un cálculo de riesgo basada en una mutación identificada en una población concreta (p.R136Q; OR 24,3), mientras que para el gen ERCC4 existen valores demasiado dispares (OR 1,7-8,64)

CMO: Cáncer de mama y ovario hereditario

- **PALB2**

El gen PALB2 (“*partner and localizer of BRCA2*”), localizado en el cromosoma 16p12.2, codifica una proteína de 130 kDa y 1186 aminoácidos con funciones de supresor tumoral, que interactúa con BRCA2 y está implicada en su localización nuclear y estabilidad, siendo necesaria para las funciones de BRCA2 en la recombinación homóloga y en la reparación de las roturas de doble hebra en el ADN (Xia et al., 2006b).

El gen PALB2 no tiene una estructura clara de dominios funcionales; sin embargo, el alineamiento de secuencias homólogas de PALB2 en diferentes especies revela varias regiones conservadas: una región *coiled-coil* amino terminal y una región de repeticiones de motivos WD-40 carboxilo terminal (Xia et al., 2006b) (Figura 11). La región carboxilo terminal de repeticiones WD-40 se corresponde con el dominio de interacción con el extremo amino terminal de BRCA2, mientras que la región *coiled-coil* amino terminal se corresponde con la región de interacción con BRCA1, la misma región que permite la oligomerización de PALB2 y la formación del foco en la zona de ADN dañado (Zhang et al., 2009; Sy et al., 2009).



Figura 11. Estructura de la proteína PALB2 (1186 aminoácidos) y regiones conservadas que aparecen en el alineamiento de secuencias (Modificado de Sy et al., 2009).

Recientemente se han identificado mutaciones germinales en el gen PALB2 como modificadoras del riesgo a padecer cáncer de mama en familias con cáncer de mama hereditario, indicando que PALB2, igual que BRCA1 y BRCA2, es un supresor tumoral implicado en el riesgo de cáncer de mama hereditario (Tischkowitz et al., 2007; Rahman et al., 2007; Erkkö et al., 2007). Las mutaciones germinales bialélicas de PALB2, son además responsables de generar el subtipo N de la anemia de Fanconi (proteína N o FANCN) (Xia et al., 2007; Reid et al., 2007).

La anemia de Fanconi fue descrita por el doctor suizo Guido Fanconi en 1927 (Fanconi, 1927). Se trata de un desorden genético recesivo, altamente heterogéneo, caracterizado por inestabilidad cromosómica, anomalías durante el desarrollo, insuficiencia progresiva de la médula ósea y una alta incidencia de tumores malignos (Joenje et al., 2001; Taniguchi et al., 2006).

Las células de la anemia de Fanconi se caracterizan por un alto grado de inestabilidad genómica, incluyendo elevados niveles de roturas a nivel cromosómico e intercambios entre cromátidas (Joenje et al., 2001); de hecho, el diagnóstico de la enfermedad se realiza en base al incremento de la rotura cromosómica en presencia de

agentes que provoquen entrecruzamiento de hebras del ADN (ICL, *interstrand crosslinks*) (Levy-Lahad, 2010).

Ensayos de inmunoprecipitación y purificación de proteínas por afinidad encaminados a determinar la existencia de otras proteínas asociadas a PALB2, además de BRCA2 (Xia et al., 2006b), permitieron determinar que la proteína BRCA1 también interacciona con PALB2. Las proteínas BRCA1 y BRCA2 coexisten formando complejos proteicos (Chen et al., 1998; Dong et al., 2003) cuya formación se detiene en ausencia de PALB2, lo que sugiere que PALB2 es un mediador necesario en la interacción de BRCA1 y BRCA2 (Zhang et al., 2009; Sy et al., 2009).

PALB2 colocaliza con BRCA1 y BRCA2 en la región donde se produce el daño al ADN (Xia et al., 2006b). La proteína BRCA1 es necesaria para la focalización de PALB2 y BRCA2. El complejo proteico formado por BRCA1, BRCA2 y PALB2 participa en el proceso de reparación del ADN por recombinación homóloga (Xia et al., 2006b; Moynahan et al., 1999; Moynahan et al., 2001), proceso en el que, la proteína BRCA2 desarrolla un papel esencial facilitando la acción de la recombinasa RAD51 para iniciar el proceso y la correcta interacción entre BRCA1 y PALB2 es necesaria para el correcto funcionamiento de la reparación por recombinación homóloga mediada por BRCA2 (Zhang et al., 2009; Sy et al., 2009).

Desde que en el año 2007 se identificó a PALB2 como un gen implicado en la susceptibilidad al cáncer de mama, incrementando el riesgo de padecer la enfermedad de 2 a 6 veces (Tischkowitz et al., 2007; Rahman et al., 2007; Erkkö et al., 2007; Hollestelle et al., 2010), multitud de estudios en diferentes poblaciones han logrado identificar mutaciones en el gen PALB2 asociadas a un incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama hereditario (Erkkö et al., 2007; Rahman et al., 2007; Tischkowitz et al., 2007; Foulkes et al., 2007; Cao et al., 2009; García et al., 2009; Sluiter et al., 2009; Papi et al., 2010; Dansonka-Mieszkowska et al., 2010; Tischkowitz et al., 2010; Hellebrand et al., 2011; Casadei et al., 2011).

Las mutaciones en el gen PALB2 se encuentran distribuidas por todo el gen, lo que unido a la ausencia de mutaciones recurrentes para la mayoría de las poblaciones (excepto en población finlandesa: Erkkö et al., 2007) y la ausencia de grandes reordenamientos genéticos que contribuyan a modificar la susceptibilidad al cáncer de mama (Ameziane et al., 2009; Pylkas et al., 2008), hace necesaria la realización de un análisis completo del gen en múltiples poblaciones que aporte información del espectro

mutacional de PALB2 y de su contribución real al cáncer de mama hereditario (Hellebrand et al., 2011).

- **BRIP1**

El gen supresor tumoral BRIP1 (“*BRCA1-interacting protein 1*”) está localizado en la región 17q22.2, pertenece a la familia de las DEAH helicasa y codifica una proteína (helicasa) de 1249 aminoácidos en cuya región C-terminal presenta un dominio BRCT (*BRCA C-terminal domain*) que le permite unirse a BRCA1 (Cantor et al., 2001; Cantor et al., 2004) (Figura 12). Se extiende a lo largo de 180 Kb de ADN genómico y se localiza próximo a BRCA1 (región 17q21) (Levitus et al., 2006; Cantor et al., 2001).

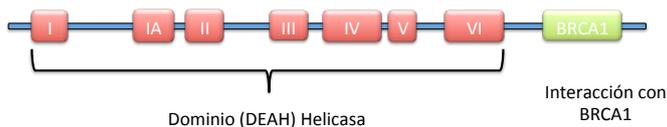


Figura 12. Estructura de la proteína BRIP1. Se muestran el dominio helicasa con los siete motivos helicasa que contiene y el dominio de interacción con BRCA1 (Modificado de Rutter et al., 2003).

La proteína BRIP1 está implicada en los procesos de reparación del ADN y control del ciclo celular dependientes de BRCA1 (Cantor et al., 2001). La interacción de ambas proteínas se produce a través del dominio BRCT de la proteína BRCA1 y es necesaria para el establecimiento del punto de control en fase G2 del ciclo celular durante el proceso de respuesta al daño en el ADN (Yu et al., 2003), en el cual BRIP1 contribuye a las funciones de reparación de roturas de doble hebra asociadas a BRCA1 y a la reparación por recombinación homóloga (Cantor et al., 2001; Shiozaki et al., 2004; Levitus et al., 2006). Se ha demostrado que el dominio BRCT de BRCA1 media la interacción con la proteína BRIP1 a través de la fosforilación de la serina en la posición 990 (S990), localizada en un motivo C-terminal conocido como pSXXF, presente en diversas proteínas como ABRAXAS y CTIP (Yu et al., 2004).

BRIP1 se expresa de forma ubicua en todas las células y colocaliza con BRCA1 en las zonas de ADN dañado. Se cree que BRIP1 desenrolla la molécula de ADN en la proximidad de la región dañada, facilitando el acceso de BRCA1. Se ha sugerido

también que la proteína BRIP1 es necesaria para la llegada a tiempo de la proteína BRCA1 al foco de ADN dañado para el desarrollo correcto del proceso de reparación de roturas de doble hebra (Peng et al., 2006).

Al igual que otros genes implicados en la ruta de BRCA1/BRCA2 en la reparación del ADN dañado, tales como CHEK2 y PABL2, BRIP1 es considerado un gen de susceptibilidad al cáncer de mama, de penetrancia moderada (Walsh et al., 2007). La primera evidencia del papel de BRIP1 como gen de susceptibilidad al cáncer de mama llegó al observarse que las mutaciones patogénicas en BRIP1 están presentes en aproximadamente el 1 % de las familias con cáncer de mama hereditarios de desarrollo temprano sin mutación en BRCA1/2 (Seal et al., 2006); sin embargo, estudios posteriores sugieren que la contribución de BRIP1 a la susceptibilidad al cáncer de mama debe ser más limitada que la inicialmente indicada (Guénard et al., 2008; Cao et al., 2009; Nikkila et al., 2009).

Las mutaciones bialélicas en el gen BRIP1 son responsables de generar el subtipo J de la anemia de Fanconi (proteína J o FANCF) (Levitus et al., 2005; Litman et al., 2005; Godthelp et al., 2005; Levran et al., 2005; Wang et al., 2007), mientras que las mutaciones en heterocigosidad incrementan dos veces el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Levran et al., 2005; Walsh et al., 2007; Seal et al., 2006; Litman et al., 2005; Cantor et al., 2006). La historia familiar es importante en la susceptibilidad del gen BRIP1 al cáncer de mama, ya que en aquellas familias con una fuerte historia familiar, el riesgo individual debe ser mayor al descrito previamente (Byrnes et al., 2008).

Al igual que en el caso del gen PTEN, se ha observado que pequeños cambios en los niveles de expresión del gen BRIP1 pueden incrementar el riesgo a desarrollar cáncer sin necesidad de que la responsable sea una segunda mutación somática inactivante. La mutación c.2992_2995delAAGA genera un codón de stop después del dominio helicasa y está asociada con una disminución en la expresión de la proteína BRIP1 en pacientes con cáncer de mama (De Nicolo et al., 2008). La mutación p.P47A está asociada con una reducción de hasta el 50 % de la expresión de la proteína BRIP1, esta relacionada con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama (Cantor et al., 2001). Así pues, tanto la reducción de la expresión proteica como la existencia de mutaciones patogénicas inactivantes, son responsables de los casos de incremento del riesgo de cáncer de mama asociados a BRIP1 (Cantor et al., 2011).

Estudios previos identificaron los polimorfismos p.Pro919Ser, c.64G>A y c.47G>A con la susceptibilidad al cáncer de mama (Seal et al. 2006; Sigurdson et al., 2004; Rutter et al., 2003; Frank et al., 2007; García-Closas et al., 2006); sin embargo, estos resultados no han sido validados (Huo et al., 2009; Vahteristo et al., 2006; Song et al., 2007; Frank et al., 2007; Pharoah et al., 2007). Un reciente meta-análisis ha analizado la asociación de estos tres polimorfismos del gen BRIP1 con el incremento del riesgo de cáncer de mama concluyendo que, los polimorfismos p.Pro919Ser y c.64G>A no están implicados en la modificación de la susceptibilidad al cáncer de mama, mientras que el polimorfismo c.47C>G incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama 1,4 veces sobre la población no portadora (Pabalan et al., 2013).

- **RAD51C**

El gen RAD51C (RAD51 homólogo C) (Dosanjh et al., 1998), localizado en el cromosoma 17q25.1, pertenece a la familia de proteínas RAD51; consta de 9 exones y codifica una proteína de 376 aminoácidos.

La proteína RAD51C consta de un dominio de unión a nucleótidos (*Walker motif*), constituido por dos secuencias separadas, A y B, altamente conservadas en las proteínas de la familia RAD51. Mutaciones de cambio de aminoácido en cualquiera de los aminoácidos de la secuencia A (denominada *P-loop*) resultan en una proteína no funcional (French et al., 2003).

El extremo amino terminal de la proteína está caracterizado por la existencia de dos potenciales codones de inicio, separados entre sí por 27 pares de bases, que codifican dos proteínas diferentes conocidas como *full-length RAD51C* y *N-truncated RAD51C*, aunque no se han descrito diferencias referentes a la función de ambas proteínas (French et al., 2003). Además, en la región C-terminal localizamos una pequeña secuencia de residuos que actúa como señal de localización nuclear (NLS) (French et al., 2003) (Figura 13).

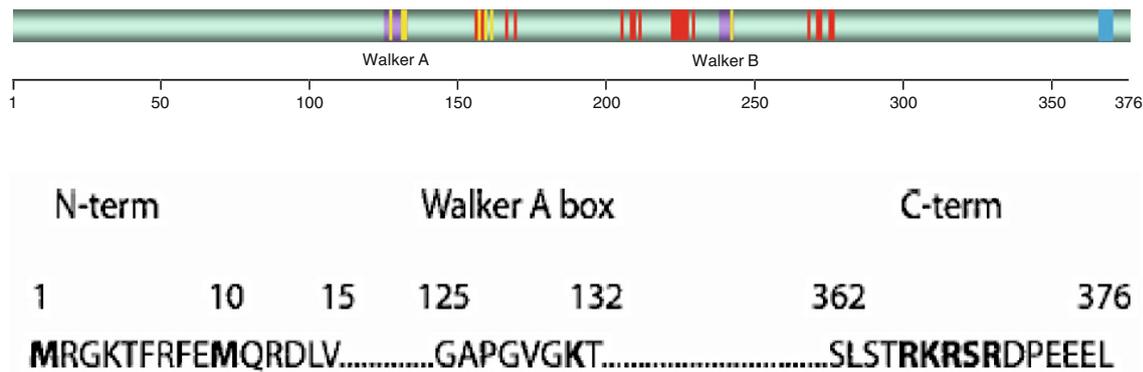


Figura 13. Dominios funcionales en RAD51C. Figura superior: representación esquemática de la proteína RAD51C, con señal de localización nuclear en extremo carboxilo terminal (azul). Figura inferior: en el extremo N-terminal vemos los dos aminoácidos metionina (M) que actúan como dos codones de inicio independientes y en el extremo C-terminal tenemos la señal de localización nuclear (en negrita). En el centro de la secuencia se localiza el dominio de unión a aminoácidos y podemos ver la secuencia A de este *Walker motif*.

RAD51C se localiza en los sitios de ADN dañado antes e independientemente de RAD51, lo que apoya la idea de que RAD51C está implicado en la fase temprana de la recombinación homóloga y es responsable del desplazamiento de RAD51 al foco de ADN dañado (Badie et al., 2009). Además, se ha comprobado que RAD51C es responsable de la fosforilación de CHEK2 por ATM, permitiendo la activación de los puntos de control del ciclo celular. Una activación defectuosa de CHEK2 origina una progresión de las células con ADN dañado a la fase G2/M del ciclo celular (Badie et al., 2009).

De la misma forma que en los genes BRCA2, PALB2 y BRIP1, mutaciones germinales bialélicas en el gen RAD51C están implicadas en el desarrollo de la anemia de Fanconi. Recientemente se ha identificado una mutación germinal bialélica en RAD51C, p.R258H, que genera un fenotipo con características de anemia de Fanconi (Vaz et al., 2010). El gen RAD51C se considera por tanto, el decimocuarto de los genes implicados en la anemia de Fanconi y responsable del fenotipo O (proteína O o FANCO) (Vaz et al., 2010; Kee et al., 2010).

Debido a que varios de los genes implicados en la anemia de Fanconi están también implicados en la susceptibilidad al cáncer de mama (BRCA2: Wooster et al., 1995, PALB2: Rahman et al., 2007 y BRIP1: Seal et al., 2006), se ha sugerido que RAD51C podría estar implicado igualmente en la susceptibilidad al cáncer de mama, habiéndose identificado mutaciones patogénicas que segregan con la enfermedad en el

1,3 % de los pacientes pertenecientes a familias con al menos un caso de cáncer de mama y un caso de cáncer de ovario no portadoras de mutación en BRCA1/2. Sin embargo, no se han encontrado mutaciones en familias en las que únicamente se desarrollase cáncer de mama (Meindl et al., 2010). No obstante esta incidencia no ha sido confirmada en otros estudios (Zheng et al., 2010; Akbari et al., 2010; Wong et al., 2011; Thompson et al., 2011; Romero et al., 2011; Vuorela et al., 2011; Clague et al., 2011).

- **CHEK2**

El gen CHEK2 está localizado en el cromosoma 22q12.1; sin embargo, en el genoma se han encontrado numerosos pseudogenes con secuencias homólogas a los exones 10-14 del gen. CHEK2 codifica una serina/treonina quinasa muy conservada entre especies, implicada en el control del ciclo celular, que juega un papel importante en la reparación del ADN y es activada en respuesta a las roturas de doble hebra en el ADN a través de fosforilación mediante ATM (Matsuoka et al., 1998; Revisado en Oldenburg et al., 2007) (Figura 14). La activación de CHEK2 desencadena la fosforilación de otras proteínas claves en el control del ciclo celular, como BRCA1 y p53, lo que posiblemente influya en la función de éstas como reparadores del ADN (Lee et al., 2000; Schneider et al., 2004).



Figura 14. Estructura de la proteína CHEK2 (543 aminoácidos) y los tres dominios que la constituyen. Dominio SQ/TQ, ubicado en la región N-terminal con 7 series Ser-Glu o Thr-Glu, que actúan como sitios de fosforilación para las quinasas ATM/ATR; Dominio FHA, implicado en la interacción con factores de transcripción; Dominio quinasa, dominio funcional de la proteína que incluye el *loop* de activación, región estructuralmente muy conservada en los dominios quinasa, que se fosforila para permitir la activación completa de la proteína. (Modificado de Bartek et al., 2001)

Su papel en la susceptibilidad al cáncer de mama fue sugerido tras la identificación de la mutación c.1100delC, que elimina la actividad quinasa de la proteína, en un individuo con síndrome de Li-Fraumeni (LFS) sin mutación en TP53 (Bell et al., 1999). Existe la posibilidad de que las mutaciones germinales en el gen

CHEK2 contribuyan a los casos de cáncer de mama dentro de las familias con LFS mas que al desarrollo del propio LFS (Sodha et al., 2002). No se ha establecido una relación clara entre CHEK2 y el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Bell et al., 2007).

La frecuencia del genotipo heterocigoto de la mutación c.1100delC ha sido estimada, en población control, en torno al 1 %. En pacientes con cáncer de mama se estima que la prevalencia de esta mutación se eleva tres veces más, aproximadamente entre el 1,5% y 3%, mientras que en pacientes con cáncer de mama familiar, sin mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2, la prevalencia de la mutación c.1100delC en heterocigosis alcanzó porcentajes de entre 4,9 % y 11,4 %, en función del número de casos de cáncer de mama existentes en las familias. El incremento del riesgo en pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 es de aproximadamente 2 veces, situándose en 4,8 veces en las familias con mayor número de casos afectados, lo que conduce a un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama de hasta un 37 % en mujeres portadoras de la mutación c.1100delC en heterocigosis (Meijers-Heijboer et al., 2002; Vahteristo et al., 2002; Oldenburg et al., 2003; Meijers-Heijboer et al., 2003; The CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium, 2004; Nevanlinna et al., 2006; Weischer et al., 2007; Weischer et al., 2008).

Los pacientes portadores de la mutación c.1100delC desarrollan cáncer de mama a edades mas tempranas y tienen un riesgo 8 veces superior de desarrollar cáncer de mama contralateral, con un peor pronóstico tanto de tiempo libre de enfermedad como de supervivencia global (Oldenburg et al., 2003; de Bock et al., 2004; Johnson et al., 2005; Schmidt et al., 2007). Sin embargo, múltiples estudios coinciden en considerar que no existe ninguna asociación entre el riesgo a padecer cáncer de mama y la incidencia de la mutación c.1100delC, debido a que no se detecta en pacientes con cáncer de mama esporádico (Jekimovs et al., 2005; Scharrer et al., 2010) o en determinadas poblaciones, como la española (Osorio et al., 2004; Bellosillo et al., 2005).

- **BARD1**

El gen BARD1 está localizado en el cromosoma 2q34-35 y codifica una proteína de 777 aminoácidos que comparte características estructurales y funcionales con BRCA1 (Wu et al., 1996). BARD1, al igual que BRCA1, presenta un dominio RING amino terminal (residuos 46-90) y dos dominios BRCT en el extremo carboxilo terminal (residuos 616-653 y 743-777) (Irminger-Finger et al., 1999). La homología en la secuencia de aminoácidos sugiere que ambas proteínas derivan de un ancestro común que contiene dominio RING y dominio BRCT (Figura 15). El gen BARD1 posee tres repeticiones de anquirina (ANK) altamente conservadas (Ayi et al., 1998; Irminger-Finger et al., 1998; Gautier et al., 2000) implicadas en la interacción proteína-proteína y localizadas en proteínas implicadas en procesos de regulación transcripcional (Fox et al., 2008; Sedgwick et al., 1999).

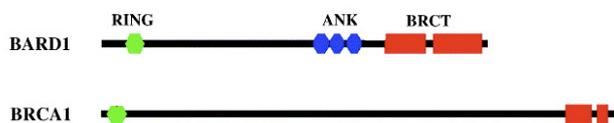


Figura 15. Motivos estructurales de la proteína BRCA1 y BARD1 (Modificado de Irminger-Finger et al., 2002).

La proteína BARD1 fue identificada a través de su interacción con el dominio RING de la proteína BRCA1; en un principio se propuso como uno de los genes de alta penetrancia implicados en el desarrollo del cáncer de mama al encontrarse mutada en casos de cáncer de mama familiar sin mutación en BRCA1/2 (Wu et al., 1996; Ghimenti et al., 2002; Ishitobi et al., 2003) y también en casos de cáncer de mama esporádico (Ishitobi et al., 2003; Thai et al., 1998).

Estudios *in vitro* empleando los residuos 1-109 de BRCA1 y 26-119 de BARD1 (total o parte del dominio RING de ambas proteínas) demostraron que las proteínas BRCA1 y BARD1 dimerizan, frecuentemente formando heterodímeros, más resistentes a la proteólisis, aunque también pueden formar homodímeros (Meza et al., 1999). Ésta unión parece ser esencial para estabilizar ambas proteínas y para las funciones como

supresor tumoral de BRCA1 (Wu et al., 1996; Meza et al., 1999; Baer et al., 2002; Simons et al., 2006).

BARD1 es una proteína nuclear con una distribución en tejidos similar a BRCA1; ambas proteínas tienen niveles de expresión altos en testículos, bazo y células con actividad proliferativa, así como en las células apoptóticas (Miki et al., 1994; Marquis et al., 1995; Ayi et al., 1998; Irminger-Finger et al., 1998). La expresión de BRCA1 y BARD1 es esencial para la supervivencia de la célula. Bajos niveles de BRCA1 generan una acumulación de BARD1 en el citoplasma iniciando la apoptosis (Irminger-Finger et al., 2002; Jefford et al., 2004; Rodriguez et al., 2004).

Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro*, que la muerte celular va acompañada de niveles incrementados de BARD1, tanto a nivel de ARNm como de proteína, mientras que las células con expresión disminuida de BARD1 no responden al proceso apoptótico. BARD1 está implicada en la respuesta a la apoptosis por estrés genotóxico, dependiente de p53, que implica unión y estabilización de la proteína p53 y, sin embargo, es independiente de BRCA1, lo cual es muy importantes en aquellos tejidos donde no hay expresión de BRCA1 o donde BARD1 se acumula más rápidamente que BRCA1 (Revisado en Irminger-Finger et al., 2001; Jefford et al., 2004).

Las células con expresión disminuida de BARD1 muestran una fase S muy prolongada, indicando que BARD1 está implicado en el proceso de proliferación celular. Estas células desarrollan inestabilidad genómica, pérdida de inhibición de crecimiento por contacto y pérdida de propiedades morfogenéticas (Irminger-Finger et al., 1998), similar a la pérdida de función en los supresores tumorales.

A través del análisis genético del gen BARD1 se han localizado mutaciones en tumores esporádicos y hereditarios (Thai et al., 1998); sin embargo, no se ha demostrado todavía si estas mutaciones bloquean la actividad de supresor tumoral de BRCA1 o representa una pérdida de función de BARD1 independiente de BRCA1.

Diversos trabajos han evaluado si mutaciones germinales en BARD1 pueden explicar los casos de cáncer de mama hereditario en familias de alto riesgo no portadoras de mutaciones en BRCA1/2, identificándose mutaciones germinales patogénicas relacionadas con cáncer de mama. Sin embargo, éstas mutaciones patogénicas ocurren en una minoría de las familias con cáncer de mama hereditario

(Ghimenti et al., 2002; Ishitobi et al., 2003; Karppinen et al., 2004; Vahteristo et al., 2006; De Brakeleer et al., 2010; Sabatier et al., 2010; Ratajska et al., 2011)

- **ABRAXAS**

El gen ABRAXAS (FAM175A, ABRA1 o CCDC98) está localizado en el cromosoma 4q21.23 y codifica una proteína de 409 aminoácidos. Sirve como organizador de un complejo enzimático que tiene como núcleo central BRCA1 (Wang et al., 2007; Kim et al., 2007b; Liu et al., 2007), asociando BRCA1 a un complejo de proteínas implicado en el reconocimiento de las cadenas de ADN marcadas con ubiquitina y la reparación de DSBs (*double strands breaks*) (Wang et al., 2007; Sobhian et al., 2007; Wang et al., 2009; Shao et al., 2009; Kim et al., 2007; Feng et al., 2009) (Figura 16). ABRAXAS y el resto de miembros de este complejo, RAP80, BRCC36, MERIT40/NBA1 y BRCC45 son necesarios para el control del daño al ADN y para la resistencia de las células a las radiaciones ionizantes (Solyom et al., 2012).

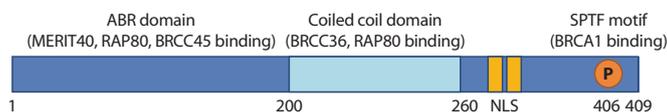


Figura 16. Estructura del gen ABRAXAS, principales dominios de interacción con otras proteínas y motivo pSXXF fosforilado de interacción con BRCA1 en el extremo C-terminal (Modificado de Solyom et al., 2012).

La proteína ABRAXAS actúa como mediadora en la interacción entre BRCA1 y RAP80 en respuesta al daño al ADN (Kim et al., 2007; Sobhian et al., 2007; Wang et al., 2007) aunque, no se ha podido detectar interacción directa entre ambas, de forma que deben existir mediadores en la unión entre BRCA1 y RAP80 (Liu et al., 2007; Kim et al., 2007).

ABRAXAS se une a BRCA1 a través de su extremo C-terminal. Diferentes estudios han demostrado que el dominio BRCT de BRCA1 une los motivos pSXXF (donde S es una fosfoserina) (Yu et al., 2003; Rodríguez et al., 2003; Manke et al.,

2003; Glover et al., 2004; Yu et al., 2004; Greenberg et al., 2006; Kim et al., 2007) y la proteína ABRAXAS posee un motivo pSXXF en el extremo C-terminal, idéntico al motivo de BRIP1 necesario para la interacción con el dominio BRCT de BRCA1 (Yu et al., 2004). La Ser406 de la proteína ABRAXAS, perteneciente a este motivo, se encuentra fosforilada *in vivo*, de forma que el dominio BRCT de BRCA1 la reconoce específicamente (Liu et al., 2007).

Se ha observado que en células sin expresión de ABRAXAS, BRCA1 no se acumula en las regiones de ADN dañado, lo que sugiere que la proteína ABRAXAS es la responsable de la ubicación de BRCA1 en las regiones de ADN dañado (Liu et al., 2007; Wang et al., 2007; Kim et al., 2007). En células sin expresión de BRCA1, se mantiene la formación de focos de la proteína ABRAXAS inducidos por daño al ADN, de forma que la proteína ABRAXAS, además de interactuar con BRCA1, se localiza aguas arriba de BRCA1 en la ruta de respuesta al ADN dañado (Liu et al., 2007; Kim et al., 2007) y a diferencia de otras proteínas que interactúan con BRCA1, como BRIP1, la acumulación de ABRAXAS en el foco de ADN dañado no es dependiente de BRCA1 (Kim et al., 2007).

El complejo BRCA1-ABRAXAS-RAP80 controla la activación del punto de control G2/M inducido por daño (Kim et al., 2007; Sobhian et al., 2007; Wang et al., 2007). Tras el daño al ADN, las células normales detienen su ciclo celular en fase G2, antes de entrar en mitosis, permitiendo que las lesiones en el ADN sean reparadas. Las células con expresión disminuida de BRCA1, ABRAXAS o RAP80 no detienen su ciclo celular, y entran en mitosis a pesar del daño al ADN, lo que sugiere que las tres proteínas son necesarias para la correcta progresión del ciclo celular y la activación del punto de control G2/M (Cortez et al., 1999; Xu et al., 2001; Liu et al., 2007; Kim et al., 2007).

La hipersensibilidad hacia las radiaciones ionizantes exhibida por las células sin expresión de ABRAXAS o RAP80 es muy alta comparada con células control, sin embargo mucho más baja que la de células sin expresión de BRCA1, lo que permite concluir que ambas proteínas únicamente median en una pequeña parte de las funciones de reparación del ADN dañado. Igualmente, la delección de ABRAXAS y RAP80 reduce la recombinación homóloga inducida por roturas de doble hebra del ADN, aunque en menor medida que la observada en caso de delección de BRCA1 o BRCA2 (Kim et al., 2007).

- **ERCC4**

El gen ERCC4 (*excision repair cross-complementation group 4*, también conocido como XPF) está localizado en el cromosoma 16p13.12, consta de 11 exones y se expande aproximadamente 28.2 Kb a lo largo del ADN genómico (Liu et al., 1993). Codifica una proteína denominada ERCC4, perteneciente a la familia de las nucleasas, con 916 aminoácidos que contiene un dominio ERCC4 (Figura 17).



Figura 17. Esquema de la proteína ERCC4 (916 aminoácidos), constituida por dos dominios. Dominio ERCC4, con actividad catalítica; Dominio de unión a ERCC1, en el extremo C-terminal (814-905) (Modificado de Shi et al., 2012).

ERCC4 es una enzima clave en la ruta de reparación NER que forma complejos con ERCC1 para actuar como una endonucleasa específica de estructura, responsable de la rotura inicial en el extremo 5' de la región de ADN dañado durante la reparación por excisión del ADN (Fan et al., 1999; Wood et al., 2001; Tripsianes et al., 2005; Tsodikov et al., 2005).

El complejo ERCC4/ERCC1 desempeña un papel importante en la eliminación de los entrecruzamientos de hebras (ICL), las roturas de doble hebra (DSB) y el proceso *class switch recombination* (CSR) de las inmunoglobulinas (Niedernhofer et al., 2004; Ahmad et al., 2008; Tian et al., 2004; Brookman et al., 1996).

Mutaciones germinales en ERCC4, así como de otros genes de la familia XP, están asociadas con síndromes hereditarios en humanos muy poco frecuentes, como Xeroderma pigmentoso (XP), síndrome de Cockayne (CS) y tricotiodistrofia (TTD) (Lehmann et al., 2003), todos ellos con un patrón de herencia autosómico recesivo (Kraemer et al., 1994).

Se ha demostrado que los niveles de expresión de ERCC4 están correlacionados con el riesgo, la progresión y la respuesta a la quimioterapia con cisplatino, al igual que con el pronóstico de muchos cánceres humanos incluyendo el de cabeza y cuello (Wei

et al., 1996; Chang et al., 2000; Langer et al., 2004; Liu et al., 2007; Koberle et al., 2010; Vaezi et al., 2011), lo que sugiere que una expresión alterada de ERCC4 puede conducir una alteración de la capacidad de reparación del ADN, modulando con ello la susceptibilidad al cáncer.

Hasta la fecha se han detectado un total de 580 SNPs en el gen ERCC4 y diversos estudios han tratado de confirmar la asociación entre los SNPs de ERCC4 y el riesgo de cáncer de mama, pulmón, cabeza y cuello, piel, páncreas y vejiga, sin haberse alcanzado resultados suficientemente concluyentes, lo que puede ser debido a que las variantes identificadas ejercen un muy pequeño efecto sobre el riesgo de cáncer, difícilmente detectable (Winsey et al., 2000; Smith et al., 2003; Milne et al., 2006; García-Closas et al., 2006; Huang et al., 2006; Hung et al., 2008; Shao et al., 2008; McWilliams et al., 2008; Abbasi et al., 2009; Han et al., 2009; Doherty et al., 2011).

- **ATM**

El gen ATM está localizado en el cromosoma 11q22-23 y codifica una proteína quinasa que desempeña un papel muy importante en la detección y señalización de las roturas de doble hebra en el ADN (Figura 18). La actividad de la quinasa ATM es responsable de la fosforilación de p53, BRCA1 y CHEK2, proteínas implicadas en las rutas de respuesta al daño en el ADN (Shiloh, 2003 ;Revisado en Oldenburg et al., 2007).



Figura 18. Estructura y dominios de la proteína ATM (3056 aminoácidos). Extremo N-terminal, región (22 aminoácidos) de dimerización e interacción con sustratos y región (10 aminoácidos) de interacción con c-Abl; Dominio FAT, de autofosforilación para interacción con sustratos; Dominio ATM quinasa (PI3K); Dominio FATC, de interacción con la histona Tip60HAT, necesaria para la completa activación de la proteína ATM (Modificado de Khalil et al., 2012).

Los portadores de mutaciones bialélicas en el gen ATM padecen un raro desorden autosómico recesivo, denominado ataxia telangiectasia (AT) (Savitsky et al., 1995), caracterizado por ataxia cerebelosa, degradación neurológica progresiva,

telangiectasia oculocutánea, inmunodeficiencia, inestabilidad cromosómica, hipersensibilidad a la radiación e incremento del riesgo de cáncer, en particular leucemias y linfomas (Revisado en Oldenburg et al., 2007; Revisado en Campeau et al., 2008).

La incidencia estimada de AT es de 1:40.000 a 1:100.000 individuos, con una incidencia estimada de portadores de 1:100 a 1:200. Estudios basados en parientes de individuos con AT sugieren que las mujeres portadoras de mutaciones heterocigotas en el gen ATM no desarrollan el fenotipo AT, pero presentan un riesgo incrementado de sufrir cáncer de mama (Pippard et al., 1988; Swift et al., 1990; Easton, 1994; Ahmed et al., 2006), con un riesgo relativo estimado hasta 2 veces superior al de la población sin mutación (Thompson et al., 2005; Renwick et al., 2006; Brunet et al., 2008; Bogdanova et al., 2009; Goldgar et al., 2011). Debemos resaltar que algunas de estas mutaciones, como p.E1978X, c.3802delG o c.8264_8268delATAAG, fueron previamente identificadas como causantes de AT en homocigosis.

Estudios recientes han demostrado que la agrupación de variantes *missense* de significado desconocido en el gen ATM se asocian con un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Tavtigian et al., 2009; Fletcher et al., 2010).

La demostración de que mutaciones en ATM predisponen al cáncer de mama (Renwick et al., 2006) permitió confirmar la relación del gen ATM con el cáncer de mama; sin embargo, todavía se desconoce que es lo que determina que las mujeres con mutaciones en ATM desarrollen cáncer de mama (aproximadamente el 15 % de las portadoras) (Ahmed et al., 2006).

- **TGFB1**

El gen TGFB1 está localizado en el cromosoma 19p13.1. Constituido por 7 exones y 6 regiones intrónicas muy grandes, codifica una proteína multifuncional, TGFβ1 (Figura 19), que actúa como un factor de crecimiento autocrino negativo, ya que muchos tipos celulares sintetizan TGFβ1 y casi todos tienen receptores específicos, a través de los cuales la proteína TGFβ1 actúa controlando la proliferación y la diferenciación celular (Revisado en Oldenburg et al., 2007).



Figura 19. Estructura de la proteína TGF β 1 (390 aminoácidos). Está constituida por el dominio bisagra (aminoácidos 30-74) y el dominio brazo (aminoácidos 75-271). Ambos dominios son responsables del mantenimiento de la estructura del monómero de TGF β 1 por uniones entre la Lys-56 del dominio bisagra y la Tyr-103/Tyr-104 del dominio brazo. El dominio bisagra de TGF β 1 permite la formación de dímeros de la proteína, que se activa mediante la unión de la integrina α -5 a la secuencia de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp) ubicada en el extremo C-terminal.

En células normales, TGF β 1 actúa como un potente inhibidor de la proliferación y migración, y promueve la apoptosis, propiedades que están asociadas con las funciones de los genes supresores tumorales (Rosfjord et al., 1999; Janda et al., 2002). La ausencia de la proteína TGF β 1 funcional puede inducir cambios celulares asociados con progresión tumoral (Lehmann et al., 2000), invasión (Oft et al., 2002) y angiogénesis (Schulze et al., 2001; Goumans et al., 2002). TGF β 1 inhibe el desarrollo temprano de lesiones benignas, pero promueve la invasión y la metástasis cuando su actividad como supresor tumoral se encuentra anulada. Hasta la fecha se han localizado varias mutaciones que interrumpen la ruta de señalización de TGF β 1 en los tumores de mama (Lucke et al., 2001; Chen et al., 1998; Xie et al., 2002).

Múltiples estudios han tratado de determinar el papel de las mutaciones germinales en el gen TGFB1 en el desarrollo del cáncer de mama, aunque no han sido concluyentes (Dunning et al., 2003; Krippel et al., 2003; Hishida et al., 2003; Jin et al., 2004; Le Marchand et al., 2004; Kaklamani et al., 2005; Lee et al., 2005; Shin et al., 2005; Cox et al., 2007; Jakubowska et al., 2009; Rebbeck et al., 2009; Qiu et al., 2010; Niu et al., 2010).

Cox y colaboradores atribuyeron a la variante p.L10P un incremento del riesgo a desarrollar cáncer de mama de un 8 % y un incremento del riesgo aún mayor en el desarrollo temprano de la enfermedad (Cox et al., 2007), aunque un estudio multicéntrico posterior (Rebbeck et al., 2009) no encontró evidencias de asociación con cáncer de mama en individuos portadores de mutación en los genes BRCA1/2. Un reciente meta-análisis sugiere que la variante p.L10P puede actuar como un factor de riesgo de baja penetrancia en el desarrollo del cáncer de mama (Qiu et al., 2010).

En un reciente meta-análisis Niu y colaboradores examinaron la posible asociación de la variante -509C>T con el cáncer de mama, observando un incremento de la actividad promotora, un incremento en los niveles de proteína y una disminución del riesgo a desarrollar cáncer de mama (Niu et al., 2010).

- **CASP8**

El gen CASP8 está localizado en el cromosoma 2q33-34 y se expande 51.2 Kb en el ADN genómico (Figura 20). Las caspasas son importantes mediadores del proceso apoptótico (Hengartner et al., 2000).

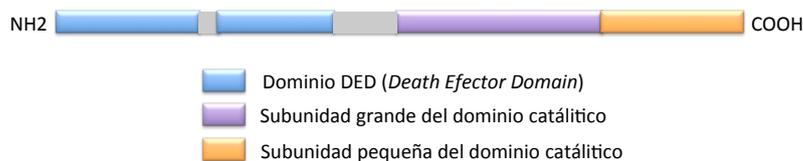


Figura 20. Estructura de la proteína CASP8, constituida por tres dominios (Modificado de Grenet et al., 1999).

El proceso apoptótico mediado por receptores de muerte celular (*death receptors*; superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral) provoca la formación del complejo DISC (*death-inducing signalling complex*), que engloba tanto los receptores de muerte celular y la proteína adaptadora (proteína FADD), como las caspasas iniciadoras 10 (CASP10) y 8 (CASP8). El reclutamiento de las caspasas 8 y 10 al complejo DISC y al apoptosoma conduce a la activación de las caspasas mediante dimerización (Chen et al., 2002; Wang et al., 2001; Engels et al., 2005; McDonald et al., 2004; Milhas et al., 2005).

Se ha observado que la mutación germinal p.R248W del gen CASP8, en homocigosis, es responsable de un desorden autoinmune autosómico recesivo denominado, síndrome linfoproliferativo tipo IIB. Este síndrome está caracterizado por linfadenopatía y esplenomegalia asociadas con inmunodeficiencia, debido a los defectos en activación de linfocitos T, linfocitos B y las células *natural killer* (Chun et al., 2002).

Debido a su implicación en el inicio del proceso apoptótico, se cree que CASP8 y CASP10 pueden actuar como genes de susceptibilidad al cáncer de mama familiar de baja penetrancia (Revisado en Oldenburg et al., 2007).

Estudios previos, en pacientes con cáncer de mama hereditario sin mutación en los genes BRCA1 o BRCA2, mostraron que la variante p.D302H se asocia con una disminución del riesgo a padecer cáncer de mama en función de la dosis alélica (el genotipo homocigoto His/His es el que mas efecto tiene sobre la disminución del riesgo), identificándose al alelo mutado como protector frente al cáncer de mama. Se ha observado el mismo efecto en individuos portadores de las variantes p.D302H de CASP8 en combinación con la variante p.V410I de CASP10 (MacPherson et al., 2004; Frank et al., 2005; Frank et al., 2006; Palanca Suela et al., 2010).

- **NBN y RAD50**

El gen NBN está localizado en el cromosoma 8q2.1 y codifica una proteína de 754 aminoácidos, NBS1, implicada en procesos de reparación del ADN (Walsh et al., 2007) (Figura 21). Recientemente se ha identificado una delección de 5 pb (657del5; c.657_661delACAAA) en el gen NBN, que aparece asociada con un incremento de 3 veces en el riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres heterocigotas (Bogdanova et al., 2007).

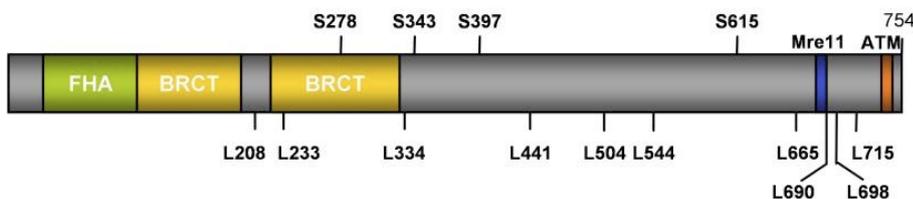


Figura 21. Estructura de la proteína NBS1 (754 aminoácidos), dominios que la constituyen y residuos Ser y Leu, dianas de fosforilación y acetilación de la proteína. Dominio FHA implicado en la interacción con factores de transcripción; dominios BRCT, implicados en la interacción con otras proteínas; dominios de interacción con la proteína Mre11 y proteína ATM (Modificado de Chrzanowska et al., 2012).

Mutaciones en homocigosis en el gen NBN son responsables del síndrome de rotura de Nijmegen (NBS), desorden autosómico recesivo que presenta inestabilidad

cromosómica y está caracterizado por microcefalia, retraso en el crecimiento, inmunodeficiencia y predisposición a diferentes tumores malignos.

El gen RAD50 está localizado en el cromosoma 5q31 y codifica una proteína de 1312 aminoácidos, esencial en en la reparación de roturas de ADN de doble hebra, que interacciona con BRCA1 y NBS1 (Figura 22).



Figura 22. Estructura de la proteína RAD50 (1312 aminoácidos). La imagen muestra los dos dominios ATPasa (A y B) en los extremos amino y carboxilo terminal, los dos dominios de interacción con la proteína Mre-11 (M), las dos regiones *coiled-coil* (CC) y el dominio de interacción en anillo de zinc (aminoácido 635-734), que contiene dos residuos Cys capaces de coordinar una molécula de zinc con la ayuda de otros dos residuos Cys de otra proteína RAD50, constituyendo homodímeros. Imagen sin escala.

Los genes NBN y RAD50 forman parte del complejo proteico MRN (MRE11, RAD50 y NBS1), como parte del sistema de reconocimiento y reparación de las roturas de doble hebra en el ADN, mantenimiento de los telómeros y control del ciclo celular (Varon et al., 1998; Lavin, 2007). Las mutaciones en heterocigosis en alguno de los componentes del complejo parecen estar implicadas en el incremento de la susceptibilidad a padecer cáncer de mama (Heikkinen et al., 2003; Heikkinen et al., 2006; Bogdanova et al., 2008).

El análisis del gen NBN en pacientes con síndrome de rotura de Nijmegen (NBS) permitió la identificación de una mutación fundadora en población eslava, c.657del5. Aproximadamente el 90 % de los pacientes portadores homocigotos de la mutación c.657del5, que afecta al exón 6 de NBN, han sido identificados en ésta población (Varon et al., 2000; Maurer et al., 2010). También aparece identificada como asociada a un incremento en el riesgo de cáncer de mama en población polaca y bielorrusa (Gorski et al., 2003; Steffen et al., 2006; Bogdanova et al., 2008); sin embargo, no ha sido identificada en población alemana, checa y china (Bogdanova et al., 2008; Carlomagno et al., 1999; He et al., 2011; Mateju et al., 2012).

El estudio del gen RAD50 en población finlandesa, permitió la identificación de una mutación fundadora, c.687delT, asociada a un incremento de 4,3 veces en el riesgo a padecer cáncer de mama (Heikkinen et al., 2003; Heikkinen et al., 2006; Bogdanova

et al., 2008). Análisis posteriores en distintas poblaciones no lograron identificar en ningún caso esta mutación (Uhrhammer et al., 2009).

7. VARIANTES ALÉLICAS DE BAJA PENETRANCIA CARACTERIZADAS POR GWAS

El riesgo de padecer cáncer de mama en portadores de mutaciones en BRCA1 y BRCA2 varía con la edad del diagnóstico y diversos factores de riesgo (Antoniou et al., 2003; Begg et al., 2008; Simchoni et al., 2006). Se ha sugerido que el riesgo a desarrollar cáncer de mama en portadores de mutaciones en BRCA1 y BRCA2 está modificado por otra serie de factores genéticos, constituyendo un modelo poligénico (Antoniou et al., 2002; Antoniou et al., 2003; Begg et al., 2008; Antoniou et al., 2008b).

Múltiples estudios de tipo GWAS (genome-wide association studies) han identificado regiones en el genoma que contienen SNPs que parecen estar asociados con el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Easton et al., 2007; Hunter et al., 2007; Stacey et al., 2007; García-Closas et al., 2008; Tapper et al., 2008; Gold et al., 2008) (Tabla 6).

Tabla 6. Genes/variantes alélicas de penetrancia/riesgo bajo (Modificado de Campeau et al., 2008). El OR representa el riesgo de cáncer de mama para portadores de mutaciones en BRCA1 o BRCA2.

Gen	Odd ratio (95% IC)	MAF en población norte de Europa	Referencia
FGFR2	1,26 (1,23-1,30)	0,38	Easton et al., 2007
TOX3 (TNRC9)	1,14 (1,09-1,20)	0,46	Easton et al., 2007
MAP3K1	1,13 (1,09-1,18)	0,28	Easton et al., 2007
LSP1	1,06 (1,02-1,11)	0,3	Easton et al., 2007
Región 8q	1,06 (1,01-1,11)	0,4	Easton et al., 2007
miR146	-	0,29	Shen et al., 2008
Región 2q35	1,11 (1,03-1,20)	0,11-0,52 en varias poblaciones	Stacey et al., 2007
Región 16q12	1,27 (1,19-1,36)	0,30-0,54 en varias poblaciones	Stacey et al., 2007
Región 5p12	1,19 (1,13-1,26) Mayor en tumores ER+	0,20-0,31 en varias poblaciones	Stacey et al., 2008
Región 6q22.33	1,41 (1,25-1,59)	0,21 en Judios Ashkenazi	Gold et al., 2008

La determinación de las variantes alélicas implicadas en la modificación del riesgo, en individuos portadores de mutaciones en genes de alta penetrancia, es un paso muy importante en el objetivo de comprender completamente esta enfermedad (Easton et al., 2007; Stacey et al., 2007; Stacey et al., 2008).

- **FGFR2**

El polimorfismo rs2981582 (cambio C>T) del gen FGFR2 (*Fibroblast growth factor receptor 2*) está ubicado en el cromosoma 10 (<http://omim.org/entry/176943>). Éste gen codifica una proteína implicada en el crecimiento de las células tumorales, la capacidad invasiva, la motilidad y la angiogénesis (Houssaint et al., 1990; Dionne et al., 1990; Fu et al., 2012). La proteína FGFR2 es miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos, que presentan una secuencia de aminoácidos muy conservada entre los distintos miembros de la familia y a lo largo de la evolución (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2263>).

Estudios de GWAS han permitido la detección de cinco SNPs en el intrón 2 de FGFR2, entre los cuales se encuentra el polimorfismo rs2981582. Este polimorfismo aparece asociado al cáncer de mama en no portadores de mutación en los genes BRCA1/2, modificando muy levemente el riesgo de padecer cáncer de mama, del 10 % al 12-14 % (Easton et al., 2007; Hunter et al., 2007) y asociado al cáncer de mama en individuos portadores de mutación en BRCA2, actuando multiplicativamente con la mutación en el gen BRCA2 e incrementando el riesgo del individuo portador (Antoniou et al., 2008a).

Se ha intentado relacionar el polimorfismo rs2981582 con las características clínicas de los pacientes, tales como la edad al nacimiento del primer hijo y el número de hijos, no encontrándose ninguna interacción significativa con el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Travis et al., 2010; Milne et al., 2010; Campa et al., 2011; Butt et al., 2012). Otros estudios han encontrado relación entre la edad de los pacientes y el riesgo de cáncer de mama, al observar que los individuos homocigotos para el alelo menos frecuente (TT) presentan un desarrollo temprano del cáncer de mama esporádico (Fu et al., 2012).

Más del 90 % de los cánceres de mama causados por mutaciones en BRCA1 no expresan el receptor de estrógenos (ER-), mientras que los tumores de mama causados por mutaciones en BRCA2 tienen una expresión de ER similar a la población general, siendo mayoritariamente ER+ (Lakhani et al., 2005). La variante rs2981582 se ha descrito asociada con los tumores de mama ER+, de forma que, el escaso o nulo efecto de la variante sobre el riesgo en portadores de mutaciones en BRCA1 pueda ser explicable por el débil efecto de esta variante sobre el cáncer de mama ER- (García-Closas et al., 2008; Reeves et al., 2010; Mulligan et al., 2011; Fu et al., 2012).

El riesgo absoluto de desarrollar cáncer de mama a la edad de 70 años para un paciente portador de mutación en BRCA2 es de 43 % para los portadores del genotipo normal (CC) y del 63 % para los portadores del genotipo menos frecuente (TT) del SNP rs2981582 (Antoniou et al., 2008a).

- **Región 8q24**

El SNP rs13281615 (cambio A>G) está localizado en la región 8q24. Estudios de GWAS permitieron la localización de esta variante y su identificación como implicada en el riesgo a desarrollar cáncer de mama, colorectal y de próstata en diferentes grupos étnicos (Witte, 2007; Easton et al., 2007; Tomlinson et al., 2007).

Estudios recientes coinciden en la identificación del SNP rs13281615 como asociado al cáncer de mama bilateral con un riesgo relativo 1,21 veces superior al de la población no portadora (Teraoka et al., 2011) e implicado en la expresión del receptor de estrógenos (ER+) de los tumores mamarios (Stacey et al., 2007; García-Closas et al., 2008; Reeves et al., 2010); sin embargo no se ha asociado con enfermedad metastásica (Bertucci et al., 2012).

A pesar de estas evidencias a favor de su implicación en el desarrollo del cáncer de mama, múltiples estudios descartan esta variante como modificadora del riesgo, ya que no encuentran resultados significativos que permitan asociarla con el riesgo a padecer cáncer de mama, tanto en portadores de mutación en BRCA1 como en BRCA2 (Antoniou et al., 2009; Mulligan et al., 2011; Butt et al., 2012).

- **miR146**

Los MicroRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de ARN de cadena sencilla con actividad reguladora, producidas a través de un proceso que da lugar a un transcrito primario (pri-miRNA) y a un precursor miRNA (pre-miRNA). Las variantes alélicas en los ARN maduros, así como en los pri- y pre-miRNA, representan una interesante fuente de varianza fenotípica en las enfermedades genéticas y pueden contribuir directamente a la susceptibilidad de la enfermedad (Bandiera et al., 2010).

El polimorfismo rs2910164 (cambio G>C) se localiza en el gen miR146, ubicado en el cromosoma 5q33.3 (Landi et al., 2008). Este miRNA interacciona con el extremo 3'UTR del gen BRCA1 (Shen et al., 2008), regulando negativamente su expresión (García et al., 2011).

Ciertos estudios identificaron el polimorfismo rs2910164 como modificador del riesgo a padecer cáncer de mama. El alelo C (menos frecuente) está implicado en el desarrollo temprano del cáncer de mama independientemente de la presencia de mutaciones en BRCA1/2, aunque este resultado no ha podido ser confirmado (Shen et al., 2008; Pastrello et al., 2010; Catucci et al., 2010, García et al., 2011).

Además, múltiples estudios muestran el polimorfismo rs2910164 del gen miR146 como modificador del riesgo a padecer diversos tipos de cáncer. Portadores del alelo C, menos frecuente, presentan un riesgo incrementado de cáncer gástrico (Okubo et al., 2010) y una disminución en el riesgo a padecer cáncer de próstata (Xu et al., 2010a); mientras que individuos homocigotos CC muestran una disminución en el riesgo de padecer cáncer papilar de tiroides (Jazdzewski et al., 2008) y portadores del genotipo GG muestran incremento tanto del riesgo a desarrollar carcinoma hepatocelular (Xu et al., 2010b) como de padecer carcinoma escamoso del esófago (Guo et al., 2010).

- **TP53 y MDM2**

El gen supresor tumoral TP53 es responsable del mantenimiento de la integridad genómica y de la prevención de las transformaciones oncogénicas de las células

(Vogelstein et al., 2000; Levine, 1997). El gen TP53 es activado tras el daño al ADN y la respuesta de TP53 forma parte de la ruta de control del daño y reparación del ADN (Jin et al., 2001; Zhou et al., 2000), regulando los procesos de detención del ciclo celular y apoptosis (Levine, 1997).

El polimorfismo p.Arg72Pro (c.215G>C; rs1042522) está localizado en una región rica en prolina del gen TP53 (Matlashewski et al., 1987). Diferentes estudios sugieren que esta región, participa en la transmisión de las señales apoptóticas, activando la muerte celular pero no la detención del crecimiento celular (Sakamuro et al., 1997; Walker et al., 1996).

El gen MDM2, ubicado en la región 12q14.3-q15, es un conocido protooncogén, amplificado y sobreexpresado en diversos tumores malignos (Toi et al., 1997; Rayburn et al., 2005). Se trata de un regulador clave tanto para la ruta de p53 como para la ruta que conecta las funciones de supresor tumoral de PTEN con p53 (Mayo et al., 2002; Harris et al., 2005). Este gen regula la respuesta de TP53, controla sus niveles y actividad (Bond et al., 2005; Michael et al., 2003) mediante la inhibición de su expresión y mediando en su degradación vía ubiquitinación (Michael et al., 2003), manteniendo así bajos los niveles de p53 en ausencia de estrés (Moll et al., 2003).

El polimorfismo c.-309T>G (rs2279744) del gen MDM2, está localizado en la región promotora de MDM2 y regula la afinidad del activador transcripcional SP1, modulando los niveles de ARNm y proteína (Bond et al., 2004; Bond et al., 2005).

La proteína p53 regula positivamente la expresión de MDM2, creándose por tanto un circuito de retroalimentación negativo (Michael et al., 2003). Las alteraciones en los genes TP53 y MDM2 pueden afectar a este circuito de retroalimentación, modificando la respuesta de TP53 al daño al ADN (Whibley et al., 2009) y generando como consecuencia, una acumulación de errores en el ADN y alteración de la progresión tumoral (Zhou et al., 2000).

Se ha observado que el alelo Pro del polimorfismo p.Arg72Pro es responsable de una disminución en la respuesta apoptótica (Thomas et al., 1999; Dumont et al., 2003; Pim et al., 2004) y se ha asociado con un desarrollo temprano del cáncer de mama en pacientes portadores de mutación en BRCA1 (Martin et al., 2003) y en pacientes con síndrome de Li-Fraumeni (Bougeard et al., 2006). No se ha observado relación con el

desarrollo temprano del cáncer de mama en casos de cáncer esporádico (Schmidt et al., 2007).

Varios estudios han demostrado que el genotipo Arg/Arg induce apoptosis mas efectivamente (Thomas et al., 1999; Dumont et al., 2003; Toyama et al., 2007).

Desde el punto de vista clínico, se ha comprobado que el genotipo Pro/Pro está asociado a peores expectativas de supervivencia (Tommiska et al., 2005) y de tiempo libre de enfermedad, pudiendo ser empleado el genotipo Pro/Pro como un marcador pronóstico independiente en cáncer de mama (Toyama et al., 2007). En el caso de pacientes heterocigotos Arg/Pro, la anulación del alelo Arg en tejido tumoral (pérdida de heterocigosidad) ha sido asociada con una disminución del tiempo libre de enfermedad y la supervivencia total (Bonafe et al., 2003).

El genotipo homocigoto GG del c.-309T>G de MDM2 incrementa los niveles de expresión de la proteína MDM2, de forma que las células que poseen este genotipo presentan una ruta de respuesta de TP53 comprometida y forman complejos p53-MDM2 inactivos en respuesta al estrés (Bond et al., 2004; Arva et al., 2005; Toyama et al., 2007).

Se ha observado un pequeño incremento del riesgo a padecer cáncer de mama en aquellos pacientes con genotipo homocigoto GG para el c.-309T>G del gen MDM2 que no presentaran mutación en TP53 (Boersma et al., 2006; Millikan et al., 2006; Wilkening et al., 2006). También se ha visto implicado en el desarrollo temprano del síndrome de Li-Fraumeni, el cáncer de mama esporádico y pacientes con tumores de tipo ER+ (Bond et al., 2004; Bond et al., 2006).

El genotipo TT del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 está relacionado con peor pronóstico en pacientes con mutaciones patogénicas en el gen TP53 y/o con expresión anormal de la proteína p53, lo que sugiere una interacción entre el polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 y la presencia de alteraciones somáticas en el gen TP53 en el tumor (Boersma et al., 2006).

Por lo general, los efectos de ambos polimorfismos sobre la incidencia del cáncer de mama parecen ser bastante pequeños, aunque pueden ser mucho mas fuertes en combinación con cambios somáticos adicionales en el tumor. De forma individual, el riesgo de desarrollar cáncer de mama para los portadores del genotipo G/G del polimorfismo c.-309T>G es de dos a tres veces superior y el riesgo para los portadores

del genotipo Arg/Pro del polimorfismo p.Arg72Pro es hasta dos veces superior (van den Broek et al., 2011).

Un reciente meta-análisis muestra que los pacientes con el genotipo TG en el c.-309T>G del gen MDM2 presentan mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, en poblaciones asiáticas; mientras que los genotipos Pro/Pro o Arg/Pro de la variante p.Arg72Pro del gen TP53 no tienen ningún efecto sobre la incidencia del cáncer de mama. Asimismo no observan ningún efecto combinado entre ambos polimorfismos sobre la incidencia del cáncer de mama (Cheng et al., 2012).

- **SNPs de BRCA1**

Los estudios de asociación tienen una capacidad limitada para la identificación de las variantes genéticas causantes de la modificación del riesgo debido a la existencia de desequilibrios de ligamiento (LD) entre los SNPs próximos. Esto es particularmente cierto en el caso de BRCA1, localizado dentro de un gran bloque de LD de 390 Kb. En esa enorme región de LD se han localizado mas de 120 SNPs, entre los cuales, se encuentran los SNPs c.2731C>T (Pro871Leu; rs799917), c.3232A>G (Glu1038Gly; rs16941) y c.3667A>G (Lys1183Arg; rs16942) (nomenclatura según *Breast Cancer Information Core*).

Las tres variantes indicadas forman uno de los múltiples haplotipos existentes en BRCA1. La presencia de estas variantes *missense*, podría alterar la función o la estabilidad de la proteína BRCA1; sin embargo, ninguna de estas variantes está localizada en un dominio funcional de BRCA1.

Los estudios iniciales acerca de los haplotipos del gen BRCA1 llegaron a la conclusión de que existe una distinta distribución genotípica de los SNPs entre los grupos paciente y control, sin embargo, esa distinta distribución no parece ser suficiente para que exista un sustancial incremento del riesgo a padecer cáncer de mama (Dunning et al., 1997; Friedman et al., 1994; Durocher et al., 1996; Neuhausen et al., 1996).

En la actualidad, los estudios realizados acerca de éstos polimorfismos del gen BRCA1 han demostrado que sí existe asociación entre estos SNPs y el riesgo de cáncer

de mama, en mujeres portadoras de mutación en BRCA1 (Cox et al., 2011) y cáncer de mama esporádico (Cox et al., 2005; Freedman et al., 2005).

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El cáncer de mama es el más frecuente en mujeres y la principal causa de muerte tanto en países desarrollados como en países en desarrollo, representando un 23 % del total de nuevos casos de cáncer (se estima en 1 millón de nuevos casos cada año) y un 14 % del total de muertes en 2008 (Jemal et al., 2011).

Aproximadamente un 5-10% de los cánceres de mama tienen una predisposición genética debido a la presencia de mutaciones germinales de genes de susceptibilidad, de forma que el aumento del riesgo se transmite a las siguientes generaciones.

Está comúnmente aceptado que existen tres clases de genes de susceptibilidad: los genes que confieren un alto riesgo individual (genes de alta penetrancia), los genes que se asocian con un riesgo moderado (genes de penetrancia intermedia) y los genes cuyas variantes alélicas confieren un riesgo bajo (genes de baja penetrancia). Entre los primeros encontramos los genes BRCA1 y BRCA2, PTEN, TP53, LKB1/STK11 y CDH1. En el segundo grupo se incluyen, entre otros: CHEK2, PALB2, BRIP1 y RAD51C. En el último grupo nos encontramos con diferentes SNPs caracterizados por estudios de genes candidatos o por GWAS.

Las mutaciones de los genes BRCA1 y BRCA2 son muy poco frecuentes en la población y explican menos del 20 % de los casos de cáncer de mama y ovario familiar, mientras que las mutaciones de los genes TP53, PTEN, STK11 y CDH1 se asocian a síndromes específicos y suponen menos del 5 % de los casos (Easton, 1999). Se estima que el conjunto de todos los genes de alta penetrancia conocidos puede explicar un 25 % de los casos de cáncer de mama hereditario, lo que indica que en la mayoría de los casos las causas continúan sin explicación (Thompson et al., 2004; Oldenburg et al., 2007; Turnbull et al., 2008; Lallo et al., 2012).

Actualmente se acepta que el cáncer de mama es una enfermedad compleja, determinada por la combinación de múltiples variantes genéticas cada una de las cuales tiene un efecto individual modesto (Antoniou et al., 2002; Easton et al., 2007). Este modelo poligénico de susceptibilidad sugiere que múltiples alelos contribuyen a un incremento del riesgo familiar en la mayoría de los cánceres. El estudio de asociación de genes candidatos es la principal aproximación en la búsqueda de alelos de susceptibilidad y los resultados de estos estudios muestran que aunque estos genes están asociados con el riesgo de cáncer de mama, el efecto individual es pequeño (Pharoah et al., 2007).

La identificación de nuevos polimorfismos y de su riesgo relativo en estudios de grandes poblaciones es esencial para entender el efecto combinado de estos SNP y poder establecer modelos de predicción de riesgo confiables.

Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos con el fin de profundizar en la susceptibilidad al cáncer de mama familiar:

1. Analizar los genes TP53, ABRAXAS, PALB2, RAD51C, BARD1, BRIP1, CHEK2 y ERCC4 en familias con alta penetrancia de cáncer de mama.
2. Analizar la distribución de genotipos de los polimorfismos modificadores del riesgo rs16941, rs16942 y rs799917 del gen BRCA1, rs2279744 del gen MDM2, rs1042522 del gen TP53, rs2981582 del gen FGFR2, rs2910164 del gen miR146 y rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama familiar.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. Pacientes y controles en estudio

Hemos estudiado 31 probandos pertenecientes familias españolas con cáncer de mama remitidos desde diferentes hospitales de la Comunidad de Castilla y León a la Consulta de Consejo Genético del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario de Salamanca entre los años 2004 y 2010. En todos los casos las muestras de sangre periférica se obtuvieron previa información y bajo consentimiento informado para los estudios genéticos. La selección de los pacientes a incluir en el programa de Consejo Genético del Hospital Universitario de Salamanca se basa en el cumplimiento de al menos uno de los criterios establecidos por la Junta de Castilla y León (Tabla 7).

Tabla 7. Criterios de inclusión en el programa de Consejo Genético de la Junta de Castilla y León.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

ÚNICO CASO	Cáncer de mama bilateral, 2 primarios ipsilaterales/mama y ovario en el mismo individuo
	Cáncer de mama u ovario diagnosticado antes de los 40 años
	Cáncer de mama en el varón
DOS CASOS	2 cánceres de mama, uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años (familiares de 1º grado)
	Cáncer de mama antes de los 50 años y ovario en la misma familia (familiares de 1º y 2º grado)
	2 casos de cáncer de ovario a cualquier edad (1º y 2º grado)
TRES CASOS	3 ó mas casos de cáncer de mama (2 en 1º grado) y/o ovario (1º y 2º grado), diagnosticados a cualquier edad

Los casos seleccionados, fueron estudiados en la Unidad de Consejo Genético y pertenecen a diferentes familias, con cáncer de mama hereditario, no portadores de mutación en los genes BRCA1 o BRCA2 y con una elevada carga hereditaria de la enfermedad (3 ó más familiares de 1º grado afectados).

El análisis molecular de la región codificante de los genes BRCA1 y BRCA2 fue realizado por la Unidad de Consejo Genético en Cáncer Hereditario del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca previamente a este trabajo.

En los 31 casos seleccionados realizamos un análisis de grandes reordenamientos (pérdidas/amplificaciones) genómicos en los genes BRCA1 y BRCA2, completando el análisis molecular de ambos genes y procedimos a realizar el análisis mutacional de los genes TP53, ABRAXAS, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD51C, BARD1 y ERCC4.

Para el análisis de discriminación alélica de los polimorfismos de baja penetrancia se analizaron muestras de sangre periférica de 116 mujeres sanas, que no habían padecido ningún tipo de cáncer a lo largo de su vida, 61 probandos pertenecientes a diferentes familias con cáncer de mama portadores de mutación en BRCA1 ó BRCA2 y 312 probandos pertenecientes a diferentes familias con cáncer de mama sin mutación en BRCA1 ó BRCA2, de los cuales 104 probandos tenían una alta carga hereditaria de la enfermedad (3 ó mas familiares de 1º grado afectados) y 208 probandos tenían una menor carga hereditaria de la enfermedad (menos de 3 familiares de 1º grado afectados en la familia) (Tabla 8).

Tabla 8. Grupos de pacientes empleados en el estudio.

Características	Denominación
Grupo de mujeres, sin historial personal ni familiar de cáncer	Control
Pacientes con cáncer de mama familiar y mutación en los genes BRCA1/2	CMF+
Pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2	CMF-
<ul style="list-style-type: none"> • Con alta carga hereditaria de la enfermedad (3 ó mas familiares afectados) 	CMF->3
<ul style="list-style-type: none"> • Con baja carga hereditaria de la enfermedad (2 ó menos familiares afectados) 	CMF-<3

Desde el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca obtuvimos los datos biológicos de los tumores de los pacientes de la provincia de Salamanca: expresión de receptor de estrógenos, expresión de receptor de progesterona y sobreexpresión de la proteína Her2. En función de los datos biológicos del tumor, los tumores de mama se clasificaron, según los criterios de Carey, en cuatro subtipos: Luminal A, Luminal B, Her2 y *Basal Like* (Carey et al., 2007). En total,

obtuvimos datos de 36 pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en BRCA1 ó BRCA2 y de 161 de los pacientes con cáncer de mama sin mutación en BRCA1 y BRCA2, de los cuales 49 pertenecían al grupo con mayor carga hereditaria de la enfermedad y 112 pertenecían al grupo con menor carga hereditaria de la enfermedad. En el resto de los casos no pudimos obtener los datos biológicos de los tumores puesto que no estaban disponibles en la base de datos o historias clínicas de los pacientes.

2. Manipulación de los ácidos nucleicos. Extracción de ADN de sangre periférica

El ADN genómico de alto peso molecular fue extraído a partir de sangre periférica de los pacientes recogida en tubos con EDTA.

Tras centrifugar la muestra de sangre periférica se aisló la interfase de células leucocitarias, que fue resuspendida en tampón Fornace (0.25M sacarosa; 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 25 mM KCl; 5mM MgCl₂); EDTA (ácido etilendiaminotetra acético) 0.5M pH 8, quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; proteinasa K (20 mg/L), enzima que degrada las proteínas; y SDS (dodecil sulfato sódico) al 10 %, detergente que rompe las membranas celulares. Esta mezcla fue incubada a 55°C durante unas 16 horas, tras lo cual el ADN fue purificado por tratamiento con una mezcla de fenol tamponado y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y posterior centrifugado para separar las fases. El ADN se mantiene en la fase acuosa, que fue purificada nuevamente con CIAA y centrifugado para separar las dos fases, una que contiene el ADN y otra que contiene los detritos celulares. Tras este paso se añadió etanol absoluto frío a la fase acuosa, precipitando el ADN, que fue recuperado, lavado con etanol al 70% y, finalmente, resuspendido en agua desionizada. La muestra de ADN fue almacenada a -20°C en tubos eppendorff con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como la posible contaminación.

La concentración y el grado de contenido proteico de ADN se calcula tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro automático de ADN/ARN (ND-1000 Spectrophotometer Nanodrop Technologies, Inc. Wilmington, USA), siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de ADN/ml} = (\text{DO}_{260}) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

(Nota: 50 es un factor de corrección introducido, ya que la unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es un valor de absorbancia que tiene 50 µg de ADN/ml).

El cociente DO_{260} / DO_{280} se utiliza para el grado de contaminación proteica, considerándose como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos; en estos casos, se procedió a realizar una nueva purificación del ADN. Valores superiores indican un exceso de ARN, que se elimina tratando la solución de ADN con ARNasa y purificando de nuevo, según el método descrito anteriormente (Sambrook et al., 1989).

3. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR

Las muestras de DNA fueron amplificadas por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Se amplificaron todos los exones codificantes de los genes TP53, ABRAXAS, PALB2, BRIP1, RAD51C, BARD1 y ERCC4, así como las zonas de unión intrón-exón mediante cebadores específicos que anillaban en la zona intrónica. En el caso del gen CHEK2 se amplificaron únicamente el fragmento desde el exón 2 al exón 3 y el exón 10.

La amplificación de los exones 8 y 11 del gen ERCC4, los exones 4 y 5 del gen PALB2, el exón 20 del gen BRIP1 y los exones 4 y 8 del gen BARD1, debido a su gran tamaño, fueron amplificados en varios fragmentos ordenados alfabéticamente de 5' a 3'. Al contrario, la amplificación de los exones 2 y 3 de PALB2 se llevó a cabo en un mismo fragmento por ser de pequeño tamaño tanto los exones como los intrones. El exón 1 de los genes PALB2 y BRIP1 no se analizó por no ser codificante.

Las secuencias de los cebadores y el tamaño del fragmento amplificado para estos genes se detalla en las tablas 9-16.

Tabla 9. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de cada exón de ERCC4 y tamaño del fragmento que generan.

ERCC4

EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENtido	Tamaño amplicón
1	5'- TTGAGTTCGGCCTACTCTCC -3'	5'- CCCTCCATCCCTGTCAGA -3'	369 pb
2	5'- TGACCTATTA AAAA CTGCCCTGT -3'	5'- GGGAGCTGAGTCCTTTCAAGA -3'	362 pb
3	5'- AAGAAAAATGTGATGAATGAATGG -3'	5'- GGTTCATCAAACAAAATTACAATGAA -3'	395 pb
4	5'- GGGGTGTTAAACCAAGACCA -3'	5'- AACAGCAAATTCCTATTAACAACA -3'	382 pb
5	5'- GATACACAGGAAATAATCCTTTTGA -3'	5'- CACACCTGATCCCCCTAAA -3'	354 pb
6	5'- GCTGAACAGCGACAGATCAC -3'	5'- TTTCACATGGCCAAGAAGA -3'	381 pb
7	5'- TCTGTTGTTTTAAAGCCTTTGG -3'	5'- TCACCATGTTGGTCAGGCTA -3'	297 pb
8A	5'- GCACAGGAAACTAGGAGGA -3'	5'- CGACGATATCCTTCCTCGAC -3'	396 pb
8B	5'- TGAAGAACTGGAAGAGGAAGGA -3'	5'- CATGCAACTGGTATAGTTTCTGG -3'	384 pb
9	5'- GAGCTAGTGTGTGATAATGAAACC -3'	5'- CTGGAGGACAATTGAGACCA -3'	395 pb
10	5'- CCCATCATTGTCTTGGCATA -3'	5'- CCAACCCCATTTTAAAGAG -3'	398 pb
11A	5'- AGATTTTGTATATTCCTTCTTTGAGA -3'	5'- TTCAGCTCCTCAAACAACTCC -3'	498 pb
11B	5'- TTCACTCCCCAGACTACGG -3'	5'- GAGCCGCTGAAAAGTACAGG -3'	422 pb

Tabla 10. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de cada exón de ABRAXAS y tamaño del fragmento que generan.

ABRAXAS

EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENtido	Tamaño amplicón
1	5'- CTGCCACCACAGGGTCTT -3'	5'- AGGGGGAGAGAAGGCAGAG -3'	300 pb
2	5'- ACTGGTAGCACATATTGTATACATAG -3'	5'- CAGCATAACTATCAAATATAGGAG -3'	256 pb
3	5'- CTTCTGGCGTGAGGTAAG -3'	5'- TTTCCATTCTACTCAGTACCACCA -3'	257 pb
4	5'- GCTTTGGTAGTTGGGTTAGGAATAAC -3'	5'- AACACTGCTTAAAAATCTGTCAAAG -3'	265 pb
5	5'- AAGAAAGCCATTTAAGGTTGTT -3'	5'- GTGACAATCTGATGCGACAA -3'	407 pb
6	5'- GGGACAAGTAATCTATTCCAGCA -3'	5'- CAGCCTAGTTTACTTGAGTAATGG -3'	328 pb
7	5'- TTGGTCCTTGACAATGAATAAGTT -3'	5'- TGTTTGCACAATGATAAACTGC -3'	351 pb
8	5'- AAAGGCAAATAGTTTTGGGTATT -3'	5'- CACCTTTGCACTCCAACCTA -3'	341 pb
9	5'- ACAACTGTAAAATCTTTTGA CTTAATTT -3'	5'- GTGTATTACTGCAACAGGTGAACATAG -3'	675 pb

Tabla 11. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de cada exón de TP53 y tamaño del fragmento que generan.

TP53

EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENIDO	Tamaño amplicón
1	5'- GCTCAAGACTGGCGCTAAAA -3'	5'- GTGACTCAGAGAGGACTCAT -3'	187 pb
2	5'- GAAGCAGCCATTCTTTCTCT -3'	5'- GGTCCCCAGCCCAACCCTT -3'	415 pb
3	5'- GGAGCCGCAGTCAGATCCTA -3'	5'- GGTCCCCAGCCCAACCCTT -3'	335 pb
4	5'- CAACGTTCTGGTAAGGACAA -3'	5'- GCCAGGCATTGAAGTCTCAT -3'	445 pb
5	5'- GCCGTGTTCCAGTTGCTTTA -3'	5'- AGGAGGGGCCAGACCTAAGA -3'	351 pb
6	5'- AGCGCTGCTCAGATAGCGAT -3'	5'- TAAGCAGCAGGAGAAAGCCC -3'	311 pb
7	5'- AAGGCGCACTGGCCTCATCTT -3'	5'- GAGGTGGATGGGTAGTAG -3'	266 pb
8	5'- GACCTGATTTCTTACTGCCT -3'	5'- TCTCCTCCACCCTTCTT -3'	219 pb
9	5'- GGAGACCAAGGGTGCAGTAT -3'	5'- GCCCAATTGCAGGTAAAAC -3'	233 pb
10	5'- GGTACTTGAAGTGCAGTTTCT -3'	5'- CAGCTGCCTTTGACCATGAA -3'	344 pb
11	5'- CCAGCCTTAGGCCCTTCAAA -3'	5'- TGTCAGTGGGGAACAAGAA -3'	209 pb

Tabla 12. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de cada exón de BARD1 y tamaño del fragmento que generan.

BARD1

EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENIDO	Tamaño amplicón
1	5'- ACAGTCGCGCCGCGCTCGA -3'	5'- CAGAACTGTGCGACCCGTG -3'	108 pb
2	5'- AGATGTTTATCTAACAATGACTC -3'	5'- AGTTGTAATATACATCAAACC -3'	147 pb
3	5'- ATTCTGCTGAATGGGTTGCTT -3'	5'- TAACTAAGAGAGATAGGGATAG -3'	227 pb
4A	5'- GGAGCTCCATGTGGGAGCAA -3'	5'- AACATCTGCAGGAGGACTTGG -3'	271 pb
4B	5'- GGTACACCACCTTCTACATT -3'	5'- TCTGAGATGGTATTTTCAGAGT -3'	170 pb
5	5'- TGCTTTTAAATTTCCATTTTGTTCC -3'	5'- AAGAAGTGTAAAACACAGAAAGA -3'	164 pb
6	5'- TGCTCTTTCTTATCACTTCTTTC -3'	5'- CTTGACTCAAGAATATAGGTCC -3'	272 pb
7	5'- TTGAGTCGAGTCACACATTTGA -3'	5'- CTATTATGTTCTTTCATAACCA -3'	234 pb
8A	5'- TAATGTCTTTGTCTAGTCGTCTAA -3'	5'- GGTAGTTCTCCAAAAGGATCA -3'	264 pb
8B	5'- TAATGTCTTTGTCTAGTCGTCTAA -3'	5'- TTCTGAAGACAGCCCACTGC -3'	124 pb
9	5'- GAGTTATAAGAAGCAGGCCAA -3'	5'- ATTTCTAATTCTCTCAAATCCAA -3'	200 pb
10	5'- TAGTGCTCACTTGATACTTAGT -3'	5'- CATAATAAGAACAATGAAAGTTGT -3'	188 pb
11	5'- TTGATCTGCCTTTAACAATG -3'	5'- GCCCTGCCGAACCCTCTC -3'	297 pb

Tabla 13. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de cada exón de PALB2 y tamaño del fragmento que generan.

PALB2

EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENIDO	Tamaño amplicón
1	5'- AGGCCGAATGGTGGATTTA -3'	5'- GACTGCCGAGGACACAAAG -3'	331 pb
2-3	5'- CCTCTGACTCCACCTTTCCA -3'	5'- CCTGGGAAATGAATAATAAGCA -3'	488 pb
4A	5'- TCATCTGCCTGAATGAAATG -3'	5'- TGGTTCTGGAGAATCTGGAAG -3'	620 pb
4B	5'- GCAAAAATCCTGCTAGATCACC -3'	5'- TGGTTTTTCATTTGCTGGTAAGT -3'	561 pb

4C	5'- CCAACTGCCACAAGTTCTAA -3'	5'- TGAAGTGGTTGCCTGTGC -3'	568 pb
4D	5'- TCCAATGAGGAACTGACCA -3'	5'- CAGACGTAAGCCACCACACT -3'	534 pb
5A	5'- TTGTCTGTTTTGTTGGGTTTTG -3'	5'- GCGCAACCGTATTTAAAGGA -3'	586 pb
5B	5'- AGACGGGCTTTTCTTCATC -3'	5'- AGGCATTTCATTCCTTCAGAG -3'	559 pb
6	5'- AGTGGGTAATGCAGGCAGAC -3'	5'- TGAAGTGAATTCCTTTTCAGTTCATT -3'	213 pb
7	5'- TGCTTGCATAAAACAGCACT -3'	5'- TGGTAAGCTGCCCATCTACA -3'	293 pb
8	5'- TGGAAAATCTGGATTAACAAAAA -3'	5'- TGCACCTAAAACCAGCTGACA -3'	221 pb
9	5'- ATTAAGGTTACTCCTCACATCAC -3'	5'- CCCAAGTCTCTGAAACCTGT -3'	287 pb
10	5'- CCTAGAGACTGCTTAGTGCAA -3'	5'- TTCACAACAACCTGTAAAATTAG -3'	250 pb
11	5'- TTTTCTGAATACTGGTTTGTGGGA -3'	5'- CGGGGAAGGTTTGTTCATTA -3'	244 pb
12	5'- TGCCAGATCTTTATTTTCTGA -3'	5'- TGTGTTTGCACAGTGCCTTT -3'	281 pb
13	5'- TTGGGAACATGGTTTTGACC -3'	5'- TTGCCATTTGAAGCTTTATG -3'	657 pb

Tabla 14. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de cada exón de RAD51C y tamaño del fragmento que generan.

RAD51C

EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	Tamaño amplicón
1	5'- TCCGCTTACGTCTGACGTC -3'	5'- AGGCGAGAGAACGAAGACTG -3'	303 pb
2	5'- AGACAATCGATTATCATGTTAC -3'	5'- TTGGTTTCTGACGATAGTAC -3'	414 pb
3	5'- ATTTCTGTTGCCTTGGGGAG -3'	5'- AATGGAGTGTGCTGAGGTC -3'	388 pb
4	5'- TGCCAATACATCCAACAGG -3'	5'- GTAGGTCAAGGAAGGAAGAG -3'	322 pb
5	5'- CAAATCTAATATTATCTCTTCTG -3'	5'- CGCTATTTTACATTTCTAGAC -3'	244 pb
6	5'- CAATCTTGGCCAGACTGGTC -3'	5'- AACGGTACTGTGCTTAGTGC -3'	290 pb
7	5'- TTCCAGGTTTTTGAAGCAAG -3'	5'- TAGGTGATATCAGACAAGGC -3'	345 pb
8	5'- ATAATGAGTTTGGTCATCTG -3'	5'- CTCCTTAGATAATTACCGCCC -3'	199 pb
9	5'- CTGGCCCTAGAATAAAGTAG -3'	5'- GGTAACAAGTCCACTTGTAC -3'	286 pb

Tabla 15. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de cada exón de BRIP1 y tamaño del fragmento que generan.

BRIP1

EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	Tamaño amplicón
2	5'- TTCTTTGTAAGGCGTGTCTCAA -3'	5'- ATACTCAATGTACTTTATGGGTCA -3'	243 pb
3	5'- TTGTTGTGTTCCCTGGAGTG -3'	5'- GACAGCATGGCTGAACCAGT -3'	325 pb
4	5'- CTGGGTGAAGCTGGGCTGTAG -3'	5'- CAACTGACCCAGGCAAAATA -3'	281 pb
5	5'- AAGCCTTACATCCTGGTTCC -3'	5'- CTAAGTGGGTTATTTACTGCCAAT -3'	254 pb
6	5'- GAGCTGTTTTGGCCTTTGAG -3'	5'- TTCCTTCTTAAAACTGAACAATGG -3'	239 pb
7	5'- TTCCATGTGAGGTTTGATAACG -3'	5'- GCAGTTAATTTGATTTTCCGAAG -3'	481 pb
8	5'- GCCTTGTGGCTTTAATGATG -3'	5'- CATCTCCATGAGTAGGAAGAAGGT -3'	373 pb
9	5'- TGAAATATCTTGCTGCTGTTG -3'	5'- TTTTTCATATAAAGGCAGCACA -3'	321 pb
10	5'- GATCAACGCATGACAATAATGA -3'	5'- AATTCATAAATACGTTTCACAGGT -3'	270 pb
11	5'- CCCTCCCAACCCTCTATAC -3'	5'- TGCTAGCATCCAATTAGGCTAT -3'	258 pb
12	5'- TGGGAAGGTACCAGCTCTTT -3'	5'- TGCTGGTACTGAGCAAGAAGAC -3'	333 pb
13	5'- TCAGACTCTAGACTCAAGCGAT -3'	5'- TTAAGTGTGGCACTTCAGG -3'	364 pb
14	5'- CATGCCTTTTTCAGGCATAA -3'	5'- TTGCCTTACCCTAGGAAGC -3'	318 pb
15	5'- GCCGTAGTCACATTGGCTTA -3'	5'- TTTTCACCAGACCATGAAATAA -3'	270 pb
16	5'- TTCTGAGAAATTTGGATATGCTTTT -3'	5'- TGCTGAAAGACTGCACAATG -3'	319 pb
17	5'- TTGAGATCACACAGCTGATTAGTTA -3'	5'- CCAGTTCCTATGTTCCAGTT -3'	278 pb
18	5'- CTGTCCCACTGGAAAAGTGG -3'	5'- TCTGCTGTGAAAAGTGTGCTT -3'	297 pb
19	5'- GGTTACTTCACTAGAAAAGCAAGTG -3'	5'- TCAAAGGTAATGGGAAGAACTTT -3'	456 pb
20A	5'- GCAATTATGTTAGCTAGGAGCAGA -3'	5'- TCAAATCTCTATTTGAAGTGGACTG -3'	516 pb
20B	5'- TGAACATCCGCTCTGTTCTG -3'	5'- TGCAATCCTCAGCTTCACT -3'	305 pb
20C	5'- AACAAATTCAGATTGCATTTTAGC -3'	5'- GAGTTTAAACATAAGCATGATGAC -3'	328 pb

Tabla 16. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de cada exón de CHEK2 y tamaño del fragmento que generan.

CHEK2

EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	Tamaño amplicón
2-3	5'- AACAGCCCTCTGATGCATGC -3'	5'- TTCCTCCTATGAGAGAGTGG -3'	256 pb
10	5'- GCAAGTTCAACATTATCCCTTTT -3'	5'- ATCACCTCCTACCAGTCTGTGC -3'	245 pb

En la mayor parte de los casos, la amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25 μ L, empleando 10 μ l de *MasterMix 5'Prime Eppendorf*[®] (contiene *Taq Polymerase*, KCl, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Mg²⁺ y el detergente *Igepal*[®]-CA360), 10 μ L de agua libre de nucleasas, 1 μ L de cada oligonucleótido cebador (sentido y anti-

sentido) y 3 μL de ADN obtenido por el método anteriormente descrito (concentración 0,1-0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En la figura 23 se describen los programas de amplificación empleados para este tipo de reacción de PCR.

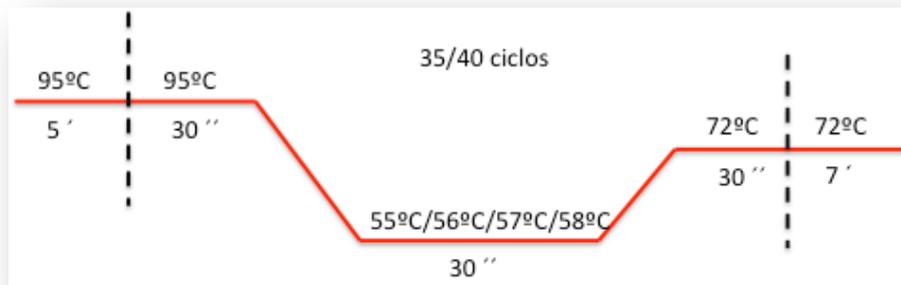


Figura 23. Programas de amplificación empleados para los genes ERCC4 (excepto exón 7), ABRAXAS (excepto exón 1), PALB2, RAD51C, TP53 y BARD1. ERCC4: 55°C como temperatura de anillamiento y 35 ciclos; ABRAXAS: 58°C como temperatura de anillamiento y 35 ciclos; PALB2: 55°C como temperatura de anillamiento (56°C para los exones 4C y 4D), 94°C como temperatura de desnaturalización y 35 ciclos; RAD51C: 57°C como temperatura de anillamiento, 94°C como temperatura de desnaturalización y 35 ciclos (exón 5 añadir 2 μL de MgCl_2 adicionales y exón 8 añadir 0,5 μL de DMSO adicionales); TP53: 58°C como temperatura de anillamiento y 40 ciclos; BARD1: 55°C como temperatura de anillamiento y 35 ciclos; BRIP1 exón 14: 58°C como temperatura de anillamiento y 35 ciclos (2 μL de MgCl_2 adicionales).

La amplificación del exón 7 de ERCC4, el exón 1 de ABRAXAS y los exones 2-3 y 10 de CHEK2 se llevó a cabo con el sistema *GoTaq[®] Hot Start Polymerase* (Promega). Para amplificar el exón 7 de ERCC4 y el exón 1 de ABRAXAS, se emplearon, en un volumen final de 25 μL , 5 μL de 5X *Colorless GoTaq[®] Flexi Buffer*, 3 μL de MgCl_2 25 mM, 0,5 μL dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,125 μL de *GoTaq[®] Hot Start Polymerase* (5u/ μL), 1,5 μL de cada oligonucleótido cebador (sentido y antisentido), 10,375 μL de agua libre de nucleasas y 3 μL de ADN obtenido por el método anteriormente descrito (concentración 0,1-0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En el caso de los exones 2-3 y 10 de CHEK2, se empleó un volumen final de 20 μL , constituido por 4 μL de 5X *Colorless GoTaq[®] Flexi Buffer*, 1/1,1 μL de MgCl_2 25 mM, 0,4 μL dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,25/0,2 μL de *GoTaq[®] Hot Start Polymerase* (5u/ μL), 1/0,75 μL de cada oligonucleótido cebador (sentido y antisentido), 9,35/9,8 μL de agua

libre de nucleasas y 3 μL de ADN obtenido por el método anteriormente descrito (concentración 0,1-0,2 $\mu\text{g/mL}$).

En la figura 24 se describen los programas de amplificación empleados para los exones 7 y 1 de ERCC4 y ABRAXAS respectivamente.

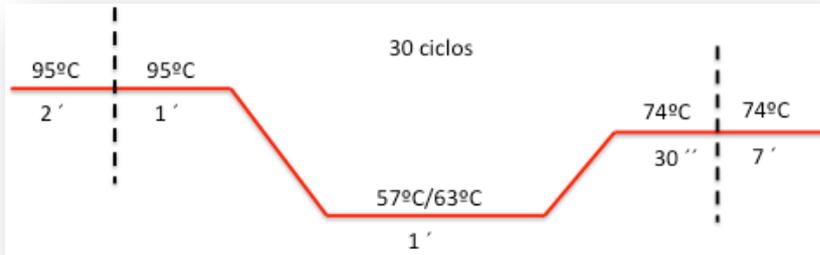


Figura 24. Programas de amplificación empleados para los 7 y 1 de ERCC4 y ABRAXAS respectivamente. 57°C: Exón 7 de ERCC4; 63°C: Exón 1 de ABRAXAS.

En las figuras 25 y 26 se describen los programas de amplificación empleados para los exones 2-3 y 10 del gen CHEK2.

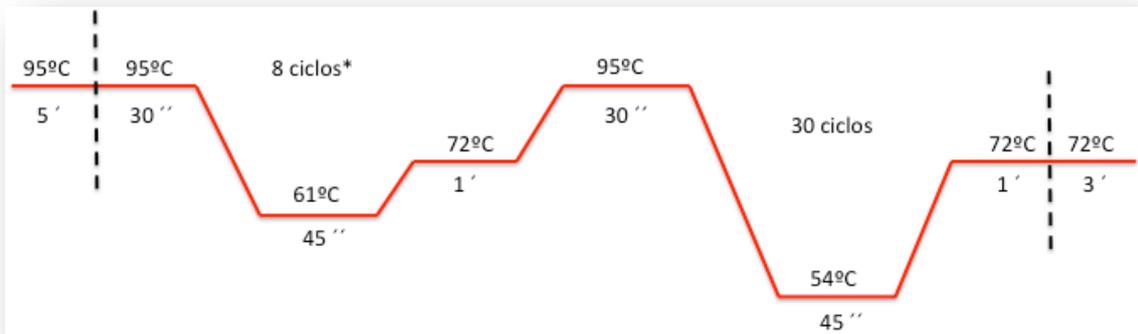


Figura 25. Programa de amplificación del fragmento 2-3 del gen CHEK2. *la temperatura disminuye 1°C en cada ciclo

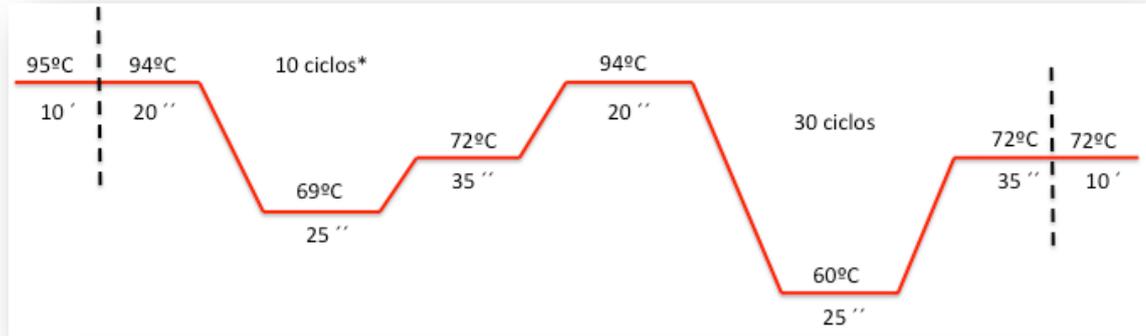


Figura 26. Programa de amplificación del exón 10 del gen CHEK2. *la temperatura disminuye 1°C en cada ciclo.

La amplificación de los exones del gen BRIP1 (excepto el exón 14) se llevo a cabo mediante el sistema *AmpliTaq Gold*[®] de *Applied Biosystems* (Roche). En un volumen final de 25 μ L se emplearon, 2,5 μ L de GeneAmp 10X PCR Buffer II, 2,5 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0,4 μ L de *AmpliTaq DNA Polymerase*, 1 μ L dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 μ L de cada oligonucleótido cebador (sentido y antisentido), 14,6 μ L de agua libres de nucleasas y 3 μ L de ADN obtenido por el método anteriormente descrito (concentración 0,1-0,2 μ g/mL).

En la figura 27 se describen los programas de amplificación empleados para la amplificación de los genes BRIP1 y CHEK2.

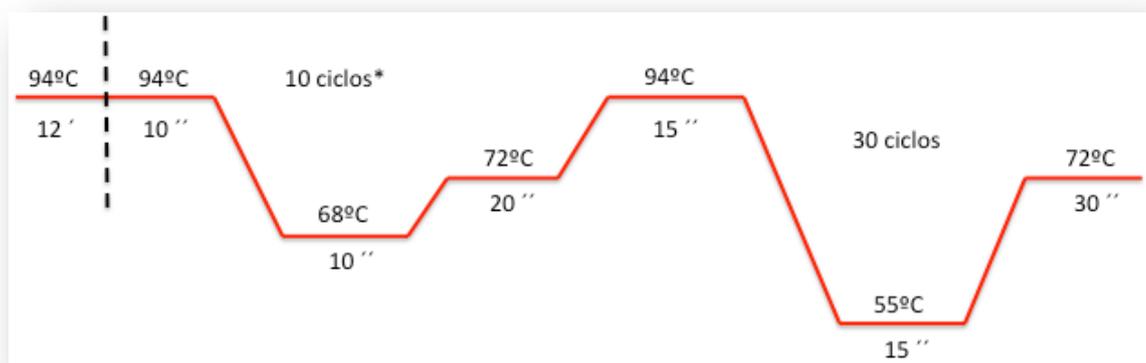


Figura 27. Programa de amplificación de los exones de BRIP1 (excepto el exón 14). *la temperatura disminuye 1,5°C en cada ciclo.

4. Electroforesis en gel de agarosa

El tamaño del producto amplificado se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa preparados al 2% con tampón TBE (Tris 0.044 M; ácido bórico 0.044 M; EDTA 1.0mM pH= 8,3) y teñido con bromuro de etidio. Las muestras migraron en paralelo a un marcador de tamaño de DNA derivado del DNA del fago Φ X-174 cortado por la endonucleasa Hae III. Los fragmentos que esta endonucleasa genera en el DNA del fago Φ X-174 se corresponden con los siguientes tamaños: 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.072 Kb. La electroforesis se llevó a cabo con un potencial constante de 120 voltios durante 40 minutos.

Para la monitorización de la electroforesis, el DNA se mezcló con dos colorantes incorporados al tampón de carga: el xileno cianol, que migra dentro del rango de los fragmentos de 5 Kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra con los fragmentos de 0.5 Kb.

5. Análisis de los fragmentos amplificados por PCR mediante CSGE (Electroforesis en gel sensible a la conformación)

Los fragmentos amplificados fueron sometidos a un análisis por CGSE siguiendo la técnica descrita por Orita, con algunas modificaciones (Orita y coll., 1989).

Esta técnica requiere una desnaturalización previa de los fragmentos de ADN amplificados por PCR a 95°C y una lenta re-naturalización posterior que permite la formación de heterodúplex (combinación entre una hebra de ADN mutada y otra hebra de ADN no mutada) y homodúplex en el caso de los individuos heterocigotos; y homodúplex en individuos portadores de una mutación en homocigosis o individuos *wild type* (Figura 28). Heterodúplex y homodúplex presentan un patrón de migración diferente en una electroforesis en un gel de acrilamida.

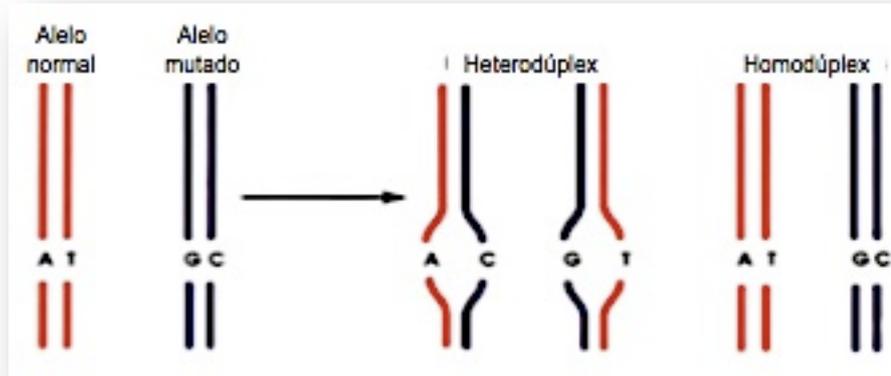


Figura 28. Formación de heterodúplex tras la desnaturalización y posterior re-naturalización del producto de PCR en un individuo heterocigoto.

Los fragmentos amplificados se separaron en geles de MDE TM 2X (AT Biochem, Inc. USA), un polímero de acrilamida modificado derivado del vinilo. Se utilizaron las siguientes cantidades para preparar cada gel:

- Agua destilada: 7.705mL
- Formamida 99%: 5.98mL
- Etilenglicol 99%: 4.025mL
- TBE 10X: 2.415mL
- MDE TM 2X: 20.125mL
- TEMED (N, N, N, N' Tetrametilendiamina): 36.8 μ L
- APS 25% (Persulfato de amonio): 138 μ L

La electroforesis se llevó a cabo a 180 voltios durante aproximadamente 21 horas (el tiempo varía dependiendo del tamaño del fragmento de PCR).

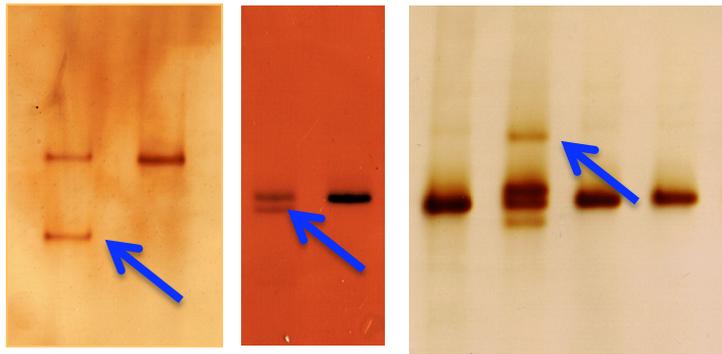


Figura 29. Ejemplo de patrones anómalos observados mediante la técnica CSGE.

El gel fue teñido con nitrato de plata. Para ello se utilizó un kit comercial ADN Silver Staining Kit de Amershan Pharmacia®, con un volumen de 250mL, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Esta técnica fue utilizada de forma rutinaria para el rastreo de mutaciones en los genes BRCA1, BRCA2, PALB2, BRIP1, RAD51C y BARD1.

6. Análisis de grandes reordenamientos genómicos: MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Para el estudio de grandes pérdidas/amplificaciones genómicas de los genes BRCA1 y BRCA2 se empleó la técnica de amplificación por PCR multiplex dependiente de ligación (MLPA). Es un método empleado para establecer el número de copias existente hasta en 45 secuencias de ADN en una única reacción. Fue descrito por Schouten en 2002 y consta de cuatro etapas: desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación (Schouten et al., 2002) (Figura 30).

En esta técnica consta de dos sondas diferentes, específicas y adyacentes para cada exón. Cada una de las sondas lleva incorporado uno de los oligonucleótidos universales empleados para la amplificación final de los fragmentos. Con ello se reduce la inespecificidad de la técnica, puesto que es imprescindible que ambas sondas reconozcan las regiones de unión para que se lleve a cabo la amplificación.

En un primer paso, la mezcla de las sondas de MLPA se añade al ADN genómico desnaturizado. Las dos partes de la sonda hibridan con secuencias diana adyacentes y las sondas se ligan mediante una enzima ligasa termoestable.

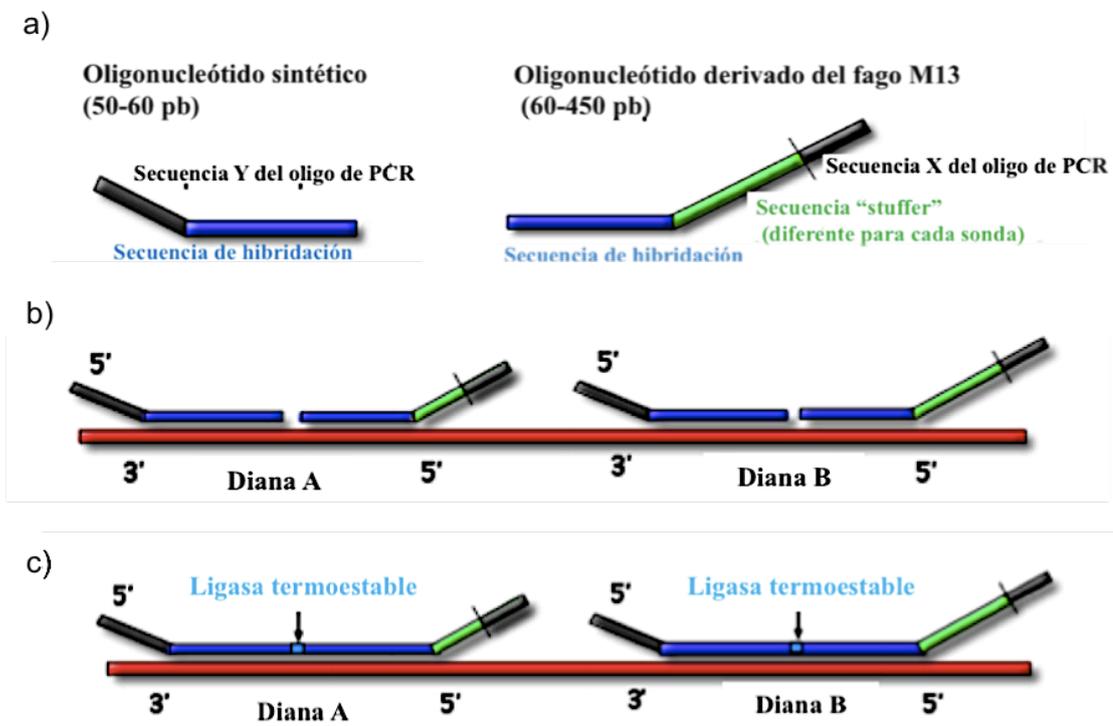


Figura 30. a) esquema de las sondas de MLPA, b) etapa de hibridación de las sondas, c) etapa de ligación de las sondas.

Para amplificar las sondas ligadas se emplea una pareja de oligonucleótidos universales marcadas con el fluorocromo FAM, dando lugar a tantos productos de amplificación como sondas empleadas. Estos productos se someten a cromatografía capilar y el resultado se visualiza en forma de electroferograma.

El estudio del gen BRCA1 se llevó a cabo empleando los reactivos del kit comercial SALSA MLPA KIT P002-c2 BRCA1 (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). El reactivo contiene 27 sondas para los 24 exones de BRCA1 salvo el exón 4. Para los exones 1, 11 y 13 existen dos sondas. La mezcla consta de 34 sondas diferentes, cuyos productos de amplificación varían entre las 127 y 454 pb, así como 7 fragmentos control que generan productos menores de 130 pb. La diferencia entre productos de amplificación consecutivos es de 6 a 9 pb..

Por otro lado, la mezcla de sondas contiene cuatro fragmentos control “DQ” (*DNA quantity*) que dan lugar a productos de amplificación de 64, 70, 76, y 82 pb. Estos fragmentos sirven de control, ya que serán más evidentes si la cantidad de ADN de nuestras muestras es muy baja. Estos fragmentos no requieren una reacción de ligación para ser amplificados, por lo que son visibles incluso cuando falla la etapa de ligación. Además, en la mezcla encontramos otros fragmentos control “DD” (*DNA denaturation*) de 88, 92 y 96 pb, que consisten en 2 sondas sintéticas y cuyo propósito es avisarnos de que el ADN no se ha desnaturalizado por completo: el fragmento de 88 pb y el de 96 pb son específicos de secuencias que se localizan en islas CpG muy difíciles de desnaturalizar. Si los productos de amplificación de ADN estos son mucho menores que los de 92 y 127-454 pb, entonces la desnaturalización del de nuestras muestras puede haber sido incompleta y nuestros resultados poco fiables.

En la tabla 17 se recogen las sondas utilizadas para la detección de grandes reordenamientos en el gen BRCA1.

Tabla 17. Sondas de MLPA para el gen BRCA1.

Nombre de la sonda	Longitud	Posición en el gen de las sondas internas	Posición cromosómica de las sondas externas	Localización inicio	Localización fin
Control probe 00797-L00093	127		05q31.1	132037612	132037671
Control probe 06452-L05978	136		06p22.2	24253896	24253960
BRCA1 probe 00763-L00268	148	1a		38530812	38530870
BRCA1 probe 00764-L00269	157	1b		38530571	38530629
BRCA1 probe 00765-L00270	166	2		38529585	38529649
BRCA1 probe 00826-L00341	175	3		38521268	38521329
BRCA1 probe 00767-L00272	184	5		38512011	38512075
Control probe 02946-L03265	198		07q31.2	116931557	116931634
BRCA1 probe 00827-L00342	208	6		38510430	38510497
BRCA1 probe 00769-L00274	216	7		38509662	38509723
BRCA1 probe 01004-L00569	226	8		38505340	38505407
BRCA1 probe 01005-L00581	236	9		38502751	38502832
BRCA1 probe 00772-L00277	244	10		38501402	38501466
Control probe 00518-L00098	256		02q13	113249258	113249313
BRCA1 probe 00830-L00345	266	11		38500273	38500334
BRCA1 probe 00774-L00279	277	11		38497460	38497521
BRCA1 probe 00775-L00280	285	12		38496486	38496553
BRCA1 probe 02603-L02074	295	13		38488025	38488086
BRCA1 probe 00833-L00349	305	14		38482059	38482124

Control probe 00495-L00303	316		12p12.3	25152177	25152240
BRCA1 probe 00778-L00347	328	15		38479958	38480021
BRCA1 probe 00779-L00003	337	16		38476716	38476774
BRCA1 probe 00780-L00283	346	17		38473167	38473237
BRCA1 probe 00781-L00284	355	18		38469436	38469500
BRCA1 probe 00782-L00285	364	19		38468858	38468925
Control probe 00655-L00304	374		4q27	123596999	123597063
BRCA1 probe 00783-L00356	389	20		38462606	38462666
BRCA1 probe 00784-L12004	399	21		38456598	38456659
BRCA1 probe 00785-L00288	407	22		38454659	38454717
BRCA1 probe 00786-L00289	415	23		38453196	38453251
BRCA1 probe 02831-L13862	427	24		38450726	38450799
Control probe 00596-L00083	436		11p13	33837614	33837669
Control probe 04074-L03710	445		17q11.2	26581419	26581498
Control probe 00673-L00117	454		03p22.1	41241033	41241085
BRCA1 probe 11283-L12001	463	13		38487745	38487817

El estudio del gen BRCA2 se llevó a cabo empleando los reactivos del kit comercial SALSA MLPA KIT P045 BRCA2/CHEK2. Este kit contiene sondas para 25 de los 27 exones codificantes de BRCA2. Hay dos sondas para el exón 1 y el 11, y no hay sondas para los exones 5 y 23 ya que están muy próximos a los exones vecinos y/o son zonas muy ricas en adenina/timina. Como control, se añadieron 13 sondas para otros genes localizados en distintos cromosomas, dos de ellas en posiciones 5' y 3' del gen BRCA2.

Además, se incluyen tres sondas para el gen CHEK2. Una de ellas solo amplifica en caso de que esté presente la mutación 1100delC. Las otras dos indicarían si hay cambios en el número de copias del gen.

Las sondas tienen productos de amplificación entre 130 y 481 pb, así como 5 fragmentos control que dan lugar a productos de amplificación menores de 130 pb. La mezcla contiene cuatro fragmentos control "DQ" (*DNA quantity*) que dan lugar a productos de amplificación de 64, 70, 76, y 82 pb (igual que para BRCA1). Además, también contiene un producto de amplificación de 92 pb como control de la ligación.

En la tabla 18 se recogen los nombres, posición y longitud de las sondas.

Tabla 18. Sondas de MLPA para el gen BRCA2.

Nombre de la sonda	Longitud	Posición en el gen de las sondas internas	Posición cromosómica de las sondas externas	Localización inicio	Localización fin
Control probe 00797-L00463	130		05q31.1	132037612	132037671
BRCA2 probe 02283-L12281	137	1		31787593	31787655
BRCA2 probe 02285-L01776	148	1		31787801	31787866
BRCA2 probe 09297-L08066	154	14		31827123	31827203
Control probe 02143-L09586	160		13q13.1	31767521	31767582
BRCA2 probe 02486-L01985	166	2		31788599	31788665
BRCA2 probe 08898-L09587	172	3		31791539	31791614
BRCA2 probe 01599-L10642	178	3		31791362	31791438
Control probe 01217-L00694	184		04q35.2	187390325	187390398
BRCA2 probe 09812-L10643	191	23		31851892	31851969
BRCA2 probe 01600-L04671	197	4		31797209	31797282
BRCA2 probe 08265-L08128	202	7		31798677	31798748
Control probe 02333-L01826	211		12q23.2	101762243	101762310
BRCA2 probe 01602-L01184	220	8		31801290	31801362
BRCA2 probe 01603-L01185	229	9		31803119	31803195
Control probe 00517-L00097	238		02q13	113606702	113606757
BRCA2 probe 01604-L01186	247	10		31804736	31804806
BRCA2 probe 02279-L01770	256	11		31808425	31808498
Control probe 06800-L02040	265		22q12.1	27469904	27469971
BRCA2 probe 01606-L01188	274	11		31813228	31813304
BRCA2 probe 01607-L01189	283	12		31816481	31816557
Control probe 03018-L02458	292		12q13.13	50594518	50594580
BRCA2 probe 02280-L01771	301	13		31818973	31819043
BRCA2 probe 09809-L10257	310	5		31798240	31798321
BRCA2 probe 09296-L11090	319	27		31871035	31871101
BRCA2 probe 01610-L01192	326	15		31828641	31828711
BRCA2 probe 01611-L01193	337	16		31829982	31830055
BRCA2 probe 04585-L03983	346	6		31798360	31798436
BRCA2 probe 02281-L01772	355	17		31834744	31834814
BRCA2 probe 01613-L01195	364	18		31835565	31835641
Control probe 02667-L04984	373		11q22.3	107655436	107655500
BRCA2 probe 01614-L01196	382	19		31842558	31842628
BRCA2 probe 08266-L08129	391	20		31843090	31843161
CHEK2 probe 02579-L12282	400	10		27425855	27425926
BRCA2 probe 02069-L01970	409	21		31848828	31848903
BRCA2 probe 01617-L01199	418	22		31851548	31851618
Control probe 06942-L06522	427		11q12.3	61486331	61486392
BRCA2 probe 08267-L08130	436	24		31852214	31852283
BRCA2 probe 08268-L08131	445	25		31867023	31867097
Control probe 02144-L01619	454		13q13.1	31879392	31879462
BRCA2 probe 11984-L15346	463	26		31869059	31869132

BRCA2 probe 09293-L15678	476	27		31870386	31870454
Control probe 05028-L15679	486		02q32.2	189584681	189584754
CHEK2 probe 01772-L15680	495	12		27421827	27421904

El protocolo aplicado es el recomendado por el fabricante con ligeras modificaciones. Partimos de 100ng de ADN diluidos en ddH₂O hasta un volumen de 5µl. Se desnaturalizaron a 98°C durante 10 minutos y después se atemperaron a 25°C en un termociclador. Se añadió 1,5µl de mezcla de sondas SALSA (*SALSA Probemix*) y 1,5µl de tampón MLPA. Posteriormente, se incubaron un minuto a 95°C e, inmediatamente, a 60°C durante 16-20 horas (fase de desnaturalización e hibridación de las sondas).

Tras la incubación del ADN con las sondas durante 16 horas a 60°C, se redujo la temperatura del termociclador a 54°C y se añadió la mezcla de ligación que incluye dos tampones, ddH₂O y ligasa 65. Se incubó la muestra con la ligasa a 54°C durante 15 minutos y después se inactivó la enzima calentando la muestra 98°C durante cinco minutos (fase de ligación).

En la última fase del proceso (fase de amplificación) se lleva a cabo la amplificación del ADN mediante una reacción de PCR. La mezcla de PCR contenía *Taq Polimerasa SALSA*, tampón de dilución de la enzima, agua destilada y estéril y cebadores universales marcados con fluorocromo:

Sentido: 5' - *GGGTTCCCTAAGGGTTGGA – 3'

Anti-sentido: 5' - GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA – 3'

*Marcado con fluorocromo (FAM).

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

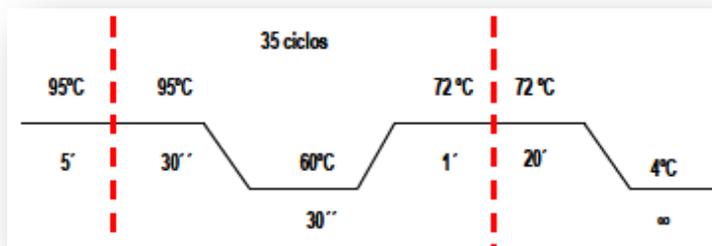


Figura 31. Programa estándar de amplificación de MLPA

Para comprobar la correcta amplificación, se cargaron 6 μl de producto de PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Para visualizar los resultados se preparó cada muestra empleando 1 μl del producto de PCR, 0,5 μl de marcador de tamaño marcado con ROX (GeneScan TM-500, Applied Biosystems) y 9 μl de formamida desionizada. Esta mezcla se analizó en un secuenciador ABI Prism 3700 (PE Applied Biosystems) y se visualizaron los resultados mediante el software GeneScan 3.5. El análisis se realiza mediante comparación del electroferograma obtenido de cada muestra y uno procedente de un control. La pérdida de una copia de la secuencia de un exón supone una reducción del 35-55% del área relativa del pico de amplificación. La ganancia de 2 a 3 copias de la secuencia estudiada da lugar a un incremento del 30-55% en el área relativa del pico de amplificación. La desviación estándar en el área de cada pico debe ser menor del 10% para todas las sondas. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

7. Cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (dHPLC).

Se utilizó el sistema WAVE® (*Transgenomic*, Gran Bretaña), basado en la cromatografía líquida de intercambio iónico en fase de reversa (Xiao & Oefner, 2001).

El sistema consta de una columna llena de una matriz no porosa, constituida por esferas de un polímero denominado poliestirenodivinilbenceno (fase estacionaria). Por su naturaleza, las esferas de la columna son electrostáticamente neutras e hidrofóbicas, por lo que no reaccionan con los ácidos nucleicos. Para facilitar la unión entre la fase estacionaria y el ADN, se añade acetato de trietilamonio (TEAA), que actúa como

molécula puente permitiendo la adsorción de los ácidos nucleicos a las esferas ya que es hidrofóbica (por lo que se une a la matriz) y tiene carga positiva (por lo que se une a los ácidos nucleicos).

Para poder realizar el análisis de ácidos nucleicos debe permitirse la formación de los homodúplex y heterodúplex mediante desnaturalización de las muestras a 95° C y renaturalización de las mismas. La resolución de las muestras se realiza aplicando una temperatura de desnaturalización específica para cada fragmento, que depende de la longitud y de la secuencia de bases del fragmento que se quiere analizar.

La fase móvil del sistema consiste en una combinación de soluciones que extraen el ADN de la columna: TEAA 0.1M y acetonitrilo al 25%. A concentraciones mayores de acetonitrilo, la interacción hidrofóbica entre la matriz y el ADN/TEAA se va debilitando y los fragmentos comienzan a ser eluidos de la columna, en primer lugar los heterodúplex (que presentan una unión más débil) y posteriormente los homodúplex (que quedan retenidos con más fuerza y, por tanto, son los últimos en salir de la columna) (Figura 32).

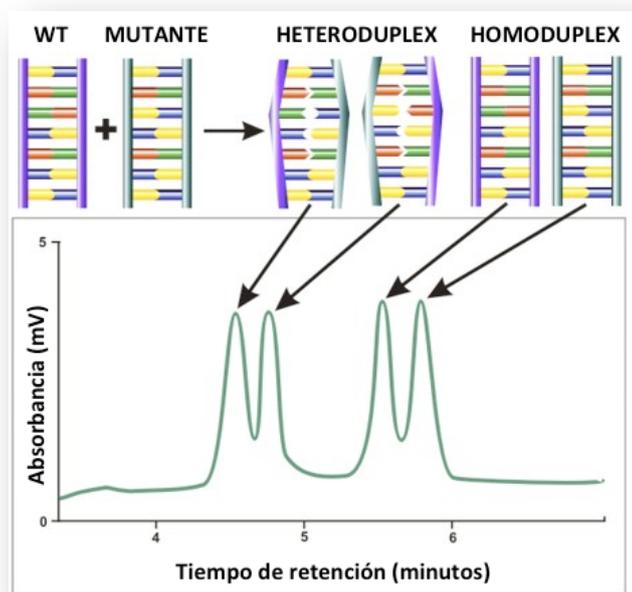


Figura 32. Patrón de picos de elución de los heterodúplex y homodúplex.

Los fragmentos de ADN eluidos pasan por un detector ultravioleta a medida que van saliendo de la columna, y el software de análisis (*Navigator*, Sistema *WAVE*,

Transgenomic) lo representa en forma de picos, correspondientes al tiempo que tarda cada fragmento en eluir a través de la columna, llamado también tiempo de retención.

Esta técnica fue utilizada para el análisis mutacional del gen ERCC4 y la detección de las variantes p.I157T (55,5 °C) y c.1100delC (54,5 °C) de los exones 3 y 10 del gen CHEK2.

Tabla 19. Temperaturas de desnaturalización empleadas en el análisis por dHPLC de los distintos exones del gen ERCC4.

Exón/Fragmento	T ^o C de desnaturalización
1	65,2
2	53,3
3	54,9
4	54,0
5	52,5
6	53,5
7	54,7
8A	56,9
8B	58,2
9	57,0
10	53,7
11A	58,5
11B	58,5

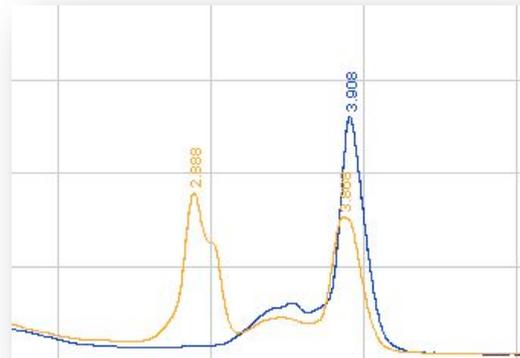


Figura 33. Cromatograma correspondiente al análisis de la mutación c.1905-28G>A y c.1905-35T>C del intrón 9 de ERCC4.

8. Secuenciación automática

Todos los productos de PCR analizados a través de CGSE y dHPLC que mostraron un patrón de migración/elución diferente fueron secuenciados.

La muestra amplificada de DNA se purificó con el fin de eliminar cualquier resto de cebadores, dNTPs o iones procedentes de la reacción, que pudieran inhibir la

reacción de secuenciación. Para la purificación se utilizó el kit comercial *High Pure Product Purification Kit*, Roche.

La secuenciación de los productos purificados se llevó a cabo en el secuenciador ABI 377 (*Applied Biosystems*) en el Servicio Central de Secuenciación de la Universidad de Salamanca y en el secuenciador ABI 3100 (*Applied Biosystems*) en la Unidad de Genómica o Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca).

9. Discriminación alélica

9.1. Mediante sondas TaqMan

En la PCR con sondas TaqMan o sondas de hidrólisis, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores utilizados para llevar a cabo la PCR con sondas TaqMan incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

Para la discriminación alélica hemos empleado sondas específicas marcadas con fluorocromos. Estas sondas de hibridación específica son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En la tabla 20 se describen los fluorocromos más empleados y sus espectros de excitación y emisión. En todos nuestros ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan los fluorocromos empleados fueron VIC y

FAM.

Tabla 20. Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la reacción de PCR con sondas TaqMan. Las sondas TaqMan que utilizamos en este trabajo están marcadas con VIC y FAM.

Fluorocromo	Máx λ_{abs} (nm)	Máx λ_{em} (nm)
Cascade blue (varios)	374-403	422-430
YOYO-1	491	509
Bodipy	503	512
Fluoresceína (FITC)	494	520
SYBR Green I	497	520
TOTO-1	513	532
FAM	495	535
Luciferina	430	540
VIC	538	554
JOE	525	555
HEX	530	560
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460, 502	526, 650
Cy5	643	667
Quantum Red/Red 670	480, 565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480, 565	613
Rojo Texas	596	615
Homodímero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la Taq Polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Figura 34).

El incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

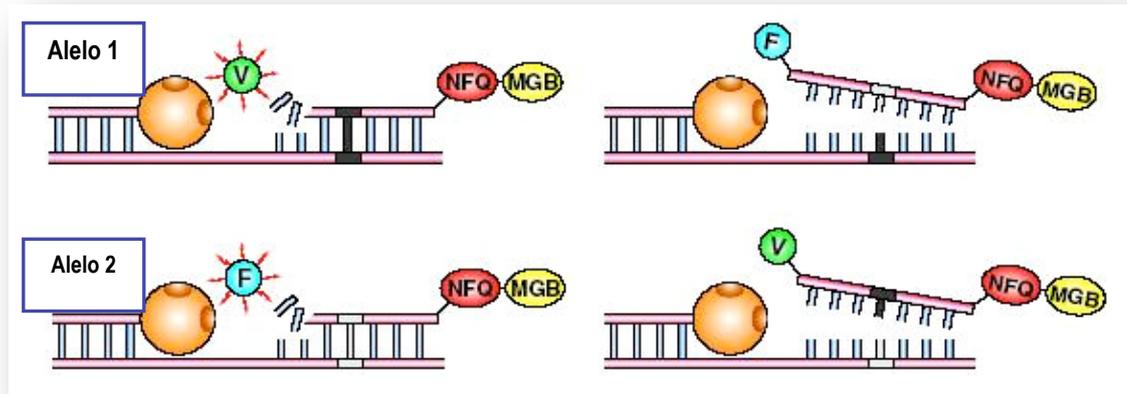


Figura 34. Mecanismo de la reacción PCR con sondas TaqMan. La esfera naranja representa la Taq polimerasa. V: colorante VIC. F: colorante FAM

Esta técnica permitió analizar rápida y eficazmente la distribución de las variantes alélicas de baja penetrancia de los genes BRCA1, FGFR2 y miR146 y la variante alélica de baja penetrancia de la región genómica 8q24 (Tabla 21)(Figura 35).

Tabla 21. Sondas de *Applied Biosystem* empleadas en la discriminación alélica de polimorfismos de baja penetrancia.

Gen/Región	Identificación	Sonda Applied Biosystem
BRCA1	rs16941	c_2287888_10
BRCA1	rs16942	c_2287889_20
BRCA1	rs799917	c_2287943_10
FGFR2	rs2981582	c_2917302_10
miR146	rs2910164	c_15946974_10
8q24	rs13281615	c_1332250_10

Nuestro estudio se realizó en el termociclador *StepOnePlus* de *Applied Biosystems* que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez (Figura 26). De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados.

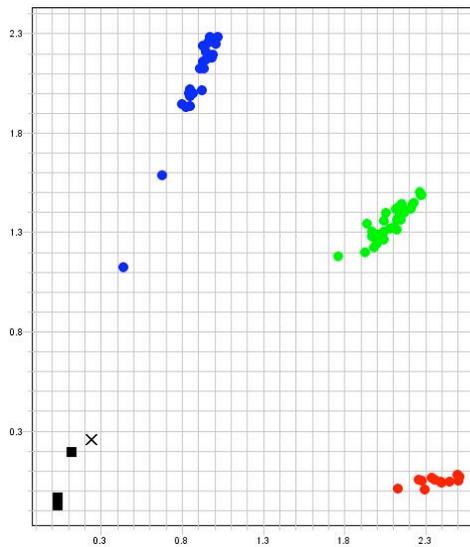


Figura 35. Discriminación alélica del polimorfismo C2731T (rs799917)

9.2. Mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

El estudio poblacional de los polimorfismos de los genes TP53 (rs1042522) y MDM2 (rs2279744) se realizó por discriminación alélica mediante RFLP.

Para detectar la variante p.Arg72Pro (c.215G>C; rs1042522) del gen TP53 amplificamos mediante PCR el exón 4 del gen, en el que se localiza esta variante. Los oligonucleótidos empleados para esta amplificación fueron:

Forward: 5' TCTACAGTCCCCCTTGCCGT 3'

Reverse: 5' CTGACCGTGCAAGTCACAGA 3'

El polimorfismo c.215G>C (p.Arg72Pro) se analizó mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción BstUI (Bsh1236I, Fermentas), que reconoce el sitio de corte **C**GCG, y posterior electroforesis en gel de agarosa al 3% generando tres patrones diferentes (Figura 36):

- Homocigoto CC (Pro/Pro): un fragmento de 291 pb.
- Homocigoto GG (Arg/Arg): dos fragmentos de 165 y 126 pb.
- Heterocigoto GC (Arg/Pro): tres fragmentos de 291, 165 y 126 pb.

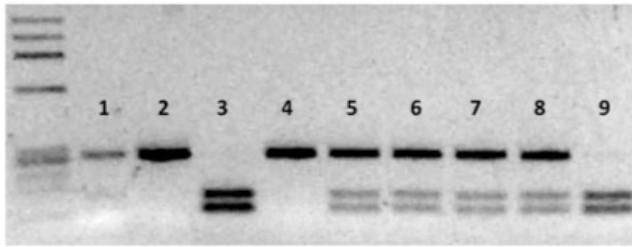


Figura 36. Análisis del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 mediante PCR-RFLP. Electroforesis del producto de digestión con la enzima Bsh1236I para el análisis del polimorfismo p.Arg72Pro. Carriles 1, 2, y 4: Homocigoto CC; Carriles 3 y 9: Homocigoto GG; Carriles 5, 6, 7 y 8: Heterocigoto GC

Para la detección de la variante c.-309T>G ubicada en la región promotora del gen MDM2, en primer lugar amplificamos la región empleando oligos específicos:

Forward: 5' GAGGTCTCCGCGGGAGTTC 3'

Reverse: 5'CGTGTCTGAACTTGACCAGC 3'

El polimorfismo c.-309T>G se analizó mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción MspAII (*BioLabs*), que reconoce el sitio de corte CMGCKG (siendo K=G o T; M=A o C), y posterior electroforesis en geles de agarosa al 3% generando tres patrones diferentes (Figura 37):

- Homocigoto TT: un fragmento de 190 pb.
- Homocigoto GG: dos fragmentos de 144 pb y 46 pb.
- Heterocigoto TG: tres fragmentos de 190 pb, 144 pb y 46 pb.

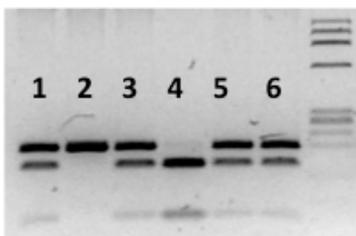


Figura 37. Análisis del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 mediante PCR-RFLP. Electroforesis del producto de digestión con la enzima MspAII para el análisis del polimorfismo c.-309T>G. Carril 2: Homocigoto TT; Carril 4: Homocigoto GG; Carriles 1, 3, 5 y 6: Heterocigoto TG.

10.Análisis estadístico

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de las variables estudiadas, calculando la proporción de pacientes en cada categoría.

La relación entre las distintas variables clínicas y moleculares se analizó mediante la elaboración de tablas de contingencia y el test χ^2 de Pearson. En los casos en los que la frecuencia de alguno de los grupos fue menor del 5%, se empleó el test exacto de Fisher.

En los estudios de asociación de polimorfismos, se analizó la distribución de genotipos entre pacientes y controles mediante el test χ^2 de Pearson o el test de Fisher. En aquellos polimorfismos en los que encontramos diferencias estadísticamente significativas, analizamos los modelos de herencia y realizamos una regresión logística multivariante para conocer el riesgo que puede generar la presencia de un determinado genotipo. Además se llevó a cabo un estudio de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos incluidos en el trabajo y un análisis multivariante de co-segregación de polimorfismos empleando la técnica de representación biplot, que permite la representación simultánea de individuos y variantes en el mismo espacio.

En todos los se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se observaron valores de P-valor < 0.05 .

El análisis de representación biplot fue realizado con el programa MultiBiplot (Vicente Villardon, 2010), los estudios de desequilibrio de ligamiento se llevaron a cabo con el programa SNPstats (Sole et al., 2006) y el resto de análisis fueron realizados con el paquete estadístico SPSS v.18.0.

11. Análisis bioinformático.

Para el análisis de la conservación interespecífica de las secuencia proteicas se empleó el programa informático ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), y la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>), que permiten el alineamiento de múltiples secuencias de DNA o proteínas, permitiendo ver las similitudes o diferencias entre las secuencias alineadas.

- **Estudios *in silico* de la patogenicidad de las mutaciones**

El estudio del comportamiento teórico de mutaciones *missense* de significado desconocido no descritas previamente se llevó a cabo mediante el empleo de tres programas informáticos:

- PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)
- PMut (<http://mmb.pcb.ub.es/PMut/>)
- SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>)

Se empleó el programa ESEfinder (<http://cb1.utdallas.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi>) para predecir de forma teórica el efecto de las mutaciones sobre el procesamiento del ARNm por unión de proteínas a su secuencia.

El estudio de simulación de la estructura secundaria de las proteínas con deleciones de aminoácidos sin cambios en la fase de lectura se realizó con el programa PSIPRED (*Protein Secondary Structure Prediction*) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

- **Bases de datos**

La búsqueda de mutaciones identificadas en este trabajo se realizó en diversas bases de datos pertenecientes a instituciones científicas, así como en publicaciones previas, con el fin de recabar información sobre su existencia, frecuencia de aparición o patogenicidad.

- PubMed (*U.S. National Library of Medicine*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)
- UniProt (*Universal Protein Resource*) (<http://www.uniprot.org/>)
- HGMD (*The Human Gene Mutation Database*) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)
- LOVD (*Leiden Open Variation Database*) (<http://www.lovd.nl/3.0/home>)
- UMD (*Universal Mutation Database*) (<http://www.umd.be/>)

- IARC TP53 database (<http://p53.iarc.fr/>)

- *Mismatch Repair Genes Variant Database*
(<http://www.med.mun.ca/mmrvariants/>)

RESULTADOS

Hemos estudiado 31 probandos de diferentes familias con cáncer de mama hereditario con 3 ó más familiares de 1º grado afectados. El análisis molecular de la región codificante de los genes BRCA1 y BRCA2 fue realizado por la Unidad de Consejo Genético en Cáncer Hereditario del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca previamente a este trabajo, no encontrándose mutaciones en ninguno de los pacientes incluidos en el mismo.

El análisis de grandes reordenamientos (pérdidas/amplificaciones) genómicos en los genes BRCA1 y BRCA2 mediante la técnica MLPA (Figura 38), no permitió identificar alteraciones, de forma que confirmamos que ninguno de los pacientes seleccionados para este estudio es portador de mutaciones patogénicas en BRCA1 o BRCA2.

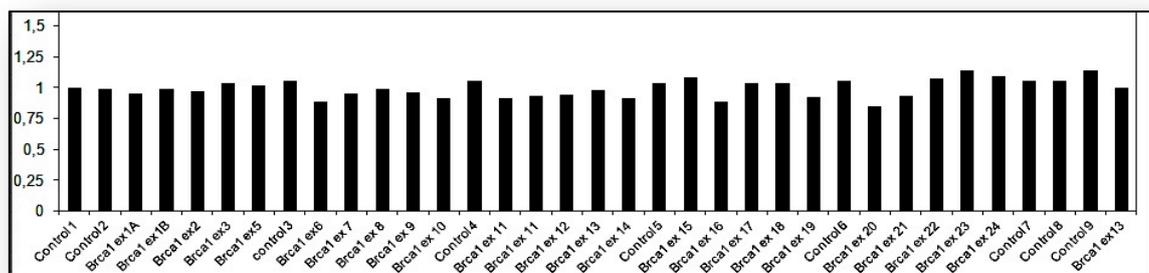


Figura 38. Análisis MLPA normal en el gen BRCA1.

• **ESTUDIO DE GENES QUE PREDISPONEN AL CÁNCER DE MAMA FAMILIAR**

El análisis molecular de la región codificante de los genes TP53, ABRAXAS, PALB2, BRIP1, RAD51C, BARD1, CHEK2 y ERCC4, en las 31 familias seleccionadas no ha permitido identificar mutaciones patogénicas que permitan explicar la alta tasa de incidencia de casos de cáncer de mama en dichas familias. No obstante, hemos identificado 50 mutaciones diferentes en todos los genes analizados, las cuales han sido catalogadas como variantes de significado desconocido o polimorfismos neutrales.

1. ANÁLISIS DEL GEN TP53

De las 13 mutaciones encontradas en el gen TP53, ninguna fue considerada como patogénica. De ellas, 10 aparecen identificadas como polimorfismos neutrales según datos de la IARC y 3 son de nueva descripción en este trabajo (Tabla 22).

Tabla 22. Mutaciones identificadas en el gen TP53.

Mutación	Cambio de aminoácido	Localización	Clasificación	Nº veces identificado
c.108G>A	p.Pro36Pro	ex 4	Polimorfismo silencioso	4
c.453C>T	p.Pro151Pro	ex 5	Polimorfismo silencioso	17
c.639A>G	p.Arg213Arg	ex 6	Polimorfismo silencioso	4
c.215C>G	p.Arg72Pro	ex 4	Variante <i>missense</i>	29
c.74+38C>G	-	IVS2	Polimorfismo Intrónico	8
c.75-80C>G*	-	IVS 2	Polimorfismo Intrónico	13
c.97-30C>A	-	IVS 3	Polimorfismo Intrónico	1
rs17878362	-	IVS 3	Polimorfismo Intrónico	13
c.560-40A>C*	-	IVS 5	Polimorfismo Intrónico	4
c.672+62A>G	-	IVS 6	Polimorfismo Intrónico	15
c.782+61T>A*	-	IVS 7	Polimorfismo Intrónico	13
c.993+12T>C	-	IVS 9	Polimorfismo Intrónico	5
c.1100+30A>T	-	IVS 10	Polimorfismo Intrónico	2

Las variantes identificadas con * son de nueva descripción.

En nuestro trabajo hemos encontrado la variante *missense*, p.Arg72Pro (Matlashewski et al., 1987), consecuencia de una transversión de guanina a citosina, en 29 familias. Esta mutación se asocia con un incremento en el riesgo de desarrollo

temprano de cáncer de mama en pacientes portadores de mutación en BRCA1 (Martin et al., 2003) y en pacientes con síndrome de Li-Fraumeni (Bougeard et al, 2006), ya que modifica la respuesta apoptótica de p53 (Thomas et al., 1999; Dumont et al., 2003; Pim et al., 2004; Toyama et al., 2007), modificando las expectativas de supervivencia (Bonafe et al., 2003; Tommiska et al., 2005) y de tiempo libre de enfermedad (Bonafe et al., 2003; Toyama et al., 2007).

Así mismo, hemos encontrado tres variantes intrónicas de nueva descripción, c.75-80C>G, c.560-40A>C y c.782+61T>A, ubicadas en los intrónes 2, 5 y 7, que hemos considerado polimorfismos no patogénicos por estar localizadas en zonas alejadas de los sitios clásicos de procesamiento.

2. ANÁLISIS DEL GEN ABRAXAS

El estudio del gen ABRAXAS nos permitió identificar 4 mutaciones, si bien ninguna fue considerada como patogénica. De ellas, tres son polimorfismos neutrales previamente identificados por otros grupos (<http://www.uniprot.org/>) y la cuarta es una mutación no descrita, de significado desconocido (Tabla 23).

Tabla 23. Mutaciones identificadas en el gen ABRAXAS.

Mutación	Cambio de aminoácido	Localización	Clasificación	Nº veces identificado
c.216-34G>A	-	IVS3	Polimorfismo intrónico	20
c.216-44T>C	-	IVS3	Polimorfismo intrónico	5
c.1117G>A	p.Asp373Asn	ex 9	Variante <i>missense</i>	1
c.826_828delGAG*	p.276delGlu	ex 9	Delección <i>in frame</i>	1

Las variantes identificadas con * son de nueva descripción.

La variante p.Asp373Asn (c.1117G>A) es una variante identificada previamente como polimorfismo no patogénico (Clark et al., 2003; Osorio et al., 2009; Novak et al.,

2009; <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6UWZ7#ref2>) de acuerdo a las frecuencias alélicas y genotípicas identificadas en pacientes con cáncer de mama y población control.

No obstante, en ninguno de los estudios previos se llevo a cabo un estudio bioinformático de predicción, de forma que decidimos realizar un estudio de predicción de patogenicidad, análisis filogenético de conservación de aminoácidos y predicción de conservación de los sitios de unión ESE.

El aminoácido de la posición 373 no se encuentra ubicado en ningún dominio conocido de la proteína ABRAXAS; además, el análisis filogenético de conservación de aminoácidos mostró que el aspártico de la posición 373 no se encuentra conservado en las diferentes especies analizadas (Figura 39C).

Los resultados de los programas de predicción de patogenicidad empleados para el análisis de esta variante no son concluyentes (Figura 39A).

Sin embargo, en el análisis de predicción mediante el programa ESEfinder, observamos la pérdida de un sitio ESE de unión, que puede afectar al procesamiento del ARNm y en definitiva, a la funcionalidad de la proteína (Figura 39B). Es necesario realizar estudios en el ARN para determinar su posible patogenicidad.

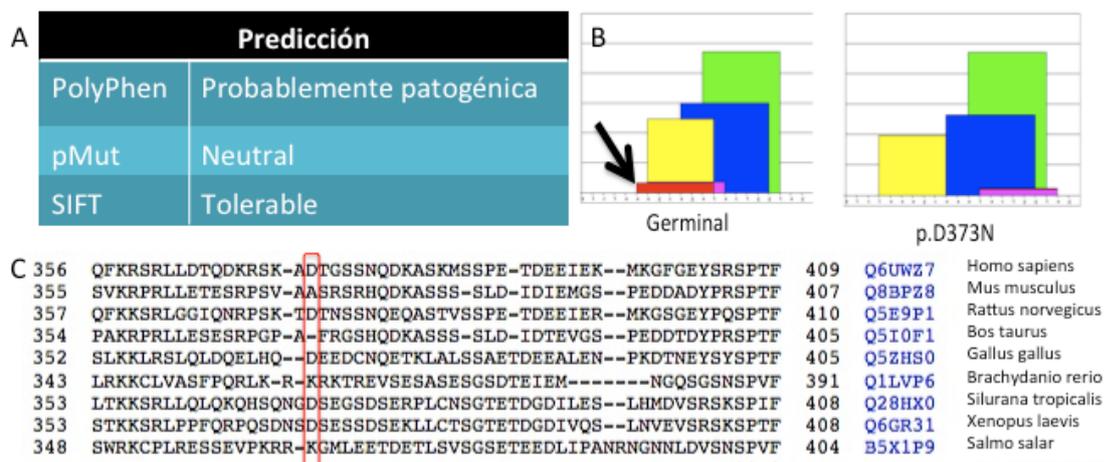


Figura 39. Estudio bioinformático de la variante c.1117G>A (p.D373N) del exón 9 del gen ABRAXAS. (A) Predicción de patogenicidad. (B) Análisis de alteración de sitios ESE. (C) Análisis de conservación evolutiva.

En nuestro trabajo hemos identificado una variante no descrita de significado desconocido en el exón 9 del gen ABRAXAS. Se trata de la variante c.826_828delGAG

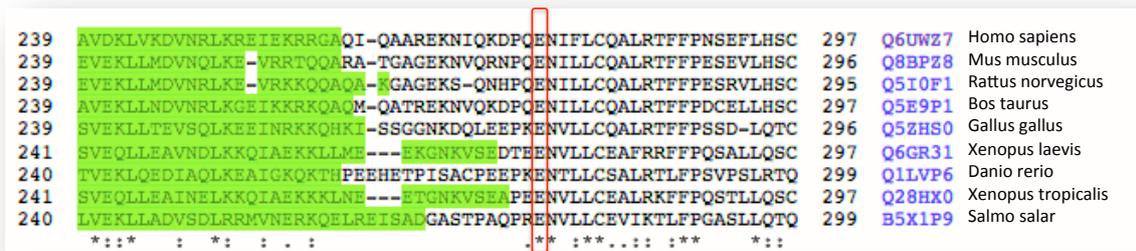


Figura 41. Estudio de conservación de aminoácidos de la proteína ABRAXAS. En el recuadro rojo vemos el glutámico de la posición 276, deletado con la mutación c.826_828delGAG. Marcado en verde el final del dominio *coiled-coil* de la proteína.

Estos datos no permiten determinar si la variante c.826_828delGAG altera la funcionalidad de la proteína. Serán necesarios más estudios para determinar con exactitud su implicación en la funcionalidad de la proteína y su posible patogenicidad.

3. ANÁLISIS DEL GEN PALB2

El estudio del gen PALB2 en las 31 familias nos permitió encontrar 7 mutaciones. De ellas, 6 son polimorfismos neutrales previamente identificados por otros grupos (Rahman et al., 2007; Foulkes et al., 2007; Erkko et al., 2007; Tischkowitz et al., 2007; <http://www.umd.be/>) y una es una mutación no descrita, c.640A>C (p.T214P) localizada en el exón 4, de significado desconocido (Tabla 24).

Tabla 24. Mutaciones identificadas en el gen PALB2.

Mutación	Cambio de aminoácido	Localización	Clasificación	Nº veces identificado
c.3300T>G	p.Thr1100Thr	ex 12	Polimorfismo silencioso	5
c.1010T>C	p.Leu337Ser	ex 4	Variante <i>missense</i>	1
c.1676A>G	p.Gln559Arg	ex 4	Variante <i>missense</i>	13
c.2014G>C	p.Glu672Gln	ex 5	Variante <i>missense</i>	6

c.2794G>A	p.Val932Met	ex 8	Variante <i>missense</i>	1
c.640A>C*	p.Thr214Pro	ex 4	Variante <i>missense</i>	1
c.212-58A>C	-	IVS3	Polimorfismo intrónico	4

Las variantes identificadas con * son de nueva descripción.

El aminoácido 214 no se encuentra localizado en ningún dominio conocido de la proteína PALB2; sin embargo, el análisis filogenético indica que la treonina de la posición 214 está muy conservada a lo largo de la evolución aunque el aminoácido Pro aparece en una de las especies incluidas en el estudio comparativo, lo que sugiere que no se trata de una mutación patogénica (Figura 42C).

Los resultados de los programas predictivos empleados para la predicción de patogenicidad de esta variante no son concluyentes (Figura 42A).

El análisis predictivo mediante el programa ESEfinder (Figura 42B) no muestra cambios en los sitios ESE, ni pérdida ni ganancia de sitios ESE, de forma que no podemos concluir que la variante c.640A>C (p.Thr214Pro) afecte al procesamiento del ARNm.

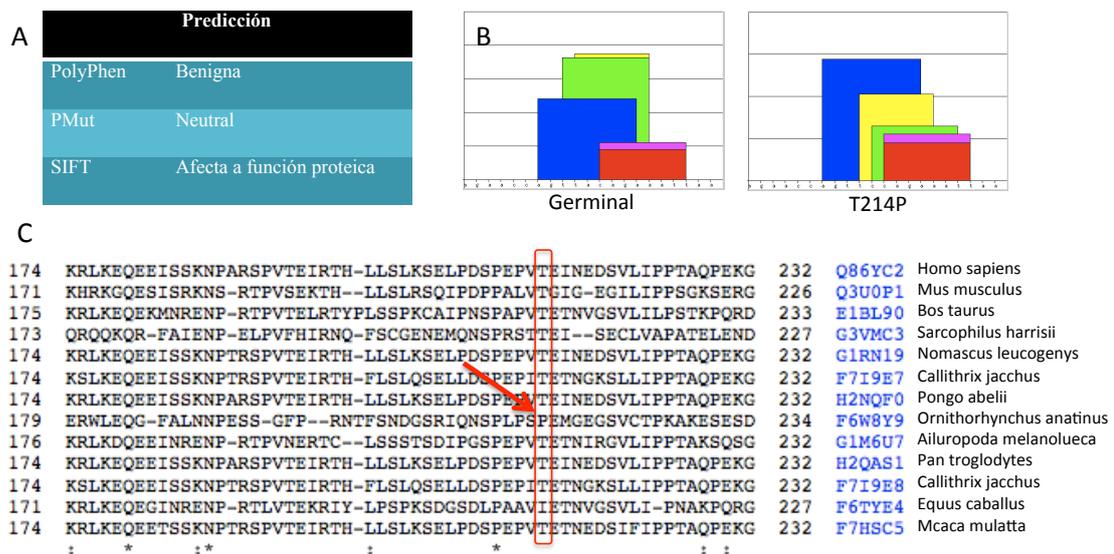


Figura 42. Estudio bioinformático de la variante de significado desconocido del exón 4 del gen PALB2, c.640A>C (p.Thr214Pro). (A) Predicción de patogenicidad. (B) Análisis de alteración de sitios ESE. (C) Análisis de conservación evolutiva.

4. ANÁLISIS DEL GEN RAD51C

El estudio del gen RAD51C permitió caracterizar tres mutaciones, dos polimorfismos neutrales de regiones intrónicas y una variante en la región 5'UTR previamente identificadas por otros grupos como variantes no patogénicas (Meindl et al., 2010; Zheng et al., 2010; Akbari et al., 2010) (Tabla 25).

Tabla 25. Mutaciones identificadas en el gen RAD51C.

Mutación	Cambio de aminoácido	Localización	Clasificación	Nº veces identificado
c.404+63_404+71dup9	-	IVS2	Polimorfismo intrónico	1
c.904+34T>C	-	IVS6	Polimorfismo intrónico	22
c.-26C>T	-	5'UTR	-	9

5. ANÁLISIS DEL GEN BARD1

El estudio del gen BARD1 mostró dos probandos portadores de mutación en este gen. Un polimorfismo silencioso en la región codificante y un polimorfismo intrónico previamente identificados por otros grupos como variantes no patogénicas (Guimenti et al., 2002; Ishitobi et al., 2003; Karppinen et al., 2004; Vahteristo et al., 2006) (Tabla 26).

Tabla 26. Mutaciones identificadas en el gen BARD1.

Mutación	Cambio de aminoácido	Localización	Clasificación	Nº veces identificado
c.1518T>C	p.His506His	ex 6	Polimorfismo silencioso	5
c.1315-19G>A	-	IVS4	Polimorfismo intrónico	8

6. ANÁLISIS DEL GEN BRIP1

El estudio del gen BRIP1 en las 31 familias incluidas en nuestro trabajo nos permitió identificar 6 mutaciones. De ellas, 5 son polimorfismos neutrales previamente identificados por otros grupos (Cantor et al., 2004; Rutter et al., 2003; Lewis et al., 2005; Seal et al., 2006) y una es una mutación no descrita, de significado desconocido (Tabla 27).

Tabla 27. Mutaciones identificadas en el gen BRIP1.

Mutación	Cambio de aminoácido	Localización	Clasificación	Nº veces identificado
c.3411T>C	p.Tyr1137Tyr	ex 20	Polimorfismo silencioso	17
c.2637G>A	p.Glu879Glu	ex 19	Polimorfismo silencioso	19
c.1616G>A	p.Arg539Lys	11	Variante <i>missense</i>	1
c.2755C>T	p.Pro919Ser	19	Variante <i>missense</i>	19
c.508-31C>G	-	IVS5	Polimorfismo intrónico	1
c.1935+22insT*	-	IVS13	Polimorfismo intrónico	16

Las variantes identificadas con * son de nueva descripción.

La variante p.Arg539Lys (c.1616G>A; rs199616792) localizada en el exón 11 del gen BRIP1, aparece identificada en la base de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), ubicada en el dominio helicasa de la proteína sin afectar a los motivos helicasa; sin embargo, hasta el momento no existen estudios bioinformáticos de predicción ni estudios funcionales por lo que procedimos a realizar un estudio bioinformático predictivo para determinar su patogenicidad (Figura 43).

El análisis predictivo mediante el programa ESEfinder no mostró cambios en los sitios ESE, ni pérdida ni ganancia de sitios ESE (Figura 43B). Los programas

predictivos empleados para determinar la posible patogenicidad de esta variante, coinciden en clasificarla como variante no patogénica (Figura 43A). El estudio de conservación evolutiva nos muestra que la arginina de la posición 539 del gen BRIP1 está muy conservada (Figura 43C); sin embargo, la presencia del alelo Lys en una de las especies incluidas en el estudio comparativo parece indicar que se trata de un polimorfismo, siendo necesario realizar un estudio poblacional.

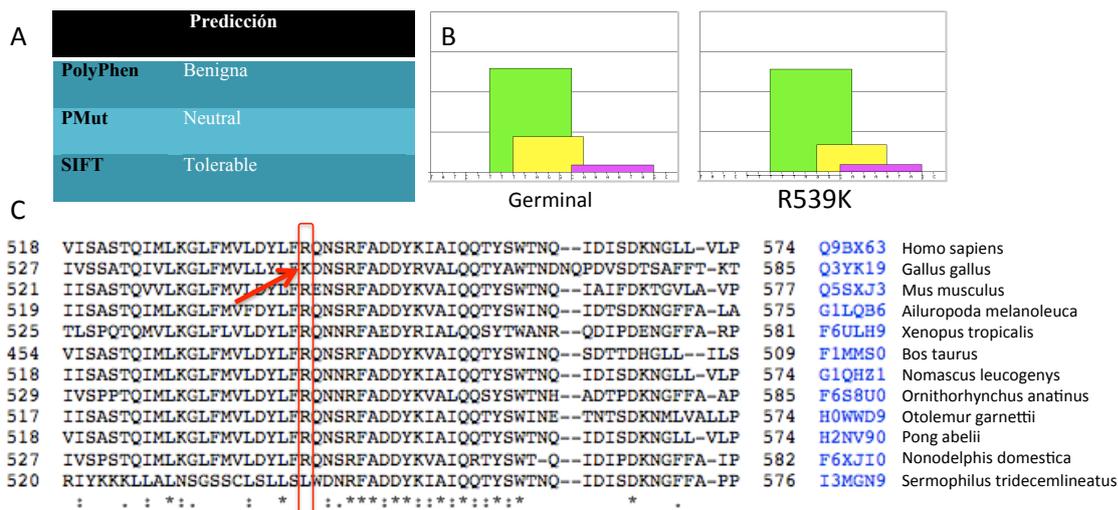


Figura 43. Estudio bioinformático de la variante p.Arg539Lys del exón 11 del gen BRIP1. (A) Predicción de patogenicidad. (B) Análisis de alteración de sitios ESE. (C) Análisis de conservación evolutiva.

Además, hemos identificado una variante intrónica de nueva descripción, c.1935+22insT, ubicada en el intrón 13, que hemos considerado como polimorfismo por estar localizada en zonas alejadas de los sitios clásicos de procesamiento.

7. ANÁLISIS DEL GEN CHEK2

El análisis del gen CHEK2 se centró en la identificación de las mutaciones, c.1100delC (exón 10) y p.Ile157Thr (exón 3), que se han descrito por otros grupos como implicadas en la modificación del riesgo de cáncer de mama (Meijers-Heijboer et al., 2003; Oldenburg et al., 2003; de Bock et al., 2004; The CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium, 2004; Nevanlinna et al., 2006; Weischer et al., 2007; Weischer et al., 2008).

No hemos identificado estas mutaciones en ninguna de las 31 familias incluidas en nuestro estudio.

8. ANÁLISIS DEL GEN ERCC4

El estudio del gen ERCC4 permitió identificar 19 mutaciones, de las que tres fueron consideradas polimorfismos silenciosos, cinco fueron consideradas mutaciones de cambio de aminoácido, una como variante de cambio de marco de lectura, nueve como polimorfismos intrónicos y una mutación en la región 5'UTR, la mayoría de ellas identificadas previamente por otros grupos (Shen et al., 1998; Fan et al., 1999; Smith et al., 2003; Lee et al., 2005; Jorgensen et al., 2007; Crew et al., 2007; Smith et al., 2008; Rajaraman et al., 2008; Han et al., 2009; Roberts et al., 2011; Shi et al., 2012). No obstante, no existe consenso en la clasificación de estas mutaciones como polimorfismos neutrales, por lo que decidimos realizar un estudio poblacional más amplio del gen ERCC4. Para ello, incrementamos el número de pacientes hasta 105 (con cáncer de mama hereditario, no portadores de mutación en BRCA1/2 y 3 ó mas familiares afectados) e introdujimos 50 controles sanos (Tabla 28).

Tabla 28. Mutaciones identificadas en el gen ERCC4.

Mutación	Cambio de aminoácido	Posición	Clasificación	Nº veces identificado (Pacientes Vs Controles)	
c.33C>T	p.Ala11Ala	ex 1	Polimorfismo silencioso	7 (6,67%)	2 (4%)
c.2505T>C	p.Ser835Ser	ex 11	Polimorfismo silencioso	50 (47,62%)	25 (50%)
c.2655G>A	p.Thr885Thr	ex 11	Polimorfismo silencioso	2 (1,9%)	2 (4%)
c.1244G>A	p.Arg415Gln	ex 8	Variante <i>missense</i>	26 (24,76%)	8 (16%)
c.1727G>C	p.Arg576Thr	ex 8	Variante <i>missense</i>	2 (1,9%)	0 (0%)
c.2624A>G	p.Glu875Gly	ex 11	Variante <i>missense</i>	3 (2,86%)	1 (2%)
c.207+11G>A	-	IVS1	Variante intrónica	64 (60,95%)	25 (50%)
c.207+49G>A	-	IVS1	Variante intrónica	11 (10,48%)	7 (14%)
c.974-71A>G	-	IVS5	Variante intrónica	1 (0,95%)	1 (2%)

c.974-57G>A	-	IVS5	Variante intrónica	1 (0,95%)	0 (0%)
c.1102+45A>G	-	IVS6	Variante intrónica	2 (1,9%)	0 (0%)
c.1905-35T>C	-	IVS9	Variante intrónica	73 (69,52%)	31 (62%)
c.1905-28G>A	-	IVS9	Variante intrónica	61 (58,1%)	23 (46%)
c.-30T>A	-	5'UTR	-	64 (60,95%)	15 (30%)
c.388+28A>G*	-	IVS2	Variante intrónica	0 (0%)	1 (2%)
c.974-6T>C*	-	IVS5	Variante intrónica	0 (0%)	1 (2%)
c.1135C>T	p.Pro379Ser	ex 7	Variante <i>missense</i>	0 (0%)	2 (4%)
c.1984T>C	p.Ser662Pro	ex 10	Variante <i>missense</i>	0 (0%)	2 (4%)
c.2291delG*	p.Ser764Thr fsX51	ex 11	Variante <i>frameshift</i>	0 (0%)	1 (2%)

Las variantes identificadas con * son de nueva descripción.

El resultado de este estudio mostró que todas las mutaciones encontradas en los pacientes con cáncer de mama, se encuentran en frecuencias comparables en los individuos sanos con excepción de las mutaciones, c.974-57G>A, c.1102+45A>G, c.-30T>A y c.1727G>C (p.Arg576Thr).

Las mutaciones c.974-57G>A y c.1102+45A>G son mutaciones intrónicas localizadas muy alejadas de los sitios clásicos de procesamiento, de forma que es muy poco probable que afecten al proceso de procesamiento del ARNm y por tanto, a la funcionalidad de la proteína.

La mutación c.-30T>A fue previamente descrita como polimorfismo no modificador del riesgo ya que, a pesar de estar localizada en la región promotora del gen, no afecta a la expresión del mismo (Brookman et al., 1996; Shen et al., 1998). El resultado del estudio poblacional indica que es el doble de frecuente en pacientes con cáncer de mama que en controles, aún así, está demasiado extendida en la población control como para ser considerada un polimorfismo modificador del riesgo.

La mutación c.1727G>C; p.Arg576Thr (Figura 44) fue descrita previamente como polimorfismo modificador del riesgo a desarrollar cáncer de mama basándose exclusivamente en la naturaleza de los cambios de aminoácido que generaba (Fan et al., 1999).

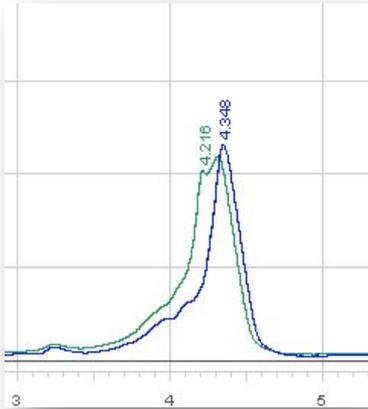


Figura 44. Imagen de la resolución de una muestra normal (azul) y una de las muestras con la mutación p.Arg576Thr (verde) del exón 8 de ERCC4 en el dHPLC.

Con el fin de determinar si la variante p.Arg576Thr podría ser considerada como patogénica, realizamos un estudio de predicción bioinformático.

El aminoácido 576 no se encuentra localizado en ningún dominio conocido de la proteína ERCC4; sin embargo, el análisis filogenético muestra que la arginina de la posición 576 está muy conservada a lo largo de la evolución (Figura 45C), lo que indica que, aunque no se localice en ningún dominio funcional de la proteína, puede ser un aminoácido importante desde el punto de vista estructural. No obstante, la presencia del aminoácido Thr en una de las especies incluidas en el estudio comparativo parece indicar que se trata de un polimorfismo.

Sin embargo, el estudio informático de predicción de patogenicidad coincide en considerar esta variante como patogénica (Figura 45A).

El análisis predictivo mediante el programa ESEfinder no muestra cambios en los sitios ESE, ni pérdida ni ganancia de sitios ESE (Figura 45B).

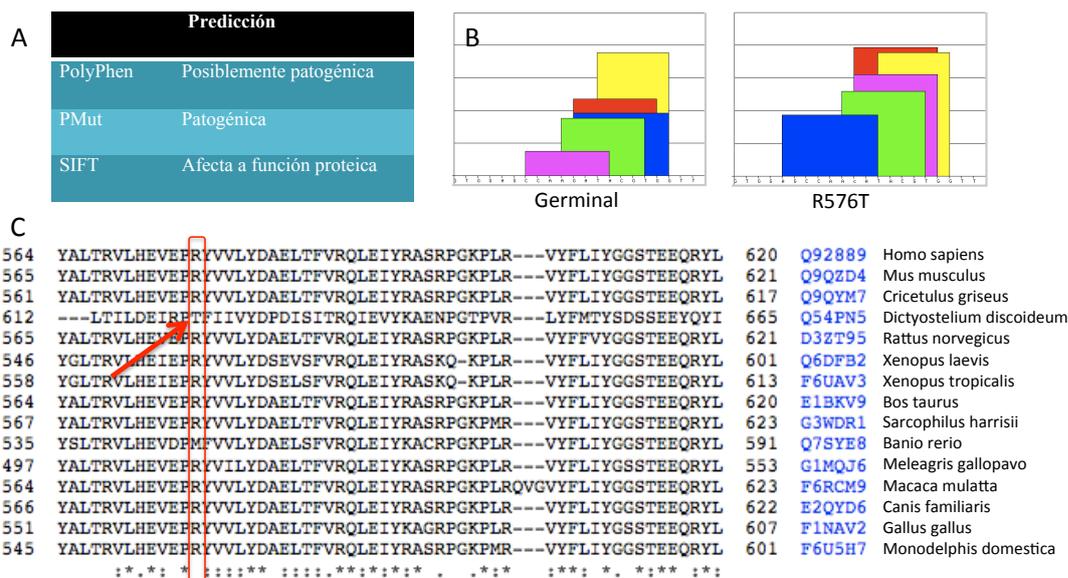


Figura 45. Estudio bioinformático de la variante p.R576T del exón 11 del gen ERCC4. (A) Predicción de patogenicidad. (B) Análisis de alteración de sitios ESE. (C) Análisis de conservación evolutiva.

Todos estos datos sugieren que la mutación p.Arg576Thr del exón 8 del gen ERCC4 puede ser una mutación patogénica, siendo necesarios mas estudios para confirmar este resultado.

Además, hemos encontrado cinco mutaciones en la población sana que no aparecen en los pacientes con cáncer de mama familiar. Se trata de las mutaciones, c.388+28A>G, c.974-6T>C, c.1135C>T (p.Pro379Ser), c.1984T>C (p.Ser662Pro) y c.2291delG (p.Ser764Thr fsX51).

La mutación c.388+28A>G es una mutación intrónica, localizada en el intrón 2, muy alejada de los sitios clásicos de procesamiento, de forma que es muy poco probable que afecten al proceso de procesamiento del ARNm y por tanto, a la funcionalidad de la proteína.

La mutación c.974-6T>C es una mutación intrónica, localizada en el intrón 5 del gen ERCC4, muy próxima a los sitios de procesamiento del ARNm. No aparece descrita previamente por otros grupos, por lo que realizaremos un estudio de predicción mediante el programa ESEfinder que mostró la aparición de un nuevo sitio ESE que puede afectar al procesamiento del ARNm y en definitiva, a la funcionalidad de la proteína, siendo necesario estudiar el ARN para confirmar su posible funcionalidad (Figura 46).

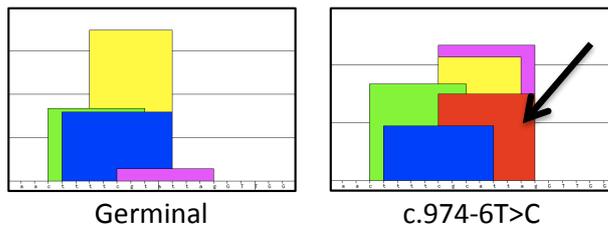


Figura 46. Estudio bioinformático de la variante c.974-6T>C del intrón 5 del gen ERCC4. Análisis de alteración de sitios ESE.

La alteración c.1135C>T (p.Pro379Ser; rs1799802) ha sido descrita en varios trabajos previos (Shen et al., 1998; Mohrenweiser et al., 2002) siempre asociada a población sana y aparece clasificada como polimorfismo neutral en la base de datos UniProt.

La alteración c.1984T>C (p.Ser662Pro; rs2020955) ha sido descrita en varios trabajos previos y clasificada como un polimorfismo neutral en un reciente meta-análisis (Shi et al., 2012).

La última de las mutaciones identificadas en la población control fue c.2291delG (p.Ser764Thr fsX51), una mutación *frameshift* localizada en el exón 11, que cambia el marco de lectura y genera un codón de parada prematuro que provoca la pérdida del dominio de unión a la proteína ERCC1. Se trata por tanto, de una mutación que altera la función de la proteína.

- **ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS CON RIESGO DE CÁNCER DE MAMA FAMILIAR. MODELO POLIGÉNICO**

El cáncer de mama es una enfermedad compleja en el que influyen factores ambientales y genéticos. Como ya hemos señalado, las familias portadoras de mutaciones en los genes BRCA1, BRCA2 son incluidas dentro del Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario; otros genes de penetrancia intermedia como PALB2 , BRIP1, etc., pueden explicar un pequeño número de agrupaciones familiares en las que no se encuentran mutaciones en los genes BRCA1/2. No obstante, existe un elevado número de familias con incidencia elevada de cáncer de mama en las que no se encuentran mutaciones en genes de penetrancia alta o intermedia; estos casos probablemente son el resultado de la acumulación de mutaciones en diferentes genes de baja penetrancia que actúan conjuntamente como modificadores del riesgo. Por otra parte, no todos los portadores de mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2 desarrollan cáncer a lo largo de su vida, por lo que otras variantes genéticas deben de actuar como moduladores de la penetrancia de las mutaciones patogénicas en los genes BRCA1 y 2.

En nuestro trabajo hemos analizado SNPs que modifican la secuencia codificante del gen BRCA1 (rs16941, rs16942 y rs799917) pero que no se han asociado con el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario por estar presentes en familias sanas, y SNPs de los genes FGFR2 (rs2981582), miR146 (rs2910164), región 8q24 (rs13281615), TP53 (rs1042522) y MDM2 (rs2279744), previamente vinculados por otros grupos, bien mediante estudios de GWAS o por estudios de asociación, con modificación del riesgo a padecer cáncer de mama, aunque existen discrepancias dependiendo de los estudios (Martin et al., 2003; Bond et al., 2004; Cox et al., 2005; Bond et al., 2005; Easton et al., 2007; Hunter et al., 2007; Cox et al., 2011).

Para realizar el estudio seleccionamos tres grupos de pacientes: mujeres de familias con síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario portadoras de mutación en los genes BRCA1 o BRCA2 (CMF+), mujeres con cáncer de mama familiar sin mutación en los genes BRCA1 o BRCA2 (CMF-), las cuales hemos dividido en dos subgrupos dependiendo del número de familiares afectados, y un grupo control de mujeres mayores de 40 años que no han desarrollado ningún tipo de tumor (Tabla 29).

Tabla 29. Grupos de pacientes incluidos en el estudio.

Características	Denominación
Mujeres sanas sin antecedentes	Control
Pacientes con cáncer de mama familiar y mutación en los genes BRCA1/2	CMF+
Pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2	CMF-
<ul style="list-style-type: none"> • Con alta carga hereditaria de la enfermedad (3 ó mas familiares afectados) 	CMF->3
<ul style="list-style-type: none"> • Con baja carga hereditaria de la enfermedad (2 ó menos familiares afectados) 	CMF-<3

1. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS FENOTIPOS TUMORALES EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA FAMILIAR.

Hemos obtenido datos clínicos y anatomopatológicos de 36 pacientes con cáncer de mama portadoras de mutación en los genes BRCA1 ó BRCA2 (CMF+) y de 161 pacientes con cáncer de mama sin mutación en los genes BRCA1 y BRCA2 (CMF-), de los cuales 49 pertenecían al grupo con alta carga hereditaria de la enfermedad (CMF->3) y 112 pertenecían al grupo con baja carga hereditaria de la enfermedad (CMF-<3) (Tabla 30).

De los 36 pacientes con cáncer de mama familiar portadores de mutación en los genes BRCA1/2, 19 (52,8 %) presentaban un tumor que expresaba receptores de estrógenos (RE+), 19 (52,8 %) expresaban receptor de progesterona (RP+), 13 (36,1 %) expresaban Her2/Neu (Her2+) y 11 (30,6 %) no mostraban expresión de ninguna de esta proteínas y fueron considerados “triple negativo”. De ellos, 13 (36%) desarrollaron el tumor antes de los 40 años.

De los 161 pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2, 119 (73,9 %) eran RE+, 115 (71,4 %) RP+, 84 (52,2 %) Her2+ y 14 (8,7 %) de tipo “triple negativo”. De ellos, 63 (52,9) desarrollaron el tumor antes de los 40 años.

Cuando dividimos el grupo de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en dos subgrupos dependiendo de la carga hereditaria de la enfermedad, observamos que de los 49 pacientes con alta carga

hereditaria de la enfermedad (CMF>3), 38 (77,6 %) desarrollaron un tumor RE+, 36 (73,5 %) RP+, 20 (40,8 %) Her2+ y 7 (14,3 %) de tipo “triple negativo”, de los cuales 10 (27,7%) desarrollaron el tumor antes de los 40 años. De los 112 pacientes con baja carga hereditaria de la enfermedad, 81 (72,3 %) desarrollaron un tumor RE+, 79 (70,5 %) RP+, 64 (57,1 %) Her2+ y 7 (6,3 %) “triple negativo”, de los cuales 53 (47%) desarrollaron el tumor antes de los 40 años.

Tabla 30. Características biológicas de los tumores incluidos en nuestro trabajo en función de los receptores celulares.

Características biológicas de los tumores incluidos en nuestro trabajo

	RE+	RP+	RE+/RP+	Her2+	RE+/Her2+	RP+/Her2+	RE+/RP+ /Her2+	Triple Negativo
CMF+	19 (52,8%)	19 (52,8%)	17 (47,2%)	13 (36,1%)	9 (25%)	9 (25%)	9 (25%)	11 (30,6%)
CMF-	119 (73,9%)	115 (71,4%)	104 (64,6%)	84 (52,2%)	62 (38,5%)	58 (36%)	53 (32,9%)	14 (8,7%)
CMF->3	38 (77,6%)	36 (73,5%)	36 (73,5%)	20 (40,8%)	16 (32,7%)	15 (30,6%)	15 (30,6%)	7 (14,3%)
CMF-<3	81 (72,3%)	79 (57,1%)	68 (60,7%)	64 (57,1%)	46 (41,1%)	43 (38,4%)	38 (33,9%)	7 (6,3%)

En el momento actual la clasificación biológica del cáncer de mama establece cuatro categorías, en función de las características biológicas anteriormente mencionadas. Podemos clasificar los tumores de mama en, Luminal A, Luminal B, Her2 y *Basal Like* (Carey et al., 2007), perteneciendo los tumores triple negativos (RE-, RP- y Her2-) al subtipo *Basal Like*, asociado a un peor pronóstico. En la tabla 31 se muestra la distribución de estos tipos de tumor en los diferentes grupos de cáncer de mama familiar

Tabla 31. Distribución de los subtipos de cáncer de mama entre los diferentes grupos clínicos. Los subgrupos Luminal A y Luminal B se han obtenido a partir del grupo Luminal.

Subtipos tumorales

	Luminal A	Luminal B	Luminal	Her2	Basal Like
CMF+	12 (33,3 %)	9 (25 %)	21 (58,3 %)	4 (11,1 %)	11 (30,6 %)
CMF-	63 (39,1 %)	67 (41,6 %)	130 (80,7 %)	17 (10,6 %)	14 (8,7 %)

CMF->3	22 (44,9 %)	16 (32,7 %)	38 (77,6 %)	4 (8,2 %)	7 (14,3 %)
CMF-<3	41 (36,6 %)	51 (45,5 %)	92 (82,1 %)	13 (11,6 %)	7 (6,3 %)

a) Estudio global

Inicialmente comparamos los grupos de pacientes con cáncer de mama en función de ser portadores o no de mutación en los genes BRCA1/2.

Estudio de la expresión del Receptor de Estrógenos.

Como mostramos en la tabla 32, al comparar el porcentaje de tumores que expresan el RE en pacientes con cáncer de mama familiar observamos que los pacientes portadores de mutaciones en BRCA1/2 tienen una mayor incidencia de tumores RE-.

Tabla 32. Expresión del receptor de estrógenos en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	19/52,8%	17/47,2%	2,535	1,206;5,329	0,014
CMF-	119/73,9%	42/26,1%	1		

Al comparar ambos grupos en función de la edad de diagnóstico del cáncer, en el caso de los pacientes con enfermedad en edades tempranas (<40 años) no observamos diferencias estadísticamente significativas (Tabla 33); sin embargo, al seleccionar pacientes diagnosticados después de los 40 años de edad, comprobamos que los pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (CMF+) presentan con más frecuencia tumores RE- (Tabla 34).

Tabla 33. Expresión del receptor de estrógenos en pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 menores de 40 años.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	5/38,5%	8/61,5%	2,6	0,762;8,874	0,127
CMF-	39/61,9%	24/38,1%	1		

Tabla 34. Expresión del receptor de estrógenos en pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 mayores de 40 años.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	14/60,9%	9/39,1%	2,857	1,071;7,621	0,036
CMF-	80/81,6%	18/18,4%	1		

Estudio de la expresión del Receptor de Progesterona

El análisis de la expresión del receptor de progesterona en pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama, mostró que los pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 tienen una mayor incidencia de tumores RP- (Tabla 35).

Tabla 35. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	19/52,8%	17/47,2%	2,237	1,069;4,68	0,033
CMF-	115/71,4%	46/28,6%	1		

Si comparamos ambos grupos en función de la edad de diagnóstico del paciente, en el caso de mujeres con diagnóstico en edades tempranas (<40 años) no observamos diferencias estadísticamente significativas (Tabla 36); sin embargo, en el caso de las pacientes con diagnóstico de la enfermedad después de los 40 años, comprobamos que las pacientes portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 desarrollan con más frecuencia un tumor de mama de tipo RP- (Tabla 37).

Tabla 36. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 menores de 40 años.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	6/46,2%	7/53,8%	1,773	0,533;5,897	0,350
CMF-	38/60,3%	25/39,7%	1		

Tabla 37. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 mayores de 40 años.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	13/56,5%	10/43,5%	2,821	1,085;7,331	0,033
CMF-	77/78,6%	21/21,4%	1		

Estudio de la expresión de Her2

La comparación de la expresión de Her2 en los diferentes grupos de pacientes con cáncer familiar incluidos en nuestro trabajo no mostró diferencias estadísticamente significativas, ni siquiera al subdividir los grupos según la edad de diagnóstico de la enfermedad (Tablas A1-A3 Anexo).

Estudio de los tumores “triple negativo”

Nuestros resultados muestran que los tumores “triple negativos” son más frecuentes en las mujeres con cáncer de mama familiar portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 (Tabla 38).

Tabla 38. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2.

	Triple - (N/%)	No Triple - (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	11/30,6%	25/69,4%	1		
CMF-	14/8,7%	147/91,3%	4,62	1,885;11,322	0,001

Cuando segregamos ambos grupos en función de la edad de diagnóstico de la enfermedad, observamos que, en el caso de mujeres con diagnóstico en edades tempranas, la presencia de tumores triple negativos es cerca de 7 veces más frecuente en las portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 (Tabla 39).

Tabla 39. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en menores de 40 años.

	Triple -(N/%)	No Triple - (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	6/46,2%	7/53,8%	1		
CMF-	7/11,1%	56/88,9%	6,857	1,788;26,293	0,005

Al comparar las pacientes con diagnóstico de la enfermedad después de los 40 años, aunque también observamos una mayor incidencia de tumores triple negativo en el grupo de portadoras de mutación en los genes BRCA1/2, el riesgo es menor que en el grupo con diagnóstico antes de los 40 años (Tabla 40).

Tabla 40. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en mayores de 40 años.

	Triple -(N/%)	No Triple - (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	5/21,7%	18/78,3%	1		
CMF-	7/7,1%	91/92,9%	3,611	1,03;12,655	0,045

Estudio por subtipo biológico del tumor

Como mostramos en la tabla 41, al analizar la distribución de los tumores de cada categoría (considerando el subtipo Luminal como un único grupo) en las pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama, observamos que los pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 tienen una mayor incidencia de tumores *Basal Like* mientras que los pacientes no portadores de mutación tienen una mayor incidencia de tumores de tipo Luminal.

Tabla 41. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	21/58,3%	15/41,7%	2,995	1,387;6,468	0,005
CMF-	130/80,7%	31/19,3%	1		
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	4/11,1%	32/88,9%	1		
CMF-	17/10,6%	144/89,4%	1,059	0,334;3,359	0,923
	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	11/30,6%	25/69,4%	1		
CMF-	14/8,7%	147/91,3%	4,62	1,885;11,322	0,001
p valor global: 0,001					

Cuando subdividimos el subtipo Luminal en Luminal A y Luminal B, no hemos encontrado diferencias entre los grupos (Tabla 42).

Tabla 42. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	LuminalA (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	12/33,3%	24/66,7%	1		
CMF-	63/39,1%	98/60,9%	0,778	0,363;1,666	0,518
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	9/25%	27/75%	1		
CMF-	67/41,6%	94/58,4%	0,468	0,207;1,059	0,068
p valor global: 0,004					

Cuando subdividimos ambos grupos en función de la edad de diagnóstico de la enfermedad, comprobamos que las mujeres con diagnóstico de la enfermedad antes de los 40 años no muestran diferencias en la incidencia del subtipo Luminal, mientras que el tipo *Basal Like* es más frecuente en las mujeres portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 (Tabla 43).

Tabla 43. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	6/46,2%	7/53,8%	3,157	0,92;10,7378	0,066
CMF-	46/73%	17/27%	1		
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	1/7,7%	12/92,3%	1		
CMF-	10/15,9%	53/84,1%	0,442	0,051;3,788	0,456
	BasalLike (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	6/46,2%	7/53,8%	1		
CMF-	7/11,1%	56/88,9%	6,857	1,788;26,293	0,005
p valor global: 0,009					

Cuando subdividimos el grupo Luminal en Luminal A y Luminal B, no encontramos diferencias de incidencia entre los dos grupos (Tabla 44).

Tabla 44. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	3/23,1%	10/76,9%	1		
CMF-	23/36,5%	40/63,5%	0,522	0,13;2,091	0,358
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	3/23,1%	10/76,9%	1		
CMF-	23/36,5%	40/63,5%	0,522	0,13;2,091	0,358
p valor global: 0,025					

Al realizar este análisis en mujeres diagnosticadas de cáncer de mama familiar después de los 40 años, portadoras o no de mutación en los genes BRCA1 /2, no hemos encontrado diferencias entre los grupos (Tablas A4 y A5 Anexo).

b) Comparación entre tumores de mama en pacientes con y sin mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados.

A la vista de los resultados anteriores, decidimos analizar si las características biológicas de los tumores se asociaban con el número de familiares afectados, para lo cual el grupo de pacientes con cáncer de mama familiar que no presentaban mutación en los genes BRCA1/2 fue dividido en dos grupos dependiendo de que existieran tres o más familiares afectados.

De manera preliminar comparamos las características biológicas del tumor en el grupo de mujeres no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en la distribución de estas características entre ambos grupos de pacientes (Tablas A6-A23 Anexo).

Estudio de la expresión del Receptor de Estrógeno

Como mostramos en la tabla 45, los tumores que expresan el RE son menos frecuentes en las pacientes portadoras de mutación en los genes BRCA1/2.

Tabla 45. Expresión del receptor de estrógenos en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	19/52,8%	17/47,2%	3,091	1,211;7,891	0,018
CMF->3	38/77,6%	11/22,4%	1		

Al comparar ambos grupos en función de la edad de diagnóstico del cáncer, no obtuvimos diferencias significativas independientemente de la edad del diagnóstico (Tablas A24 y A25 Anexo).

Estudio de la expresión del Receptor de Progesterona

El análisis de la expresión del receptor de progesterona no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupo de pacientes con cáncer de mama

portadores y no portadores de mutación con tres o más familiares afectados. Al dividir los grupos de pacientes en función de la edad de diagnóstico tampoco encontramos diferencias significativas en la expresión del receptor de progesterona (Tablas A26-A28 Anexo).

Estudio de la expresión de Her2

El estudio de la expresión de Her2 en los tumores de las pacientes portadoras de mutaciones en los genes BRCA1/2 y de pacientes con cáncer de mama en más de tres familiares no mostró ninguna diferencia. Al dividir los dos grupos por edades de diagnóstico tampoco encontramos diferencias en la expresión de Her2 (Tablas A29-A31 Anexo).

Estudio de los tumores “Triple negativo”

El estudio de la incidencia de tumores “triple negativos” entre los grupos de pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 y los no portadores con más de tres familiares afectados, no mostró diferencias significativas (Tabla 46).

Tabla 46. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados.

	Triple -(N/%)	No Triple - (N/%)	p
CMF+	11/30,6%	25/69,4%	0,070
CMF->3	7/14,3%	42/85,7%	

Al subdividirlos por edades de diagnóstico de la enfermedad tampoco encontramos diferencias (Tablas A32 y A33 Anexo).

Estudio por subtipo biológico de tumor

El estudio de la distribución de los subtipos Luminal, Her2 y *Basal Like* entre las pacientes portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 y las pacientes con tres o más familiares afectados, no mostró diferencias entre los dos grupos (Tabla 47 y 48). Al subdividir las de acuerdo con la edad de diagnóstico tampoco encontramos diferencias (Tablas A34-A37 Anexo).

Tabla 47. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor		
	Luminal (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	21/58,3%	15/41,7%
CMF->3	38/77,6%	11/22,4%
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	4/11,1%	32/88,9%
CMF->3	4/8,2%	45/91,8%
	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	11/30,6%	25/69,4%
CMF->3	7/14,3%	42/85,7%
p valor global: 0,143		

Tabla 48. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor		
	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	12/33,3%	24/66,7%
CMF->3	22/44,9%	27/55,1%
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	9/25%	27/75%
CMF->3	16/32,7%	33/67,3%
p valor global: 0,273		

c) Comparación entre tumores de mama en pacientes con y sin mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados.

Estudio de la expresión del Receptor de Estrógeno

Como mostramos en la tabla 49, Las pacientes portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 presentan con más frecuencia tumores RE- que las mujeres con cáncer de mama no portadoras de mutación en estos genes y con menos de tres familiares afectados.

Tabla 49. Expresión del receptor de estrógenos en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	19/52,8%	17/47,2%	2,338	1,078;5,071	0,032
CMF-<3	81/72,3%	31/27,7%	1		

Al comparar ambos grupos en función de la edad de diagnóstico de las pacientes, no obtuvimos diferencias significativas. La expresión del receptor de estrógeno es independientemente de la edad del diagnóstico (Tablas A38 y A39 Anexo).

Estudio de la expresión del Receptor de Progesterona

El análisis de la expresión del receptor de progesterona no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupo de pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación con menos de tres familiares afectados (Tabla A40 Anexo).

Si comparamos ambos grupos en función de la edad de diagnóstico, no observamos diferencias estadísticamente significativas en el caso de mujeres con diagnóstico en edades tempranas (<40 años) (Tabla 50); sin embargo, en el caso de las

pacientes con diagnóstico de la enfermedad posterior a los 40 años, comprobamos que las pacientes portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 suelen desarrollar un tumor de mama de tipo RP- (Tabla 51).

Tabla 50. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en menores de 40 años.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	6/46,2%	7/53,8%	1,778	0,524;6,031	0,356
CMF-<3	32/60,4%	21/39,6%	1		

Tabla 51. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en mayores de 40 años.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	13/56,5%	10/43,5%	3,013	1,065;8,524	0,038
CMF-<3	47/79,7%	12/20,3%	1		

Estudio de la expresión de Her2

El análisis de la expresión de Her2 mostró que los pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 desarrollan con más frecuencia tumores Her2- que las pacientes sin mutación y con menos de tres familiares afectados (Tabla 52).

Tabla 52. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores o no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	13/36,1%	23/63,9%	2,359	1,085;5,127	0,03
CMF-<3	64/57,1%	48/42,9%	1		

Al comparar ambos grupos en función de la edad de diagnóstico del paciente, no observamos diferencias significativas (Tablas A41 y A42 Anexo).

Estudio de los tumores “Triple negativo”

Como mostramos en la tabla 53, al comparar la incidencia de tumores triple negativos en pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama, observamos que los pacientes portadores de mutaciones en los genes BRCA1/2 tienen una mayor incidencia de tumores triple negativos que las que no son portadoras y tienen menos de tres familiares afectados.

Tabla 53. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados.

	Triple -(N/%)	No Triple - (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	11/30,6%	25/69,4%	1		
CMF-<3	7/6,3%	105/93,7%	6,6	2,325;18,733	0,000

Cuando comparamos ambos grupos en función de la edad de diagnóstico del cáncer observamos que en mujeres con diagnóstico de la enfermedad antes de los 40 años hay mayor incidencia de tumores triple negativos en pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (tabla 54).

Tabla 54. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en menores de 40 años.

	Triple -(N/%)	No Triple - (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	6/46,2%	7/53,8%	1		
CMF-<3	5/9,4%	48/90,6%	8,229	1,974;34,294	0,004

Esta diferencia se mantiene al comparar los grupos de pacientes diagnosticadas después de los 40 años de edad, aunque la diferencia es menor que entre las pacientes diagnosticadas antes de los 40 años (tabla 55).

Tabla 55. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en mayores de 40 años.

	Triple -(N/%)	No Triple - (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	5/21,7%	18/78,3%	1		
CMF-<3	2/3,4%	57/96,6%	7,917	1,413;44,358	0,019

Estudio por subtipo biológico del tumor

Como mostramos en la tabla 56, al comparar la incidencia de tumores de cada categoría (considerando el subtipo Luminal como un único grupo) en pacientes con cáncer de mama familiar portadoras de mutación en BRCA1/2 y en pacientes no portadoras con menos de tres familiares afectados, observamos que los pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 tienen una mayor incidencia de tumores *Basal Like* mientras que los pacientes no portadores de mutación tienen una mayor incidencia de tumores de tipo Luminal.

Tabla 56. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	21/58,3%	15/41,7%	3,286	1,447;7,462	0,004
CMF-<3	92/82,1%	20/17,9%	1		
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	4/11,1%	32/88,9%	1		
CMF-<3	13/11,6%	99/88,4%	0,952	0,2;3,1279	0,935

	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	11/30,6%	25/69,4%	1		
CMF-<3	7/6,3%	105/93,7%	6,6	2,325;18,733	0
p valor global: 0,000					

Cuando subdividimos el subtipo Luminal en Luminal A y Luminal B, observamos que las mujeres no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 tienen una mayor incidencia de tumores Luminal B (Tabla 57).

Tabla 57. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	12/33,3%	24/66,7%	1		
CMF-<3	41/36,6%	71/63,4%	0,866	0,392;1,913	0,722
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	9/25%	27/75%	2,508	1,082;5,816	0,032
CMF-<3	51/45,5%	61/54,5%	1		
p valor global: 0,001					

Al subdividir ambos grupos en función de la edad de diagnóstico, observamos una mayor incidencia de tumores *Basal Like* entre las mujeres portadoras de mutación en BRCA1/2 diagnosticadas antes de los 40 años, y de tumores Luminal entre mujeres no portadoras (Tabla 58).

Tabla 58. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B en menores de 40 años.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	6/46,2%	7/53,8%	3,59	1,021;12,62	0,046
CMF-<3	40/75,5%	13/24,5%	1		
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p

CMF+	1/7,7%	12/92,3%	1		
CMF-<3	8/15,1%	45/84,9%	0,469	0,053;4,123	0,495
	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	6/46,2%	7/53,8%	1		
CMF-<3	5/9,4%	48/90,6%	8,229	1,974;34,294	0,004
p valor global: 0,006					

Sin embargo, al subdividir los tumores de tipo Luminal en dos subgrupos, Luminal A y Luminal B, no hemos encontrados diferencias en la incidencia de estos subtipos (Tabla 59).

Tabla 59. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	3/23,1%	10/76,9%	1		
CMF-<3	19/35,8%	34/64,2%	0,537	0,131;2,192	0,386
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	3/23,1%	10/76,9%	1		
CMF-<3	21/39,6%	32/60,4%	0,457	0,11;1,8592	0,274
p valor global: 0,017					

En el caso de pacientes diagnosticadas después de los 40 años, observamos una mayor incidencia de tumores *Basal Like* entre las mujeres portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 con diagnóstico posterior a los 40 años y de tumores de tipo Luminal entre mujeres no portadoras con baja carga hereditaria de la enfermedad (Tabla 60).

Tabla 60. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	15/65,2%	8/34,8%	3,962	1,235;12,711	0,021

CMF-<3	52/88,1%	7/11,9%	1		
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	3/13%	20/87%	1		
CMF-<3	5/8,5%	54/91,5%	1,62	0,354;7,411	0,534
	BasalLike (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	5/21,7%	18/78,3%	1		
CMF-<3	2/3,4%	57/96,6%	7,917	1,413;44,358	0,019
p valor global: 0,019					

Al subdividir subtipo de cáncer Luminal en dos grupos, Luminal A y Luminal B, observamos una mayor incidencia de tumores Luminal B en pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (Tabla 61).

Tabla 61. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	9/39,1%	14/60,9%	1		
CMF-<3	22/37,3%	37/62,7%	1,081	0,402;2,909	0,877
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
CMF+	6/26,1%	17/73,9%	2,931	1,014;8,473	0,047
CMF-<3	30/50,8%	29/49,2%	1		
p valor global: 0,027					

2. ESTUDIO DE DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS DE POLIMORFISMOS DE BAJA PENETRANCIA EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA EN FUNCIÓN DEL FENOTIPO TUMORAL.

Tras la identificación del subtipo de tumor predominante en cada grupo de pacientes, trataremos de establecer una relación entre la distribución de genotipos de los polimorfismos de baja penetrancia de los genes BRCA1 (c.2731C>T, c.3232A>G, c.3667A>G), TP53 (p.Arg72Pro), MDM2 (c.-309T>G; rs2279744), FGFR2

(rs2981582), miR146 (rs2910164) y la región cromosómica 8q24 (rs13281615) y los fenotipos tumorales.

2.1. Distribución de genotipos de polimorfismos de baja penetrancia de acuerdo con el subtipo tumoral en pacientes con cáncer de mama.

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos en todos los pacientes con cáncer de mama de acuerdo con los subtipos biológicos de tumor mostró que sólo los polimorfismos c.2731C>T del gen BRCA1 y rs2910164 del gen miR146 presentan una distinta distribución en función del subtipo del cáncer.

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos del exón 11 del gen BRCA1, c.2731C>T, c.3232A>G, c.3667A>G, mostró que sólo el polimorfismo c.2731C>T presenta una distinta distribución en función del subtipo de cáncer (Tablas A43-A48 Anexo).

En la tabla 62 mostramos la distribución de genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en los pacientes con cáncer de mama observando que el genotipo TT es más frecuente en los tumores de tipo Luminal A.

Tabla 62. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

Subtipos biológicos de tumor (Luminal A)

LUMINAL A	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	25/33,3%	58/47,5%	1		
	CT	33/44,0%	52/42,6%	0,679	0,358;1,289	0,236
	TT	17/22,7%	12/9,8%	0,304	0,127;0,730	0,008
Dominante	CC	25/33,3%	58/47,5%	1,812	0,997;3,294	0,051
	CT+TT	50/66,7%	64/52,5%	1		
Recesivo	TT	17/22,7%	12/9,8%	1		

CC+CT	58/77,3%	110/90,2%	2,687	1,202;6,007	0,016
p valor global: 0,024					

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos p.Arg72Pro del gen TP53 y c.-309T>G (rs2279744) del gen MDM2, no mostró diferencias estadísticamente significativas en la distribución en función del subtipo de cáncer (Tablas A49-A52 Anexo).

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos identificados mediante estudios GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146, mostró que sólo el polimorfismo rs2910164 del gen miR146 presenta una distinta distribución en función del subtipo de cáncer (Tabla A53-A58 Anexo).

Como mostramos en la tabla 63, la distribución de genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 muestra que el alelo G es más frecuente en los tumores de tipo Luminal.

Tabla 63. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

Subtipos biológicos de tumor (Luminal)

LUMINAL	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	75/49,7%	32/69,6%	1		
	CG	63/41,7%	13/28,3%	0,484	0,234;1,0	0,05
	GG	13/8,6%	1/2,2%	0,180	0,023;1,437	0,106
Dominante	CC	75/49,7%	32/69,6%	2,316	1,145;4,685	0,019
	CG+GG	76/50,3%	14/30,4%	1		
Recesivo	GG	13/8,6%	1/2,2%	1		
	CC+CG	138/91,4%	45/97,8%	4,239	0,539;33,313	0,170
p valor global: 0,043						

Si subdividimos el grupo de pacientes con cáncer de mama en función de la edad de diagnóstico, la distribución de los genotipos de los polimorfismos de acuerdo con los subtipos biológicos observamos que sólo el polimorfismo rs2910164 del gen miR146 presentan una distinta distribución de genotipos en pacientes mayores de 40 años en función del subtipo del cáncer.

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos del exón 11 del gen BRCA1, c.2731C>T, c.3232A>G, c.3667A>G, no mostró una distinta distribución en función del subtipo de cáncer (Tablas A59-A70 Anexo).

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos p.Arg72Pro del gen TP53 y c.-309T>G (rs2279744) del gen MDM2, no mostró diferencias estadísticamente significativas en la distribución en función del subtipo de cáncer (Tabla A71-A78 Anexo).

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos identificados mediante estudios GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146, mostró que sólo el polimorfismo rs2910164 del gen miR146 presenta una distinta distribución en función del subtipo de cáncer en pacientes con diagnóstico de la enfermedad posterior a los 40 años (Tabla A79-A90 Anexo).

Como mostramos en la tabla 64, la distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 muestra que, en pacientes con diagnóstico posterior a los 40 años, el alelo G es más frecuente en tumores de tipo Luminal.

Tabla 64. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama mayores de 40 años en función del subtipo de tumor, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

Subtipos biológicos de tumor (Luminal)

LUMINAL	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	45/45,5%	17/77,3%	1		
	CG	44/44,4%	5/22,7%	0,301	0,102;0,886	0,029
	GG	10/10,1%	0/0,0%	-	-	-
Dominante	CC	45/45,5%	17/77,3%	4,080	1,396;11,927	0,010

Recesivo	CG+GG	54/54,5%	5/22,7%	1		
	GG	10/10,1%	0/0,0%	1		
	CC+CG	89/89,9%	22/100,0%	-	-	-
p valor global: 0,019						

2.2. Distribución de genotipos de polimorfismos de baja penetrancia de acuerdo con el subtipo tumoral en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2.

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos de los polimorfismos de acuerdo con los subtipos tumorales en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (Tablas A91-A106 Anexo).

La subdivisión del grupo de pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 según la edad de diagnóstico tampoco revela una distinta distribución de los genotipos de los polimorfismos de baja penetrancia (Tablas A107-A138 Anexo).

2.3. Distribución de genotipos de polimorfismos de baja penetrancia de acuerdo con el subtipo tumoral en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2.

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos en todos los pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 de acuerdo con los subtipos biológicos de tumor mostró que sólo el polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 presenta una distinta distribución en función del subtipo del cáncer. En la tabla 65 mostramos que el genotipo TT está asociado al subtipo Luminal A, mientras que el alelo C está asociado a tumores de tipo Luminal B.

Tabla 65. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

Subtipos biológicos de tumor (Luminal A y Luminal B)

LUMINAL A	Genotipo	LUMINAL A (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	21/33,3%	45/45,9%	1		
	CT	26/41,3%	43/43,9%	0,772	0,379;1,571	0,475
	TT	16/25,4%	10/10,2%	0,292	0,113;0,750	0,011
Dominante	CC	21/33,3%	45/45,9%	1		
	CT+TT	42/66,7%	53/54,1%	0,589	0,305;1,136	0,114
Recesivo	TT	16/25,4%	10/10,2%	1		
	CC+CT	47/74,6%	88/89,8%	2,996	1,260;7,121	0,013
	p valor: 0,030					
LUMINAL B	Genotipo	LUMINAL B (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	30/44,8%	36/38,3%	1		
	CT	32/47,8%	37/39,4%	0,964	0,490;1,897	
	TT	5/7,5%	21/22,3%	3,5	1,178;10,4	0,024
Dominante	CC	30/44,8%	36/38,3%	1		
	CT+TT	37/55,2%	58/61,7%	1,306	0,691;2,468	0,410
Recesivo	TT	5/7,5%	21/22,3%	1		
	CC+CT	62/92,5%	73/77,7%	0,280	0,100;0,787	0,016
p valor: 0,041						

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G y c.3667A>G del gen BRCA1, p.Arg72Pro del gen TP53, c.-309T>G del gen MDM2, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 de acuerdo con los subtipos tumorales en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (Tablas A139-A153 Anexo).

La subdivisión del grupo de pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 según la edad de diagnóstico mostró que sólo los polimorfismos c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 presentan una distinta distribución de los genotipos de los polimorfismos de baja penetrancia en pacientes con edad de diagnóstico posterior a los 40 años (Tabla 66-67) (Tablas A154-A Anexo).

En la tabla 66 mostramos la distinta distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667>>G en función del subtipo de tumor del paciente. Aunque existe significación estadística (p valor 0,035), parece que ésta es debida exclusivamente a la ausencia de tumores de tipo Her2 con genotipo CC (más frecuente), lo que imposibilita el cálculo estadístico de riesgo.

Tabla 66. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 mayores de 40 años en función del subtipo de tumor, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	0/0,0%	44/48,4%	1		
	CT	5/71,4%	38/41,8%	-	-	-
	TT	2/28,6%	9/9,9%	-	-	-
Dominante	CC	0/0,0%	44/48,4%	1		
	CT+TT	7/100,0%	47/51,6%	-	-	-
Recesivo	TT	2/28,6%	9/9,9%	1		
	CC+CT	5/71,4%	82/90,1%	3,644	0,616;21,576	0,154
						p valor: 0,035

Como mostramos en la tabla 67, el polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 presenta una distinta distribución de genotipos en función del subtipo tumoral en pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2, mayores de 40 años, puesto que el alelo C aparecen asociados al subtipo Luminal B.

Tabla 67. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 mayores de 40 años en función del subtipo de tumor, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

Subtipos biológicos de tumor (Luminal A y Luminal B)

LUMINAL B	Genotipo	LUMINAL B (N/%)	Resto (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	22/50,00%	17/31,48%	1		
	CT	19/43,18%	22/40,74%	1,498	0,62;3,619	0,369
	TT	3/6,82%	15/27,78%	6,471	1,609;26,026	0,009
Dominante	CC	22 /50,00%	17/31,48%	1		
	CT+TT	22/50,00%	37/68,52%	2,176	0,955;4,962	0,064
Recesivo	TT	3 /6,82%	15/27,78%	1		
	CC+CT	41/93,18%	39/72,22%	0,190	0,051;0,708	0,013
						p valor: 0,019

2.4. Distribución de genotipos de polimorfismos de baja penetrancia de acuerdo con el subtipo tumoral en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2.

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos de los polimorfismos de baja penetrancia de acuerdo con los subtipos tumorales al comparar pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con pacientes no portadores (Tablas A186-A201 Anexo).

3. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES BRCA1 (rs799917, rs16941 y rs16942), TP53 (rs1042522), MDM2 (rs2279744), FGFR2 (rs2981582), miR146 (rs2910164) Y REGIÓN CROMOSÓMICA 8q24 (rs13281615) EN CÁNCER DE MAMA FAMILIAR

El estudio de los polimorfismos c. 2731C>T, c.3232A>G y c.3667A>G del gen BRCA1, p.Arg72Pro del gen TP53, c.-309T>G del gen MDM2, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146 se realizó en muestras de sangre periférica de 116 mujeres sanas que no habían padecido

ningún tipo de cáncer a lo largo de su vida, 61 probandos pertenecientes a diferentes familias con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1 ó BRCA2 (incluyendo las 31 familias seleccionadas inicialmente) y 312 probandos pertenecientes a diferentes familias con cáncer de mama sin mutación en los genes BRCA1 ó BRCA2, de los cuales 104 probandos tenían una alta carga hereditaria de la enfermedad, con tres ó mas familiares de primer grado afectados, y 208 probandos tenían una menor carga hereditaria de la enfermedad, con menos de tres familiares de primer grado afectados.

3.1. Comparación de la distribución de genotipos de los polimorfismos de los genes BRCA1, TP53, MDM2, FGFR2, miR146 y región cromosómica 8q24 en mujeres sanas y en pacientes con cáncer de mama

Como mostramos en las tablas 68-72, al comparar la distribución de los genotipos de los polimorfismos en los grupos de mujeres sanas y pacientes con cáncer de mama (grupos CMF+ y CMF-), se observó que los genotipos de los polimorfismos c.2731C>T del gen BRCA1 y p.Arg72Pro del gen TP53 presentan una diferente distribución entre los grupos.

En la tabla 68 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1.

Tabla 68. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos Control y CM total.

	Genotipo	Control (N/%)	CM total (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	56/48,3%	163/43,7%	0,196
	AG	53/45,7%	166/44,5%	
	GG	7/6,0%	44/11,8%	
c.3667A>G	AA	56/48,3%	177/47,5%	0,214
	AG	53/45,7%	153/41,0%	
	GG	7/6,0%	43/11,5%	
	CC	54/46,6%	157/42,1%	0,048

c.2731C>T	CT	55/47,4%	161/43,2%
	TT	7/6,0%	55/14,7%

La distribución de genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 mostró diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, por lo que procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 69). No observamos distinta distribución de genotipos de los polimorfismos c.3232A>G y c.3667A>G en los grupos de pacientes estudiados.

Tabla 69. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos Control y CM total, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	Control (N/%)	CM total (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	54/46,6%	157/42,1%	1		
	CT	55/47,4%	161/43,2%	1,007	0,652;1,556	0,976
	TT	7/6,0%	55/14,7%	2,702	1,161;6,292	0,021
Dominante	CC	54/46,55%	157/42,1%	1		
	CT+TT	62/53,45%	216/57,9%	1,198	0,788;1,821	0,397
Recesivo	TT	7/6,03%	55/14,7%	2,693	1,191;6,091	0,017
	CC+CT	109/93,97%	318/85,3%	1		

Tras el análisis realizado, observamos que el genotipo TT es más frecuente en pacientes con cáncer de mama, vinculado por tanto a un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama hereditario.

En la tabla 70 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen MDM2 y TP53.

Tabla 70. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G (rs2279744) del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos Control y CM total.

	Genotipo	Control (N/%)	CM total (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	40/34,5%	170/45,6%	0,081

	TG	54/46,6%	153/41,0%	
	GG	22/19,0%	50/13,4%	
p.Arg72Pro	GG	53/45,7%	201/53,9%	0,023
	GC	49/42,2%	153/41,0%	
	CC	14/12,1%	19/5,1%	

Observamos que, el polimorfismo p.Arg72Pro presenta una distinta distribución de genotipos entre ambos grupos de pacientes, por lo que procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 71). No observamos distinta distribución de genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2.

Tabla 71. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos Control y CM total, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	Control (N/%)	CM total (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	GG	53/45,7%	201/53,9%	1		
	GC	49/42,2%	153/41,0%	0,823	0,529;1,281	0,388
	CC	14/12,1%	19/5,1%	0,358	0,168;0,760	0,008
Dominante	GG	53/45,7%	201/53,9%	1		
	GC+CC	63/54,3%	172/46,1%	0,720	0,474;1,094	0,124
Recesivo	CC	14/12,1%	19/5,1%	1		
	GG+GC	102/87,9%	354/94,9%	2,557	1,239;5,278	0,011

El análisis de la distribución de genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro en mujeres sanas y pacientes con cáncer de mama mostró que el genotipo Pro/Pro (CC) es más frecuente en mujeres sanas sin antecedentes de cáncer de mama, mientras que el alelo Arg (G) es más frecuente en pacientes con cáncer de mama familiar (Tabla 71).

En la tabla 72 mostramos la distribución de los genotipos de los tres polimorfismos identificados mediante estudios GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146. La

distribución de genotipos de estos tres polimorfismos, no mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo de mujeres sanas con el grupo de mujeres con cáncer de mama.

Tabla 72. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos Control y CM total.

	Genotipo	Control (N/%)	CM total (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	26/22,4%	83/22,3%	0,113
	CT	47/40,5%	187/50,1%	
	TT	43/37,1%	103/27,6%	
rs13281615	AA	36/31,0%	115/30,8%	0,968
	AG	57/49,2%	180/48,3%	
	GG	23/19,8%	78/20,9%	
rs2910164	CC	71/61,2%	197/52,8%	0,125
	CG	41/35,3%	146/39,1%	
	GG	4/3,4%	30/8,0%	

3.2. Comparación de la distribución de genotipos de los polimorfismos de los genes BRCA1, TP53, MDM2, FGFR2, miR146 y región cromosómica 8q24 en mujeres sanas y en pacientes con cáncer de mama familiar portadores de mutación en BRCA1/2 (CMF+)

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos entre el grupo de mujeres sanas con el grupo de pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2, no mostró diferencias estadísticamente significativas.

En la tabla 73 mostramos la distribución de genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1 en los grupos de pacientes analizados.

Tabla 73. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731T>C del gen BRCA1 en los grupos Control y CMF+.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF+ (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	56/48,3%	31/50,8%	0,768
	AG	53/45,7%	25/41,0%	
	GG	7/6,0%	5/8,2%	
c.3667A>G	AA	56/48,3%	35/57,4%	0,344
	AG	53/45,7%	21/34,4%	
	GG	7/6,0%	5/8,2%	
c.2731C>T	CC	54/46,6%	32/52,5%	0,381
	CT	55/47,4%	23/37,7%	
	TT	7/6,0%	6/9,8%	

Resultados similares obtuvimos al comparar la distribución de los genotipos de los polimorfismos de los genes MDM2 y TP53 entre mujeres sanas y portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (Tabla 74).

Tabla 74. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G (rs2279744) del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos Control y CMF+.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF+ (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	40/34,5%	29/47,5%	0,232
	TG	54/46,6%	22/36,1%	
	GG	22/19,0%	10/16,4%	
p.Arg72Pro	GG	53/45,7%	31/50,8%	0,492
	GC	49/42,2%	26/42,6%	
	CC	14/12,1%	4/6,6%	

En la tabla 75 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos identificados mediante estudios de GWAS en los grupos de mujeres sanas y portadoras de mutación en los genes BRCA1/2, en los que tampoco observamos diferencias.

Tabla 75. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos Control y CMF+.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF+ (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	26/22,4%	9/14,8%	0,389
	CT	47/40,5%	30/49,2%	
	TT	43/37,1%	22/36,1%	
rs13281615	AA	36/31,0%	15/52,8%	0,666
	AG	57/49,1%	33/39,1%	
	GG	23/19,8%	13/8,0%	
rs2910164	CC	71/61,2%	38/62,3%	0,335
	CG	41/35,3%	18/29,5%	
	GG	4/3,4%	5/8,2%	

3.3. Comparación de la distribución de genotipos de los polimorfismos de los genes BRCA1, TP53, MDM2, FGFR2, miR146 y región cromosómica 8q24 en mujeres sanas y en pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en BRCA1/2 (CMF-)

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos incluidos en nuestro trabajo en el grupo de mujeres sanas y el grupo de mujeres con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 mostró que los genotipos de los polimorfismos c.2731C>T del gen BRCA1 y p.Arg72Pro del gen TP53, presentan una diferente distribución.

En la tabla 76 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1, c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T, en los grupos de pacientes estudiados.

Tabla 76. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos Control y CMF-.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	56/48,3%	132/42,3%	0,137
	AG	53/45,7%	141/45,2%	
	GG	7/6,0%	39/12,5%	
c.3667A>G	AA	56/48,3%	142/45,5%	0,183
	AG	53/45,7%	132/42,3%	
	GG	7/6,0%	38/12,2%	
c.2731C>T	CC	54/46,4%	125/40,1%	0,029
	CT	55/47,4%	138/44,2%	
	TT	7/6,0%	49/15,7%	

Se observa que los genotipos del polimorfismo c.2731C>T presentan una distinta distribución en los grupos de pacientes estudiados, por lo que procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 77).

Tabla 77. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos Control y CMF-, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF- (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	54/46,4%	125/40,1%	1		
	CT	55/47,4%	138/44,2%	1,084	0,693;1,694	0,72
	TT	7/6,0%	49/15,7%	3,024	1,288;7,102	0,01
Dominante	CC	54/46,55%	125/40,06%	1		

Recesivo	CT+TT	62/53,45%	187/59,94%	1,303	0,848;2,002	0,23
	TT	7/6,03%	49/15,71%	2,901	1,274;6,606	0,01
	CC+CT	109/93,97%	263/84,29%	1		

Los resultados del análisis al comparar la distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del exón 11 del gen BRCA1 muestran que el genotipo TT está asociado a un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama, en ausencia de mutación en los genes BRCA1/2.

En la tabla 78 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos de los genes MDM2 y TP53 en los grupos de mujeres sanas y mujeres con antecedentes familiares no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2.

Tabla 78. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G (rs2279744) del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos Control y CMF-.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	40/34,5%	141/45,2%	0,086
	TG	54/46,6%	131/42,0%	
	GG	22/19,0%	40/12,8%	
p.Arg72Pro	GG	53/45,69%	170/54,49%	0,019
	GC	49/42,24%	127/40,70%	
	CC	14/12,07%	15/4,81%	

Observamos que, la distribución de genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 muestra diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, por lo que procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 79).

Tabla 79. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos Control y CMF-, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF- (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	GG	53/45,69%	170/54,49%	1		
	GC	49/42,24%	127/40,70%	0,808	0,515;1,269	0,36
	CC	14/12,07%	15/4,81%	0,334	0,151;0,737	0,01
Dominante	GG	53/45,69%	170/54,49%	1		
	GC+CC	63/54,31%	142/45,51%	0,703	0,458;1,078	0,11
Recesivo	CC	14/12,07%	15/4,81%	1		
	GG+GC	102/87,93%	297/95,19%	2,718	1,268;5,824	0,01

Tras el análisis de los resultados, al comparar la distribución de genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en el grupo de mujeres sanas y de mujeres no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2, observamos que el genotipo Pro/Pro (CC) tiene un efecto protector, puesto que está asociado a la población control. Por otro lado, el alelo Arg (G) está asociado a un incremento del riesgo de cáncer en ausencia de mutación en los genes BRCA1/2.

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos identificados mediante GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de mujeres sanas y el grupo de mujeres con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (Tabla 80).

Tabla 80. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos Control y CMF-.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	26/22,4%	74/23,7%	0,068
	CT	47/40,5%	157/50,3%	
	TT	43/37,1%	81/26,0%	
rs13281615	AA	36/31,0%	100/32,1%	0,932
	AG	57/49,1%	147/47,1%	

rs2910164	GG	23/19,8%	65/20,8%	
	CC	71/61,2%	159/51,0%	0,335
	CG	41/35,3%	128/41,0%	
	GG	4/3,4%	25/8,0%	

Los resultados obtenidos hasta este momento, sugieren que los polimorfismos c.2731C>T del gen BRCA1 y p.Arg72Pro del gen TP53 presentan diferente distribución entre el grupo de mujeres sanas y el grupo de mujeres con cáncer de mama. Sin embargo, dentro del grupo de mujeres con cáncer de mama las diferencias observadas son debidas exclusivamente al grupo de mujeres con cáncer de mama no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2.

A la vista de estos resultados decidimos determinar si el número de familiares afectados modificaba los resultados, para lo que el grupo de mujeres con cáncer de mama no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 fue dividido en dos grupos, en función del número de individuos afectados en la familia.

- **Pacientes con alta carga hereditaria de la enfermedad (tres o más familiares afectados)**

El estudio de la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1, c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T, en los grupos de pacientes estudiados, no mostró diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 81).

Tabla 81. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731T>C del gen BRCA1 en los grupos Control y CMF->3.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF->3 (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	56/48,3%	46/44,2%	0,343
	AG	53/45,7%	46/44,2%	
	GG	7/6,0%	12/11,5%	

c.3667A>G	AA	56/48,3%	45/43,3%	0,431
	AG	53/45,7%	48/46,2%	
	GG	7/6,0%	11/10,6%	
c.2731T>C	AA	54/46,6%	39/37,5%	0,085
	AG	55/47,4%	50/48,1%	
	GG	7/6,0%	15/14,4%	

Resultados similares se observaron al analizar los genotipos de los polimorfismos de los genes MDM2 y TP53 (Tabla 82).

Tabla 82. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G (rs2279744) del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos Control y CMF->3.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF->3 (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	40/34,5%	42/40,4%	0,287
	TG	54/46,6%	50/48,1%	
	GG	22/19,0%	12/11,5%	
p.Arg72Pro	GG	53/45,7%	51/49,0%	0,690
	GC	49/42,2%	44/42,3%	
	CC	14/12,1%	9/8,7%	

En la tabla 83 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos identificados mediante estudios de GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146.

Tabla 83. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos Control y CMF->3.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF->3 (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	26/22,4%	28/26,9%	0,053

rs13281615	CT	47/40,5%	53/51,0%	
	TT	43/37,1%	23/22,1%	
	AA	36/31,0%	31/29,8%	0,964
	AG	57/49,1%	53/51,0%	
	GG	23/19,8%	20/19,2%	
rs2910164	CC	71/61,21%	44/42,31%	0,008
	CG	41/35,34%	49/47,12%	
	GG	4/3,45%	11/10,58%	

Como se muestra en la tabla 84 la distribución de genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 es diferente entre ambos grupos de pacientes, por lo que procedimos a realizar un análisis de riesgo.

Tabla 84. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en los grupos Control y CMF->3, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF->3 (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	71/61,21%	44/42,31%	1		
	CG	41/35,34%	49/47,12%	1,928	1,102;3,376	0,022
	GG	4/3,45%	11/10,58%	4,437	1,33;14,801	0,015
Dominante	CC	71/61,21%	44/42,31%	1		
	CG+GG	45/38,79	60/57,69%	2,152	1,255;3,689	0,005
Recesivo	GG	4/3,45%	11/10,58%	3,312	1,021;10,745	0,046
	CC+CG	112/96,55%	93/89,42%	1		

Al comparar la distribución de genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en los grupos de mujeres sanas y mujeres no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 con alta carga hereditaria de la enfermedad, observamos que los genotipos CG y GG están asociados a un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama.

- **Pacientes con baja carga hereditaria de la enfermedad (menos de tres familiares afectados)**

En la tabla 85 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1, c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T.

Tabla 85. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos Control y CMF-<3.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	56/48,3%	86/41,3%	0,120
	AG	53/45,7%	95/45,7%	
	GG	7/6,0%	27/13,0%	
c.3667A>G	AA	56/48,3%	97/46,6%	0,138
	AG	53/45,7%	84/40,4%	
	GG	7/6,0%	27/13,0%	
c.2731C>T	CC	54/46,4%	86/41,35%	0,028
	CT	55/47,4%	88/42,31%	
	TT	7/6,0%	34/16,34%	

Observamos que los genotipos del polimorfismo c.2731C>T presentan una distinta distribución entre ambos grupos de pacientes, por lo que procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 86).

Tabla 86. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos Control y CMF-<3, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF-<3 (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	54/46,4%	86/41,35%	1		

Dominante	CT	55/47,4%	88/42,31%	1,005	0,622;1,622	0,985
	TT	7/6,0%	34/16,34%	3,05	1,263;7,366	0,013
	CC	54/46,55%	86/41,35%	1		
	CT+TT	62/53,45%	122/58,65%	1,236	0,782;1,952	0,365
Recesivo	TT	7/6,03%	34/16,34%	3,043	1,303;7,105	0,01
	CC+CT	109/93,97%	174/83,66%	1		

El análisis de los resultados de la distribución de genotipos del polimorfismo c.2731C>T del exón 11 del gen BRCA1 mostró que el genotipo TT está asociado a un incremento del riesgo de cáncer de mama.

En la tabla 87 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos de los genes MDM2 y TP53.

Tabla 87. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G (rs2279744) del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos Control y CMF-<3.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	40/34,5%	99/47,6%	0,065
	TG	54/46,6%	81/38,9%	
	GG	22/19,0%	28/13,5%	
p.Arg72Pro	GG	53/45,69%	119/57,21%	0,002
	GC	49/42,24%	83/39,90%	
	CC	14/12,07%	6/2,88%	

Observamos que la distribución de genotipos del polimorfismo p.Pro72Arg presenta diferente distribución en ambos grupos de pacientes, por lo que procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 88).

Tabla 88. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos Control y CMF-<3, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF-<3 (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	GG	53/45,69%	119/57,21%	1		
	GC	49/42,24%	83/39,90%	0,754	0,467;1,218	0,249
	CC	14/12,07%	6/2,88%	0,191	0,07;0,524	0,001
Dominante	GG	53/45,69%	119/57,21%	1,589	1,006;2,51	0,047
	GC+CC	63/54,31%	91/43,75%	1		
Recesivo	CC	14/12,07%	6/2,88%	1		
	GG+GC	102/87,93%	202/97,12%	4,621	1,725;12,381	0,002

El análisis de la distribución de genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 mostró que el genotipo CC (Pro/Pro) tiene un efecto protector sobre el cáncer de mama, mientras que el alelo G (Arg) y el genotipo GG (Arg/Arg) está implicado en el incremento del riesgo de cáncer de mama en ausencia de mutación en los genes BRCA1/2.

El estudio de la distribución de los genotipos de los polimorfismos identificados mediante GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146, no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes (Tabla 89).

Tabla 89. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos Control y CMF-<3.

	Genotipo	Control (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	26/22,4%	46/22,1%	0,178
	CT	47/40,5%	104/50,0%	
	TT	43/37,1%	58/27,9%	
rs13281615	AA	36/31,0%	69/33,2%	0,791
	AG	57/49,1%	94/45,2%	
	GG	23/19,8%	45/21,6%	

rs2910164	CC	71/61,2%	115/55,3%	0,361
	CG	41/35,3%	79/38,0%	
	GG	4/3,4%	14/6,7%	

Los resultados obtenidos en función de la historia familiar, sugieren que los genotipos de los polimorfismos c.2731C>T del gen BRCA1 y p.Arg72Pro del gen TP53 presentan una diferente distribución entre el grupo de mujeres sanas y el grupo de mujeres con cáncer de mama con menos de tres familiares afectados, mientras que los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 presentan una diferente distribución entre el grupo de mujeres sanas y el grupo de mujeres con cáncer de mama con tres o más familiares afectados.

3.4. Comparación de la distribución de genotipos de los polimorfismos de los genes BRCA1, TP53, MDM2, FGFR2, miR146 y región cromosómica 8q24 en mujeres con cáncer de mama familiar portadoras (CMF+) y no portadoras de mutación en BRCA1/2 (CMF-)

En la tabla 90 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos de BRCA1, c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T, en los grupos de pacientes estudiados.

Tabla 90. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos CMF+ y CMF-.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	31/50,8%	132/42,3%	0,397
	AG	25/41,0%	141/45,2%	
	GG	5/8,2%	39/12,5%	
c.3667A>G	AA	35/57,4%	142/45,5%	0,224
	AG	21/34,4%	132/42,3%	

	GG	5/8,2%	38/12,2%	
c.2731C>T	CC	32/52,5%	125/40,1%	0,169
	CT	23/37,7%	138/44,2%	
	TT	6/9,8%	49/15,7%	

Resultados similares obtuvimos al comparar la distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G y p.Arg72Pro de los genes MDM2 y TP53 en los grupos de mujeres portadoras y no portadoras de mutación (Tabla 91).

Tabla 91. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos CMF+ y CMF-.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	29/47,5%	141/45,2%	0,611
	TG	22/36,1%	131/42,0%	
	GG	10/16,4%	40/12,8%	
p.Arg72Pro	GG	31/50,8%	170/54,5%	0,787
	GC	26/42,6%	127/40,7%	
	CC	4/6,6%	15/4,8%	

En la tabla 92 mostramos la distribución de los grupos de los polimorfismos identificados mediante estudios GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146.

Tabla 92. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos CMF+ y CMF-.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	9/14,8%	74/23,7%	0,154
	CT	30/49,2%	157/50,3%	

rs13281615	TT	22/36,1%	81/26,0%	
	AA	15/24,6%	100/32,1%	0,486
	AG	33/54,1%	147/47,1%	
	GG	13/21,3%	65/20,8%	
rs2910164	CC	38/62,3%	159/51,0%	0,226
	CG	18/29,5%	128/41,0%	
	GG	5/8,2%	25/8,0%	

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos incluidos en el estudio en el grupo de pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes.

Tras observar estos resultados decidimos determinar si el número de familiares afectados (historia familiar) modifica los resultados, para lo que el grupo de mujeres con cáncer de mama no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 fue dividido en dos grupos en función del número de familiares afectados.

- **Pacientes con alta carga hereditaria de la enfermedad (tres o más familiares afectados)**

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1, c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T, no mostró diferencias entre los grupos de pacientes incluidos en el estudio (Tabla 93).

Tabla 93. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos CMF+ y CMF->3.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	31/50,8%	46/44,2%	0,648
	AG	25/41,0%	46/44,2%	
	GG	5/8,2%	12/11,5%	

c.3667A>G	AA	35/57,4%	45/43,3%	0,216
	AG	21/34,4%	48/46,2%	
	GG	5/8,2%	11/10,6%	
c.2731C>T	CC	32/52,5%	39/37,5%	0,169
	CT	23/37,7%	50/48,1%	
	TT	6/9,8%	15/14,4%	

En la tabla 94 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53.

Tabla 94. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos CMF+ y CMF->3.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	29/47,5%	42/40,4%	0,300
	TG	22/36,1%	50/48,1%	
	GG	10/16,4%	12/11,5%	
p.Arg72Pro	GG	31/50,8%	51/49,0%	0,887
	GC	26/42,6%	44/42,3%	
	CC	4/6,6%	9/8,7%	

En la tabla 95 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos identificados mediante GWAS, observando que los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 presentan una diferente distribución entre los grupos de pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 y no portadores con alta carga hereditaria de la enfermedad.

Tabla 95. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos CMF+ y CMF->3.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	9/14,8%	28/26,9%	0,070
	CT	30/49,2%	53/51,0%	
	TT	22/36,1%	23/22,1%	
rs13281615	AA	15/24,6%	31/29,8%	0,767
	AG	33/54,1%	53/51,0%	
	GG	13/21,3%	20/19,2%	
rs2910164	CC	38/62,30%	44/42,31%	0,044
	CG	18/29,51%	49/47,12%	
	GG	5/8,20%	11/10,58%	

Para confirmar esta observación procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 96).

Tabla 96. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en los grupos CMF+ y CMF->3, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	38/62,30%	44/42,31%	1		
	CG	18/29,51%	49/47,12%	2,351	1,176;4,701	0,016
	GG	5/8,20%	11/10,58%	1,9	0,606;5,957	0,271
Dominante	CC	38/62,30%	44 /42,31%	1		
	CG+GG	23/37,70%	60/57,69%	2,253	1,179;4,305	0,014
Recesivo	GG	5/8,20%	11/10,58%	1		
	CC+CG	56/91,80%	93/89,42%	0,755	0,249;2,286	0,619

El análisis de los resultados muestra que el alelo G está asociado a un incremento del riesgo de cáncer de mama en ausencia de mutación en los genes BRCA1/2, en familias con alta carga hereditaria de la enfermedad.

- **Pacientes con baja carga hereditaria de la enfermedad (menos de tres familiares afectados)**

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos en los grupos de mujeres portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 y no portadoras, con menos de tres familiares afectados, no mostró diferente distribución de los genotipos de ninguno de los polimorfismos estudiados en ambos grupos de pacientes.

En la tabla 97 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1 c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T, en los grupos de pacientes estudiados.

Tabla 97. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos CMF+ y CMF-<3.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	31/50,8%	86/41,3%	0,348
	AG	25/41,0%	95/45,7%	
	GG	5/8,2%	27/11,9%	
c.3667A>G	AA	35/57,4%	97/46,6%	0,294
	AG	21/34,4%	84/40,4%	
	GG	5/8,2%	27/13,0%	
c.2731C>	CC	32/52,5%	86/41,3%	0,233
	CT	23/37,7%	88/42,3%	
	TT	6/9,8%	34/16,3%	

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 mostró resultados similares (Tabla 98).

Tabla 98. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos CMF+ y CMF-<3.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	29/47,5%	99/47,6%	0,823
	TG	22/36,1%	81/38,9%	
	GG	10/16,4%	28/13,5%	
p.Arg72Pro	GG	31/50,8%	119/57,2%	0,342
	GC	26/42,6%	83/39,9%	
	CC	4/6,6%	6/2,9%	

En la tabla 99 mostramos la distribución de genotipos de los polimorfismos FGFR2 y miR146 y la región cromosómica 8q24.

Tabla 99. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos CMF+ y CMF-<3.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	9/14,8%	46/22,1%	0,314
	CT	30/49,2%	104/50,0%	
	TT	22/36,1%	58/27,9%	
rs13281615	AA	15/24,6%	69/33,2%	0,385
	AG	33/54,1%	94/45,2%	
	GG	13/21,3%	45/21,6%	
rs2910164	CC	38/62,3%	115/51,0%	0,475
	CG	18/29,5%	79/41,0%	
	GG	5/8,2%	14/8,0%	

El análisis de la distribución de genotipos de los polimorfismos en los grupos de pacientes portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función de la historia familiar mostró que, el polimorfismo rs2910164 del gen miR146 presenta una distinta distribución de genotipos en el grupo de pacientes portadores con respecto al grupo de pacientes no portadores con mayor carga hereditaria de la enfermedad.

3.5. Comparación de la distribución de genotipos de los polimorfismos de los genes BRCA1, TP53, MDM2, FGFR2, miR146 y región cromosómica 8q24 en mujeres con cáncer de mama familiar no portadoras (CMF->3 y CMF-<3)

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos en el grupo de mujeres no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 no permite determinar si, en función de la historia familiar existe una distinta distribución de los genotipos de los polimorfismos de los genes BRCA1, TP53, MDM2, FGFR2, miR146 y región 8q24.

En la tabla 100 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1 en el grupo de pacientes no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 en función de la historia familiar.

Tabla 100. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos CMF->3 y CMF-<3.

	Genotipo	CMF->3 (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	46/44,2%	86/41,3%	0,868
	AG	46/44,2%	95/45,7%	
	GG	12/11,5%	27/11,9%	
c.3667A>G	AA	45/43,3%	97/46,6%	0,592
	AG	48/46,2%	84/40,4%	
	GG	11/10,6%	27/13,0%	
c.2731C>T	CC	39/37,5%	86/41,3%	0,625
	CT	50/48,1%	88/42,3%	
	TT	15/14,4%	34/16,3%	

Al comparar la distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en el grupo de mujeres no portadoras de

mutación en los genes BRCA1/2 en función de la historia familiar obtenemos resultados similares (Tabla 101).

Tabla 101. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos CMF->3 y CMF-<3.

	Genotipo	CMF->3 (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	42/40,4%	99/47,6%	0,305
	TG	50/48,1%	81/38,9%	
	GG	12/11,5%	28/13,5%	
p.Arg72Pro	GG	51/49,0%	119/57,2%	0,056
	GC	44/42,3%	83/39,9%	
	CC	9/8,7%	6/2,9%	

La distribución de los genotipos de los polimorfismos identificados mediante GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146, no mostró diferencias en el grupo de pacientes no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 (Tabla 102).

Tabla 102. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos CMF->3 y CMF-<3.

	Genotipo	CMF->3 (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	28/26,9%	46/22,1%	0,454
	CT	53/51,0%	104/50,0%	
	TT	23/22,1%	58/27,9%	
rs13281615	AA	31/29,8%	69/33,2%	0,629
	AG	53/51,0%	94/45,2%	
	GG	20/19,2%	45/21,6%	
	CC	44/42,31%	115/51,0%	0,083

rs2910164	CG	49/47,12%	79/41,0%
	GG	11/10,58%	14/8,0%

A modo de resumen, en la tabla 103 mostramos los resultados significativos del análisis de las distribuciones de los genotipos de los polimorfismos estudiados en los distintos grupos de pacientes.

Tabla 103. Tabla resumen de las distribuciones de los genotipos de los polimorfismos estudiados en los distintos grupos de pacientes y su implicación en el cáncer de mama.

Tabla resumen

Control	Vs CM total	c.2731C>T	TT asociado a CM
		p.Arg72Pro	Pro/Pro protector
			Arg asociado CM
	Vs CMF+	-	-
	Vs CMF-	c.2731C>T	TT asociado CM
		p.Arg72Pro	Pro/Pro protector
			Arg asociado CM
	Vs CMF->3	rs2910164 (miR146)	G asociado CM
	Vs CMF-<3	c.2731C>T	TT asociado CM
		p.Arg72Pro	Pro/Pro protector
		Arg y Arg/Arg asociado CM	
CMF+	Vs CMF-	-	-
	Vs CMF->3	rs2910164 (miR146)	G asociado CM no portadores
	Vs CMF-<3	-	-
CMF->3	Vs CMF-<3	-	-

4. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES BRCA1 (rs799917, rs16941, rs16942), TP53 (rs1042522), MDM2 (rs2279744), FGFR (rs2981582), miR146 (rs2910164) Y REGIÓN CROMOSÓMICA 8q24 (rs13281615) EN CÁNCER DE MAMA FAMILIAR EN FUNCIÓN DE LA VARIABLE EDAD

La edad de diagnóstico puede ser un factor condicionante en la distinta distribución de genotipos de los polimorfismos de los genes BRCA1, TP53, MDM2,

FGFR2, miR146 y región 8q24 en los grupos de pacientes incluidos en el estudio. Para determinar si la edad de diagnóstico y la distribución genotípica de los polimorfismos están asociados en los distintos grupos de pacientes, analizaremos la relación en cada grupo de pacientes, subdivididos en función de la edad en mayores y menores de 40 años.

4.1. Grupo de pacientes portadores de mutación

En la tabla 104 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1 en el grupo de pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1 en función de la variable edad.

Tabla 104. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en el grupo CMF+ en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	8/36,4%	23/59,0%	0,224
	AG	12/54,5%	13/33,3%	
	GG	2/9,1%	3/7,7%	
c.3667A>G	AA	12/54,5%	23/59,0%	0,942
	AG	8/36,4%	13/33,3%	
	GG	2/9,1%	3/7,7%	
c.2731C>T	CC	9/40,9%	23/59,0%	0,381
	CT	10/45,5%	13/33,3%	
	TT	3/13,6%	3/7,7%	

El estudio de la distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en función de la variable edad, mostró que los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 presentan una distinta distribución en función de la edad de diagnóstico del cáncer de mama (Tabla 105).

Tabla 105. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en el grupo CMF+ en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	11/50,0%	18/46,2%	0,903
	TG	8/36,4%	14/35,9%	
	GG	3/13,6%	7/17,9%	
p.Arg72Pro	GG	14/63,64%	17/43,59%	0,031
	GC	5/22,73%	21/53,85%	
	CC	3/13,64%	1/2,56%	

Para verificar esta observación procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 106).

Tabla 106. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en el grupo CMF+ en función de la variable edad, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	<40 (Nº/%)	>40 (Nº/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	GG	14/63,64%	17/43,59%	1		
	GC	5/22,73%	21/53,85%	3,459	1,037;11,539	0,044
	CC	3/13,64%	1/2,56%	0,275	0,026;2,94	0,285
Dominante	GG	14/63,64%	17/43,59%	1		
	GC+CC	8/36,36%	22/56,41%	2,265	0,773;6,634	0,136
Recesivo	CC	3/13,64%	1/2,56%	1		
	GG+GC	19/86,36%	38/97,44%	6	0,584;61,619	0,132

El análisis de los resultados muestra que, el genotipo Arg/Pro (GC) está asociado a un retraso en la edad de aparición del tumor, ya que aparece asociado al grupo de pacientes con diagnóstico de la enfermedad posterior a los 40 años.

Observamos resultados similares al analizar la distribución de los genotipos de los polimorfismos identificados mediante GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146 (Tabla 107).

Tabla 107. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en el grupo CMF+ en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	2/9,1%	7/17,9%	0,614
	CT	11/50,0%	19/48,7%	
	TT	9/40,9%	13/33,3%	
rs13281615	AA	5/22,7%	10/25,6%	0,694
	AG	11/50,0%	22/56,4%	
	GG	6/27,3%	7/17,9%	
rs2910164	CC	18/81,82%	20/51,28%	0,030
	CG	2/9,09%	16/41,03%	
	GG	2/9,09%	3/7,69%	

Los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 presentan distinta distribución en función de la edad de diagnóstico, por lo que procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 108).

Tabla 108. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en el grupo CMF+ en función de la variable edad, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	<40 (Nº/%)	>40 (Nº/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	18/81,82%	20/51,28%	1		
	CG	2/9,09%	16/41,03%	7,2	1,451;35,732	0,016
	GG	2/9,09%	3/7,69%	1,35	0,202;9,018	0,757
Dominante	CC	18/81,82%	20/51,28%	1		

Recesivo	CG+GG	4/18,18%	19/48,72%	4,275	1,222;14,954	0,023
	GG	2/9,09%	3/7,69%	1		
	CC+CG	20/90,91%	36/92,31%	1,2	0,185;7,792	0,849

El análisis de los resultados muestra que, el alelo G (principalmente el genotipo CG) está asociado a un retraso en la edad de aparición del cáncer.

4.2. Grupo de pacientes no portadores de mutación.

En la tabla 109 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en el grupo de pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1 en función de la edad.

Tabla 109. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en el grupo CMF- en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	31/30,39%	101/48,10%	0,001
	AG	62/60,78%	79/37,62%	
	GG	9/8,82%	30/14,29%	
c.3667A>G	AA	43/42,2%	99/47,1%	0,184
	AG	50/49,0%	82/39,0%	
	GG	9/8,8%	29/13,8%	
c.2731C>T	CC	37/36,3%	88/41,9%	0,229
	CT	52/51,0%	86/41,0%	
	TT	13/12,7%	36/17,1%	

Observamos que los genotipos del polimorfismo c.3232A>G presentan una distinta distribución en el grupo de pacientes no portadores de mutación en los genes

BRCA1/2 en función de la edad de diagnóstico, por lo que procedemos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 110).

Tabla 110. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en el grupo CMF- en función de la variable edad, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	<40 (Nº/%)	>40 (Nº/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	AA	31/30,39%	101/48,10%	1		
	AG	62/60,78%	79/37,62%	0,391	0,232;0,659	0,000
	GG	9/8,82%	30/14,29%	1,023	0,439;2,386	0,958
Dominante	AA	31/30,39%	101/48,10%	2,122	1,286;3,504	0,003
	AG+GG	71/69,61%	109/51,90%	1		
Recesivo	GG	9/8,82%	30/14,29%	1		
	AA+AG	93/91,18%	180/85,71%	0,581	0,265;1,274	0,175

Al comparar la distribución de genotipos del polimorfismo c.3232A>G observamos que el genotipo AA está asociado a un retraso en la edad de aparición del tumor, mientras que el genotipo AG aparece asociado a un desarrollo temprano de la enfermedad.

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 no mostró diferencias significativas en función de la edad de diagnóstico (Tabla 111).

Tabla 111. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en el grupo CMF- en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	45/44,1%	96/45,7%	0,786
	TG	42/41,2%	89/42,4%	
	GG	15/14,7%	25/11,9%	

p.Arg72Pro	GG	51/50,0%	119/56,7%	0,348
	GC	44/43,1%	83/39,5%	
	CC	7/6,9%	8/3,8%	

En la tabla 112 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos identificados mediante GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs1328165 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146, observando que la distribución de genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 es distinta en función de la edad de diagnóstico del cáncer.

Tabla 112. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs1328165 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en el grupo CMF- en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	30/29,41%	44/20,95%	0,001
	CT	54/52,94%	103/49,05%	
	TT	18/17,65%	63/30,00%	
rs13281615	AA	31/30,4%	69/32,9%	0,537
	AG	46/45,1%	101/48,1%	
	GG	25/24,5%	40/19,0%	
rs2910164	CC	53/52,0%	106/50,5%	0,872
	CG	40/39,2%	88/41,9%	
	GG	9/8,8%	16/7,6%	

Para verificar esta observación realizamos un análisis de riesgo (Tabla 113).

Tabla 113. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en el grupo CMF- en función de la variable edad, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

Genotipo	<40 (Nº/%)	>40 (Nº/%)	OR	IC (95%)	p
-----------------	----------------------	----------------------	-----------	-----------------	----------

Codominante	CC	30/29,41%	44/20,95%	1		
	CT	54/52,94%	103/49,05%	1,301	0,736;2,297	0,365
	TT	18/17,65%	63/30,00%	2,386	1,185;4,805	0,015
Dominante	CC	30/29,41%	44/20,95%	1		
	CT+TT	72/70,59%	166/79,05%	1,572	0,916;2,698	0,101
Recesivo	TT	18/17,65%	63/30,00%	2	1,11;3,602	0,021
	CC+CT	84/82,35%	147/70,00%	1		

El análisis de los resultados mostró que, el genotipo TT aparece asociado a un retraso en la edad de aparición del cáncer de mama.

Tras observar estos resultados decidimos determinar si el número de familiares afectados (historia familiar) modifica los resultados obtenidos, para lo que el grupo de mujeres con cáncer de mama no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 fue dividido en dos grupos en función del número de familiares afectados.

- **Pacientes con alta carga hereditaria de la enfermedad (tres o más familiares afectados)**

En la tabla 114 mostramos la distribución de genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1, c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T, no observándose diferente distribución de genotipos.

Tabla 114. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en el grupo CMF->3 en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	11/55,0%	35/41,7%	0,361
	AG	6/30,0%	40/47,6%	
	GG	3/15,0%	9/10,7%	

c.3667A>G	AA	11/55,0%	34/40,5%	0,266
	AG	6/30,0%	42/50,0%	
	GG	3/15,0%	8/9,5%	
c.2731C>T	CC	9/45,0%	30/35,7%	0,700
	CT	8/40,0%	42/50,0%	
	TT	3/15,0%	12/14,3%	

El análisis de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 tampoco mostró una diferente distribución de genotipos (Tabla 115).

Tabla 115. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en el grupo CMF->3 en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	6/30,0%	36/42,9%	0,486
	TG	12/60,0%	38/45,2%	
	GG	2/10,0%	10/11,9%	
p.Arg72Pro	GG	6/30,0%	45/53,6%	0,156
	GC	12/60,0%	32/38,1%	
	CC	2/10,0%	7/8,3%	

La distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR164 no mostró diferencias en el grupo de pacientes estudiado (Tabla 116).

Tabla 116. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en el grupo CMF->3 en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	6/30,0%	22/26,2%	0,693

rs13281615	CT	11/55,0%	42/50,0%	
	TT	3/15,0%	20/23,8%	
	AA	3/15,0%	28/33,3%	0,081
	AG	10/50,0%	43/51,2%	
	GG	7/35,0%	13/15,5%	
rs2910164	CC	9/45,0%	35/41,7%	0,682
	CG	8/40,0%	41/48,8%	
	GG	3/15,0%	8/9,5%	

- **Pacientes con baja carga hereditaria de la enfermedad (menos de tres familiares afectados)**

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos de BRCA1, c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T, permitió observar una distinta distribución de los genotipos de los tres polimorfismos en función de la edad de diagnóstico de la enfermedad (Tabla 117).

Tabla 117. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en el grupo CMF->3 en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	20/24,4%	66/52,4%	0,000
	AG	56/68,3%	39/31,0%	
	GG	6/7,3%	21/16,7%	
c.3667A>G	AA	32/39,02%	65/51,59%	0,004
	AG	44/53,66%	40/31,75%	
	GG	6/7,32%	21/16,67%	
c.2731C>T	CC	28/34,1%	58/46,0%	0,027
	CT	44/53,7%	44/34,9%	

TT	10/12,2%	24/19,1%
----	----------	----------

Para verificar esta observación procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 118-120).

Tabla 118. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en el grupo CMF-<3 en función de la variable edad, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	<40 (Nº/%)	>40 (Nº/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	AA	20/24,4%	66/52,4%	1		
	AG	56/68,3%	39/31,0%	0,211	0,111;0,403	0,000
	GG	6/7,3%	21/16,7%	1,061	0,376;2,989	0,911
Dominante	AA	20/24,4%	66/52,4%	1		
	AG+GG	62/75,6%	60/47,6%	0,608	0,342;1,081	0,090
Recesivo	GG	6/7,3%	21/16,7%	1		
	AA+AG	76/92,7%	105/83,3%	0,590	0,266;1,310	0,195

El análisis de los resultados mostró que, en el caso del polimorfismo c.3232A>G, el genotipo AG está relacionado con el riesgo de desarrollo temprano de la enfermedad (Tabla 118).

Tabla 119. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en el grupo CMF-<3 en función de la variable edad, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	<40 (Nº/%)	>40 (Nº/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	AA	32/39,02%	65/51,59%	1		
	AG	44/53,66%	40/31,75%	0,448	0,245;0,817	0,009
	GG	6/7,32%	21/16,67%	1,723	0,633;4,689	0,287
Dominante	AA	32/39,02%	65/51,59%	1		
	AG+GG	50/60,98%	61/48,41%	0,601	0,341;1,056	0,077

Recesivo	GG	6/7,32%	21/16,67%	2,533	0,976;6,577	0,056
	AA+AG	76/92,68%	105/83,33%	1		

El análisis de los resultados mostró que, en el caso del polimorfismo c.3667A>G, el genotipo GG está asociado a un retraso en la edad de aparición del cáncer, mientras que el genotipo AG aparece como implicado en el desarrollo temprano de la enfermedad (Tabla 119).

Tabla 120. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en el grupo CMF-<3 en función de la variable edad, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	<40 (Nº/%)	>40 (Nº/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	28/34,1%	58/46,0%	1		
	CT	44/53,7%	44/34,9%	0,483	0,261;0,893	0,020
	TT	10/12,2%	24/19,1%	1,159	0,488;2,751	0,739
Dominante	CC	28/34,1%	58/46,0%	1		
	CT+TT	54/65,9%	68/54,0%	0,608	0,342;1,081	0,090
Recesivo	TT	10/12,2%	24/19,1%	1		
	CC+CT	72/87,8%	102/80,9%	0,590	0,266;1,310	0,195

En el caso del polimorfismo c.2731C>T, el análisis de los resultados mostró que el genotipo heterocigoto CT está asociado con el riesgo de desarrollo temprano de la enfermedad (Tabla 120).

En la tabla 121 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en función de la edad.

Tabla 121. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en el grupo CMF-<3 en función de la edad.

Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
-----------------	---------------------	---------------------	----------------

c.-309T>G	TT	39/47,6%	60/47,6%	0,681
	TG	30/36,6%	51/40,5%	
	GG	13/15,9%	15/11,9%	
p.Arg72Pro	GG	45/54,9%	74/58,7%	0,082
	GC	32/39,0%	51/40,5%	
	CC	5/6,1%	1/0,8%	

El estudio de la distribución de los genotipos de los polimorfismos identificados mediante GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146 mostró que, el polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 presenta una diferente distribución de genotipos en función de la edad (Tabla 122).

Tabla 122. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en el grupo CMF-<3 en función de la edad.

	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	24/29,27%	22/17,46%	0,021
	CT	43/52,44%	61/48,41%	
	TT	15/18,29%	43/34,13%	
rs13281615	AA	28/34,1%	41/32,5%	0,954
	AG	36/43,9%	58/46,0%	
	GG	18/22,0%	27/21,4%	
rs2910164	Genotipo	<40 (N/%)	>40 (N/%)	0,917
	CC	44/53,7%	71/56,3%	
	CG	32/39,0%	47/37,3%	
	GG			

Para verificar la distinta distribución de genotipos del polimorfismo rs2981582 procedimos a realizar un análisis de riesgo (Tabla 123).

Tabla 123. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en el grupo CMF- <3 en función de la variable edad, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	<40 (Nº/%)	>40 (Nº/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	24/29,27%	22/17,46%	1		
	CT	43/52,44%	61/48,41%	1,548	0,77;3,11	0,22
	TT	15/18,29%	43/34,13%	3,127	1,371;7,134	0,007
Dominante	CC	24/29,27%	22/17,46%	1		
	CT+TT	58/70,73%	104/82,54%	1,956	1,009;3,791	0,047
Recesivo	TT	15/18,29%	43/34,13%	2,314	1,184;4,523	0,014
	CC+CT	67/81,71%	83/65,87%	1		

El análisis los resultados mostró que, en el grupo de pacientes con baja carga hereditaria de la enfermedad, el alelo T está asociado a un retraso en la edad de aparición del cáncer.

4.3. Comparación de la distribución de genotipos en mujeres portadoras de mutación y en no portadoras, en menores de 40 años

En la tabla 124 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1 en mujeres menores de 40 años, portadoras y no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2.

Tabla 124. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos CMF+ y CMF- en menores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	8/36,4%	31/30,4%	0,850
	AG	12/54,5%	62/60,8%	

c.3667A>G	GG	2/9,1%	9/8,8%	
	AA	12/54,5%	43/42,2%	0,536
	AG	8/36,4%	50/49,0%	
	GG	2/9,1%	9/8,8%	
c.2731C>T	CC	9/40,9%	37/36,3%	0,893
	CT	10/45,5%	52/51,0%	
	TT	3/13,6%	13/12,7%	

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos de los genes MDM2 y TP53 en mujeres menores de 40 años no muestra distinta distribución de genotipos (Tabla 125).

Tabla 125. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos CMF+ y CMF- en menores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	11/50,0%	45/44,1%	0,879
	TG	8/36,4%	42/41,2%	
	GG	3/13,6%	15/14,7%	
p.Arg72Pro	GG	14/63,6%	51/50,0%	0,167
	GC	5/22,7%	44/43,1%	
	CC	3/13,6%	7/6,9%	

En la tabla 126 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos identificados mediante GWAS, rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146, en mujeres menores de 40 años.

Tabla 126. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos CMF+ y CMF- en menores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	2/9,09%	30/29,41%	0,024
	CT	11/5,00%	54/52,94%	
	TT	9/40,91%	18/17,65%	
rs13281615	AA	5/22,7%	31/30,4%	0,773
	AG	11/50,0%	46/45,1%	
	GG	6/27,3%	25/24,5%	
rs2910164	CC	18/81,82%	53/51,96%	0,022
	CG	2/9,09%	40/39,22%	
	GG	2/9,09%	9/8,82%	

Observamos los genotipos de los polimorfismos rs2981582 (Tabla 127) y rs2910164 (Tabla 128) presentan distinta distribución en ambos grupos de pacientes, por lo que procedimos a realizar un análisis de riesgo.

Tabla 127. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en los grupos CMF+ y CMF-, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	2/9,09%	30/29,41%	1		
	CT	11/5,00%	54/52,94%	0,327	0,068;1,575	0,164
	TT	9/40,91%	18/17,65%	0,133	0,026;0,687	0,016
Dominante	CC	2/9,09%	30 /29,41%	1		
	CT+TT	20/90,91%	72/70,59%	0,24	0,053;1,091	0,065
Recesivo	TT	9/40,91%	18/17,65%	1		
	CC+CT	13/59,09%	84/82,35%	3,231	1,2;8,701	0,02

El análisis de los resultados mostró que, el genotipo TT está asociado a un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama en presencia de mutación en los genes BRCA1/2, puesto que está asociado al grupo de portadores, mientras que el alelo

C está asociado al grupo de pacientes no portadores, por lo que están implicados en el incremento del riesgo de padecer cáncer en ausencia de mutación.

Tabla 128. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en los grupos CMF+ y CMF-, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	18/81,82%	53/51,96%	1		
	CG	2/9,09%	40/39,22%	6,792	1,489;30,978	0,013
	GG	2/9,09%	9/8,82%	1,528	0,302;7,744	0,608
Dominante	CC	18/81,82%	53 /51,96	1		
	CG+GG	4/18,18%	49/48,04%	4,16	1,316;13,152	0,015
Recesivo	GG	2/9,09%	9/8,82%	1		
	CC+CG	20/90,91%	93/91,18%	1,033	0,207;5,152	0,968

El análisis de los resultados, en el caso del polimorfismo rs2910164 del gen miR146, mostró que el alelo G está asociado al grupo de pacientes no portadores de mutación y por tanto, a un incremento del riesgo de cáncer de mama en ausencia de mutación en los genes BRCA1/2.

4.4. Comparación de la distribución de genotipos en mujeres portadoras de mutación y en no portadoras, en mayores de 40 años

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen BRCA1 en mujeres mayores de 40 años, no mostró diferencias en la distribución de genotipos en mujeres portadoras y no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 (Tabla 129).

Tabla 129. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos CMF+ y CMF- en mayores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
c.3232A>G	AA	23/59,0%	101/48,1%	0,363
	AG	13/33,3%	79/37,6%	
	GG	3/7,7%	30/14,3%	
c.3667A>G	AA	23/59,0%	99/47,1%	0,336
	AG	13/33,3%	82/39,0%	
	GG	3/7,7%	29/13,8%	
c.2731C>T	CC	23/59,0%	88/41,9%	0,105
	CT	13/33,3%	86/41,0%	
	TT	3/7,7%	36/17,1%	

En la tabla 130 mostramos la distribución de los genotipos de los polimorfismos de los genes MDM2 y TP53 en mujeres portadoras y no portadoras mayores de 40 años.

Tabla 130. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.-309T>G del gen MDM2 y p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos CMF+ y CMF- en mayores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
c.-309T>G	TT	18/46,2%	96/45,7%	0,530
	TG	14/35,9%	89/42,4%	
	GG	7/17,9%	25/11,9%	
p.Arg72Pro	GG	17/43,6%	119/56,7%	0,248
	GC	21/53,8%	83/39,5%	
	CC	1/2,6%	8/3,8%	

Idéntico resultado hemos obtenido al analizar la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 y rs2910164 de los genes FGFR2 y miR146 y el polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 (Tabla 131).

Tabla 131. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en los grupos CMF+ y CMF- en mayores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p-valor
rs2981582	CC	7/17,9%	44/21,0%	0,876
	CT	19/48,7%	103/49,0%	
	TT	13/33,3%	63/30,0%	
rs13281615	AA	10/25,6%	69/32,9%	0,600
	AG	22/56,4%	101/48,1%	
	GG	7/17,9%	40/19,0%	
rs2910164	CC	20/51,3%	106/50,5%	0,995
	CG	16/41,0%	88/41,9%	
	GG	3/7,7%	16/7,6%	

4.5. Comparación de la distribución de genotipos en mujeres portadoras de mutación y en no portadoras con tres o más familiares afectados, en menores de 40 años

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos en mujeres menores de 40 años, portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 y no portadoras con alta carga hereditaria de la enfermedad mostró que el polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 (Tabla 132) presenta una distinta distribución genotípica entre ambos grupo de pacientes. Por el contrario, los polimorfismos de los genes BRCA1 (c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T), MDM2 (c.-309T>G), FGFR2 (rs2981582), la región 8q24 (rs13281615) y miR146 (rs2910164) no muestran diferente distribución de genotipos (Tablas A202-A204 Anexo).

En la tabla 132 mostramos la distribución de genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes menores de 40 años. Observamos que el alelo Pro (C), especialmente el genotipo Arg/Pro (GC), está asociado a un incremento del riesgo de cáncer de mama en familias con alta carga hereditaria de la enfermedad no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2.

Tabla 132. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos CMF+ y CMF->3 en menores de 40 años, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	GG	14/63,64%	6/30,00%	1		
	GC	5/22,73%	12/60,00%	5,6	1,36;23,059	0,017
	CC	3/13,64%	2/10,00%	1,556	0,205;11,829	0,669
Dominante	GG	14/63,64%	6 /30,00%	1		
	GC+CC	8/36,36%	14/70,00%	4,083	1,122;14,863	0,033
Recesivo	CC	3/13,64%	2/10,00%	1		
	GG+GC	19/86,36%	18/90,00%	1,421	0,212;9,518	0,717

4.6. Comparación de la distribución de genotipos en mujeres portadoras de mutación y en no portadoras con tres o más familiares afectados, en mayores de 40 años

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos en mujeres mayores de 40 años, portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 y no portadoras con alta carga hereditaria de la enfermedad mostró que sólo los polimorfismos c.2731C>T del gen BRCA1 y rs2910164 del gen miR146 presentan una distinta distribución genotípica entre ambos grupos (Tabla 133-134). Por el contrario, los polimorfismos c.3232A>G y c.3667A>G del gen BRCA1, p.Arg72Pro del gen TP53, c.-309T>G del gen MDM2, rs2981582 del gen FGFR2 y rs13281615 de la región 8q24 no presentan diferente distribución de genotipos en los grupos de pacientes estudiados (Tablas A205-A207 Anexo).

Como mostramos en la tabla 133, al comparar la distribución del genotipo c.2731C>T en pacientes mayores de 40 años observamos que existen diferencias estadísticamente significativas en la distribución de genotipos entre portadores y no portadores. El alelo T es más frecuente en familias no portadoras con alta carga

hereditaria de la enfermedad, incrementando el riesgo de padecer cáncer de mama en ausencia de mutación en los genes BRCA1/2.

Tabla 133. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en los grupos CMF+ y CMF->3 en mayores de 40 años, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	23/58,97%	30/35,71%	1		
	CT	13/33,33%	42/50,00%	2,477	1,085;5,657	0,031
	TT	3/7,69%	12/14,29%	3,067	0,774;12,151	0,111
Dominante	CC	23/58,97%	30/35,71%	1		
	CT+TT	16/41,03%	54/64,29%	2,587	1,188;5,637	0,017
Recesivo	TT	3/7,69%	12/14,29%	1		
	CC+CT	36/92,31%	72/85,71%	0,5	0,133;1,885	0,306

El análisis de la distribución de genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en mayores de 40 años mostró que el alelo G es más frecuente en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (Tabla 134).

Tabla 134. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en los grupos CMF+ y CMF->3 en mayores de 40 años, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	15/65,2%	13/33,3%	1		
	CG	7/30,4%	21/53,8%	3,462	1,115;10,746	0,032
	GG	1/4,3%	5/12,8%	5,769	0,595;55,947	0,131
Dominante	CC	15/65,2%	13/33,3%	1		
	CG+GG	8/34,8%	26/66,7%	3,750	1,266;11,110	0,017
Recesivo	GG	1/4,3%	5/12,8%	1		
	CC+CG	22/95,7%	34/87,2%	0,309	0,034;2,826	0,298

4.7. Comparación de la distribución de genotipos en mujeres portadoras de mutación y en no portadoras con menos de tres familiares afectados, en menores de 40 años

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos en mujeres menores de 40 años, portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 y no portadoras con baja carga hereditaria de la enfermedad mostró que el polimorfismo rs2910164 del gen miR146 (Tabla 135) presenta una distinta distribución genotípica entre ambos grupos de pacientes. Por el contrario, los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1, p.Arg72Pro del gen TP53, c.-309T>G del gen MDM2, rs2981582 del gen FGFR2 y rs13281615 de la región 8q24 no presentan distinta distribución de genotipos (Tablas A208-A210 Anexo).

En la tabla 135 mostramos que, al comparar la distribución de genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes menores de 40 años, observamos que el alelo G está asociado al incremento del riesgo de padecer cáncer de mama en ausencia de mutación en los genes BRCA1/2 en familias con baja carga hereditaria de la enfermedad.

Tabla 135. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en los grupos CMF+ y CMF-<3 en menores de 40 años, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF-<3 (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	CC	18/81,82%	44/53,66%	1		
	CG	2/9,09%	32/39,02%	6,545	1,417;30,234	0,016
	GG	2/9,09%	6/7,32%	1,227	0,226;6,662	0,812
Dominante	CC	18/81,82%	44/53,66%	1		
	CG+GG	4/18,18%	38/46,34%	3,886	1,21;12,486	0,023
Recesivo	GG	2/9,09%	6/7,32%	1		
	CC+CG	20/90,91%	76/92,68%	1,267	0,237;6,758	0,782

4.8. Comparación de la distribución de genotipos en mujeres portadoras de mutación y en no portadoras con menos de tres familiares afectados, en mayores de 40 años

No hemos observado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos de los polimorfismos incluidos en el estudio al comparar, en pacientes mayores de 40 años, los grupos de pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 y no portadores con baja carga hereditaria de la enfermedad (Tablas A211-A213 Anexo).

4.9. Comparación de la distribución de genotipos en mujeres no portadoras de mutación en función del número de familiares afectados, en menores de 40 años

No hemos observado diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos de los polimorfismos incluidos en el estudio al comparar, en pacientes menores de 40 años, los grupos de pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados (Tablas A214-A216 Anexo).

4.10. Comparación de la distribución de genotipos en mujeres no portadoras de mutación en función del número de familiares afectados, en mayores de 40 años

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos en mujeres mayores de 40 años no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2 con alta y baja carga hereditaria de la enfermedad mostró que el polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 presenta una distinta distribución genotípica entre ambos grupos (Tabla 136). Por el contrario los polimorfismos de los genes BRCA1, MDM2, FGFR, miR146 y la región 8q24 no presentan distinta distribución de genotipos entre los grupos de pacientes incluidos en el estudio (Tablas A217-A219 Anexo).

El análisis de la distribución de genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en mujeres mayores de 40 años mostró que existe una diferente distribución de genotipos en función del número de familiares afectados (Tabla 136). Sin embargo, aunque existe significación estadística (p valor 0,022), parece que ésta es debida exclusivamente a la baja incidencia del genotipo CC (menos frecuente) en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2, lo que imposibilita el cálculo estadístico de riesgo.

Tabla 136. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en los grupos CMF->3 y CMF-<3 en mayores de 40 años, indicando la significación y el OR. Regresión logística multivariante.

	Genotipo	CMF->3 (N/%)	CMF-<3 (N/%)	OR	IC (95%)	p
Codominante	GG	25/64,1%	35/59,3%	1		
	GC	10/25,6%	24/40,7%	1,714	0,698;4,211	0,240
	CC	4/10,3%	0/0,0%	-	-	-
Dominante	GG	25/64,1%	35/59,3%	1		
	GC+CC	14/35,9%	24/40,7%	1,224	0,531;2,823	0,635
Recesivo	CC	4/10,3%	0/0,0%	1		
	GG+GC	35/89,7%	59/100,0%	-	-	-

A modo de resumen, en la tabla 137 mostramos los resultados significativos del análisis de las distribuciones de los genotipos de los polimorfismos estudiados en los distintos grupos de pacientes en función de la edad de diagnóstico de la enfermedad.

Tabla 137. Tabla resumen de las distribuciones de los genotipos de los polimorfismos estudiados en los distintos grupos de pacientes en función de la edad y su implicación en el cáncer de mama.

Tabla resumen

CMF+	Vs Edad	p.Arg72Pro	Arg/Pro asociado >40
		rs2910164 (miR146)	G y CG asociado >40
CMF-	Vs Edad	c.3232A>G	AA asociado >40
			AG asociado <40

		rs2981582 (FGFR2)	TT asociado >40
CMF->3	Vs Edad	-	-
CMF-<3	Vs Edad	c.3232A>G	AG asociado <40
		c.3667A>G	GG asociado >40
			AG asociado <40
		c.2731C>T	CT asociado <40
		rs2981582 (FGFR2)	T asociado >40
CMF+	Vs CMF- (<40)	rs2981582 (FGFR2)	TT asociado CM portadores
			C asociado CM no portadores
		rs2910164 (miR146)	G asociado CM en no portadores
	Vs CMF- (>40)	-	-
	Vs CMF->3 (<40)	p.Arg72Pro	Pro asociado CM no portadores
	Vs CMF->3 (>40)	c.2731C>T	T asociado CM en no portadores
		rs2910164 (miR146)	G asociado CM no portadores
	Vs CMF-<3 (<40)	-	-
		rs2910164 (miR146)	G asociado CM no portadores
	Vs CMF-<3 (>40)	-	-
CMF->3	Vs CMF-<3 (<40)	-	-
	Vs CMF-<3 (>40)	p.Arg72Pro	CC asociado alto riesgo
			G asociado bajo riesgo

DISCUSIÓN

El cáncer de mama hereditario representa el 5-10 % de todos los casos de cáncer de mama (Ford et al., 1995) y la herencia de una mutación germinal en uno de los dos genes de susceptibilidad al cáncer de mama, BRCA1 y BRCA2, confieren un riesgo muy alto de padecer cáncer de mama y/o ovario hereditario (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995). Se estima que aproximadamente un 20 % del riesgo de cáncer de mama familiar es debido a la presencia de mutaciones germinales en uno de los dos principales genes de susceptibilidad, BRCA1 y BRCA2 (Oldenburg et al., 2007; Lallo et al., 2012).

La historia familiar de cáncer de mama constituye el principal criterio para la identificación de los casos con mutación germinal en los genes BRCA1 y BRCA2; sin embargo, la ausencia de familiares afectados no excluye la posible presencia de mutaciones en ambos genes, siendo hasta del 18 % la prevalencia estimada de mutaciones en el gen BRCA1 en tumores de mama triple negativos en pacientes sin historial familiar mayores de 50 años (Kandel et al., 2006; Eisinger et al., 1998; Pohlreich et al., 2005; Iau et al., 2004; Foulkes et al., 2003).

Sin embargo, el análisis de los genes BRCA1/2 no permite explicar todos los casos de cáncer de mama familiar (Ford et al., 1998). La mayoría de las alteraciones identificadas en los genes BRCA1 y BRCA2 son mutaciones puntuales y pequeñas inserciones o deleciones, detectadas mediante técnicas basadas en la PCR (*polimerase chain reaction*) y, sin embargo, en los últimos años se están identificando un gran número de grandes reordenamientos genéticos (LGRs, *large genomic rearrangements*) en ambos genes (Mazoyer et al., 2005; Agata et al., 2005; Woodward et al., 2005; Casilli et al., 2006), que no es posible identificar mediante técnicas basadas en la PCR.

El primero de los grandes reordenamientos genéticos identificados en BRCA1 (deleción de 1 Kb, que eliminaba el exón 17) fue detectado en 1997 mediante la técnica de *Southern Blot* (Puget et al., 1997). En la actualidad la técnica de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) es la más frecuentemente usada para la detección de este tipo de mutaciones.

La incidencia de grandes reordenamientos genómicos es variable entre las distintas poblaciones (Figura 47). La contribución de los LGRs al conjunto de mutaciones en BRCA1 en una población varía desde el 0 % en población franco-canadiense, iraní y sudafricana hasta el 27 % en población alemana (Hogervorst et al., 2003; Moisan et al., 2006; Pietschmann et al., 2005; Sluiter et al., 2011).

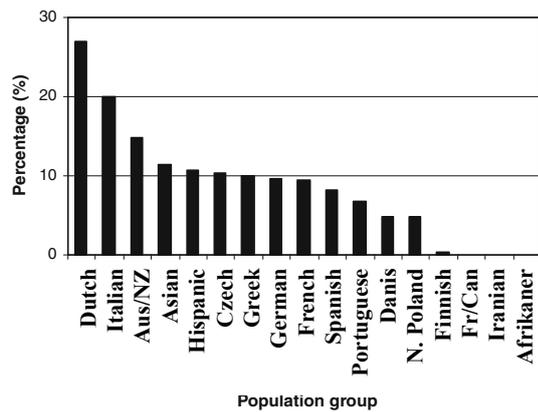


Figura 47. Porcentaje de grandes reordenamientos genéticos identificados en el gen BRCA1 en función del total de mutaciones identificadas. Aus/NZ: Australia/Nueva Zelanda; N. Poland: norte de Polonia; Fr/Can: Franco-Canadienses (Tomado de Sluiter et al., 2011).

Los reordenamientos genéticos en BRCA2 tienen una incidencia mínima en la susceptibilidad al cáncer de mama y ovario hereditario, con la excepción de la población portuguesa, donde se ha identificado una mutación fundadora, c.156_157insAlu en el exón 3, que representa más del 25 % de las mutaciones patogénicas identificadas en los genes BRCA1/2 (Machado et al., 2007; Peixoto et al., 2009).

La diferencia en la incidencia de LGRs entre BRCA1 y BRCA2 es debida a las diferencias en la estructura genómica de ambos genes. El mayor número de LGRs encontrados en el gen BRCA1 puede ser debido a la existencia de un pseudogen de BRCA1 30 Kb aguas arriba o al alto porcentaje (41,5 %) de elementos repetitivos (secuencias Alu) en el gen (Agata et al., 2005; Bunyan et al., 2004; Casilli et al., 2006; Machado et al., 2007; Nordling et al., 1998; Tournier et al., 2004; Walsh et al., 2006; Welch et al., 2001; Wang et al., 2001; Woodward et al., 2005).

En población española, la incidencia de grandes reordenamientos genómicos en el gen BRCA1 se sitúa alrededor del 1,4-1,6% en pacientes sin historial familiar de cáncer de mama, con una prevalencia del 2 % en pacientes con historia familiar no portadores de mutaciones puntuales en BRCA1 o BRCA2. La prevalencia de estos LGR en el gen BRCA2 varía desde el 0 % en casos sin historial familiar de cáncer de mama hasta el 1,5 % en pacientes con cáncer de mama hereditario no portadores de mutaciones puntuales en los genes BRCA1 o BRCA2 (Miramar et al., 2008; de la Hoya et al., 2006; Palanca Suela et al., 2008; Gutierrez-Enriquez et al., 2007; del Valle et al., 2010; García-Casado et al., 2011; Garibay et al., 2012). Estos LGR representan aproximadamente un 14,5 % del total de mutaciones patogénicas identificadas en los genes BRCA1 y BRCA2 (del Valle et al., 2010).

En nuestro trabajo hemos empleado unos criterios estrictos para la selección de pacientes con cáncer de mama hereditario, considerando como familia de alto riesgo a aquella que presenta al menos tres familiares en primer grado afectados por cáncer de mama. Tras descartar la presencia de mutaciones puntuales en los genes BRCA1 y BRCA2, procedimos al análisis de grandes reordenamientos genómicos, no identificando este tipo de alteraciones en ninguna de las 31 familias de alto riesgo seleccionadas. Dos de los principales y más recientes trabajos en población española (del Valle et al., 2010; Garibay et al., 2012) muestran un porcentaje de reordenamientos en los genes BRCA1 y BRCA2, próximo al 2 % en el gen BRCA1 y al 1 % en el gen BRCA2, en familias de alto riesgo, bajo riesgo e incluso casos de cáncer de mama esporádico; estos valores disminuyen hasta el 0,65 % en el caso del gen BRCA1 y el 0,25 % en el caso del gen BRCA2 si aplicamos criterios estrictos para la selección de familias de alto riesgo y consideramos el número de mutaciones identificadas en ambos genes en esos pacientes de alto riesgo.

En resumen, todas los pacientes incluidos en nuestro trabajo a pesar de la alta penetrancia familiar de cáncer de mama carecen de alteraciones en los genes BRCA1 y BRCA2.

1. ESTUDIO DE GENES QUE PREDISPONEN AL CÁNCER DE MAMA FAMILIAR. MODELO MONOGÉNICO.

Además de los genes BRCA1 y BRCA2, los genes TP53, PTEN, STK11, CDH1 suelen ser considerados como genes de alta penetrancia en el cáncer de mama. Las mutaciones altamente penetrantes de los genes BRCA1 y BRCA2 son muy poco frecuentes en la población y suponen menos del 20 % del riesgo genético de cáncer de mama, mientras que las mutaciones de los genes TP53, PTEN, STK11 y CDH1, suponen menos del 5 % del riesgo (Easton, 1999). Se ha estimado que el conjunto de todos los genes de alta penetrancia conocidos, únicamente podrían explicar una pequeña parte del cáncer de mama hereditario, no mas del 25 %, lo que sugiere que en la mayoría de los casos las causas continúan sin explicación (Thompson et al., 2004; Oldenburg et al., 2007; Turnbull et al., 2008; Lallo et al., 2012), y los factores

ambientales son incapaces de explicar todos los casos de cáncer de mama familiar restantes.

Dos son las principales estrategias que se han sugerido para identificar posibles genes de susceptibilidad: los estudios de ligamiento genético en familias con múltiples casos de cáncer de mama no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2, en los que se analiza la posible asociación con una región concreta del genoma, que no han logrado detectar nuevas regiones, y los estudios de asociación caso-control, enfocados al estudio de genes candidatos que analizan directamente la frecuencia de los genotipos de genes implicados en susceptibilidad.

En nuestro trabajo hemos realizado una búsqueda de mutaciones en genes de alta (TP53) y moderada penetrancia (PALB2, BRIP1, RAD51C, BARD1 y CHEK2) en familias con cáncer de mama hereditario no portadoras de mutación en los genes BRCA1 y BRCA2 con alta carga hereditaria de la enfermedad.

El análisis del gen TP53 no permitió identificar mutaciones germinales patogénicas en los pacientes con cáncer de mama hereditario y fuerte componente familiar, confirmando que la incidencia de mutaciones germinales patogénicas en familias con cáncer de mama sin síndrome de Li-Fraumeni es extremadamente baja (Garber et al., 1991; Strong et al., 1992; Borresen et al., 1992; Varley et al., 1997; Rapakko et al., 2001; de Jong et al., 2002; Evans et al., 2002; Bradbury et al., 2007; Campeau et al., 2008).

Los genes PALB2, BRIP1 y BARD1 han sido implicados en la susceptibilidad al cáncer de mama en numerosos estudios (Ghimenti et al., 2002; Ishitobi et al., 2003; Karppinen et al., 2004; Seal et al., 2006; Walsh et al., 2007; Rahman et al., 2007; Foulkes et al., 2007; Erko et al., 2007; Tischkowitz et al., 2007; De Nicolo et al., 2008; De Brakeleer et al., 2010; Ratajska et al., 2010); sin embargo, en nuestro trabajo no hemos identificado mutaciones patogénicas en ninguno de los casos de cáncer de mama familiar. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento de estos genes en cáncer de mama familiar muestran unos criterios de selección de pacientes muy poco estrictos, lo que quizás pueda explicar las discrepancias.

El gen RAD51C ha sido identificado como implicado en la susceptibilidad al cáncer de mama y ovario hereditario tras el análisis de familias con al menos un caso de cáncer de mama y un caso de cáncer de ovario, resultados que no lograron reproducir en pacientes con cáncer de mama familiar, sin antecedentes de cáncer de ovario (Meindl et al., 2010). Múltiples estudios han analizado el gen RAD51C validando los resultados obtenidos por Meindl y colaboradores (Wong et al., 2011; Thompson et al., 2011; Romero et al., 2011; Vuorela et al., 2011; Clague et al., 2011).

En nuestro trabajo, el análisis del gen RAD51C en pacientes pertenecientes a familias de alto riesgo con historial familiar de cáncer de mama y sin historial familiar de cáncer de ovario no ha permitido identificar mutaciones patogénicas, lo que confirma que RAD51C debe estudiarse sólo en familias con casos de cáncer de mama y de ovario.

La variante c.1100delC del gen CHEK2 ha sido identificada como responsable de un incremento del riesgo de hasta dos veces en mujeres y diez veces en varones de desarrollar cáncer de mama hereditario (Meijers-Heijboer et al., 2002; Vahteristo et al., 2002; Oldenburg et al., 2003; Cybulski et al., 2004). Además, una segunda variante ha sido identificada como responsable de una parte de la susceptibilidad al cáncer de mama; se trata de la variante p.I157T, asociada con un incremento moderado del riesgo (Kilpivaara et al., 2004; Cybulski et al., 2004; Bogdanova et al., 2005). Sin embargo, estudios en población española no han encontrado estas mutaciones en casos de cáncer de mama familiar de alto riesgo, moderado riesgo e incluso en cáncer de mama esporádico (Osorio et al., 2004; Bellosillo et al., 2005), no debiendo considerar al gen CHEK2 como uno de los genes implicados en la susceptibilidad al cáncer de mama en población española. Nuestros resultados confirman esta observación.

Sin embargo, un reciente estudio en población española ha identificado la mutación c.1100delC en un paciente perteneciente a una familia con diez miembros afectados de cáncer de mama. Se han estudiado además, dos familiares con cáncer de mama, uno de los cuales no era portador de la mutación c.1100delC, siendo necesario completar el estudio de segregación para determinar el grado de implicación de la mutación en la familia (Gracia-Aznarez et al., 2013).

Los resultados de nuestro estudio sugieren que los genes PALB2, BRIP1, RAD51C, TP53, BARD1 y CHEK2 no deben ser considerados como genes de predisposición al cáncer de mama en familias con alta penetrancia sin mutación en los genes BRCA1/2 y cuestiona la utilidad de incluirlas de rutina en los test genéticos de cáncer de mama y ovario hereditario. Por otra parte, pone de manifiesto la necesidad de continuar la búsqueda de genes de predisposición al síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.

1.1. Estudio del gen ABRAXAS

El gen supresor tumoral ABRAXAS (FAM175A, ABRA1 o CCDC98) codifica una proteína que actúa como organizador de un complejo enzimático que tiene como núcleo central BRCA1, permitiendo el reconocimiento de las cadenas de ADN marcadas con ubiquitina, la localización de BRCA1 en el foco de ADN dañado, la reparación de DSBs y el control del ciclo celular mediante la activación del punto de control G2/M inducido por daño (Wang et al., 2007; Sobhian et al., 2007; Wang et al., 2009; Shao et al., 2009; Kim et al., 2007; Feng et al., 2009).

Varios estudios han analizado el gen ABRAXAS en busca de mutaciones asociadas con el riesgo al desarrollo de cáncer de mama, aunque los resultados son contradictorios (Novak et al., 2008; Solyom et al., 2012). Los antecedentes en población española han identificado la mutación patogénica p.Met299Ile en una de las 168 familias de alto riesgo que incluye el estudio de Osorio y colaboradores (Osorio et al., 2009).

En nuestra serie, los criterios de selección de pacientes han sido estrictos, incluyendo sólo familias con al menos tres casos de cáncer de mama en familiares de primer grado. El análisis del gen ABRAXAS en estas familias ha permitido la identificación de dos mutaciones germinales, la variante *missense* c.1117G>A (p.Asp373Asn) y la delección *in frame* c.826_828delGAG (p.276delGlu).

La variante p.Asp373Asn (c.1117G>A) ha sido descrita previamente como polimorfismo no patogénico tras la realización de estudios poblacionales y observación de frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes y población control (Clark et al., 2003; Osorio et al., 2009; Novak et al., 2009; bases de datos UniProt y SNPdb). En

nuestro trabajo hemos realizado un análisis bioinformático de la alteración p.Asp373Asn. Los programas de predicción de patogenicidad muestran resultados contradictorios y el análisis de conservación de aminoácidos, muestra que la posición 373 no está conservada en las diferentes especies analizadas, por lo que podría modificar la función de la proteína pero no lo suficiente para favorecer el desarrollo tumoral.

La mutación c.826_828delGAG (p.276delGlu) descrita por primera vez en este trabajo, localizada en el exón 9 del gen ABRAXAS, supone la pérdida del aminoácido glutámico de la posición 276, ubicado en una región muy conservada de la proteína y próximo al dominio *coiled-coil*, una región estructuralmente importante. El análisis bioinformático de la estructura secundaria de la proteína no predice alteraciones; sin embargo, al ser un aminoácido muy conservado en diferentes especies y encontrarse muy próximo a una región de la proteína estructuralmente importante, sugiere que la mutación p.276delGlu podría ser considerada como patogénica. Sin embargo, son necesarios estudios a nivel de expresión y actividad de la proteína para confirmar la posible patogenicidad de esta mutación.

Nuestro trabajo ha permitido identificar una nueva mutación patogénica en el gen ABRAXAS siendo necesarios más estudios para confirmar su asociación como factor de riesgo para desarrollar cáncer de mama; sin embargo, la escasa frecuencia de mutaciones patogénicas asociadas con el riesgo de cáncer de mama identificadas, permite sugerir que el gen ABRAXAS no debe ser considerado como uno de los genes de susceptibilidad al cáncer de mama.

1.2. Estudio del gen ERCC4

El gen ERCC4 (excision repair cross-complementation group 4) codifica la proteína ERCC4, enzima clave en la ruta de reparación NER, que forma complejos con ERCC1 para actuar como una endonucleasa durante la reparación del ADN por escisión de nucleótidos (NER), en la eliminación de los entrecruzamientos de hebras (ICL), las roturas de doble hebra (DSB) y el proceso *class switch recombination* (CSR) de las inmunoglobulinas (Fan et al., 1999; Wood et al., 2001; Tripsianes et al., 2005; Tsodikov et al., 2005; Niedernhofer et al., 2004; Ahmad et al., 2008; Tian et al., 2004; Brookman et al., 1996).

Hasta la fecha han sido identificados un total de 580 SNPs en el gen ERCC4 y múltiples estudios han tratado de evaluar la posible asociación entre estos SNPs y el riesgo de cáncer de mama familiar y cáncer de mama esporádico, con resultados contradictorios (Winsey et al., 2000; Mohrenweiser et al., 2002; Smith et al., 2003; Lee et al., 2005; Milne et al., 2006; García-Closas et al., 2006; Huang et al., 2006; Crew et al., 2007; Rajaraman et al., 2008; Hung et al., 2008; Shao et al., 2008; McWilliams et al., 2008; Abbasi et al., 2009; Han et al., 2009; Osorio et al., 2009; Roberts et al., 2011; Doherty et al., 2011).

Estos resultados previos refuerzan la hipótesis del modelo poligénico de susceptibilidad genética, según el cual, la mayor parte de la susceptibilidad al cáncer de mama resulta del efecto combinado de múltiples variantes genéticas, cada una de las cuales desarrolla un efecto individual modesto sobre el riesgo de cáncer (Antoniou et al., 2002; Pharoah et al., 2007).

En nuestro trabajo, el análisis del gen ERCC4 en pacientes pertenecientes a familias de alto riesgo con historial familiar de cáncer de mama no ha permitido identificar mutaciones germinales patogénicas que permitan asociar el gen con la susceptibilidad al cáncer de mama familiar. No obstante, hemos identificado la mutación p.Arg576Thr, presente en el 2 % de las pacientes y en ninguna de las mujeres control. Los programas predictivos indican que se trata de una mutación patogénica y el análisis filogenético muestra que se trata de un aminoácido muy conservado, lo que nos permite sugerir que se trata de una mutación patogénica. Sin embargo, son necesarios estudios a nivel de proteína para determinar la patogenicidad de la alteración.

El análisis en controles sanos, ha permitido la identificación de dos mutaciones de nueva descripción.

La variante c.2291delG (p.Ser764Thr fsX51) modifica el marco de lectura y trunca la proteína en el codón 815. Es una mutación muy próxima al extremo C-terminal de la proteína, que resulta en la pérdida del dominio responsable de la heterodimerización con ERCC1. Esta mutación ha sido identificada en una mujer de 47 años sin antecedentes familiares de cáncer, diagnosticada de cáncer de cérvix secundario a infección por el virus del papiloma humano. La edad de la paciente no permite descartar la posibilidad de que desarrolle un cáncer de mama en un futuro. Son necesarios estudios funcionales y de segregación familiar para confirmar la patogenicidad.

Por otro lado, hemos caracterizado la variante c.974-6T>C, ubicada en el intrón 5 del gen ERCC4. El estudio predictivo preliminar mediante el programa ESEfinder mostró la aparición de un nuevo sitio ESE, por lo que esta mutación podría afectar al procesamiento del ARNm; sin embargo, serán necesarios estudios en el ARN así como estudios poblacionales para verificar estos resultados preliminares.

El análisis del gen ERCC4 forma parte de un proyecto colaborativo a nivel nacional, dirigido desde el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en el que se analizaron 1573 pacientes procedentes de familias españolas de alto riesgo sin mutación en los genes BRCA1/2 y 854 controles sin antecedentes personales y familiares de cáncer. El resultado del estudio, en el que se incluyen las mutaciones identificadas en nuestro trabajo, concluye que todas las mutaciones identificadas en pacientes con cáncer de mama aparecen en una frecuencia comparable en la población control, mientras que aquellas mutaciones identificadas exclusivamente en población control no aparecen en ningún caso en pacientes con cáncer de mama, de forma que no es posible considerarlas mutaciones patogénicas relacionadas con el riesgo de padecer cáncer de mama (artículo sometido a revisión).

A la vista de estos resultados, parece que el gen ERCC4 no debe ser considerado como uno de los genes de susceptibilidad al cáncer de mama.

2. ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS CON RIESGO DE CÁNCER DE MAMA FAMILIAR. MODELO POLIGÉNICO.

2.1. Análisis de características biológicas y subtipos clínicos de tumor en pacientes con cáncer de mama familiar

Es conocido que los pacientes portadores de mutación en el gen BRCA1 desarrollan, en la mayoría de los casos, tumores sin expresión del receptor de estrógenos (RE-) (Armes et al., 1999). Recientemente se ha observado en poblaciones de judíos Ashkenazi, con mutaciones fundadoras tanto en el gen BRCA1 como en el gen BRCA2, que los cánceres de mama desarrollados mayoritariamente no expresan los

receptores de estrógenos, progesterona ni Her2 (tumores triple negativos) (Comen et al., 2011).

Estos datos ponen de manifiesto la existencia de una asociación entre los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama y la presencia de mutaciones en las proteínas BRCA1 o BRCA2.

El análisis de los datos moleculares y clínicos de los tumores de los pacientes con cáncer de mama familiar incluidos en nuestro estudio confirma que los pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1 o BRCA2 presentan con más frecuencia tumores sin expresión de receptor de estrógenos y progesterona (41,67 %), al contrario que los pacientes no portadores de mutación (19,25 %). La expresión de Her2 es similar en ambos grupos, aunque es un 18 % más frecuente en el grupo de pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 ($p > 0,05$). No obstante, al analizar la distribución de tumores triple negativos, estos eran más frecuentes en mujeres con tumores portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (30,6 %) que en mujeres con tumores no portadores (8,7 %; $p < 0,05$).

Por otra parte, los pacientes portadores de mutaciones en los genes BRCA1/2 presentan con más frecuencia tumores de tipo *Basal Like*, mientras que entre los pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 son más frecuentes los tumores de tipo Luminal.

Estos resultados confirman que las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 asociadas a pérdida de función de los mismos, se asocian con el desarrollo de tumores más agresivos que no expresan receptores. Esta observación implica que la estrategia terapéutica en este grupo de pacientes debe de ser diferente.

No existe ningún estudio previo en el que se analicen las características biológicas de los tumores en función del historial familiar de los pacientes. En nuestro trabajo, el estudio comparativo del grupo de pacientes portadores de mutaciones en los genes BRCA1/2 y el grupo de pacientes no portadores de mutaciones subdividido en función del historial familiar, tres o más familiares afectados (CMF->3) y menos de tres familiares afectados (CMF-<3), mostró que las diferencias anteriormente observadas entre los pacientes portadores (CMF+) y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (CMF-) son debidas exclusivamente al subgrupo de pacientes con menor carga hereditaria de la enfermedad (CMF-<3). Los pacientes no portadores de mutación

en los genes BRCA1/2 y tres o más familiares afectados (CMF->3) presentan con más frecuencia tumores sin expresión de receptor de estrógenos y progesterona (22,5 % frente a 17,9 % en CMF-<3) y tumores sin sobreexpresión de Her2 (59,8 % frente a 42,9 % en CMF-<3) de forma que, la incidencia de tumores triple negativos en familias con tres o más miembros afectados (14,3 %) difiere mucho de la incidencia en familias con menos de tres miembros afectados (6,3 %). La incidencia de tumores triple negativos en familias con tres o más miembros afectados (14,3 %) se asemeja a la incidencia en familias portadoras de mutaciones en los genes BRCA1/2 (30,6 %; $p>0,05$) indicando que probablemente, las mutaciones en los genes BRCA1/2 no están relacionadas con la ausencia de expresión de los receptores de estrógenos y progesterona y de la ausencia de expresión de la proteína Her2.

Por primera vez, nuestro trabajo ha permitido identificar dos subgrupos claramente diferenciados dentro del conjunto de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1 o BRCA2, con diferencias en cuanto a las características biológicas y el subtipo clínico de tumor desarrollado.

También tratamos de determinar si existe relación entre la edad de diagnóstico del paciente y las características biológicas del tumor, por lo que repetimos los análisis realizados anteriormente subdividiendo cada grupo de pacientes en mayores y menores de 40 años. Observamos que sí existen diferencias entre los grupos de pacientes analizados en función de la edad de diagnóstico; sin embargo, estas diferencias son menores a las observadas independientemente de la variable edad, disminuyendo la capacidad de discriminar entre grupos de pacientes, y carecen de significación estadística, de forma que no podemos considerar que exista relación entre la edad de diagnóstico y las características biológicas del tumor.

2.2. Análisis de la distribución de genotipos en pacientes con cáncer de mama familiar

La mayor parte de la susceptibilidad genética resulta de los efectos combinados de muchas variantes genéticas, cada una de las cuales tiene un efecto individual modesto (Antoniou et al., 2002). El modelo poligénico de susceptibilidad al cáncer sugiere que múltiples alelos contribuyen a un incremento del riesgo familiar en la

mayoría de los cánceres. Los estudios de asociación de genes candidatos son, normalmente, el principal enfoque usado en la búsqueda de estos alelos de susceptibilidad y los resultados de estos estudios sugieren que una proporción de los SNPs en estos genes candidatos están asociados con el riesgo de cáncer de mama, pero que el efecto individual de estos SNPs es probable que sea pequeño (Pharoah et al., 2007).

En nuestro trabajo hemos analizado la distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G (rs16941), c.3667A>G (rs16942) y c.2731C>T (rs799917) del gen BRCA1, los polimorfismos c.-309T>G (rs2279744) y p.Arg72Pro (rs1042522) de los genes MDM2 y TP53 y los polimorfismos rs2981582, rs13281615 y rs2910164 del gen FGFR2, región cromosómica 8q24 y del gen miR146, en 116 mujeres sanas mayores de 40 años, sin antecedentes personales ni familiares de cáncer y en 373 probandos con cáncer de mama: 61 portadores de mutación en los genes BRCA1/2 y 312 probandos pertenecientes a diferentes familias con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1 ó BRCA2.

- **Polimorfismos del gen BRCA1**

El estudio bioinformático de los polimorfismos c.3667A>G (rs16942) y c.2731C>T (rs799917) del exón 11 del gen BRCA1 mostró que no tienen ningún efecto sobre la estructura o función de la proteína, mientras que el polimorfismo c.3232A>G (rs16941) es considerado como patogénico por los programas predictivos y se encuentra en una región muy conservada en las diferentes especies analizadas.

En el estudio de predicción de patogenicidad (Tabla 138), los programas pMUT y SIFT consideran el cambio c.3232A>G (rs16941) como patogénico. Sin embargo, ninguno de los tres programas predictivos permiten analizar las tres mutaciones conjuntamente, por lo que no podemos analizar el efecto del haplotipo.

Tabla 138. Predicciones sobre las consecuencias de los polimorfismos en estudio obtenidas con los programas Polyphen, SIFT y pMUT.

	c.3232A>G (rs16941)	c.3667A>G (rs16942)	c.2731C>T (rs799917)
Polyphen (Puntuación)	Beningno (1,160)	Beningno (0,303)	Beningno (0,700)
SIFT (Puntuación)	Patogénica (0,04)	Neutral (1,00)	Neutral (1,00)
pMUT (Puntuación)	Patogénica (0,789)	Neutral (0,095)	Neutral (0,166)

En un amplio estudio de variantes de significado desconocido realizado en 2008 se ha sugerido que el análisis con el programa Polyphen de estos polimorfismos muestra que ninguno de los tres cambios tienen significado patológico (Lee et al., 2008). Sin embargo, estudios realizados en pacientes italianos (Tommasi et al., 2008) e indios (Rajasekaran et al., 2007) han encontrado que el análisis con el programa SIFT muestra que los polimorfismos c.2731C>T y c.3232A>G presentan un índice de tolerancia inferior a 0,5 lo que sugiere que puede tener significado funcional, mientras que el estudio con el programa Polyphen no encuentra patogenicidad en estos polimorfismos pero sí en el polimorfismo c.3667A>G con un PSIC (*position-specific independent count*) de 1,658, considerándose patogénico cuando este índice es mayor de 1.1 (Tommasi et al., 2008).

Estas diferencias entre los diferentes estudios pone de manifiesto que los estudios *in silico* deben ser contemplados con precaución pues los resultados difieren entre grupos dependiendo de la secuencia incluida en el análisis.

El análisis de conservación de aminoácidos en una secuencia es un dato importante, ya que nos permite conocer los residuos de una secuencia de ADN que son importantes para la función o cuales pueden variar sin afectar a la misma. Además, también nos permite determinar cual es el grado de tolerabilidad de una proteína hacia ese cambio, ya que si el cambio se produce entre aminoácidos con propiedades fisicoquímicas diferentes, podría ser considerado como patogénico.

En este trabajo hemos empleado la base de datos UniProt para analizar el grado de conservación de los aminoácidos. Como se observa en la figura 48 la comparación de la posición 1038 (c.3232A>G; p.E1038G; rs16941) en diferentes especies pone de manifiesto que el aminoácido Glu (E) está muy conservado entre las especies analizadas, de forma que un cambio de aminoácido de Glu (E) a Gly (G) podría suponer una importante modificación de la estructura o la función de la proteína.

REMGNEN-IPSTVSTISRNNIRENVFTEASSSNINEVG-----SSTNEVGSSINEIGS	1063	F38398	Homo sapiens
REMGNEN-IPSTVSTISRNNIRENVFTEASSSNINEVG-----SSTNEVGSSINEVGS	1063	Q9GKK8	Rattus norvegicus
REMGNEN-IPSTVSTISRNNIRENVFTEASSSNINEVG-----SSTNEVGSSINEVGS	1063	Q6J6I8	Pan troglodytes
RAVGNIIPSTVSTISHNNIRENAFTEASSSNINEVG-----SSTNEVGSSINEVGP	1063	Q6J6I9	Gorilla gorilla gorilla
REMGNEN-IPSTVSTISRNNIRENVFTEASSSNINEVG-----SSTNEVGSSINEVGS	1063	Q6J6J0	Macaca mulatta
KTLGSESIQSAVSTISQNNIQESTFTEVSSNSVNEVG-----SSTNEVGSSVNEVGS	1057	Q864U1	Pongo pygmaeus
RAVGNERVIQSTVSTISQNNIRECASIEVSSSSVNEVV-----SSTNEVGSSVNEVGS	1063	Q95153	Bos taurus
-----	256	Q9JKL6	Canis familiaris
KAMNGSIIQNTVSTISQNN-RENAFTEVSSSTINEVG-----FSTNEIGSSVNEIGS	755	Q8WMT5	Sorex araneus
RAVGSESIYFSTVSTISQNYMKESARIEGSSSSVNEVS-----SSTNEVCSSINEVGS	781	Q8WMT6	Ochotona princeps
RAMGNKNIIPSTVSTISHNN-RENAFTEVSSSSIEYVGSSTNEAGSSTNEVGSSINEVGS	845	Q46488	Alouatta seniculus
RAMANKRIIQSTVNTISQNNIRDSASIEASSSSINEVG-----SSTNEVGSSINEVGP	841	Q46490	Galeopterus variegatus
KAVGNENTVPTMTNTINQNN-RESAYIEASSSSINEVGS-----SSTNEVGSSVNEVGP	839	Q46489	Otolemur crassicaudatus
RTIGNETIIQSTVGTISQNNIRESTFTEGSSSSIEYAG-----SSTNELGSSVNEVGS	768	Q8WMT4	Rousettus amplexicaudatus
RTIGNETIIQSTVGTISQNNIRESTFTEGSSSSIEYAG-----SSTNELGSSVNEVGS	783	Q9TT63	Pteropus rayneri
RAIGNETIIQSTVGTISQNNIRESTFTEGSSSGIEYAG-----SSTNELGSSVNEVGS	789	Q9TT64	Cynopterus sphinx
RAMRNENILST-VSPISL-NNRESTFTEGSSSS-----TNEVGSSVNEVGS	780	Q9TT67	Tadarida brasiliensis

Figura 48. Alineamiento múltiple alrededor de la posición 1038 (cambio c.3232A>G; p.E1038G; rs16941)

En el caso de la posición 1183 (c.3667A>G; p.K1183R; rs16942), se observa que los dos aminoácido están presentes en diferentes especies y que, en esta posición, aparecen otros aminoácidos como Lisina (K), lo que sugiere que es una posición que no desempeña un papel relevante para el mantenimiento de la estructura y función de la proteína (Figura 49).

IKEDTSAENDIKESSAVFSKSVQKIELSRSPSPFTHTHLAQGYRRGAKKLESSEENLSEDEELPCFQHLLFGKVNIPSQST	1242	Homo sapiens
IKEDTSAENDIKESSAVFSKSVQKIELSRSPSPFTHTHLAQGYRRGAKKLESSEENLSEDEELPCFQHLLFGKVNIPSQST	1242	Rattus norvegicus
IKEDTSAENDIKESSAVFSKSVQKIELSRSPSPFTHTHLAQGYRRGAKKLESSEENLSEDEELPCFQHLLFGKVNIPSQST	1242	Pan troglodytes
IKEDTSAANDIKESSAVFSKSIQKIELSRSPSPFTHTHLAQGYRQAEAKKLESSEENLSEDEELPCFQHLLFGKVNIPSQST	1242	Gorilla gorilla gorilla
IKEDTSAENDIKESSAVFSKSVQKIELSRSPSPFTHTHLAQGYRRGAKKLESSEENLSEDEELPCFQHLLFGKVNIPSQST	1242	Macaca mulatta
IKENSHFAESDIKERSAVFSKSVQKIEFRGSPGPFTHTHLAQGHQRGAKKLES-EETVSEDEELPCFQQLLFGKVTSTLSPST	1236	Pongo pygmaeus
IKGVSAESDIKERSAVFSKSVQKIEFRSRSPSPDHTRLAQGYRQRTKLESSEENMSSEEEELPCFQHLLFGKVTNMPST	1243	Bos taurus
-----	256	Canis familiaris
IKE-ISFAESDIKEQSAVFGKSVQKIEFKRRPNPLDDXDLAQTHRRQSRKLESSE-----	903	Sorex araneus
VMENTSFMDGIRERSAVFSE-----	897	Ochotona princeps
IKEDTSAEYGIKETSTVFSKSVQKIELSRSPSPFTHTHLAQVYQRGAKKLESSEENLSEEEELPCFQHLLFGKVNTP-QST	1023	Alouatta seniculus
IKENTSAESDSKERSAVFSKSVQKIELSRSPSPFAQTCLAQGHQRGAKKLESSEENVSEDEELPCFQHLLFGKVTNIPSQST	1020	Galeopterus variegatus
LKENTSAENNIKERSAVFSKSNVQKIEISRSPLAHIHILHTQAHQREVVKLESSEENMSSEDEELPCFQHLLFGKVTNTPSQST	1018	Otolemur crassicaudatus
IKENIGFDEGDIKERSAVFSKSVQKIEFRRSPLARTSLSQRRRGARKLESSEE-----	917	Rousettus amplexicaudatus
IKENIGFDESGIKERSAVFSKSVQKIEFRRSPLAHTSLSQRRRGARKLESSEE-----	935	Pteropus rayneri
IKDNISFDESGIQERSAVFSKSNVQKIEFRRSPLAHASLSQGRPRRA-----	933	Cynopterus sphinx
IKENSSFAGSGIKERSAIFSKSVQKIEFRRSPLFAHHLTHTRQRGARKLESS-----	930	Tadarida brasiliensis

Figura 49. Alineamiento múltiple alrededor de la posición 1183 (cambio c.3667A>G; p.K1183R; rs16942).

Finalmente, el análisis del codon 871 (c.2731C>T; p.P871L; rs799917) muestra que el aminoácido conservado en la mayoría de las especies es la Leu (L), un aminoácido apolar, de forma que en la especie humana, única especie en la que aparece el aminoácido Pro (P), un cambio de éste, también apolar, hacia Leu no debe ser considerado patogénico, por lo que podemos afirmar que la variante no modifica la función ni la estructura de la proteína (Figura 50).

HEVNH-SRETSIEMEESELDAQYLQNTFKVSKRQSFALL	SNPGNAEEECATFSAHSGSL-	892	P38398	Homo sapiens
HEVNH-SRETSIEMEESELDAQYLQNTFKVSKRQSFALL	SNPGNPEEECATFSAHCRSL-	892	Q9GKK8	Rattus novergicus
HEVNH-SRETSIEMEESELDAQYLQNTFKVSKRQSFALL	SNPGNPEEECATFSAHSRSL-	892	Q6J6I8	Pan troglodytes
SEVNH-SQETSIEIEESELDTQYLQNTFKVSKRQSFALL	SNPGNPEEECATFSAHSRSL-	891	Q6J6I9	Gorilla gorilla gorilla
HEVNH-SQETSIEEMEESELDTQYLQNTFKVSKRQSFALL	SNPGNPEEECATFSAHSRSL-	892	Q6J6J0	Macaca mulatta
HDINYVIQETSREMEDSELDTQYLQNTFKASKRQTFALL	SNPGNPQKECATVFAHSGSL-	885	Q864U1	Pongo pygmaeus
CKDNH-TQETSIEEMEESELDTQCLRNMFVSKRQSFALL	SYPRDPEEDCVTVCPRSRAF-	890	Q95153	Bos taurus
-----	-----	256	Q9JKL6	Canis familiaris
YEDNHT--VEARVEESELDTQYLHNTFKASNRHSFALL	SNPGNSGRECSTVFAHSGSL-	587	Q8WMT5	Sorex araneus
SEDDH-IQETDTELESELDTQYLQNTFKTSKRQSFALL	SKPGDPERGCVTAHTHSSCL-	609	Q8WMT6	Ochotona princeps
PEVNY-SQETSIDMRESELDTQYLQNTFKVSKRQSFALL	SNPGNPEKECATFSACSRSL-	668	O46488	Alouatta seniculus
CGVDH-IQKTSIEMQESSELDTQYLQNTFKVSKRQSFALL	SNPGNPEKECATVYAHSRLL-	668	O46490	Galeopterus variegatus
HEINH-IQKISMEDSELDTQYLQNTFKFSKRQSFALL	SNLG---KECATVCAQSLAS	668	O46489	Otlemur crassicaudatus
HEVNY-TQKTNIEIEENELDTQYLQNTFKVSKRQSFALL	SNPGNLEKECATGYAHSRSL-	596	Q8WMT4	Rousettus amplexicaudatus
REVNY-XXXXXXXXXXXXXXXXXX--XXXXXXXXXXXXXXXXXX	SNPGNLEKECATGYAHSKSL-	611	Q9TT63	Pteropus rayneri
HEVNS-TXXXXXXXXXXXXXXXXXX--XXXXXXXXXXXXXXXXXX	SDPGNLEKECATGYAHSRSL-	617	Q9TT64	Cynopterus sphinx
PEVNH-XXXXXXXXXEESELDTQYLQNTFKVSKRQSFALL	SNP---EKEYATVYGHRSRSL-	616	Q9TT67	Tadarida brasiliensis

Figura 50. Alineamiento múltiple alrededor de la posición 871 (cambio c.2731C>T; p.P871L; rs799917).

Además de programas para la predicción de patogenicidad y la conservación de aminoácidos, es muy útil la predicción de la estructura secundaria de la proteína, que nos indica en qué forma varía esta estructura proteica al introducir nuevas variantes en su secuencia.

Para la predicción de la estructura secundaria de la proteína empleamos el programa PSIPRED, analizando las tres regiones en las que se localizan los polimorfismos al introducir cada una de las mutaciones de manera aislada y en combinación (Figuras 51-53).

El análisis predictivo de la estructura secundaria de la proteína en la región que flanquea el codón 871 (posición de la variante c.2731C>T; p.P871L; rs799917) mostró que, la proteína no sufre ningún tipo de modificación cuando introducimos los polimorfismos en la secuencia, tanto de manera individual como agrupados (Figura 51).

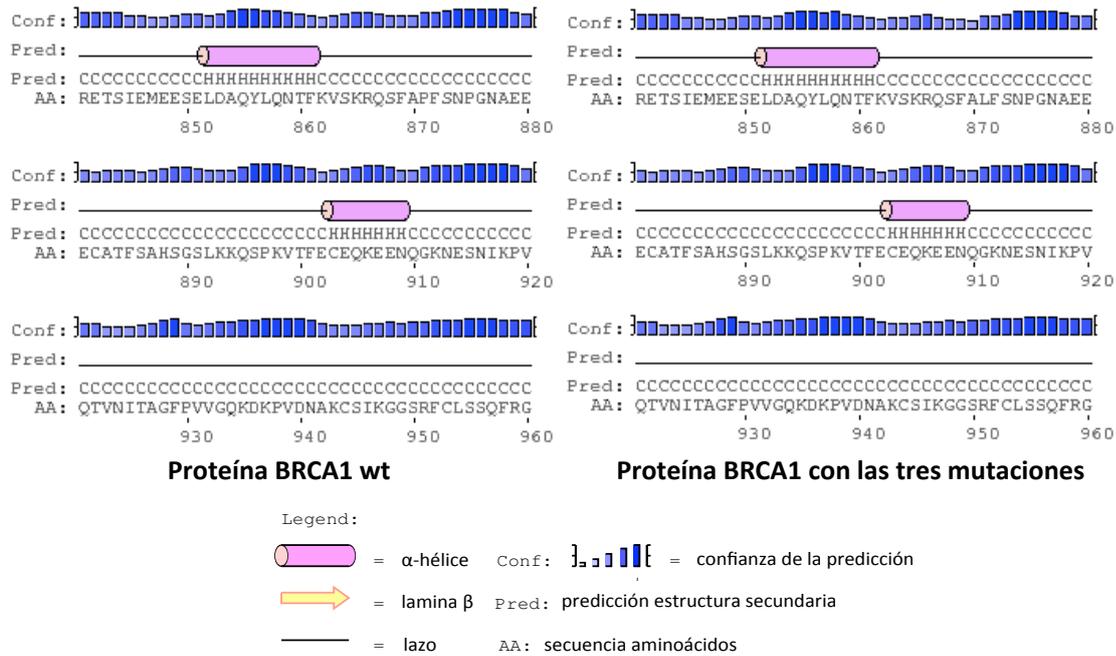


Figura 51. Predicción de la estructura secundaria para la proteína BRCA1 en la región que comprende la mutación c.2731C>T (p.P871L; rs799917). Solo se muestra la proteína *wild type* y la proteína con las tres mutaciones.

En el caso de la región que flanquea el codón 1038 (posición de la variante c.3232A>G; p.E1038G; rs16941) al introducir la variante rs16941 (p.E1038G) en la secuencia observamos la pérdida de una pequeña α -hélice adyacente a la variante que engloba dos aminoácidos Phe (F) y Lys (K) de las posiciones 1036 y 1037 respectivamente. La introducción en la secuencia del aminoácido Gly (G) provoca la pérdida de esta α -hélice, mientras que el aminoácido Glu (E) mantiene la estructura de la proteína sin cambios, tanto al introducir la variante de forma individual como combinada con los otros polimorfismos del exón 11 del gen BRCA1 (Figura 52).

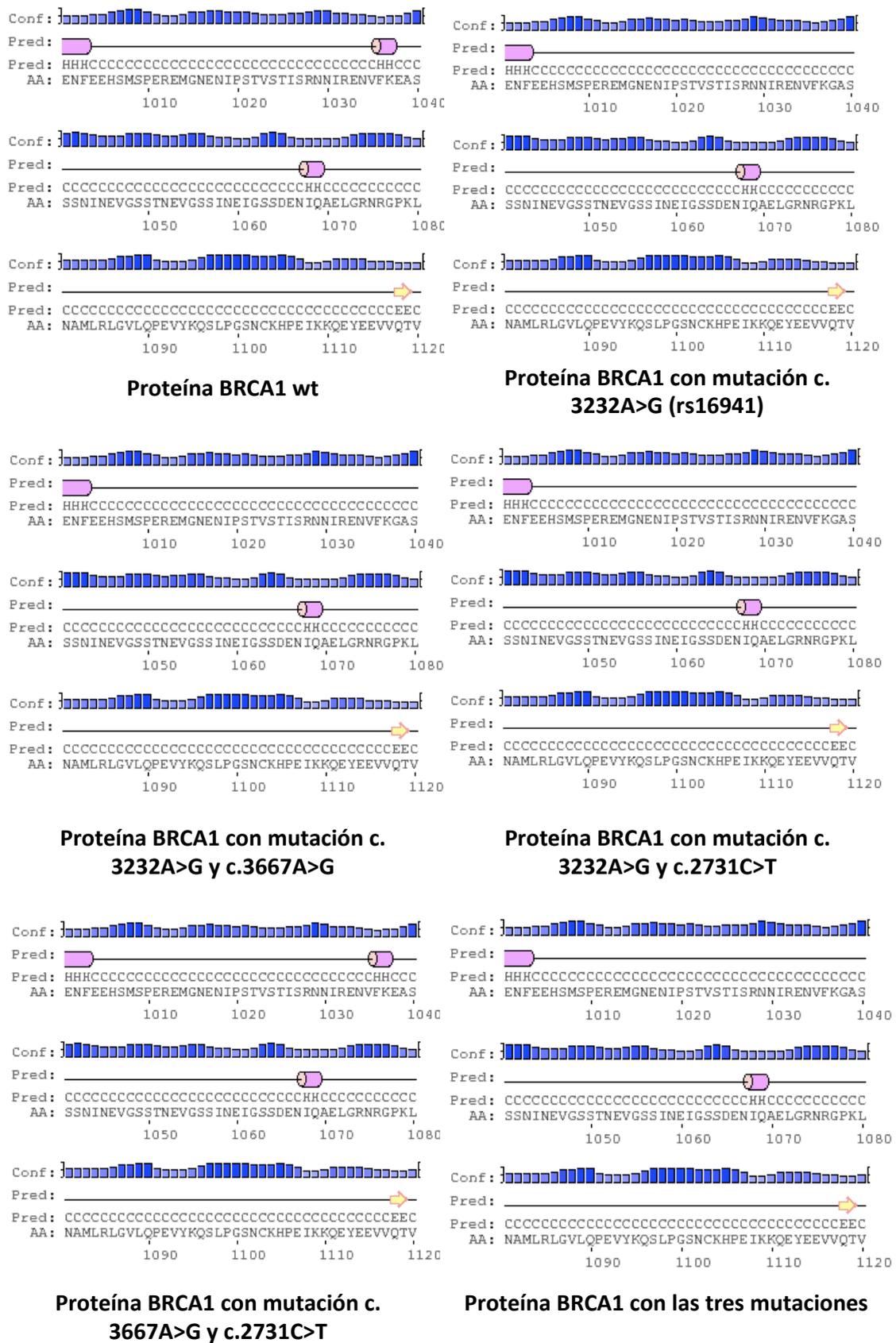


Figura 52. Predicción de la estructura secundaria para la proteína BRCA1 en la región que comprende la mutación c.3232A>G (p.E1038G; rs16941). Solo se muestra la proteína *wild type* y las combinaciones de dos y tres polimorfismos.

Finalmente, el análisis de la región que flanquea el codón 1183 (posición de la variante c.3667A>G; p.K1183R; rs16942) mostró que la proteína BRCA1 no sufre ningún tipo de modificación cuando introducimos los polimorfismos en la secuencia, tanto de manera individual como agrupados (Figura 53).

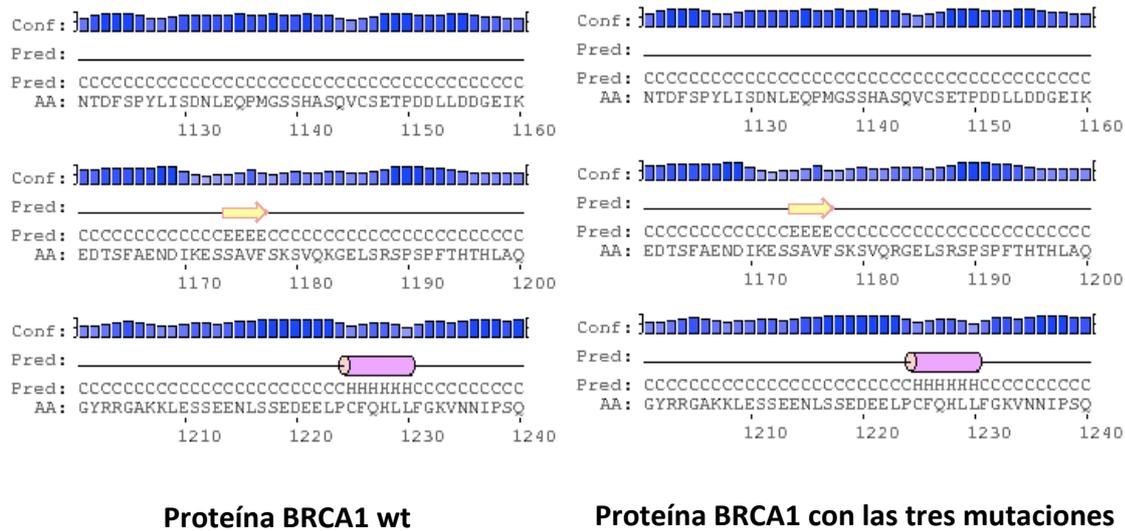


Figura 53. Predicción de la estructura secundaria para la proteína BRCA1 en la región que comprende la mutación c.3667A>G (p.K1183R; rs16942). Solo se muestra la proteína *wild type* y la proteína con los tres polimorfismos.

El estudio bioinformático mostró que, a nivel predictivo, la posición 1038 (c.3232A>G; p.E1038G; rs16941) está muy conservada en las diferentes especies analizadas, de forma que un cambio de aminoácido de Glu (E) a Gly (G) podría modificar la estructura o la función de la proteína. Al analizar la estructura secundaria de la proteína hemos verificado esta hipótesis al observar que, al introducir en la secuencia proteica el aminoácido Gly en lugar de Glu en las proximidades de la posición 1038, se pierde una α -hélice. Sin embargo, será necesario comprobar la actividad de la proteína *in vivo* para determinar si esta modificación de la estructura es suficiente para alterar su funcionalidad.

Hemos observado además, que la interacción de los tres polimorfismos no parece ejercer ningún efecto sobre la estructura de la proteína BRCA1, mas allá del efecto que puedan ejercer individualmente, como en el caso del polimorfismo c.3232A>G (rs16941).

La relación entre los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 y el riesgo de cáncer de mama ha generado mucha controversia. Múltiples estudios han evaluado el riesgo que supone ser portador de estos polimorfismos para el desarrollo de cáncer de mama, encontrando asociación con el riesgo a desarrollar cáncer de mama en mujeres portadoras de mutación en BRCA1 (Cox et al., 2011) y en mujeres con cáncer de mama esporádico (Cox et al., 2005; Freedman et al., 2005), mientras que en otros estudios no se observó relación con el cáncer de mama familiar, independientemente de la presencia o no de mutaciones en BRCA1 o BRCA2 (Tommasi et al., 2005; Freedman et al., 2005; Soucek et al., 2007; Huo et al., 2009).

En uno de los primeros estudios realizados, Durocher y colaboradores observaron que el alelo T del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 es más frecuente en familias con alto riesgo de padecer cáncer de mama que en mujeres sanas (Durocher et al., 1996). En nuestra serie hemos observado resultados similares ya que, el genotipo TT del polimorfismo c.2731C>T (p.Pro871Leu; rs799917) aparece asociado con un aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama en ausencia de mutaciones en los genes BRCA1/2. Además, los tumores de mama portadores del genotipo TT son más frecuentemente de tipo Luminal A, mientras que los portadores del alelo C aparecen con más frecuencia con fenotipo tipo Luminal B.

Sin embargo, no hemos observado asociación entre los polimorfismos c.3232A>G (p.Glu1038Gly; rs16941) y c.3667A>G (p.Lys1183Arg; rs16942) con el riesgo de cáncer de mama ni con un subtipo tumoral concreto. Aunque, si tenemos en cuenta la edad de diagnóstico de la enfermedad, observamos que en el grupo de pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 el alelo A del polimorfismo c.3232A>G está asociado con un incremento del riesgo de cáncer de mama en pacientes mayores de 40 años (genotipo AA) y menores de 40 años (genotipo AG). Además, en función de la historia familiar, subdividiendo el grupo de pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (CMF-) en dos subgrupos, con tres o más familiares afectados (CMF->3) y menos de tres familiares afectados (CMF-<3) observamos que, en el subgrupo con menor carga hereditaria de la enfermedad (CMF-<3), el genotipo AG del polimorfismo c.3232A>G y del polimorfismo c.3667A>G se asocia con un incremento del riesgo en pacientes menores de 40 años y el genotipo GG

del polimorfismo c.3667A>G está asociado con el incremento del riesgo en pacientes mayores de 40 años.

Estos resultados muestran por tanto que el genotipo TT del polimorfismo c.2731C>T (p.Pro871Leu; rs799917), los genotipos AA y AG del polimorfismo c.3232A>G (p.Glu1038Gly; rs16941) y los genotipos AG y GG del polimorfismo c.3667A>G (p.Lys1183Arg; rs16942) del gen BRCA1 están asociados con la predisposición al cáncer de mama en familias no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2, lo que podría sugerir un efecto protector frente al desarrollo de mutaciones en los genes BRCA1/2 pero no frente al desarrollo tumoral.

Los polimorfismos que se encuentran próximos en el mismo cromosoma pueden estar asociados y encontrarse en desequilibrio de ligamiento. El desequilibrio de ligamiento tiene su origen en el proceso de recombinación meiótica, donde la probabilidad de recombinación entre locus cercanos es muy baja. Normalmente esos locus se heredan en bloque y el conjunto de polimorfismos que se transmiten juntos a la descendencia se denomina haplotipo.

Ninguno de los estudios previos ha analizado el haplotipo de los tres polimorfismos incluidos en nuestro trabajo, aunque si han sido analizados otros haplotipos existentes en el gen BRCA1.

El análisis de cuatro alelos localizados en los intrones 8 y 18 y en los exones 11 y 13 (rs799917, rs8176166, rs3737559 y rs8176267) por el grupo de Cox (Cox et al., 2005) les permitió definir cinco haplotipos con una frecuencia superior al 5 % (haplotipos CAGA, CAGG, TAAA, TAGA y TGGA), observando que el haplotipo CAGG se asociaba con un ligero, aunque significativo, incremento del riesgo a desarrollar cáncer de mama. También se observó una interacción significativa entre dicho haplotipo y los pacientes con antecedentes de cáncer de mama familiar. Únicamente el alelo rs799917 (c.2731C>T) coincide con los polimorfismos analizados en nuestro trabajo; sin embargo, Cox y colaboradores inciden en la existencia de diferentes haplotipos en el gen BRCA1 debido al gran desequilibrio de ligamiento existente en esta zona del genoma y en la necesidad de conocer su implicación en la susceptibilidad al cáncer de mama (Cox et al., 2005).

Por otra parte, el grupo de genética humana del CNIO analizó tres de los polimorfismos estudiados por el grupo de Cox localizados en los intrones 8 y 18 y en el exón 13 (rs8176166, rs3737559 y rs8176267) en población española observando que las mutaciones en el gen BRCA1 se producían más fácilmente en las portadoras de los haplotipos AAA, AGA y GGA, pero no en el haplotipo AGG, por lo que la relevancia de estos hallazgos, contraria a las publicaciones previas, es incierta (Osorio et al., 2003).

En nuestro trabajo no hemos empleado polimorfismos intrónicos del gen BRCA1, sino que nos hemos centrado en el estudio de polimorfismos exónicos que provoquen cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína BRCA1. El estudio del haplotipo constituido por los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del exón 11 del gen BRCA1 mostró que se encuentran en desequilibrio de ligamiento y que existen dos haplotipos mayoritarios, el haplotipo CAA constituido por los alelos c.2731C, c.3232A y c.3667A, y el haplotipo TGG constituido por los alelos c.2731T, c.3232G y c.3667G. El resto de haplotipos posibles originados a partir de estos polimorfismos aparecen en muy baja frecuencia (Tabla 139).

Tabla 139. Frecuencias de los principales haplotipos originados por la segregación conjunta de los polimorfismos c.2731C>T, c.3232A>G y c.3667A>G del exón 11 del gen BRCA1 en los grupos de pacientes incluidos en el estudio.

Haplotipo	Control	CM total	CMF+	CMF-	CMF->3	CMF-<3
C A A	0.7026	0.6141	0.6787	0.6015	0.5971	0.6106
T G G	0.2888	0.3135	0.2456	0.3268	0.3243	0.3317
T A A	0.0086	0.0386	0.0259	0.041	0.0373	0.0481
C A G	-	0.0212	0.0344	0.0186	0.0253	0.0048
Resto	< 1 %					

Hemos realizado un análisis estadístico multivariante para determinar la posible asociación entre la segregación conjunta de los alelos de los polimorfismos del gen BRCA1 y los grupos de pacientes incluidos en el estudio (Figura 54).

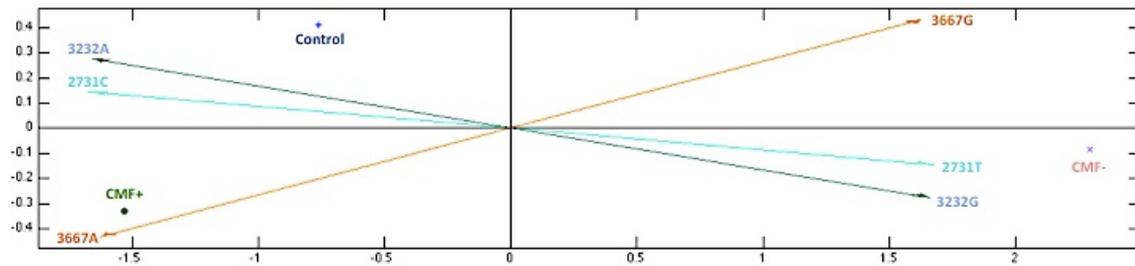


Figura 54. Representación biplot de los grupos de pacientes y los principales haplotipos originados por la cosegregación de los alelos de los tres polimorfismos del gen BRCA1.

Observamos que el grupo de pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 está altamente relacionado con el haplotipo TGG, c.2731T (p.871Leu; rs799917), c.3232G (p.1038Gly; rs16941) y c.3667G (p.1183Arg; rs16942); mientras que el grupo de pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 está altamente relacionado con el haplotipo CAA.

Al dividir el grupo de pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del historial familiar, con tres o más familiares afectados (CMF->3) y con menos de tres familiares afectados (CMF-<3), el análisis multivariante mostró que, al igual que en el caso anterior, el haplotipo TGG constituido por los alelos mutados de los tres polimorfismos, está altamente relacionado con el grupo de pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2, independientemente del historial familiar (Figura 55).

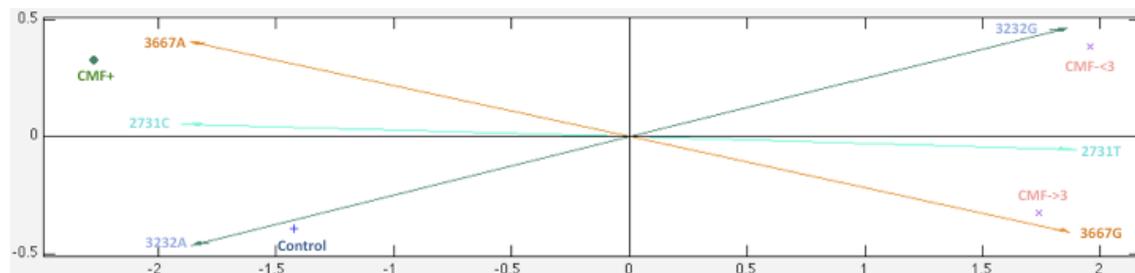


Figura 55. Representación biplot de los grupos de pacientes y los principales haplotipos originados por la cosegregación de los alelos de los tres polimorfismos del gen BRCA1.

La observación de que el haplotipo TGG está fuertemente relacionado con el grupo de pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 podría sugerir un efecto protector frente al desarrollo de mutaciones en estos genes. Una posible

explicación podría ser la existencia de incompatibilidades para la presencia en la misma proteína del haplotipo (TGG) y el alelo mutado procedente de una mutación patogénica; en este caso, la presencia del haplotipo TGG debería modificar la función de la proteína, lo que es poco probable porque existen mujeres sanas homocigotas para el haplotipo. Una segunda posibilidad es que el haplotipo TGG estabilice el ADN y dificulte la aparición de nuevas mutaciones o que favorezca los mecanismos de reparación del ADN al favorecer el acceso de factores de transcripción. Para poder confirmar esta hipótesis son necesarios estudios que no hemos incluido en este trabajo. Finalmente, cabe la posibilidad de que la existencia del haplotipo modifique la estabilidad del ARN cuando se asocian otras mutaciones y dificulte la supervivencia del ARN mutado y de la célula portadora de la mutación, siendo necesarios más estudios para comprobar esta hipótesis.

En resumen, nuestro trabajo pone de manifiesto que el estudio de los polimorfismos rs799917, rs16941 y rs16942 del gen BRCA1 podría facilitar los estudios de análisis de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2.

- **Polimorfismos de los genes MDM2 y TP53**

El polimorfismo c.-309T>G (rs2279744) del gen MDM2 se encuentra localizado en la región promotora y se ha descrito asociado con un incremento del riesgo a padecer cáncer de mama (Boersma et al., 2006; Millikan et al., 2006; Wilkening et al., 2006; van den Broek et al., 2011; Cheng et al., 2012). El estudio de este polimorfismo no mostró ninguna relación con el riesgo de cáncer de mama en ninguno de los grupos analizados en nuestro trabajo.

El polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 se encuentra en la región rica de residuos de prolina, localizada entre el dominio de transactivación y el dominio de unión al ADN, que participa en la inducción de la apoptosis (Sakamuro et al., 1997). El alelo Arg presenta una mayor capacidad de inducir apoptosis debido tanto a la activación de la transcripción de genes apoptóticos como a su mayor capacidad de inducir apoptosis por mecanismos independientes de la activación transcripcional. Por el contrario, el alelo Pro presenta menor capacidad apoptótica pero induce de manera más eficaz la parada del ciclo celular en fase G1 en respuesta a daños en el ADN

(Thomas et al., 1999; Dumont et al., 2003; Pim et al., 2004; Toyama et al., 2007; Whibley et al., 2009).

Múltiples estudios han evaluado el riesgo que supone ser portador de este polimorfismo para el desarrollo de cáncer de mama, aunque los resultados son contradictorios. Estos trabajos sugieren que el alelo Pro está asociado a un desarrollo temprano del cáncer de mama en pacientes portadores de mutación en BRCA1 (Martin et al., 2003) o que los genotipos portadores del alelo Pro no tienen ningún efecto sobre la incidencia del cáncer de mama (Cheng et al., 2012). En nuestro trabajo hemos observado que el alelo Pro no está asociado al desarrollo temprano del cáncer de mama en portadores de mutación en el gen BRCA1, siendo el genotipo Arg/Pro más frecuente en el grupo de pacientes mayores de 40 años portadores de mutación en los genes BRCA1/2.

Además, hemos observado que el genotipo Pro/Pro tiene un efecto protector frente el desarrollo de cáncer de mama, puesto que aparece más frecuentemente en el grupo de mujeres sanas, mientras que el alelo Arg es más frecuente en pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2, coincidiendo con otros estudios realizados (van den Broek et al., 2011). Estos resultados concuerdan con la mayor capacidad del alelo Arg en la inducción de apoptosis, protegiendo del desarrollo tumoral a las células portadoras de mutaciones en BRCA1/2 cuyos procesos de reparación del ADN están comprometidos, y con la mayor eficacia del alelo Pro en la inducción de parada del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN (Thomas et al., 1999; Dumont et al., 2003; Pim et al., 2004; Toyama et al., 2007; Whibley et al., 2009).

La proteína p53 regula positivamente la expresión del gen MDM2, mientras que el gen MDM2 regula la respuesta de TP53, controla sus niveles y actividad inhibiendo su expresión y mediando en su degradación vía ubiquitinación, creándose por tanto un circuito de retroalimentación negativo (Bond et al., 2005; Michael et al., 2003), de forma que cualquier alteración en estos genes puede afectar a la ruta de respuesta del gen TP53 de control del daño y reparación del ADN. A este respecto, estudios recientes han observado que el efecto de ambos polimorfismos sobre el riesgo de cáncer de mama puede ser mucho mayor en combinación con alteraciones somáticas en el gen TP53 en el tumor (Boersma et al., 2006; van den Broek et al., 2011).

Recientemente, varios trabajos han estudiado la posible interacción entre los polimorfismos c.-309T>G (rs2279744) del gen MDM2 y p.Arg72Pro (rs1042522) del gen TP53 y su efecto sobre el riesgo de cáncer de mama y, al igual que en nuestro trabajo, no han observado efecto combinado sobre la incidencia del cáncer de mama (van den Broek et al., 2011; Cheng et al., 2012).

- **Polimorfismos identificados mediante GWAS**

Diversos estudios GWAS permitieron la identificación de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146 como asociados con el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Easton et al., 2007; Hunter et al., 2007; Witte et al., 2007; Tomlinson et al., 2007). Nosotros hemos analizado si estos polimorfismos se asocian con la incidencia de cáncer de mama en nuestra serie de pacientes.

El polimorfismo rs2981582 (cambio C>T) está ubicado en el cromosoma 10, en el intrón 2 del gen FGFR2 (*Fibroblast growth factor receptor 2*), que codifica una proteína implicada en el crecimiento de las células tumorales, la capacidad invasiva, la motilidad y la angiogénesis (Houssaint et al., 1990; Dionne et al., 1990; Fu et al., 2012). Estudios iniciales evaluaron el riesgo de ser portador de este polimorfismo, identificando una leve asociación de los alelos C y T con el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Easton et al., 2007; Hunter et al., 2007), mientras que recientemente se determinó la existencia de una fuerte asociación del alelo T y el genotipo TT con el cáncer de mama en portadores de mutación en BRCA2 (Antoniou et al., 2008a; Antoniou et al., 2010; Milne et al., 2011). En nuestro trabajo hemos observado asociación con el riesgo de cáncer de mama; sin embargo, esta asociación se produce independientemente de la presencia de mutación en los genes BRCA1/2 ya que, en pacientes mayores de 40 años, el alelo T y el genotipo TT están asociados con pacientes no portadores, mientras que en menores de 40 años el alelo C es más frecuente en el grupo de pacientes no portadores de mutación y el genotipo TT está asociado con pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2.

Tras la identificación del polimorfismo rs13281615 (cambio A>G) de la región cromosómica 8q24 como implicado en la predisposición al cáncer de mama (Witte, 2007; Easton et al., 2007; Tomlinson et al., 2007), múltiples estudios han evaluado el riesgo que puede suponer ser portador de este polimorfismo para el desarrollo de cáncer de mama, con resultados contradictorios. Solo uno de los estudios ha validado la asociación con la susceptibilidad al cáncer de mama, estableciendo un riesgo relativo para la población no portadora de mutación en los genes BRCA1/2 de 1,21 (Teraoka et al., 2011), mientras que otros estudios han descartado esta variante como modificadora del riesgo de padecer cáncer de mama tanto en portadores de mutación en BRCA1 como en BRCA2, sin hacer referencia al riesgo en población no portadora de mutación en estos genes (Antoniou et al., 2009; Mulligan et al., 2011; Butt et al., 2012). Los resultados de nuestro trabajo muestran que no existe ningún tipo de relación entre el polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y la susceptibilidad al cáncer de mama en nuestra serie de pacientes, por lo que no debe incluirse como parámetro de estudio en nuestra población.

El polimorfismo rs2910164 (cambio G>C) se localiza en el gen miR146, que interacciona con el extremo 3'UTR del gen BRCA1 (Landi et al., 2008; Shen et al., 2008) regulando negativamente su expresión (García et al., 2011). Este polimorfismo ha sido asociado recientemente con el riesgo de cáncer de mama, tanto en individuos portadores como en no portadores de mutación en los genes BRCA1/2, identificando el alelo C como responsable del desarrollo de la enfermedad en mujeres jóvenes (Shen et al., 2008); resultados que no pudieron ser validados posteriormente (Pastrello et al., 2010; Catucci et al., 2010; García et al., 2011). En nuestra serie, el polimorfismo del gen miR146 está asociado con un incremento en la susceptibilidad al cáncer de mama independientemente de la presencia de mutaciones en los genes BRCA1/2.

Nuestros análisis confirman el incremento del riesgo de cáncer de mama asociado al polimorfismo, sin embargo, muestran que el alelo G es más frecuente en pacientes portadores de mutación en los genes BRCA1/2 mayores de 40 años y en pacientes no portadores de mutación en estos genes menores de 40 años. Este resultado concuerda con la función reguladora de los miRNAs (MicroRNAs) ya que, independientemente de la presencia de mutaciones en los genes BRCA1/2, el

polimorfismo rs2910164 es posible que afecte a su función reguladora de la expresión de la proteína BRCA1.

Al realizar el análisis en función de la historia familiar y subdividir el grupo de pacientes no portadores de mutación según el número de familiares afectados observamos que en el subgrupo de pacientes con menos de tres familiares afectados (CMF-<3) el alelo G está asociado a un incremento del riesgo en pacientes menores de 40 años, como observamos previamente en el conjunto de pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2. Por otro lado, en el subgrupo de pacientes con tres o más familiares afectados (CMF->3) observamos que el alelo G está asociado con un incremento del riesgo, pero en pacientes mayores de 40 años, como previamente habíamos observado en el grupo de pacientes portadores de mutación. Parece por tanto que el grupo de pacientes mayores de 40 años, no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 y con tres o más familiares afectados (CMF->3) tiene un componente genético que los asemeja a las familias con mutación en los genes BRCA1/2 y los aleja del grupo de pacientes menores de 40 años no portadores de mutación y con menos de tres familiares afectados (CMF-<3).

De nuevo, obtenemos evidencias de la existencia de dos subgrupos diferenciados dentro del conjunto de pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 y la distribución de genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 nos permitiría discriminar entre ambos.

Por último, examinamos la segregación alélica de estos polimorfismos junto con el haplotipo del exón 11 del gen BRCA1 identificado previamente. Observamos que no existe segregación alélica entre los polimorfismos de la región cromosómica 8q24 y del gen miR146 y dicho haplotipo; sin embargo, el alelo C del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 segrega junto con el haplotipo TGG constituyendo el genotipo conjunto TGGC, que se asocia con el grupo de pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 (Figura 56).

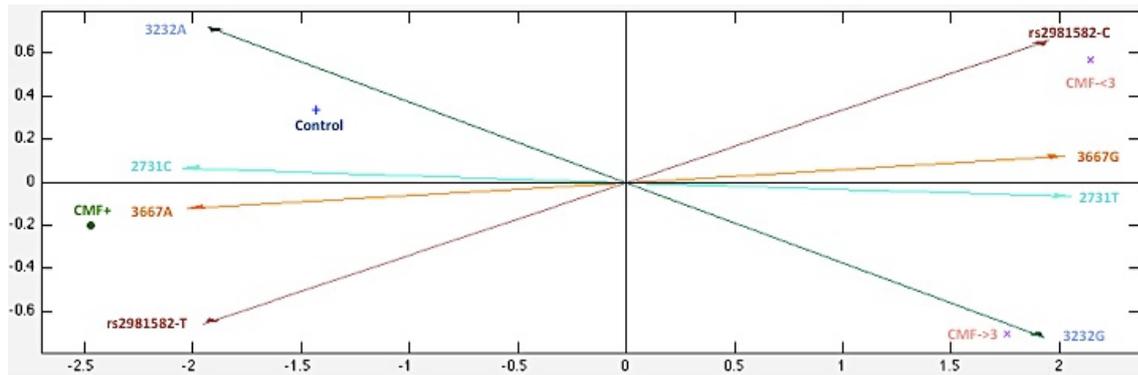


Figura 56. Representación biplot de los grupos de pacientes y la cosegregación del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 junto con los haplotipos originados por los tres polimorfismos de BRCA1.

En resumen, en este trabajo ponemos de manifiesto que los polimorfismos c.3232A>G, c.3677A>G y c.2731C>T del gen BRCA1, el polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53, el polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 y el polimorfismo rs2910164 del gen miR146, actúan como modificadores del riesgo a padecer cáncer de mama. Además, los tres polimorfismos del gen BRCA1 y el polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 segregan juntos formando el haplotipo TGGC más frecuente en el grupo de mujeres con cáncer de mama no portadoras de mutación en los genes BRCA1/2, de forma que ser portador de este haplotipo predispone a un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama pero parece proteger frente al desarrollo de mutaciones en los genes BRCA1/2 que puedan transmitirse a la descendencia.

A lo largo del proceso de diagnóstico genético, las Unidades de Consejo Genético deberían considerar la existencia de estos haplotipos puesto que, los resultados muestran que aquellos pacientes con el haplotipo TGGC originado por la segregación conjunta de los tres polimorfismos del gen BRCA1 (c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T) y el polimorfismo del gen FGFR2 (rs2981582), con una alta probabilidad, no van a desarrollar mutación en los genes BRCA1 o BRCA2.

2.3. Historia familiar y cáncer de mama

La historia familiar de cáncer de mama es considerado uno de los principales factores de riesgo en la incidencia de esta enfermedad. Así, un historial familiar de cáncer de mama duplica el riesgo de padecer la enfermedad, en relación con la población sin antecedentes familiares (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001).

Nuestro trabajo ha tratado de determinar si la distribución de genotipos de los polimorfismos incluidos en el estudio es diferente en función de la historia familiar del paciente. Los resultados obtenidos indican que, los tres polimorfismos del gen BRCA1, c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T, el polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53, el polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 y el polimorfismo rs2910164 del gen miR146 previamente asociados con el grupo de pacientes no portadores de mutación en los genes BRCA1/2, están implicados en el incremento del riesgo a desarrollar cáncer de mama en el subgrupo de pacientes con menor carga hereditaria de la enfermedad.

Además, hemos observado que en función de la edad de diagnóstico de la enfermedad, el polimorfismo rs2910164 del gen miR146, identificado como modificador del riesgo de cáncer de mama, está asociado al subgrupo de pacientes con mayor carga hereditaria de la enfermedad.

El hecho de que exista una distinta distribución de genotipos en grupos de pacientes con distinto grado de historia familiar, sugiere que dentro del grupo de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 existen dos grupos bien diferenciados que presentan una distinta distribución de genotipos de los polimorfismos estudiados y una distinta distribución de las características biológicas y subtipos clínicos de tumor.

La historia familiar es, por tanto, además de uno de los principales factores de riesgo en la incidencia del cáncer de mama, un aspecto diferencial en un grupo de pacientes que hasta ahora se creía homogéneo. Este trabajo pone de manifiesto la existencia de tres grupos diferenciados de pacientes dentro del conjunto de pacientes con cáncer de mama familiar, con una serie de características biológicas y genéticas que nos permiten discriminarlos entre sí: aquellos pacientes con cáncer de mama familiar portadores de mutación en los genes BRCA1/2, que se asocian con tumores triple

negativos y con el haplotipo CAAT, aquellos con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menor número de familiares afectados, que se asocian con tumores que expresan receptores y con el haplotipo TGGC, y aquellos con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con mayor número de familiares afectados, asociados con una mayor frecuencia en el desarrollo de tumores triple negativos y con el haplotipo TGGC.

CONCLUSIONES

1. Nuestro trabajo muestra que el gen de alta penetrancia TP53 y los genes de penetrancia moderada PALB2, BRIP1, CHEK2, RAD51C, BARD1, ERCC4 y ABRAXAS no aparecen mutados en familias castellanoleonesas con cáncer de mama no portadoras de mutación en los genes BRCA1/BRCA2 con tres o más familiares afectados, por lo que no está justificado su estudio en programas de Consejo Genético en cáncer hereditario.

2. Los alelos c.2731T, c.3232G y c.3677G del gen BRCA1 y el alelo rs2981582-C del gen FGFR2 cosegregan juntos constituyendo el haplotipo TGGC que permite discriminar familias con cáncer de mama de alta penetrancia en las que no será necesario el análisis de los genes BRCA1 y BRCA2.

3. Nuestros resultados permiten dividir, de acuerdo con las características inmunohistoquímicas y genéticas, las familias con cáncer de mama en tres grupos:

- a. familias portadoras de mutación en los genes BRCA1/2, caracterizadas por desarrollo de tumores triple negativos y la asociación con el haplotipo CAAT.
- b. familias con tres o más miembros afectados de cáncer de mama, caracterizadas por una mayor incidencia de tumores triple negativos y la asociación con el haplotipo TGGC.
- c. familias con menos de tres miembros con cáncer de mama, caracterizadas por el desarrollo de tumores que expresan receptores y la asociación con el haplotipo TGGC.

ANEXO

Tabla A1. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF+	13/36,1%	23/63,9%	0,081
CMF-	84/52,2%	77/47,8%	

Tabla A2. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en menores de 40 años.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF+	4/30,8%	9/69,2%	0,156
CMF-	33/52,4%	30/47,6%	

Tabla A3. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en mayores de 40 años.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF+	9/39,1%	14/60,9%	0,265
CMF-	51/52,0%	47/48,0%	

Tabla A4. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	15/58,3%	8/41,7%
CMF-	84/85,8%	14/14,2%
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	3/13,0%	20/87,0%
CMF-	7/7,1%	91/92,9%
	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	5/21,7%	18/78,3%
CMF-	7/7,1%	91/92,9%
p valor global: 0,057		

Tabla A5. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	9/39,1%	14/60,9%
CMF-	40/40,8%	58/59,2%
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	6/26,1%	17/73,9%
CMF-	44/44,9%	54/55,1%
p valor global: 0,094		

Tabla A6. Expresión del receptor de estrógenos en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	p
CMF->3	38/77,6%	11/22,4%	0,487
CMF-<3	81/72,3%	31/27,7%	

Tabla A7. Expresión del receptor de estrógenos en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en menores de 40 años.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	p
CMF->3	6/60,0%	4/40,0%	0,892
CMF-<3	33/62,3%	20/37,7%	

Tabla A8. Expresión del receptor de estrógenos en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en mayores de 40 años.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	p
CMF->3	32/82,1%	7/17,9%	0,931
CMF-<3	48/81,4%	11/18,6%	

Tabla A9. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	p
CMF->3	36/73,5%	13/26,5%	0,705
CMF-<3	79/70,5%	33/29,5%	

Tabla A10. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en menores de 40 años.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	p
CMF->3	6/60,0%	4/40,0%	0,982
CMF-<3	32/60,4%	21/39,6%	

Tabla A11. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en mayores de 40 años.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	p
CMF->3	30/76,9%	9/23,1%	0,746
CMF-<3	47/79,7%	12/20,3%	

Tabla A12. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF->3	20/40,8%	29/59,2%	0,056
CMF-<3	64/57,1%	48/42,9%	

Tabla A13. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en menores de 40 años.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF->3	4/40,0%	6/60,0%	0,393
CMF-<3	29/54,7%	24/45,3%	

Tabla A14. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en mayores de 40 años.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF->3	16/41,0%	23/59,0%	0,076
CMF-<3	35/59,3%	24/40,7%	

Tabla A15. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados.

	Triple - (N/%)	No Triple - (N/%)	p
--	----------------	-------------------	---

CMF->3	7/14,3%	42/85,7%	0,096
CMF-<3	7/6,3%	105/93,8%	

Tabla A16. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en menores de 40 años.

	Triple - (N/%)	No Triple - (N/%)	p
CMF->3	2/20,0%	8/80,0%	0,329
CMF-<3	5/9,4%	48/90,6%	

Tabla A17. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en mayores de 40 años.

	Triple - (N/%)	No Triple - (N/%)	p
CMF->3	5/12,8%	34/87,2%	0,076
CMF-<3	2/3,4%	57/96,6%	

Tabla A18. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	38/77,6%	11/22,4%
CMF-<3	92/82,1%	20/17,9%
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	4/8,2%	45/91,8%
CMF-<3	13/11,6%	99/88,4%
	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	7/14,3%	42/85,7%
CMF-<3	7/6,3%	105/93,7%
p valor global: 0,223		

Tabla A19. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)
--	---------------	-------------

CMF->3	6/60,0%	4/40,0%
CMF-<3	40/75,5%	13/24,5%
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	2/20,0%	8/80,0%
CMF-<3	8/15,1%	45/84,9%
	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	2/20,0%	8/80,0%
CMF-<3	5/9,4%	48/90,6%
	p valor global: 0,536	

Tabla A20. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	32/82,1%	7/17,9%
CMF-<3	52/75,5%	7/24,5%
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	2/5,1%	37/94,9%
CMF-<3	5/8,5%	54/91,5%
	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	5/12,8%	34/87,2%
CMF-<3	2/3,4%	57/96,6%
	p valor global: 0,183	

Tabla A21. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	22/44,9%	27/55,1%
CMF-<3	41/36,6%	71/63,4%
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	16/32,7%	33/67,3%
CMF-<3	51/45,5%	61/54,5%
	p valor global: 0,181	

Tabla A22. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	4/40,0%	6/60,0%
CMF-<3	19/35,8%	34/64,2%
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	2/20,0%	8/80,0%
CMF-<3	21/39,6%	32/60,4%
p valor global: 0,593		

Tabla A23. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	18/46,2%	21/53,8%
CMF-<3	22/37,3%	37/62,7%
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)
CMF->3	14/35,9%	25/64,1%
CMF-<3	30/50,8%	29/49,2%
p valor global: 0,178		

Tabla A24. Expresión del receptor de estrógenos en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en menores de 40 años.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	p
CMF+	5/38,5%	8/61,5%	0,305
CMF->3	6/60,0%	4/40,0%	

Tabla A25. Expresión del receptor de estrógenos en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en mayores de 40 años.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	p
CMF+	14/60,9%	9/39,1%	0,066
CMF->3	32/82,1%	7/17,9%	

Tabla A26. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	p
CMF+	19/52,8%	17/47,2%	0,051
CMF->3	36/73,5%	13/26,5%	

Tabla A27. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en menores de 40 años.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	p
CMF+	6/46,2%	7/53,8%	0,510
CMF->3	6/60,0%	4/40,0%	

Tabla A28. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en mayores de 40 años.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	p
CMF+	13/56,5%	10/43,5%	0,092
CMF->3	30/76,9%	9/23,1%	

Tabla A29. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF+	13/36,1%	23/63,9%	0,660
CMF->3	20/40,8%	29/59,2%	

Tabla A30. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en menores de 40 años.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF+	4/30,8%	9/69,2%	0,645
CMF->3	4/40,0%	6/60,0%	

Tabla A31. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en mayores de 40 años.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF+	9/39,1%	14/60,9%	0,883
CMF->3	16/41,0%	23/59,0%	

Tabla A32. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en menores de 40 años.

	Triple - (N/%)	No Triple - (N/%)	p
CMF+	6/46,2%	7/53,8%	0,192
CMF->3	2/20,0%	8/80,0%	

Tabla A33. Incidencia de tumores de tipo triple negativo en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en mayores de 40 años.

	Triple - (N/%)	No Triple - (N/%)	p
CMF+	5/21,7%	18/78,3%	0,356
CMF->3	5/12,8%	34/87,2%	

Tabla A34. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	6/46,2%	7/53,8%
CMF->3	6/60,0%	4/40,0%
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	1/7,7%	12/92,3%
CMF->3	2/20,0%	8/80,0%
	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	6/46,2%	7/53,8%
CMF->3	2/20,0%	8/80,0%
p valor global: 0,372		

Tabla A35. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	15/65,2%	8/34,8%
CMF->3	32/82,1%	7/17,9%
	Her2 (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	3/13,0%	20/87,0%
CMF->3	2/5,1%	37/94,9%
	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	5/21,7%	18/78,3%
CMF->3	5/12,8%	34/87,2%
p valor global: 0,304		

Tabla A36. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	3/23,1%	10/76,9%
CMF->3	4/40,0%	6/60,0%
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	3/23,1%	10/76,9%
CMF->3	2/20,0%	8/80,0%
p valor global: 0,593		

Tabla A37. Subtipos de cáncer de mama en pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	9/39,1%	14/60,9%
CMF->3	18/46,2%	21/53,8%
	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)
CMF+	6/26,1%	17/73,9%
CMF->3	14/35,9%	25/64,1%
p valor global: 0,488		

Tabla A38. Expresión del receptor de estrógenos en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en menores de 40 años.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	p
CMF+	5/38,5%	8/61,5%	0,120
CMF-<3	33/62,3%	20/37,7%	

Tabla A39. Expresión del receptor de estrógenos en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en mayores de 40 años.

	RE+ (N/%)	RE- (N/%)	p
CMF+	14/60,9%	9/39,1%	0,052
CMF-<3	48/81,4%	11/18,6%	

Tabla A40. Expresión del receptor de progesterona en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados.

	RP+ (N/%)	RP- (N/%)	p
CMF+	19/73,5%	17/26,5%	0,053
CMF-<3	79/70,5%	33/29,5%	

Tabla A41. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portador y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en menores de 40 años.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF+	4/30,8%	9/69,2%	0,122
CMF-<3	29/54,7%	24/45,3%	

Tabla A42. Expresión de Her2 en los grupos de pacientes con cáncer de mama familiar portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados en mayores de 40 años.

	Her2+ (N/%)	Her2- (N/%)	p
CMF+	9/39,1%	14/60,9%	0,100
CMF-<3	35/59,3%	24/40,7%	

Tabla A43. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	63/41,7%	22/47,8%	0,764
	AG	70/46,4%	19/41,3%	
	GG	18/11,9%	5/10,9%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	10/47,6%	75/42,6%	0,891
	AG	9/42,9%	80/45,5%	
	GG	2/9,5%	21/11,9%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	12/48,0%	73/42,4%	0,848
	AG	10/40,0%	79/45,9%	
	GG	3/12,0%	20/11,6%	

Tabla A44. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	27/36,0%	58/47,5%	0,166
	AG	36/48,0%	53/43,4%	
	GG	12/16,0%	11/9,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	36/47,4%	49/40,5%	0,362
	AG	34/44,7%	55/45,5%	
	GG	6/7,9%	17/14,0%	

Tabla A45. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	68/45,0%	24/52,2%	0,680
	AG	66/43,7%	17/37,0%	
	GG	17/11,3%	5/10,9%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	9/42,9%	83/47,2%	0,861
	AG	10/47,6%	73/41,5%	
	GG	2/9,5%	20/11,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	15/60,0%	77/44,8%	0,292
	AG	7/28,0%	76/44,2%	
	GG	3/12,0%	19/11,0%	

Tabla A46. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	32/42,7%	60/49,2%	0,226
	AG	31/41,3%	52/42,6%	
	GG	12/16,0%	10/8,2%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	36/47,4%	56/46,3%	0,247
	AG	35/46,1%	48/39,7%	
	GG	5/6,6%	17/14,0%	

Tabla A47. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	59/39,1%	24/52,2%	0,283
	CT	69/45,7%	16/34,8%	
	TT	23/15,2%	6/13,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	10/47,6%	73/41,5%	0,856
	CT	8/38,1%	77/43,8%	
	TT	3/14,3%	26/14,8%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	14/56,0%	69/40,1%	0,321
	CT	8/32,0%	77/44,8%	
	TT	3/12,0%	26/15,1%	

Tabla A48. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B (Subtipo Luminal A incluido en el apartado Resultados, Tabla 61).

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	34/44,7%	49/40,5%	0,099
	CT	36/47,4%	49/40,5%	
	TT	6/7,9%	23/19,0%	

Tabla A49. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	GG	85/56,3%	24/52,2%	0,819
	GC	58/38,4%	20/43,5%	
	CC	8/5,3%	2/4,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	GG	11/52,4%	98/55,7%	0,949
	GC	9/42,9%	69/39,2%	
	CC	1/4,8%	9/5,1%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	GG	13/52,0%	96/55,8%	0,877
	GC	11/44,0%	67/39,0%	
	CC	1/4,0%	9/5,2%	

Tabla A50. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	GG	44/58,7%	65/53,3%	0,452
	GC	26/34,7%	52/42,64%	
	CC	5/6,7%	5/4,1%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	GG	41/53,9%	68/56,2%	0,759
	GC	32/42,1%	46/38,0%	
	CC	3/3,9%	7/5,2%	

Tabla A51. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	TT	64/42,4%	20/43,5%	0,341
	TG	61/40,4%	22/47,8%	
	GG	26/17,2%	4/8,7%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	TT	11/52,4%	73/41,5%	0,572
	TG	8/38,19%	75/42,6%	
	GG	2/9,5%	28/15,9%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	TT	9/36,0%	75/43,6%	0,275
	TG	14/56,0%	69/40,1%	
	GG	2/8,0%	28/16,3%	

Tabla A52. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	TT	31/41,3%	53/43,4%	0,811
	TG	31/41,3%	52/42,6%	
	GG	13/17,3%	17/13,9%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	TT	33/43,4%	51/42,1%	0,774
	TG	30/39,5%	53/43,8%	
	GG	13/17,1%	17/14,0%	

Tabla A53. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	38/25,2%	11/23,9%	0,780
	CT	67/44,4%	23/50,0%	
	TT	46/30,5%	12/26,1%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	6/28,6%	43/24,4%	0,818
	CT	10/47,6%	80/45,5%	
	TT	5/23,8%	53/30,1%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	5/20,0%	44/25,6%	0,762
	CT	13/52,0%	77/44,8%	
	TT	77/28,0%	51/29,7%	

Tabla A54. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	14/18,7%	35/28,7%	0,267
	CT	36/48,0%	54/44,3%	
	TT	25/33,3%	33/27,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	24/31,6%	25/20,7%	0,220
	CT	31/40,8%	59/48,8%	
	TT	21/27,6%	37/30,6%	

Tabla A55. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	49/32,5%	12/26,1%	0,392
	AG	68/45,0%	26/56,5%	
	GG	34/22,5%	8/17,4%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	5/23,8%	56/31,8%	0,382
	AG	13/61,9%	81/46,0%	
	GG	3/14,3%	39/22,2%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	7/28,0%	54/31,4%	0,898
	AG	13/52,0%	81/47,1%	
	GG	5/20,0%	37/21,5%	

Tabla A56. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	24/32,0%	37/30,3%	0,966
	AG	35/46,7%	59/48,4%	
	GG	16/21,3%	26/21,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	25/32,9%	36/29,8%	0,621
	AG	33/43,4%	61/50,4%	
	GG	18/23,7%	24/19,8%	

Tabla A57. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B (Subtipo Luminal incluido en el apartado Resultados, Tabla 62).

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	14/66,7%	93/52,8%	0,484
	CG	6/28,6%	70/39,8%	
	GG	1/4,8%	13/7,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	18/72,0%	89/51,7%	0,105
	CG	7/28,0%	69/40,1%	
	GG	0/0,0%	14/8,1%	

Tabla A58. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	37/49,3%	70/57,4%	0,283
	CG	34/45,3%	42/34,4%	
	GG	4/5,3%	10/8,2%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	38/50,0%	69/57,0%	0,121
	CG	29/38,2%	47/38,8%	
	GG	9/11,8%	5/4,1%	

Tabla A59. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	15/28,8%	10/41,7%	0,462
	AG	29/55,8%	12/50,0%	
	GG	8/15,4%	2/8,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	6/54,5%	19/29,2%	0,157
	AG	5/45,5%	36/55,4%	
	GG	0/9,5%	10/15,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	4/30,8%	21/33,3%	0,960
	AG	7/53,8%	34/54,0%	
	GG	2/15,4%	8/12,7%	

Tabla A60. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	7/26,9%	18/36,0%	0,174
	AG	13/50,0%	28/56,0%	
	GG	6/23,1%	4/8,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	8/30,8%	17/34,0%	0,503
	AG	16/61,5%	25/50,0%	
	GG	2/7,7%	8/16,0%	

Tabla A61. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	48/48,5%	12/54,5%	0,684
	AG	41/41,4%	7/31,8%	
	GG	10/10,1%	3/13,6%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	4/40,0%	56/50,5%	0,585
	AG	4/40,0%	44/39,6%	
	GG	2/20,0%	11/9,9%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	8/66,7%	52/47,7%	0,454
	AG	3/25,0%	45/41,3%	
	GG	1/8,3%	12/11,0%	

Tabla A62. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	20/40,8%	40/55,6%	0,280
	AG	26/46,9%	25/34,7%	
	GG	6/12,2%	7/9,7%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	28/56,0%	32/45,1%	0,451
	AG	18/36,0%	30/42,3%	
	GG	4/8,0%	9/12,7%	

Tabla A63. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	21/40,4%	13/54,2%	0,474
	AG	23/44,2%	9/37,5%	
	GG	8/15,4%	2/8,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	6/54,5%	28/43,1%	0,367
	AG	5/45,5%	27/41,5%	
	GG	0/0,0%	10/15,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	7/53,8%	27/42,9%	0,661
	AG	4/30,8%	28/44,4%	
	GG	2/15,4%	8/12,7%	

Tabla A64. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	12/46,2%	22/44,0%	0,124
	AG	8/30,8%	24/48,0%	
	GG	6/23,1%	4/8,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	9/34,6%	25/50,0%	0,130
	AG	15/57,7%	17/34,0%	
	GG	2/7,7%	8/16,0%	

Tabla A65. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	47/47,5%	11/50,0%	0,736
	AG	43/43,4%	8/36,4%	
	GG	9/9,1%	3/13,6%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	3/30,0%	55/49,5%	0,366
	AG	5/50,0%	46/41,4%	
	GG	2/20,0%	10/9,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	8/66,7%	50/45,9%	0,379
	AG	3/25,0%	48/44,0%	
	GG	1/8,3%	11/10,1%	

Tabla A66. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	20/40,8%	38/52,8%	0,413
	AG	23/46,9%	28/38,9%	
	GG	6/12,2%	6/8,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	27/54,0%	31/43,7%	0,356
	AG	20/40,0%	31/43,7%	
	GG	3/6,0%	9/12,6%	

Tabla A67. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	17/32,7%	13/54,2%	0,196
	CT	27/51,9%	9/37,5%	
	TT	8/15,4%	2/8,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	7/63,6%	23/35,4%	0,141
	CT	4/36,4%	32/49,2%	
	TT	0/0,0%	10/15,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	6/46,2%	24/38,1%	0,779
	CT	5/38,5%	31/49,2%	
	TT	2/15,4%	8/12,7%	

Tabla A68. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	8/30,8%	22/44,0%	0,166
	CT	12/46,2%	24/48,0%	
	TT	6/23,1%	4/8,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	9/34,6%	21/42,0%	0,364
	CT	15/57,7%	21/42,0%	
	TT	2/7,7%	8/16,0%	

Tabla A69. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	42/42,4%	11/50,0%	0,764
	CT	42/42,4%	7/31,8%	
	TT	15/15,2%	4/18,2%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	3/30,0%	50/45,0%	0,388
	CT	4/40,0%	45/40,5%	
	TT	3/30,0%	16/14,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	8/66,7%	45/41,3%	0,242
	CT	3/25,0%	46/42,2%	
	TT	1/8,3%	18/16,5%	

Tabla A70. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	17/34,7%	36/50,0%	0,131
	CT	21/42,9%	28/38,9%	
	TT	11/22,4%	8/11,1%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	25/50,0%	28/39,4%	0,134
	CT	21/42,0%	28/39,4%	
	TT	4/8,0%	15/21,1%	

Tabla A71. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	GG	27/51,9%	12/50,0%	0,915
	GC	22/42,3%	10/41,7%	
	CC	3/5,8%	2/8,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	GG	4/36,4%	35/53,8%	0,561
	GC	6/54,5%	26/40,0%	
	CC	1/9,1%	4/6,2%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	GG	8/61,5%	31/49,2%	0,661
	GC	4/30,8%	28/44,4%	
	CC	1/7,7%	4/6,3%	

Tabla A72. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	GG	16/61,5%	23/46,0%	0,352
	GC	8/30,8%	24/48,0%	
	CC	2/7,7%	3/6,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	GG	11/42,3%	28/56,0%	0,306
	GC	14/53,8%	18/36,0%	
	CC	1/3,8%	4/8,0%	

Tabla A73. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	GG	58/58,6%	12/54,5%	0,460
	GC	36/36,4%	10/45,5%	
	CC	5/5,1%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	GG	7/70,0%	63/56,8%	0,634
	GC	3/30,0%	43/38,7%	
	CC	0/0,0%	5/4,5%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	GG	5/41,7%	65/59,6%	0,273
	GC	7/58,3%	39/35,8%	
	CC	0/0,0%	5/4,6%	

Tabla A74. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	GG	28/57,1%	42/58,3%	0,660
	GC	18/36,7%	28/38,9%	
	CC	3/6,1%	2/2,8%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	GG	30/60,0%	40/56,3%	0,992
	GC	18/36,0%	28/39,4%	
	CC	2/4,0%	3/4,2%	

Tabla A75. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	TT	23/44,2%	12/50,0%	0,115
	TG	17/32,7%	11/45,8%	
	GG	12/23,1%	1/4,2%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	TT	5/45,5%	30/46,2%	0,690
	TG	5/45,5%	23/35,4%	
	GG	1/9,0%	12/18,5%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	TT	7/53,8%	28/44,4%	0,196
	TG	6/46,2%	22/34,9%	
	GG	0/0,0%	13/20,6%	

Tabla A76. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	TT	11/42,3%	24/48,0%	0,607
	TG	9/34,6%	19/38,0%	
	GG	6/23,1%	7/14,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	TT	12/46,2%	23/46,0%	0,543
	TG	8/30,8%	20/40,0%	
	GG	6/23,1%	7/14,0%	

Tabla A77. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	TT	41/41,4%	8/36,4%	0,887
	TG	44/44,4%	11/50,0%	
	GG	14/14,1%	3/13,6%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	TT	6/60,0%	43/38,7%	0,422
	TG	3/30,0%	52/46,8%	
	GG	1/10,0%	16/14,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	TT	2/16,7%	47/43,1%	0,197
	TG	8/66,7%	47/43,1%	
	GG	2/16,7%	15/13,8%	

Tabla A78. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	TT	20/40,8%	29/40,3%	0,995
	TG	22/44,9%	33/45,8%	
	GG	7/14,3%	10/13,9%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	TT	21/42,0%	28/39,4%	0,957
	TG	22/44,0%	33/46,5%	
	GG	7/14,0%	10/14,1%	

Tabla A79. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	16/30,8%	7/29,2%	0,980
	CT	24/46,2%	11/45,8%	
	TT	12/23,1%	6/25,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	4/36,4%	19/29,2%	0,469
	CT	6/54,5%	29/44,6%	
	TT	1/9,1%	17/26,2%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	3/23,1%	20/31,7%	0,385
	CT	5/38,5%	30/47,6%	
	TT	5/38,5%	13/20,6%	

Tabla A80. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	7/26,9%	16/32,0%	0,576
	CT	11/42,3%	24/48,0%	
	TT	8/30,8%	10/20,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	9/34,6%	14/28,0%	0,465
	CT	13/50,0%	22/44,0%	
	TT	4/15,4%	12/28,0%	

Tabla A81. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	22/22,2%	4/18,2%	0,638
	CT	43/43,4%	12/54,5%	
	TT	34/34,3%	6/27,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	2/20,0%	24/21,6%	0,886
	CT	4/40,0%	51/45,9%	
	TT	4/40,0%	36/32,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	2/16,7%	24/22,0%	0,280
	CT	8/66,7%	47/43,1%	
	TT	2/16,7%	38/34,9%	

Tabla A82. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	7/14,3%	19/26,4%	0,270
	CT	25/51,0%	30/41,7%	
	TT	17/34,7%	23/31,9%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	15/30,0%	11/15,5%	0,102
	CT	18/36,0%	37/52,1%	
	TT	17/34,0%	23/32,4%	

Tabla A83. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	17/32,7%	7/29,2%	0,951
	AG	21/40,4%	10/41,7%	
	GG	14/26,9%	7/29,2%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	2/18,2%	22/33,8%	0,515
	AG	6/54,5%	25/38,5%	
	GG	3/27,3%	18/27,7%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	5/38,5%	19/30,2%	0,713
	AG	4/30,8%	27/42,9%	
	GG	4/30,8%	17/27,0%	

Tabla A84. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	9/34,6%	15/30,0%	0,805
	AG	11/42,3%	20/40,0%	
	GG	6/23,1%	15/30,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	8/30,8%	16/32,0%	0,904
	AG	10/38,5%	21/42,0%	
	GG	8/30,8%	13/26,0%	

Tabla A85. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	32/32,3%	5/22,7%	0,071
	AG	47/47,5%	16/72,7%	
	GG	20/20,2%	1/4,5%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	3/30,0%	34/30,6%	0,277
	AG	7/70,0%	56/50,5%	
	GG	0/0,0%	21/18,9%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	2/16,7%	35/32,1%	0,245
	AG	9/75,0%	54/49,5%	
	GG	1/8,3%	20/18,3%	

Tabla A86. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	15/30,6%	22/30,6%	0,743
	AG	24/49,0%	39/54,2%	
	GG	10/20,4%	11/15,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	17/34,0%	20/28,2%	0,529
	AG	23/46,0%	40/56,3%	
	GG	10/20,0%	11/15,5%	

Tabla A87. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	30/57,7%	15/62,5%	0,909
	CG	19/36,5%	8/33,3%	
	GG	3/5,8%	1/4,2%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	6/54,5%	39/60,0%	0,816
	CG	4/36,4%	23/35,4%	
	GG	1/9,1%	3/4,6%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	9/69,2%	36/57,1%	0,551
	CG	4/30,8%	23/36,5%	
	GG	0/0,0%	4/6,3%	

Tabla A88. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	17/65,4%	28/56,0%	0,310
	CG	9/34,6%	18/36,0%	
	GG	0/0,0%	4/8,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	13/50,0%	32/64,0%	0,164
	CG	10/38,5%	17/34,0%	
	GG	3/11,5%	1/2,0%	

Tabla A89. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B (Subtipo Luminal incluido en el apartado Resultados, Tabla 63).

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	8/80,0%	54/48,6%	0,150
	CG	2/20,0%	47/42,3%	
	GG	0/0,0%	10/9,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	9/75,0%	53/48,6%	0,187
	CG	3/25,0%	46/42,2%	
	GG	0/0,0%	10/9,2%	

Tabla A90. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	20/40,8%	42/58,3%	0,135
	CG	25/51,0%	24/33,3%	
	GG	4/8,2%	6/8,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	25/50,0%	37/52,1%	0,450
	CG	19/38,0%	30/42,3%	
	GG	6/12,0%	4/5,6%	

Tabla A91. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	8/38,1%	9/60,0%	0,430
	AG	11/52,4%	5/33,3%	
	GG	2/9,5%	1/6,7%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	3/75,0%	14/43,8%	0,474
	AG	1/25,0%	15/46,9%	
	GG	0/0,0%	3/9,49%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	6/54,5%	11/44,0%	0,809
	AG	4/36,4%	12/48,0%	
	GG	1/9,1%	2/8,0%	

Tabla A92. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	4/33,3%	13/54,2%	0,468
	AG	7/58,3%	9/37,5%	
	GG	1/8,3%	2/8,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	4/44,4%	13/48,1%	0,937
	AG	4/44,4%	12/44,4%	
	GG	1/11,1%	2/7,4%	

Tabla A93. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	9/42,9%	10/66,7%	0,365
	AG	10/47,6%	4/26,7%	
	GG	2/9,5%	1/6,7%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	3/75,0%	16/50,0%	0,601
	AG	1/25,0%	13/40,6%	
	GG	0/0,0%	3/9,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	7/63,6%	12/48,0%	0,633
	AG	3/27,3%	11/44,0%	
	GG	1/9,1%	2/8,0%	

Tabla A94. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	5/41,7%	14/58,3%	0,609
	AG	6/50,0%	8/33,3%	
	GG	1/8,3%	2/8,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	4/44,4%	15/55,6%	0,833
	AG	4/44,4%	10/37,0%	
	GG	1/11,1%	2/7,4%	

Tabla A95. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	8/38,1%	9/60,0%	0,430
	CT	11/52,4%	5/33,3%	
	TT	2/9,5%	1/6,7%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	3/75,0%	14/43,8%	0,474
	CT	1/25,0%	15/46,9%	
	TT	0/0,0%	3/9,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	6/54,5%	11/44,0%	0,809
	CT	4/36,4%	12/48,0%	
	TT	1/9,1%	2/8,0%	

Tabla A96. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	4/33,3%	13/54,2%	0,468
	CT	7/58,3%	9/37,5%	
	TT	1/8,3%	2/8,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	4/44,4%	13/48,1%	0,937
	CT	4/44,4%	12/44,4%	
	TT	1/11,1%	2/7,4%	

Tabla A97. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	GG	13/61,9%	7/46,7%	0,663
	GC	7/33,3%	7/46,7%	
	CC	1/4,8%	1/6,7%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	GG	3/75,0%	17/53,1%	0,677
	GC	1/25,0%	13/40,6%	
	CC	0/0,0%	2/6,3%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	GG	4/36,4%	16/64,0%	0,300
	GC	6/54,5%	8/32,0%	
	CC	1/9,1%	1/0%	

Tabla A98. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	GG	7/58,3%	13/54,2%	0,588
	GC	5/41,7%	9/37,5%	
	CC	0/0,0%	2/8,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	GG	6/66,7%	14/51,9%	0,409
	GC	2/22,2%	12/44,4%	
	CC	1/11,1%	1/3,7%	

Tabla A99. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	TT	8/38,1%	7/46,7%	0,258
	TG	7/33,3%	7/46,7%	
	GG	6/28,6%	1/6,7%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	TT	3/75,0%	12/37,5%	0,317
	TG	1/25,0%	13/40,6%	
	GG	0/0,0%	7/21,9%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	TT	4/36,4%	11/44,0%	0,372
	TG	6/54,5%	8/32,0%	
	GG	1/9,1%	6/24,0%	

Tabla A100. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	TT	5/41,7%	10/41,7%	0,948
	TG	5/41,7%	9/37,5%	
	GG	2/16,7%	5/20,8%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	TT	3/33,3%	12/44,4%	0,086
	TG	2/22,2%	12/44,4%	
	GG	4/44,4%	3/11,1%	

Tabla A101. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	2/9,5%	1/6,7%	0,524
	CT	10/47,6%	10/66,7%	
	TT	9/42,9%	4/26,7%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	1/25,0%	2/6,3%	0,432
	CT	2/50,0%	18/56,3%	
	TT	1/25,0%	12/37,5%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	0/0,0%	3/12,0%	0,286
	CT	8/72,7%	12/48,0%	
	TT	3/27,3%	10/40,0%	

Tabla A102. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	1/8,3%	2/8,3%	0,881
	CT	6/50,0%	14/58,3%	
	TT	5/41,7%	8/33,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	1/11,1%	2/7,4%	0,783
	CT	4/44,4%	16/59,3%	
	TT	4/44,4%	9/33,3%	

Tabla A103. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	2/9,5%	4/26,7%	0,292
	AG	13/61,9%	9/60,0%	
	GG	6/28,6%	2/13,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	1/25,0%	5/15,6%	0,514
	AG	3/75,0%	19/59,4%	
	GG	0/0,0%	8/25,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	3/27,3%	3/12,0%	0,523
	AG	6/54,5%	16/64,0%	
	GG	2/18,2%	6/24,0%	

Tabla A104. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	1/8,3%	5/20,8%	0,412
	AG	7/58,3%	15/62,5%	
	GG	4/33,3%	4/16,7%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	1/11,1%	5/18,5%	0,868
	AG	6/66,7%	16/59,3%	
	GG	2/22,2%	6/22,2%	

Tabla A105. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B (Subtipo Luminal incluido en el apartado Resultados, Tabla 62).

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	14/66,7%	13/86,7%	0,351
	CG	6/28,6%	2/13,3%	
	GG	1/4,8%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	3/75,0%	24/75,0%	0,932
	CG	1/25,0%	7/21,9%	
	GG	0/0,0%	1/3,1%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	10/90,9%	17/68,0%	0,332
	CG	1/9,1%	7/28,0%	
	GG	0/0,0%	1/4,0%	

Tabla A106. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	8/66,7%	19/79,2%	0,435
	CG	4/33,3%	4/16,7%	
	GG	0/0,0%	1/4,2%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	6/66,7%	21/77,8%	0,211
	CG	2/22,2%	6/22,2%	
	GG	1/11,1%	0/0,0%	

Tabla A107. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	1/16,7%	2/28,6%	0,879
	AG	4/66,7%	4/57,1%	
	GG	1/16,7%	1/14,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	0/0,0%	3/25,0%	0,713
	AG	1/100,0%	7/58,3%	
	GG	0/0,0%	2/16,7%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	2/33,3%	1/14,3%	0,684
	AG	3/50,0%	5/71,4%	
	GG	1/16,7%	1/14,3%	

Tabla A108. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	0/0,0%	3/30,0%	0,420
	AG	2/66,7%	6/60,0%	
	GG	1/33,3%	1/10,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	1/33,3%	2/20,0%	0,672
	AG	2/66,7%	6/60,0%	
	GG	0/0,0%	2/20,0%	

Tabla A109. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	7/46,7%	7/87,5%	0,156
	AG	7/46,7%	1/12,5%	
	GG	1/6,7%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	3/100,0%	11/55,0%	0,330
	AG	0/0,0%	8/40,0%	
	GG	0/0,0%	1/5,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	4/80,0%	10/55,6%	0,588
	AG	1/20,0%	7/38,9%	
	GG	0/0,0%	1/5,6%	

Tabla A110. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	4/44,4%	10/71,4%	0,209
	AG	5/55,6%	3/21,4%	
	GG	0/0,0%	1/7,1%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	3/50,0%	11/64,7%	0,224
	AG	2/33,3%	6/35,3%	
	GG	1/16,7%	0/0,0%	

Tabla A111. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	2/33,3%	3/42,9%	0,940
	AG	3/50,0%	3/42,9%	
	GG	1/16,7%	1/14,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	0/0,0%	5/41,7%	0,532
	AG	1/100,0%	5/41,7%	
	GG	0/0,0%	2/16,7%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	3/50,0%	2/28,6%	0,672
	AG	2/33,3%	4/57,1%	
	GG	1/16,7%	1/14,3%	

Tabla A112. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	1/33,3%	4/40,0%	0,612
	AG	1/33,3%	5/50,0%	
	GG	1/33,3%	1/10,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	1/33,3%	4/40,0%	0,612
	AG	2/66,7%	4/40,0%	
	GG	0/0,0%	2/20,0%	

Tabla A113. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	7/46,7%	7/87,5%	0,156
	AG	7/46,7%	1/12,5%	
	GG	1/6,7%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	3/100,0%	11/55,0%	0,330
	AG	0/0,0%	8/40,0%	
	GG	0/0,0%	1/5,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	4/80,0%	10/55,6%	0,588
	AG	1/20,0%	7/38,9%	
	GG	0/0,0%	1/5,6%	

Tabla A114. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	4/44,4%	10/71,4%	0,209
	AG	5/55,6%	3/21,4%	
	GG	0/0,0%	1/7,1%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	3/50,0%	11/64,7%	0,224
	AG	2/33,3%	6/35,3%	
	GG	1/16,7%	0/0,0%	

Tabla A115. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	1/16,7%	2/28,6%	0,879
	CT	4/66,7%	4/57,1%	
	TT	1/16,7%	1/14,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	0/0,0%	3/25,0%	0,713
	CT	1/100,0%	7/58,3%	
	TT	0/0,0%	2/16,7%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	2/33,3%	1/14,3%	0,684
	CT	3/50,0%	5/71,4%	
	TT	1/16,7%	1/14,3%	

Tabla A116. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	0/0,0%	3/30,0%	0,420
	CT	2/66,7%	6/60,0%	
	TT	1/33,3%	1/10,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	1/33,3%	2/20,0%	0,672
	CT	2/66,7%	6/60,0%	
	TT	0/0,0%	2/20,0%	

Tabla A117. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	7/46,7%	7/87,5%	0,156
	CT	7/46,7%	1/12,5%	
	TT	1/6,7%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	3/100,0%	11/55,0%	0,330
	CT	0/0,0%	8/40,0%	
	TT	0/0,0%	1/5,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	4/80,0%	10/55,6%	0,588
	CT	1/20,0%	7/38,9%	
	TT	0/0,0%	1/5,6%	

Tabla A118. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	4/44,4%	10/71,4%	0,209
	CT	5/55,6%	3/21,4%	
	TT	0/0,0%	1/7,1%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	3/50,0%	11/64,7%	0,224
	CT	2/33,3%	6/35,3%	
	TT	1/16,7%	0/0,0%	

Tabla A119. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	GG	5/83,3%	5/71,4%	0,629
	GC	1/16,7%	1/14,3%	
	CC	0/0,0%	1/14,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	GG	1/100,0%	9/75,0%	0,850
	GC	0/0,0%	2/16,7%	
	CC	0/0,0%	1/8,3%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	GG	4/66,7%	6/85,7%	0,514
	GC	1/16,7%	1/14,3%	
	CC	1/16,7%	0/0,0%	

Tabla A120. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	GG	2/66,7%	8/80,0%	0,557
	GC	1/33,3%	1/10,0%	
	CC	0/0,0%	1/10,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	GG	3/100,0%	7/70,0%	0,557
	GC	0/0,0%	2/20,0%	
	CC	0/0,0%	1/10,0%	

Tabla A121. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	GG	8/53,3%	2/25,0%	0,256
	GC	6/40,0%	6/75,0%	
	CC	1/6,7%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	GG	2/66,7%	8/40,0%	0,667
	GC	1/33,3%	11/55,0%	
	CC	0/0,0%	1/5,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	GG	0/0,0%	10/55,6%	0,053
	GC	5/100,0%	7/38,9%	
	CC	0/0,0%	1/5,6%	

Tabla A122. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	GG	5/55,6%	5/35,7%	0,520
	GC	4/44,4%	8/57,1%	
	CC	0/0,0%	1/7,1%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	GG	3/50,0%	7/41,2%	0,177
	GC	2/33,3%	10/58,8%	
	CC	1/16,7%	0/0,0%	

Tabla A123. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	TT	2/33,3%	4/57,1%	0,246
	TG	2/33,3%	3/42,9%	
	GG	2/33,3%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	TT	1/100,0%	5/41,7%	0,532
	TG	0/0,0%	5/41,7%	
	GG	0/0,0%	2/16,7%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	TT	3/50,0%	3/42,9%	0,344
	TG	3/50,0%	2/28,6%	
	GG	0/0,0%	2/28,6%	

Tabla A124. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	TT	1/33,3%	5/50,0%	0,612
	TG	1/33,3%	4/40,0%	
	GG	1/33,3%	1/10,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	TT	1/33,3%	5/50,0%	0,612
	TG	1/33,3%	4/40,0%	
	GG	1/33,3%	1/10,0%	

Tabla A125. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	TT	6/40,0%	3/37,5%	0,650
	TG	5/33,3%	4/50,0%	
	GG	4/26,7%	1/12,5%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	TT	2/66,7%	7/35,0%	0,485
	TG	1/33,3%	8/40,0%	
	GG	0/0,0%	5/25,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	TT	1/20,0%	8/44,4%	0,517
	TG	3/60,0%	6/33,3%	
	GG	1/20,0%	4/22,2%	

Tabla A126. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	TT	4/44,4%	5/35,7%	0,612
	TG	4/44,4%	5/35,7%	
	GG	1/11,1%	4/28,6%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	TT	2/33,3%	7/41,2%	0,129
	TG	1/16,7%	8/47,1%	
	GG	3/50,0%	2/11,8%	

Tabla A127. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B (la significación estadística se debe al bajo número de individuos identificados con subtipo tumoral Her2).

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	0/0,0%	1/14,3%	0,629
	CT	4/66,7%	4/57,1%	
	TT	2/33,3%	2/28,6%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	1/100,0%	0/0,0%	0,002
	CT	0/0,0%	8/66,7%	
	TT	0/0,0%	4/33,3%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	0/0,0%	1/14,3%	0,629
	CT	4/66,7%	4/57,1%	
	TT	2/33,3%	2/28,6%	

Tabla A128. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	0/0,0%	1/10,0%	0,850
	CT	2/66,7%	6/60,0%	
	TT	1/33,3%	3/30,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	0/0,0%	1/10,0%	0,850
	CT	2/66,7%	6/60,0%	
	TT	1/33,3%	3/30,0%	

Tabla A129. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	2/13,3%	0/0,0%	0,233
	CT	6/40,0%	6/75,0%	
	TT	7/46,7%	2/25,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	0/0,0%	2/10,0%	0,791
	CT	2/66,7%	10/50,0%	
	TT	1/33,3%	8/40,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	0/0,0%	2/11,1%	0,350
	CT	4/80,0%	8/44,4%	
	TT	1/20,0%	8/44,4%	

Tabla A130. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	1/11,1%	1/7,1%	0,829
	CT	4/44,4%	8/57,1%	
	TT	4/44,4%	5/35,7%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	1/16,7%	1/5,9%	0,499
	CT	2/33,3%	10/58,8%	
	TT	3/50,0%	6/35,3%	

Tabla A131. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	0/0,0%	2/28,6%	0,354
	AG	4/66,7%	3/42,9%	
	GG	2/33,3%	2/28,6%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	0/0,0%	2/16,7%	0,629
	AG	1/100,0%	6/50,0%	
	GG	0/0,0%	4/33,3%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	2/33,3%	0/0,0%	0,199
	AG	2/33,3%	5/71,4%	
	GG	2/33,3%	2/28,6%	

Tabla A132. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	0/0,0%	2/20,0%	0,695
	AG	2/66,7%	5/50,0%	
	GG	1/33,3%	3/30,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	0/0,0%	2/20,0%	0,695
	AG	2/66,7%	5/50,0%	
	GG	1/33,3%	3/30,0%	

Tabla A133. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	2/13,3%	2/25,0%	0,256
	AG	9/60,0%	6/75,0%	
	GG	4/26,7%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	1/33,3%	3/15,0%	0,575
	AG	2/66,7%	13/65,0%	
	GG	0/0,0%	4/20,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	1/20,0%	3/16,7%	0,509
	AG	4/80,0%	11/61,1%	
	GG	0/0,0%	4/22,2%	

Tabla A134. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	1/11,1%	3/21,4%	0,258
	AG	5/55,6%	10/71,4%	
	GG	3/33,3%	1/7,1%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	1/16,7%	3/17,6%	0,996
	AG	4/66,7%	11/64,7%	
	GG	1/16,7%	3/17,6%	

Tabla A135. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	6/100,0%	6/85,7%	0,335
	CG	0/0,0%	1/14,3%	
	GG	0/0,0%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	1/100,0%	11/91,7%	0,764
	CG	0/0,0%	1/8,3%	
	GG	0/0,0%	0/0,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	5/83,3%	7/100,0%	0,261
	CG	1/16,7%	0/0,0%	
	GG	0/0,0%	0/0,0%	

Tabla A136. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	3/100,0%	9/90,0%	0,569
	CG	0/0,0%	1/10,0%	
	GG	0/0,0%	0/0,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	3/100,0%	9/90,0%	0,569
	CG	0/0,0%	1/10,0%	
	GG	0/0,0%	0/0,0%	

Tabla A137. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	8/53,3%	7/87,5%	0,251
	CG	6/40,0%	1/12,5%	
	GG	1/6,7%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	2/66,7%	13/65,0%	0,923
	CG	1/33,3%	6/30,0%	
	GG	0/0,0%	1/5,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	5/100,0%	10/55,6%	0,182
	CG	0/0,0%	7/38,9%	
	GG	0/0,0%	1/5,6%	

Tabla A138. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	5/55,6%	10/71,4%	0,4,5
	CG	4/44,4%	3/21,4%	
	GG	0/0,0%	1/7,1%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	3/50,0%	12/70,6%	0,208
	CG	2/33,3%	5/29,4%	
	GG	1/16,7%	0/0,0%	

Tabla A139. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	55/42,3%	13/41,9%	0,996
	AG	59/45,4%	14/45,2%	
	GG	16/12,3%	4/12,9%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	7/41,2%	61/42,4%	0,988
	AG	8/47,1%	65/45,1%	
	GG	2/11,8%	18/12,5%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	6/42,9%	62/42,2%	0,968
	AG	6/42,9%	67/45,6%	
	GG	2/14,3%	18/12,2%	

Tabla A140. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	23/36,5%	45/45,9%	0,231
	AG	29/46,0%	44/44,9%	
	GG	11/17,5%	9/9,2%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	32/47,8%	36/38,3%	0,211
	AG	30/44,8%	43/45,7%	
	GG	5/7,5%	15/16,0%	

Tabla A141. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	59/45,4%	14/45,2%	0,977
	AG	56/43,1%	13/41,9%	
	GG	15/11,5%	4/12,9%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	6/35,3%	67/46,5%	0,646
	AG	9/52,9%	60/41,7%	
	GG	2/11,8%	17/11,8%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	8/57,1%	65/44,2%	0,527
	AG	4/28,6%	65/44,2%	
	GG	2/14,3%	17/11,6%	

Tabla A142. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	27/42,9%	46/46,9%	0,203
	AG	25/39,7%	44/44,9%	
	GG	11/17,5%	8/8,2%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	32/47,8%	41/43,6%	0,152
	AG	31/46,3%	38/40,4%	
	GG	4/6,0%	15/16,0%	

Tabla A143. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	51/39,2%	15/48,4%	0,607
	CT	58/44,6%	11/35,5%	
	TT	21/16,2%	5/16,1%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	7/41,2%	59/41,0%	0,981
	CT	7/41,2%	62/43,1%	
	TT	3/17,6%	23/16,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	8/57,1%	58/39,5%	0,419
	CT	4/28,6%	65/44,2%	
	TT	2/14,3%	24/16,3%	

Tabla A144. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	GG	72/55,4%	17/54,8%	0,868
	GC	51/39,2%	13/41,9%	
	CC	7/5,4%	1/3,2%	

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	GG	8/47,1%	81/56,3%	0,771
	GC	8/47,1%	56/38,9%	
	CC	1/5,9%	7/4,9%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	GG	9/64,3%	80/54,4%	0,592
	GC	5/35,7%	59/40,1%	
	CC	0/0,0%	8/5,4%	

Tabla A145. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	GG	37/58,7%	52/53,1%	0,209
	GC	21/33,3%	43/43,9%	
	CC	5/7,9%	3/3,1%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	GG	35/52,2%	54/57,4%	0,401
	GC	30/44,8%	35/36,2%	
	CC	2/3,0%	6/6,4%	

Tabla A146. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	TT	56/43,1%	13/41,9%	0,653
	TG	54/41,5%	15/48,4%	
	GG	20/15,4%	3/9,7%	

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	TT	8/47,1%	61/42,4%	0,916
	TG	7/41,2%	62/43,1%	
	GG	2/11,8%	21/14,6%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	TT	5/35,7%	64/43,5%	0,482
	TG	8/57,1%	61/41,5%	
	GG	1/7,1%	22/15,0%	

Tabla A147. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	TT	26/41,3%	43/43,9%	0,653
	TG	26/41,3%	43/43,9%	
	GG	11/17,5%	12/12,2%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	TT	30/44,8%	39/41,5%	0,911
	TG	28/41,8%	41/43,6%	
	GG	9/13,4%	14/14,9%	

Tabla A148. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	36/27,7%	10/32,3%	0,875
	CT	57/43,8%	13/41,9%	
	TT	37/28,5%	8/25,8%	

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	5/29,4%	41/28,5%	0,908
	CT	8/47,1%	62/43,1%	
	TT	4/23,5%	41/28,5%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	5/35,7%	41/27,9%	0,783
	CT	5/35,7%	65/44,2%	
	TT	4/28,6%	41/27,9%	

Tabla A149. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	13/20,6%	33/33,7%	0,200
	CT	30/47,6%	40/40,8%	
	TT	20/31,7%	25/25,5%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	23/34,3%	23/24,5%	0,392
	CT	27/40,3%	43/45,7%	
	TT	17/25,4%	28/29,8%	

Tabla A150. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	47/36,2%	8/25,8%	0,423
	AG	55/42,3%	17/54,8%	
	GG	28/21,5%	6/19,4%	

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	4/23,5%	51/35,4%	0,453
	AG	10/58,8%	62/43,1%	
	GG	3/17,6%	31/21,5%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	4/28,6%	51/34,7%	0,888
	AG	7/50,0%	65/44,2%	
	GG	3/21,4%	31/21,1%	

Tabla A151. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	23/36,5%	32/32,7%	0,828
	AG	28/44,4%	44/44,9%	
	GG	12/19,0%	22/22,4%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	24/35,8%	31/33,0%	0,604
	AG	27/40,3%	45/47,9%	
	GG	16/23,9%	18/19,1%	

Tabla A152. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	61/46,9%	19/61,3%	0,276
	CG	57/43,8%	11/35,5%	
	GG	12/9,2%	1/3,2%	

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	11/64,7%	69/47,9%	0,424
	CG	5/29,4%	63/43,8%	
	GG	1/5,9%	12/8,3%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	8/57,1%	72/49,0%	0,494
	CG	6/42,9%	62/42,2%	
	GG	0/0,0%	13/8,8%	

Tabla A153. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	29/46,0%	51/52,0%	0,504
	CG	30/47,6%	38/38,8%	
	GG	4/6,3%	9/9,2%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	32/47,8%	48/51,5%	0,315
	CG	27/40,3%	41/43,6%	
	GG	8/11,9%	5/5,3%	

Tabla A154. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	14/30,4%	8/47,1%	0,375
	AG	25/54,3%	8/47,1%	
	GG	7/15,2%	1/5,9%	

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	6/60,0%	16/30,2%	0,135
	AG	4/40,0%	29/54,7%	
	GG	0/0,0%	8/15,1%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	2/28,6%	20/35,7%	0,932
	AG	4/57,1%	29/51,8%	
	GG	1/14,3%	7/12,5%	

Tabla A155. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	7/30,4%	15/37,5%	0,261
	AG	11/47,8%	22/55,0%	
	GG	5/21,7%	3/7,5%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	7/30,4%	15/37,5%	0,559
	AG	14/60,9%	19/47,5%	
	GG	2/8,7%	6/15,0%	

Tabla A156. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	41/48,8%	5/35,7%	0,454
	AG	34/40,5%	6/42,9%	
	GG	9/10,7%	3/21,4%	

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	1/14,3%	45/49,5%	0,146
	AG	4/57,1%	36/39,6%	
	GG	2/28,6%	10/11,0%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	4/57,1%	42/46,2%	0,791
	AG	2/28,6%	38/41,8%	
	GG	1/14,3%	11/12,1%	

Tabla A157. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	16/40,0%	30/51,7%	0,496
	AG	18/45,0%	22/37,9%	
	GG	6/15,0%	6/10,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	25/56,8%	21/38,9%	0,137
	AG	16/36,4%	24/44,4%	
	GG	3/6,8%	9/16,7%	

Tabla A158. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	19/41,3%	10/58,8%	0,390
	AG	20/43,5%	6/35,3%	
	GG	7/15,2%	1/5,9%	

	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	6/60,0%	23/43,4%	0,365
	AG	4/40,0%	22/41,5%	
	GG	0/0,0%	8/15,1%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	4/57,1%	25/44,6%	0,765
	AG	2/28,6%	4/42,9%	
	GG	1/14,3%	7/12,5%	

Tabla A159. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	11/47,8%	18/45,0%	0,184
	AG	7/30,4%	19/47,5%	
	GG	5/21,7%	3/7,5%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	8/34,8%	21/52,5%	0,174
	AG	13/56,5%	13/32,5%	
	GG	2/8,7%	6/15,0%	

Tabla A160. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B (Subtipo Her2 incluido en el apartado Resultados, Tabla 66).

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	40/47,6%	4/28,6%	0,269
	AG	36/42,9%	7/50,0%	

	GG	8/9,5%	3/21,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	4/57,1%	40/44,0%	0,699
	AG	2/28,6%	41/45,1%	
	GG	1/14,3%	10/11,0%	

Tabla A161. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	16/40,0%	28/48,3%	0,538
	AG	18/45,0%	25/43,1%	
	GG	6/15,0%	5/8,6%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	24/54,5%	20/37,0%	0,083
	AG	18/40,9%	25/46,3%	
	GG	2/4,5%	9/16,7%	

Tabla A162. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	16/34,8%	11/64,7%	0,099
	CT	23/50,0%	5/2,9%	

	TT	7/15,2%	1/5,9%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	7/70,0%	20/37,7%	0,128
	CT	3/30,0%	25/47,2%	
	TT	0/0,0%	8/15,1%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	4/57,1%	23/41,1%	0,658
	CT	2/28,6%	26/46,4%	
	TT	1/14,3%	7/12,5%	

Tabla A163. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	8/34,8%	19/47,5%	0,236
	CT	10/43,5%	18/45,0%	
	TT	5/21,7%	3/7,5%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	8/34,8%	19/47,5%	0,333
	CT	13/56,5%	15/37,5%	
	TT	2/8,7%	6/15,0%	

Tabla A164. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	35/41,7%	4/28,6%	0,485
	CT	35/41,7%	6/42,9%	

	TT	14/16,7%	4/28,6%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	0/0,0%	39/42,9%	0,053
	CT	4/57,1%	37/40,7%	
	TT	3/42,9%	15/16,5%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	4/57,1%	35/38,5%	0,620
	CT	2/28,6%	39/42,9%	
	TT	1/14,3%	17/18,7%	

Tabla A165. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B (Subtipo Luminal B incluido en el apartado Resultados, Tabla 65).

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	13/32,5%	26/44,8%	0,133
	CT	16/40,0%	25/43,1%	
	TT	11/27,5%	7/12,1%	

Tabla A166. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	GG	22/47,8%	7/41,2%	0,876
	GC	21/45,7%	9/52,9%	

	CC	3/6,5%	1/5,9%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	GG	3/30,0%	26/49,1%	0,523
	GC	6/60,0%	24/45,3%	
	CC	1/10,0%	3/5,7%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	GG	4/57,1%	25/44,6%	0,688
	GC	3/42,9%	27/48,2%	
	CC	0/0,0%	4/7,1%	

Tabla A167. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	GG	14/60,9%	15/37,5%	0,117
	GC	7/30,4%	23/57,5%	
	CC	2/8,7%	2/5,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	GG	8/34,8%	21/52,5%	0,278
	GC	14/60,9%	16/40,0%	
	CC	1/4,3%	4/7,5%	

Tabla A168. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	GG	50/59,5%	10/71,4%	0,571
	GC	30/35,7%	4/28,6%	

	CC	4/4,8%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	GG	5/71,4%	55/60,4%	0,772
	GC	2/28,6%	32/35,2%	
	CC	0/0,0%	4/4,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	GG	5/71,4%	55/60,4%	0,772
	GC	2/28,6%	32/35,2%	
	CC	0/0,0%	4/4,4%	

Tabla A169. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	GG	23/57,5%	37/63,8%	0,352
	GC	14/35,0%	20/34,5%	
	CC	3/7,5%	1/1,7%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	GG	27/61,4%	33/61,1%	0,703
	GC	16/36,4%	18/33,3%	
	CC	1/3%	3/5,6%	

Tabla A170. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	TT	21/45,7%	8/47,1%	0,286
	TG	15/32,6%	8/47,1%	

	GG	10/21,7%	1/5,9%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	TT	4/40,0%	25/47,2%	0,587
	TG	5/50,0%	18/34,0%	
	GG	1/10,0%	10/18,9%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	TT	4/57,1%	25/44,6%	0,433
	TG	3/42,9%	20/35,7%	
	GG	0/0,0%	11/19,6%	

Tabla A171. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	TT	10/43,5%	19/47,5%	0,794
	TG	8/34,8%	15/37,5%	
	GG	5/21,7%	6/15,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	TT	11/47,8%	18/45,0%	0,680
	TG	7/30,4%	16/40,0%	
	GG	5/21,7%	6/15,0%	

Tabla A172. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	TT	35/41,7%	5/35,7%	0,908
	TG	39/46,4%	7/50,0%	

	GG	10/11,9%	2/14,3%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	TT	4/57,1%	36/39,6%	0,589
	TG	2/28,6%	44/48,4%	
	GG	1/14,3%	11/12,1%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	TT	1/14,3%	39/42,9%	0,318
	TG	5/71,4%	41/45,1%	
	GG	1/14,3%	11/12,1%	

Tabla A173. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	TT	16/40,0%	24/41,4%	0,785
	TG	18/45,0%	28/48,3%	
	GG	6/15,0%	6/10,3%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	TT	19/43,2%	21/38,9%	0,681
	TG	21/47,7%	25/46,3%	
	GG	4/9,1%	8/14,8%	

Tabla A174. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	16/34,8%	6/35,3%	0,983
	CT	20/43,5%	7/41,2%	

	TT	10/21,7%	4/23,5%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	3/30,0%	19/35,8%	0,428
	CT	6/60,0%	21/39,6%	
	TT	1/10,0%	13/24,5%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	3/42,9%	19/33,9%	0,207
	CT	1/14,3%	26/46,4%	
	TT	3/42,9%	11/19,6%	

Tabla A175. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	7/30,4%	15/37,5%	0,490
	CT	9/39,1%	18/45,0%	
	TT	7/30,4%	7/17,5%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	9/39,1%	13/32,5%	0,414
	CT	11/47,8%	16/40,0%	
	TT	3/13,0%	11/27,5%	

Tabla A176. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	20/23,8%	4/28,6%	0,922
	CT	37/44,0%	6/42,9%	

	TT	27/32,1%	4/28,6%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	2/28,6%	22/24,2%	0,686
	CT	2/28,6%	41/45,1%	
	TT	3/42,9%	28/30,8%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	2/28,6%	22/24,2%	0,585
	CT	4/57,1%	39/42,9%	
	TT	1/14,3%	30/33,0%	

Tabla A177. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	6/15,0%	18/31,0%	0,161
	CT	21/52,5%	22/37,9%	
	TT	13/32,5%	18/31,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	14/31,8%	10/15,185%	0,249
	CT	16/36,4%	27/50,0%	
	TT	14/31,8%	17/31,5%	

Tabla A178. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	17/37,0%	5/29,4%	0,856
	AG	17/37,0%	7/41,2%	

	GG	12/26,0%	5/29,4%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	2/20,0%	20/37,7%	0,538
	AG	5/50,0%	19/35,8%	
	GG	3/30,0%	14/26,4%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	3/42,9%	19/33,9%	0,845
	AG	2/28,6%	22/39,3%	
	GG	2/28,6%	15/26,8%	

Tabla A179. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	9/39,1%	13/32,5%	0,755
	AG	9/39,1%	15/37,5%	
	GG	5/21,7%	12/30,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	8/34,8%	14/35,0%	0,876
	AG	8/34,8%	16/40,0%	
	GG	7/30,4%	10/25,0%	

Tabla A180. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	AA	30/35,7%	3/21,4%	0,184
	AG	38/45,2%	10/71,4%	

	GG	16/19,0%	1/7,1%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	AA	2/28,6%	31/34,1%	0,343
	AG	5/71,4%	43/47,3%	
	GG	0/0,0%	17/18,7%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	AA	1/14,3%	32/35,2%	0,437
	AG	5/71,4%	43/47,3%	
	GG	1/14,3%	16/17,6%	

Tabla A181. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	AA	14/35,0%	19/32,8%	0,967
	AG	19/47,5%	29/50,0%	
	GG	7/17,5%	10/17,2%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	AA	16/36,4%	17/31,5%	0,559
	AG	19/43,2%	29/53,7%	
	GG	9/20,5%	8/14,8%	

Tabla A182. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	24/52,2%	9/52,9%	0,995
	CG	19/41,3%	7/41,2%	

	GG	3/6,5%	1/5,9%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	5/50,0%	28/52,8%	0,875
	CG	4/40,0%	22/41,5%	
	GG	1/10,0%	3/5,7%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	4/57,1%	29/51,8%	0,764
	CG	3/42,9%	23/41,1%	
	GG	0/0,0%	4/7,1%	

Tabla A183. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en menores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	14/60,9%	19/47,5%	0,242
	CG	9/39,1%	17/42,5%	
	GG	0/0,0%	4/10,0%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	10/43,5%	23/57,5%	0,207
	CG	10/43,5%	16/40,0%	
	GG	3/13,0%	1/25,0%	

Tabla A184. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL	CC	37/44,0	10/71,4%	0,125
	CG	38/45,2%	4/28,6%	

	GG	9/10,7%	0/0,0%	
	Genotipo	Her2 (N/%)	Resto (N/%)	p
Her2	CC	6/85,7%	41/45,1%	0,113
	CG	1/14,3%	41/45,1%	
	GG	0/0,0%	9/9,9%	
	Genotipo	Basal Like (N/%)	Resto (N/%)	p
BASAL LIKE	CC	4/57,1%	43/47,3%	0,662
	CG	3/42,9%	39/42,9%	
	GG	0/0,0%	9/9,9%	

Tabla A185. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor en mayores de 40 años. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

Subtipos biológicos de tumor

	Genotipo	Luminal A (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL A	CC	15/37,5%	32/55,2%	0,217
	CG	21/52,5%	21/36,2%	
	GG	4/10,0%	5/8,6%	
	Genotipo	Luminal B (N/%)	Resto (N/%)	p
LUMINAL B	CC	22/50,0%	25/46,3%	0,665
	CG	17/38,6%	25/46,3%	
	GG	5/11,4%	4/7,4%	

Tabla A186. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL	AA	8/38,1%	55/42,3%	0,825
	AG	11/52,4%	59/45,4%	
	GG	2/9,5%	16/12,3%	

Her2	AA	3/75,0%	7/41,2%	0,446
	AG	1/25,0%	8/47,1%	
	GG	0/0,0%	2/11,8%	
BASAL LIKE	AA	6/54,5%	6/42,9%	0,827
	AG	4/36,4%	6/42,9%	
	GG	1/9,1%	2/14,3%	

Tabla A187. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3232A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL A	AA	4/33,3%	23/36,5%	0,647
	AG	7/58,3%	29/46,0%	
	GG	1/8,3%	11/17,5%	
LUMINAL B	AA	4/44,4%	32/47,8%	0,927
	AG	4/44,4%	30/44,8%	
	GG	1/11,1%	5/7,5%	

Tabla A188. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL	AA	9/42,9%	59/45,4%	0,916
	AG	10/47,6%	56/43,1%	
	GG	2/9,5%	15/11,5%	
Her2	AA	3/75,0%	6/35,3%	0,334
	AG	1/25,0%	9/52,9%	
	GG	0/0,0%	2/11,8%	

BASAL LIKE	AA	7/63,6%	8/57,1%	0,911
	AG	3/27,3%	4/28,6%	
	GG	1/9,1%	2/14,3%	

Tabla A189. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.3667A>G del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL A	AA	5/41,7%	27/42,9%	0,674
	AG	6/50,0%	25/39,7%	
	GG	1/8,3%	11/17,5%	
LUMINAL B	AA	4/44,4%	32/47,8%	0,842
	AG	4/44,4%	31/46,3%	
	GG	1/11,1%	4/6,0%	

Tabla A190. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL	CC	8/38,1%	51/39,2%	0,682
	CT	11/52,4%	58/44,6%	
	TT	2/9,5%	21/16,2%	
Her2	CC	3/75,0%	7/41,2%	0,426
	CT	1/25,0%	7/41,2%	
	TT	0/0,0%	3/17,6%	
BASAL LIKE	CC	6/54,5%	8/57,1%	0,877
	CT	4/36,4%	4/28,6%	
	TT	1/9,1%	2/14,3%	

Tabla A191. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL A	CC	4/33,3%	21/33,3%	0,375
	CT	7/58,3%	26/41,3%	
	TT	1/8,3%	16/25,4%	
LUMINAL B	CC	4/44,4%	32/47,8%	0,927
	CT	4/44,4%	30/44,8%	
	TT	1/11,1%	5/7,5%	

Tabla A192. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL	GG	13/61,9%	72/55,4%	0,855
	GC	7/33,3%	51/39,2%	
	CC	1/8%	7/5,4%	
Her2	GG	3/75,0%	8/47,1%	0,581
	GC	1/25,0%	8/47,1%	
	CC	0/0,0%	1/5,9%	
BASAL LIKE	GG	4/36,4%	9/64,3%	0,260
	GC	6/54,5%	5/35,7%	
	CC	1/9,1%	0/0,0%	

Tabla A193. Distribución de los genotipos del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL A	GG	7/58,3%	37/58,7%	0,561
	GC	5/41,7%	21/33,3%	
	CC	0/0,0%	5/7,9%	
LUMINAL B	GG	6/66,7%	35/52,2%	0,274
	GC	2/22,2%	30/44,8%	
	CC	1/11,1%	2/3,0%	

Tabla A194. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdivido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL	TT	8/38,1%	56/43,1%	0,327
	TG	7/33,3%	54/41,5%	
	GG	6/28,6%	20/15,4%	
Her2	TT	3/75,0%	8/47,1%	0,556
	TG	1/25,0%	7/41,2%	
	GG	0/0,0%	2/11,8%	
BASAL LIKE	TT	4/36,4%	5/35,7%	0,981
	TG	6/54,5%	8/57,1%	
	GG	1/9,1%	1/7,1%	

Tabla A195. Distribución de los genotipos del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdivido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL A	TT	5/41,7%	26/41,3%	0,998

LUMINAL B	TG	5/41,7%	26/41,3%	
	GG	2/16,7%	11/17,5%	
	TT	3/33,3%	30/44,8%	0,065
	TG	2/22,2%	28/41,8%	
	GG	4/44,4%	9/13,4%	

Tabla A196. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL	CC	2/9,5%	36/27,7%	0,160
	CT	10/47,6%	57/43,8%	
	TT	9/42,9%	37/28,5%	
Her2	CC	1/25,0%	5/29,4%	0,985
	CT	2/50,0%	8/47,1%	
	TT	1/25,0%	4/23,5%	
BASAL LIKE	CC	0/0,0%	5/35,7%	0,062
	CT	8/72,7%	5/35,7%	
	TT	3/27,3%	4/28,6%	

Tabla A197. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2981582 del gen FGFR2 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL A	CC	1/8,3%	13/20,6%	0,569
	CT	6/50,0%	30/47,6%	
	TT	5/41,7%	20/31,7%	
LUMINAL B	CC	1/11,1%	23/34,3%	0,296
	CT	4/44,4%	27/40,3%	
	TT	4/44,4%	17/25,4%	

Tabla A198. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL	AA	2/9,5%	47/36,2%	0,053
	AG	13/61,9%	55/42,3%	
	GG	6/28,6%	28/21,5%	
Her2	AA	1/25,0%	75/23,5%	0,655
	AG	3/75,0%	80/58,8%	
	GG	0/0,0%	21/17,6%	
BASAL LIKE	AA	3/27,3%	4/28,6%	0,970
	AG	6/54,5%	7/50,0%	
	GG	2/18,2%	3/21,4%	

Tabla A199. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs13281615 de la región cromosómica 8q24 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL A	AA	1/8,3%	23/36,5%	0,144
	AG	7/58,3%	28/44,4%	
	GG	4/33,3%	12/19,0%	
LUMINAL B	AA	1/11,1%	24/35,8%	0,253
	AG	6/66,7%	27/40,3%	
	GG	2/22,2%	16/23,9%	

Tabla A200. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal no subdividido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL	CC	14/66,7%	61/46,9%	0,241

Her2	CG	6/28,6%	57/43,8%	
	GG	1/4,8%	12/9,2%	
	CC	3/75,0%	11/64,7%	0,857
	CG	1/25,0%	5/29,4%	
	GG	0/0,0%	1/5,9%	
	CC	10/90,9%	8/57,1%	0,062
BASAL LIKE	CG	1/9,1%	6/42,9%	
	GG	0/0,0%	0/0,0%	

Tabla A201. Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del subtipo de tumor. Subtipo Luminal subdividido en Luminal A y Luminal B.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF- (N/%)	p
LUMINAL A	CC	8/66,7%	29/46,0%	0,352
	CG	4/33,3%	30/47,6%	
	GG	0/0,0%	4/6,3%	
LUMINAL B	CC	6/66,7%	32/47,8%	0,535
	CG	2/22,2%	27/40,3%	
	GG	1/11,1%	8/11,9%	

Tabla A202. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados. Menores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	p
c.3232A>G	AA	3/23,1%	6/60,0%	0,118
	AG	8/61,5%	2/20,0%	
	GG	2/15,4%	2/20,0%	

c.3667A>G	AA	5/38,5%	6/60,0%	0,421
	AG	6/46,2%	2/20,0%	
	GG	2/15,4%	2/20,0%	
c.2731C>T	CC	3/23,1%	5/50,0%	0,298
	CT	8/61,5%	3/30,0%	
	TT	2/15,4%	2/20,0%	

Tabla A203. Distribución de los genotipos de los polimorfismos p.Arg72Pro del gen TP53 y c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados. Menores de 40 años (p.Arg72Pro del gen TP53 incluido en el apartado Resultados, Tabla 129).

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	p
c.-309T>G	TT	6/46,2%	3/30,0%	0,734
	TG	5/38,5%	5/50,0%	
	GG	2/15,4%	2/20,0%	

Tabla A204. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados. Menores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	p
rs2981582	CC	1/7,7%	4/40,0%	0,177
	CT	8/61,5%	4/40,0%	
	TT	4/30,8%	2/20,0%	
rs13281615	AA	2/15,4%	1/10,0%	0,642
	AG	7/53,8%	4/40,0%	
	GG	4/30,8%	5/50,0%	
rs2910164	CC	12/92,3%	5/50,0%	0,068
	CG	1/7,7%	4/40,0%	
	GG	0/0,0%	1/10,0%	

Tabla A205. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados. Mayores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	p
c.3232A>G	AA	14/60,9%	18/46,2%	0,521
	AG	8/34,8%	18/46,2%	
	GG	1/4,3%	3/7,7%	
c.3667A>G	AA	14/60,9%	17/43,6%	0,416
	AG	8/34,8%	20/51,3%	
	GG	1/4,3%	2/5,1%	
c.2731C>T	CC	14/60,9%	14/35,9%	0,122
	CT	8/34,8%	19/48,7%	
	TT	1/4,3%	6/15,4%	

Tabla A206. Distribución de los genotipos de los polimorfismos p.Arg72Pro del gen TP53 y c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados. Mayores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	p
p.Arg72Pro	GG	10/43,5%	25/64,1%	0,101
	GC	12/52,2%	10/25,6%	
	CC	1/4,3%	4/10,3%	
c.-309T>G	TT	9/39,1%	16/41,0%	0,641
	TG	9/39,1%	18/46,2%	
	GG	5/21,7%	5/12,8%	

Tabla A207. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con tres o más familiares afectados. Mayores de 40 años (rs2910164 del gen miR146 incluido en el apartado Resultados, Tabla 129).

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF->3 (N/%)	p
rs2981582	CC	2/8,7%	13/33,3%	0,076

rs13281615	CT	12/52,2%	17/43,6%	
	TT	9/39,1%	9/23,1%	
	AA	4/17,4%	12/30,8%	0,497
	AG	15/62,5%	22/56,4%	
	GG	4/17,4%	5/12,8%	

Tabla A208. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados. Menores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
c.3232A>G	AA	3/23,1%	16/30,2%	0,843
	AG	8/61,5%	31/58,5%	
	GG	2/15,4%	6/11,3%	
c.3667A>G	AA	5/38,5%	23/43,4%	0,903
	AG	6/46,2%	24/45,3%	
	GG	2/15,4%	6/11,3%	
c.2731C>T	CC	3/23,1%	22/41,5%	0,470
	CT	8/61,5%	25/47,2%	
	TT	2/15,4%	6/11,3%	

Tabla A209. Distribución de los genotipos de los polimorfismos p.Arg72Pro del gen TP53 y c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados. Menores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
p.Arg72Pro	GG	10/76,9%	27/50,9%	0,200
	GC	2/15,4%	22/41,5%	
	CC	1/7,7%	4/7,5%	
c.-309T>G	TT	6/46,2%	26/49,1%	0,954

TG	5/38,5%	18/34,0%
GG	2/15,4%	9/17,0%

Tabla A210. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados. Menores de 40 años (rs2910164 del gen miR146 incluido en el apartado Resultados, Tabla 129).

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
rs2981582	CC	1/7,7%	18/34,0%	0,172
	CT	8/61,5%	23/43,4%	
	TT	4/30,8%	12/22,6%	
rs13281615	AA	2/15,4%	21/39,6%	0,258
	AG	7/53,8%	20/37,7%	
	GG	4/30,8%	12/22,6%	

Tabla A211. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados. Mayores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
c.3232A>G	AA	14/60,9%	28/47,5%	0,329
	AG	8/34,8%	22/37,3%	
	GG	1/4,3%	9/15,3%	
c.3667A>G	AA	14/60,9%	27/45,8%	0,294
	AG	8/34,8%	23/39,0%	
	GG	1/4,3%	9/15,3%	
c.2731C>T	CC	14/60,9%	25/42,4%	0,143
	CT	8/34,8%	22/37,3%	
	TT	1/4,3%	12/20,3%	

Tabla A212. Distribución de los genotipos de los polimorfismos p.Arg72Pro del gen TP53 y c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados. Mayores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
p.Arg72Pro	GG	10/43,5%	35/59,3%	0,148
	GC	12/52,2%	24/40,7%	
	CC	1/4,3%	0/0,0%	
c.-309T>G	TT	9/39,1%	24/40,7%	0,505
	TG	9/39,1%	28/47,5%	
	GG	5/21,7%	7/11,9%	

Tabla A213. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama portadores y no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 con menos de tres familiares afectados. Mayores de 40 años.

	Genotipo	CMF+ (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
rs2981582	CC	2/8,7%	11/18,6%	0,527
	CT	12/52,2%	26/44,1%	
	TT	9/39,1%	22/37,3%	
rs13281615	AA	4/17,4%	21/35,6%	0,187
	AG	15/62,5%	26/44,1%	
	GG	4/17,4%	12/20,3%	
rs2910164	CC	15/65,2%	34/57,6%	0,799
	CG	7/30,4%	21/35,6%	
	GG	1/4,3%	4/6,8%	

Tabla A214. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados. Menores de 40 años.

	Genotipo	CMF->3 (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
c.3232A>G	AA	6/60,0%	16/30,2%	0,081
	AG	2/20,0%	31/58,5%	
	GG	2/20,0%	6/11,3%	
c.3667A>G	AA	6/60,0%	23/43,4%	0,316
	AG	2/20,0%	24/45,3%	
	GG	2/20,0%	6/11,3%	
c.2731C>T	CC	5/50,0%	22/41,5%	0,549
	CT	3/30,0%	25/47,2%	
	TT	2/20,0%	6/11,3%	

Tabla A215. Distribución de los genotipos de los polimorfismos p.Arg72Pro del gen TP53 y c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados. Menores de 40 años.

	Genotipo	CMF->3 (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
p.Arg72Pro	GG	2/20,0%	27/50,9%	0,077
	GC	8/80,0%	22/41,5%	
	CC	0/0,0%	4/7,5%	
c.-309T>G	TT	3/30,0%	26/49,1%	0,522
	TG	5/50,0%	18/34,0%	
	GG	2/20,0%	9/17,0%	

Tabla A216. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados. Menores de 40 años.

	Genotipo	CMF->3 (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
rs2981582	CC	4/40,0%	18/34,0	0,934

rs13281615	CT	4/40,0%	23/43,4%	0,108
	TT	2/20,0%	12/22,6%	
	AA	1/10,0%	21/39,6%	
	AG	4/40,0%	20/37,7%	
	GG	5/50,0%	12/22,6%	
rs2910164	CC	5/50,0%	28/52,8%	0,875
	CG	4/40,0%	22/41,5%	
	GG	1/10,0%	3/5,7%	

Tabla A217. Distribución de los genotipos de los polimorfismos c.3232A>G, c.3667A>G y c.2731C>T del gen BRCA1 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados. Mayores de 40 años.

	Genotipo	CMF->3 (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
c.3232A>G	AA	18/46,2%	28/47,5%	0,459
	AG	18/46,2%	22/37,3%	
	GG	3/7,7%	9/15,3%	
c.3667A>G	AA	17/43,6%	27/45,8%	0,225
	AG	20/51,3%	23/39,0%	
	GG	2/5,1%	9/15,3%	
c.2731C>T	CC	14/35,9%	25/42,4%	0,524
	CT	19/48,7%	22/37,3%	
	TT	6/15,4%	12/20,3%	

Tabla A218. Distribución de los genotipos de los polimorfismos p.Arg72Pro del gen TP53 y c.-309T>G del gen MDM2 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados. Mayores de 40 años (p.Arg72Pro del gen TP53 incluido en el apartado Resultados, Tabla .

	Genotipo	CMF->3 (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
c.-309T>G	TT	16/41,0%	24/40,7%	0,987
	TG	18/46,2%	28/47,5%	

GG	5/12,8%	7/11,9%
-----------	---------	---------

Tabla A219. Distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen FGFR2, rs13281615 de la región cromosómica 8q24 y rs2910164 del gen miR146 en pacientes con cáncer de mama no portadores de mutación en los genes BRCA1/2 en función del número de familiares afectados. Mayores de 40 años.

	Genotipo	CMF->3 (N/%)	CMF-<3 (N/%)	p
rs2981582	CC	13/33,3%	11/18,6%	0,168
	CT	17/43,6%	26/44,1%	
	TT	9/23,1%	22/37,3%	
rs13281615	AA	12/30,8%	21/35,6%	0,437
	AG	22/56,4%	26/44,1%	
	GG	5/12,8%	12/20,3%	
rs2910164	CC	13/33,3%	34/57,6%	0,059
	CG	21/53,8%	21/35,6%	
	GG	5/12,8%	4/6,8%	

BIBLIOGRAFÍA

1. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 1996;347:1713-27.
2. 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;358:1389-99.
3. CHEK2*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. *American journal of human genetics* 2004;74:1175-82.
4. Abbasi R, Ramroth H, Becher H, Dietz A, Schmezer P, Popanda O. Laryngeal cancer risk associated with smoking and alcohol consumption is modified by genetic polymorphisms in ERCC5, ERCC6 and RAD23B but not by polymorphisms in five other nucleotide excision repair genes. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2009;125:1431-9.
5. Agata S, Dalla Palma M, Callegaro M, et al. Large genomic deletions inactivate the BRCA2 gene in breast cancer families. *Journal of medical genetics* 2005;42:e64.
6. Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 2008;28:5082-92.
7. Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene* 2006;25:5906-11.
8. Akbari MR, Tonin P, Foulkes WD, Ghadirian P, Tischkowitz M, Narod SA. RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer patients. *Breast cancer research : BCR* 2010;12:404.
9. Alimonti A, Carracedo A, Clohessy JG, et al. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nature genetics* 2010;42:454-8.
10. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *International journal of epidemiology* 2005;34:405-12.
11. Alvarez-Breckenridge CA, Waite KA, Eng C. PTEN regulates phospholipase D and phospholipase C. *Human molecular genetics* 2007;16:1157-63.
12. Ameziane N, van den Ouweland AM, Adank MA, et al. Lack of large genomic deletions in BRIP1, PALB2, and FANCD2 genes in BRCA1/2 negative familial breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2009;118:651-3.
13. Anderson BO, Yip CH, Ramsey SD, et al. Breast cancer in limited-resource countries: health care systems and public policy. *The breast journal* 2006;12 Suppl 1:S54-69.
14. Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & development* 2004;18:1958-63.
15. Antoniou A, Pharoah PD, 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. *American journal of human genetics* 2003;72:1117-30.
16. Antoniou AC, Chenevix-Trench G. Common genetic variants and cancer risk in Mendelian cancer syndromes. *Current opinion in genetics & development* 2010;20:299-307.
17. Antoniou AC, Cunningham AP, Peto J, et al. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: updates and extensions. *British journal of cancer* 2008;98:1457-66.

18. Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 2006;25:5898-905.
19. Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, et al. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *British journal of cancer* 2002;86:76-83.
20. Antoniou AC, Sinilnikova OM, McGuffog L, et al. Common variants in LSP1, 2q35 and 8q24 and breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Human molecular genetics* 2009;18:4442-56.
21. Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, et al. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *American journal of human genetics* 2008;82:937-48.
22. Armes JE, Trute L, White D, et al. Distinct molecular pathogeneses of early-onset breast cancers in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a population-based study. *Cancer research* 1999;59:2011-7.
23. Arva NC, Gopen TR, Talbott KE, et al. A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-Mdm2 complex occurs in mdm2 SNP309 homozygous cells. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:26776-87.
24. Autier P, Boniol M, La Vecchia C, et al. Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database. *BMJ* 2010;341:c3620.
25. Ayi TC, Tsan JT, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R. Conservation of function and primary structure in the BRCA1-associated RING domain (BARD1) protein. *Oncogene* 1998;17:2143-8.
26. Aylon Y, Oren M. Living with p53, dying of p53. *Cell* 2007;130:597-600.
27. Baan R, Straif K, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *The lancet oncology* 2007;8:292-3.
28. Badie S, Liao C, Thanasoula M, Barber P, Hill MA, Tarsounas M. RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylation. *The Journal of cell biology* 2009;185:587-600.
29. Baer R, Ludwig T. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Current opinion in genetics & development* 2002;12:86-91.
30. Bandiera S, Hatem E, Lyonnet S, Henrion-Caude A. microRNAs in diseases: from candidate to modifier genes. *Clinical genetics* 2010;77:306-13.
31. Bartek J, Falck J, Lukas J. CHK2 kinase--a busy messenger. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001;2:877-86.
32. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell* 2003;3:421-9.
33. Basham VM, Lipscombe JM, Ward JM, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2002;4:R2.
34. Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer research* 1994;54:3845-52.
35. Begg CB, Haile RW, Borg A, et al. Variation of breast cancer risk among BRCA1/2 carriers. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2008;299:194-201.
36. Bell DW, Kim SH, Godwin AK, et al. Genetic and functional analysis of CHEK2 (CHK2) variants in multiethnic cohorts. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2007;121:2661-7.

37. Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999;286:2528-31.
38. Berkey CS, Frazier AL, Gardner JD, Colditz GA. Adolescence and breast carcinoma risk. *Cancer* 1999;85:2400-9.
39. Bernstein L, Teal CR, Joslyn S, Wilson J. Ethnicity-related variation in breast cancer risk factors. *Cancer* 2003;97:222-9.
40. Bertucci F, Lagarde A, Ferrari A, et al. 8q24 Cancer risk allele associated with major metastatic risk in inflammatory breast cancer. *PLoS one* 2012;7:e37943.
41. Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, et al. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* 1996;13:1919-25.
42. Biglia N, Defabiani E, Ponzzone R, Mariani L, Marengo D, Sismondi P. Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocrine-related cancer* 2004;11:69-83.
43. Bjergbaek L, Cobb JA, Tsai-Pflugfelder M, Gasser SM. Mechanistically distinct roles for Sgs1p in checkpoint activation and replication fork maintenance. *The EMBO journal* 2005;24:405-17.
44. Boardman LA, Thibodeau SN, Schaid DJ, et al. Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Annals of internal medicine* 1998;128:896-9.
45. Boersma BJ, Howe TM, Goodman JE, et al. Association of breast cancer outcome with status of p53 and MDM2 SNP309. *Journal of the National Cancer Institute* 2006;98:911-9.
46. Bogdanova N, Cybulski C, Bermisheva M, et al. A nonsense mutation (E1978X) in the ATM gene is associated with breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2009;118:207-11.
47. Bogdanova N, Feshchenko S, Cybulski C, Dork T. CHEK2 mutation and hereditary breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:e26.
48. Bogdanova N, Feshchenko S, Schurmann P, et al. Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2008;122:802-6.
49. Bonafe M, Ceccarelli C, Farabegoli F, et al. Retention of the p53 codon 72 arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003;9:4860-4.
50. Bond GL, Hirshfield KM, Kirchhoff T, et al. MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer research* 2006;66:5104-10.
51. Bond GL, Hu W, Bond EE, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 2004;119:591-602.
52. Bond GL, Hu W, Levine AJ. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Current cancer drug targets* 2005;5:3-8.
53. Borresen AL, Andersen TI, Garber J, et al. Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer research* 1992;52:3234-6.
54. Bougeard G, Baert-Desurmont S, Tournier I, et al. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *Journal of medical genetics* 2006;43:531-3.

55. Boyd NF, Byng JW, Jong RA, et al. Quantitative classification of mammographic densities and breast cancer risk: results from the Canadian National Breast Screening Study. *Journal of the National Cancer Institute* 1995;87:670-5.
56. Boyd NF, Dite GS, Stone J, et al. Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *The New England journal of medicine* 2002;347:886-94.
57. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *The New England journal of medicine* 2007;356:227-36.
58. Bradbury AR, Olopade OI. Genetic susceptibility to breast cancer. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2007;8:255-67.
59. Breivik J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Seminars in cancer biology* 2005;15:51-60.
60. Brinton L, Hoover R, Haile R. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. *Journal of the National Cancer Institute* 1995;87:8.
61. Brookman KW, Lamerdin JE, Thelen MP, et al. ERCC4 (XPF) encodes a human nucleotide excision repair protein with eukaryotic recombination homologs. *Molecular and cellular biology* 1996;16:6553-62.
62. Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *Journal of medical genetics* 2004;41:508-17.
63. Brunet J, Gutierrez-Enriquez S, Torres A, et al. ATM germline mutations in Spanish early-onset breast cancer patients negative for BRCA1/BRCA2 mutations. *Clinical genetics* 2008;73:465-73.
64. Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *British journal of cancer* 2004;91:1155-9.
65. Butt S, Harlid S, Borgquist S, et al. Genetic predisposition, parity, age at first childbirth and risk for breast cancer. *BMC research notes* 2012;5:414.
66. Byrne C, Schairer C, Brinton LA, et al. Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). *Cancer causes & control : CCC* 2001;12:103-10.
67. Byrnes GB, Southey MC, Hopper JL. Are the so-called low penetrance breast cancer genes, ATM, BRIP1, PALB2 and CHEK2, high risk for women with strong family histories? *Breast cancer research : BCR* 2008;10:208.
68. Campa D, Kaaks R, Le Marchand L, et al. Interactions between genetic variants and breast cancer risk factors in the breast and prostate cancer cohort consortium. *Journal of the National Cancer Institute* 2011;103:1252-63.
69. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Human genetics* 2008;124:31-42.
70. Canfell K, Banks E, Moa AM, Beral V. Decrease in breast cancer incidence following a rapid fall in use of hormone replacement therapy in Australia. *The Medical journal of Australia* 2008;188:641-4.
71. Cantor S, Drapkin R, Zhang F, et al. The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:2357-62.
72. Cantor SB, Andreassen PR. Assessing the link between BACH1 and BRCA1 in the FA pathway. *Cell Cycle* 2006;5:164-7.

73. Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 2001;105:149-60.
74. Cantor SB, Guillemette S. Hereditary breast cancer and the BRCA1-associated FANCD1/BACH1/BRIP1. *Future Oncol* 2011;7:253-61.
75. Cao AY, Huang J, Hu Z, et al. The prevalence of PALB2 germline mutations in BRCA1/BRCA2 negative Chinese women with early onset breast cancer or affected relatives. *Breast cancer research and treatment* 2009;114:457-62.
76. Cao AY, Huang J, Hu Z, et al. Mutation analysis of BRIP1/BACH1 in BRCA1/BRCA2 negative Chinese women with early onset breast cancer or affected relatives. *Breast cancer research and treatment* 2009;115:51-5.
77. Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nature reviews Genetics* 2001;2:91-9.
78. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007;13:2329-34.
79. Carlomagno F, Chang-Claude J, Dunning AM, Ponder BA. Determination of the frequency of the common 657Del5 Nijmegen breakage syndrome mutation in the German population: no association with risk of breast cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 1999;25:393-5.
80. Carroll BT, Couch FJ, Rebbeck TR, Weber BL. Polymorphisms in PTEN in breast cancer families. *Journal of medical genetics* 1999;36:94-6.
81. Casadei S, Norquist BM, Walsh T, et al. Contribution of inherited mutations in the BRCA2-interacting protein PALB2 to familial breast cancer. *Cancer research* 2011;71:2222-9.
82. Casilli F, Tournier I, Sinilnikova OM, et al. The contribution of germline rearrangements to the spectrum of BRCA2 mutations. *Journal of medical genetics* 2006;43:e49.
83. Catucci I, Yang R, Verderio P, et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Human mutation* 2010;31:E1052-7.
84. Chan JK, Wong CS. Loss of E-cadherin is the fundamental defect in diffuse-type gastric carcinoma and infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Advances in anatomic pathology* 2001;8:165-72.
85. Chang LC, Sheu HM, Huang YS, Kuo KW. Quantitative determination of the expression of xeroderma pigmentosum F gene in human nonmelanoma skin cancers. *Biochemical and biophysical research communications* 2000;273:454-8.
86. Chen J, Lindblom P, Lindblom A. A study of the PTEN/MMAC1 gene in 136 breast cancer families. *Human genetics* 1998;102:124-5.
87. Chen J, Silver DP, Walpita D, et al. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Molecular cell* 1998;2:317-28.
88. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2002;7:313-9.
89. Chen S, Iversen ES, Friebel T, et al. Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006;24:863-71.
90. Chen T, Carter D, Garrigue-Antar L, Reiss M. Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer research* 1998;58:4805-10.

91. Cheng H, Ma B, Jiang R, et al. Individual and combined effects of MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro on breast cancer risk: an updated meta-analysis. *Molecular biology reports* 2012;39:9265-74.
92. Chompret A, Brugieres L, Ronsin M, et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *British journal of cancer* 2000;82:1932-7.
93. Chow LM, Baker SJ. PTEN function in normal and neoplastic growth. *Cancer letters* 2006;241:184-96.
94. Chrzanowska KH, Gregorek H, Dembowska-Baginska B, Kalina MA, Digweed M. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet journal of rare diseases* 2012;7:13.
95. Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 2002;419:395-9.
96. Clark HF, Gurney AL, Abaya E, et al. The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment. *Genome research* 2003;13:2265-70.
97. Cobb JA, Bjergbaek L, Shimada K, Frei C, Gasser SM. DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *The EMBO journal* 2003;22:4325-36.
98. Collis SJ, Barber LJ, Clark AJ, Martin JS, Ward JD, Boulton SJ. HCLK2 is essential for the mammalian S-phase checkpoint and impacts on Chk1 stability. *Nature cell biology* 2007;9:391-401.
99. Comen E, Davids M, Kirchhoff T, Hudis C, Offit K, Robson M. Relative contributions of BRCA1 and BRCA2 mutations to "triple-negative" breast cancer in Ashkenazi Women. *Breast cancer research and treatment* 2011;129:185-90.
100. Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M, et al. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nature genetics* 2007;39:352-8.
101. Cox C. Patient flow: a staff nurse's perspective. *Rn* 2007;70:40-2.
102. Cox DG, Kraft P, Hankinson SE, Hunter DJ. Haplotype analysis of common variants in the BRCA1 gene and risk of sporadic breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2005;7:R171-5.
103. Cox DG, Simard J, Sinnett D, et al. Common variants of the BRCA1 wild-type allele modify the risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers. *Human molecular genetics* 2011;20:4732-47.
104. Crew KD, Gammon MD, Terry MB, et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, and breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2007;16:2033-41.
105. Cronin KA, Ravdin PM, Edwards BK. Sustained lower rates of breast cancer in the United States. *Breast cancer research and treatment* 2009;117:223-4.
106. Dansonka-Mieszkowska A, Kluska A, Moes J, et al. A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients. *BMC medical genetics* 2010;11:20.
107. de Bock GH, Schutte M, Krol-Warmerdam EM, et al. Tumour characteristics and prognosis of breast cancer patients carrying the germline CHEK2*1100delC variant. *Journal of medical genetics* 2004;41:731-5.
108. De Brakeleer S, De Greve J, Loris R, et al. Cancer predisposing *missense* and protein truncating BARD1 mutations in non-BRCA1 or BRCA2 breast cancer families. *Human mutation* 2010;31:E1175-85.

109. de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *Journal of medical genetics* 2002;39:225-42.
110. de la Hoya M, Gutierrez-Enriquez S, Velasco E, et al. Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Clinical chemistry* 2006;52:1480-5.
111. De Nicolo A, Tancredi M, Lombardi G, et al. A novel breast cancer-associated BRIP1 (FANCI/BACH1) germ-line mutation impairs protein stability and function. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14:4672-80.
112. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism* 2008;7:11-20.
113. del Valle J, Feliubadalo L, Nadal M, et al. Identification and comprehensive characterization of large genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast cancer research and treatment* 2010;122:733-43.
114. Dionne CA, Crumley G, Bellot F, et al. Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *The EMBO journal* 1990;9:2685-92.
115. Doherty JA, Weiss NS, Fish S, et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and endometrial cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2011;20:1873-82.
116. Dong Y, Hakimi MA, Chen X, et al. Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair. *Molecular cell* 2003;12:1087-99.
117. Dosanjh MK, Collins DW, Fan W, et al. Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic acids research* 1998;26:1179-84.
118. Dumay A, Feugeas JP, Wittmer E, et al. Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2013;132:1227-31.
119. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *Journal of cellular and molecular medicine* 2005;9:208-21.
120. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature genetics* 2003;33:357-65.
121. Dunning AM, Chiano M, Smith NR, et al. Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Human molecular genetics* 1997;6:285-9.
122. Dunning AM, Ellis PD, McBride S, et al. A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer research* 2003;63:2610-5.
123. Durocher F, Shattuck-Eidens D, McClure M, et al. Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or *missense* mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. *Human molecular genetics* 1996;5:835-42.
124. Easton DF. Cancer risks in A-T heterozygotes. *International journal of radiation biology* 1994;66:S177-82.
125. Easton DF. How many more breast cancer predisposition genes are there? *Breast cancer research : BCR* 1999;1:14-7.

126. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 2007;447:1087-93.
127. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* 2010;116:544-73.
128. Eisinger F, Jacquemier J, Charpin C, et al. Mutations at BRCA1: the medullary breast carcinoma revisited. *Cancer research* 1998;58:1588-92.
129. Eng C. Genetics of Cowden syndrome: through the looking glass of oncology. *International journal of oncology* 1998;12:701-10.
130. Engels IH, Totzke G, Fischer U, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. Caspase-10 sensitizes breast carcinoma cells to TRAIL-induced but not tumor necrosis factor-induced apoptosis in a caspase-3-dependent manner. *Molecular and cellular biology* 2005;25:2808-18.
131. Erkko H, Xia B, Nikkila J, et al. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature* 2007;446:316-9.
132. Evans DG, Birch JM, Thorneycroft M, McGown G, Lalloo F, Varley JM. Low rate of TP53 germline mutations in breast cancer/sarcoma families not fulfilling classical criteria for Li-Fraumeni syndrome. *Journal of medical genetics* 2002;39:941-4.
133. Evans DG, Shenton A, Woodward E, Lalloo F, Howell A, Maher ER. Penetrance estimates for BRCA1 and BRCA2 based on genetic testing in a Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family. *BMC cancer* 2008;8:155.
134. Evans DG, Susnerwala I, Dawson J, Woodward E, Maher ER, Lalloo F. Risk of breast cancer in male BRCA2 carriers. *Journal of medical genetics* 2010;47:710-1.
135. Fackenthal JD, Marsh DJ, Richardson AL, et al. Male breast cancer in Cowden syndrome patients with germline PTEN mutations. *Journal of medical genetics* 2001;38:159-64.
136. Fan F, Liu C, Tavare S, Arnheim N. Polymorphisms in the human DNA repair gene XPF. *Mutation research* 1999;406:115-20.
137. Fanconi G. Familiaere infantile pernizioosaartige Anaemie (pernizioeses Blutbild and konstitution). *Jahrbuch Kinderheild* 1927;117:24.
138. Feilotter HE, Coulon V, McVeigh JL, et al. Analysis of the 10q23 chromosomal region and the PTEN gene in human sporadic breast carcinoma. *British journal of cancer* 1999;79:718-23.
139. Feng L, Huang J, Chen J. MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair. *Genes & development* 2009;23:719-28.
140. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2010;127:2893-917.
141. Fletcher O, Johnson N, dos Santos Silva I, et al. Missense variants in ATM in 26,101 breast cancer cases and 29,842 controls. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2010;19:2143-51.
142. Ford D, Easton DF. The genetics of breast and ovarian cancer. *British journal of cancer* 1995;72:805-12.
143. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet* 1994;343:692-5.

144. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *American journal of human genetics* 1998;62:676-89.
145. Foulkes WD, Ghadirian P, Akbari MR, et al. Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast cancer research : BCR* 2007;9:R83.
146. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2003;95:1482-5.
147. Fox D, 3rd, Le Trong I, Rajagopal P, Brzovic PS, Stenkamp RE, Klevit RE. Crystal structure of the BARD1 ankyrin repeat domain and its functional consequences. *The Journal of biological chemistry* 2008;283:21179-86.
148. Frank B, Bermejo JL, Hemminki K, et al. Re: Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;97:1012; author reply -3.
149. Frank B, Hemminki K, Meindl A, et al. BRIP1 (BACH1) variants and familial breast cancer risk: a case-control study. *BMC cancer* 2007;7:83.
150. Frank B, Hemminki K, Wappenschmidt B, et al. Association of the CASP10 V410I variant with reduced familial breast cancer risk and interaction with the CASP8 D302H variant. *Carcinogenesis* 2006;27:606-9.
151. Freedman ML, Penney KL, Stram DO, et al. A haplotype-based case-control study of BRCA1 and sporadic breast cancer risk. *Cancer research* 2005;65:7516-22.
152. French CA, Tambini CE, Thacker J. Identification of functional domains in the RAD51L2 (RAD51C) protein and its requirement for gene conversion. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:45445-50.
153. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nature genetics* 1994;8:399-404.
154. Frosk P, Burgess S, Dyck T, Jobse R, Spriggs EL. The use of ancestral haplotypes in the molecular diagnosis of familial breast cancer. *Genetic testing* 2007;11:208-15.
155. Fu F, Wang C, Huang M, Song C, Lin S, Huang H. Polymorphisms in second intron of the FGFR2 gene are associated with the risk of early-onset breast cancer in Chinese Han women. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2012;226:221-9.
156. Garber JE, Goldstein AM, Kantor AF, Dreyfus MG, Fraumeni JF, Jr., Li FP. Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer research* 1991;51:6094-7.
157. Garcia AI, Buisson M, Bertrand P, et al. Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO molecular medicine* 2011;3:279-90.
158. Garcia AI, Cox DG, Barjhoux L, et al. The rs2910164:G>C SNP in the MIR146A gene is not associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Human mutation* 2011;32:1004-7.
159. Garcia MJ, Fernandez V, Osorio A, et al. Analysis of FANCB and FANCN/PALB2 fanconi anemia genes in BRCA1/2-negative Spanish breast cancer families. *Breast cancer research and treatment* 2009;113:545-51.
160. Garcia-Casado Z, Romero I, Fernandez-Serra A, et al. A de novo complete BRCA1 gene deletion identified in a Spanish woman with early bilateral breast cancer. *BMC medical genetics* 2011;12:134.

161. Garcia-Closas M, Egan KM, Newcomb PA, et al. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland, and meta-analyses. *Human genetics* 2006;119:376-88.
162. Garcia-Closas M, Hall P, Nevanlinna H, et al. Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and pathological characteristics. *PLoS genetics* 2008;4:e1000054.
163. Garcia-Closas M, Malats N, Real FX, et al. Genetic variation in the nucleotide excision repair pathway and bladder cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2006;15:536-42.
164. Garfinkel L, Boring CC, Heath CW, Jr. Changing trends. An overview of breast cancer incidence and mortality. *Cancer* 1994;74:222-7.
165. Gautier F, Irminger-Finger I, Gregoire M, Meflah K, Harb J. Identification of an apoptotic cleavage product of BARD1 as an autoantigen: a potential factor in the antitumoral response mediated by apoptotic bodies. *Cancer research* 2000;60:6895-900.
166. Ghimenti C, Sensi E, Presciuttini S, et al. Germline mutations of the BRCA1-associated ring domain (BARD1) gene in breast and breast/ovarian families negative for BRCA1 and BRCA2 alterations. *Genes, chromosomes & cancer* 2002;33:235-42.
167. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000;119:1447-53.
168. Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, et al. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *The New England journal of medicine* 1987;316:1511-4.
169. Glover JN, Williams RS, Lee MS. Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *Trends in biochemical sciences* 2004;29:579-85.
170. Guberghen DC, Wilson C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Human molecular genetics* 2003;12 Spec No 2:R239-48.
171. Godthelp BC, Wiegant WW, Waisfisz Q, et al. Inducibility of nuclear Rad51 foci after DNA damage distinguishes all Fanconi anemia complementation groups from D1/BRCA2. *Mutation research* 2006;594:39-48.
172. Gold B, Kirchoff T, Stefanov S, et al. Genome-wide association study provides evidence for a breast cancer risk locus at 6q22.33. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:4340-5.
173. Goldgar DE, Healey S, Dowty JG, et al. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2011;13:R73.
174. Goringe KL, Choong DY, Visvader JE, Lindeman GJ, Campbell IG. BARD1 variants are not associated with breast cancer risk in Australian familial breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2008;111:505-9.
175. Gorski B, Debniak T, Masojc B, et al. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003;106:379-81.
176. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *The EMBO journal* 2002;21:1743-53.
177. 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:e55681.

178. Graziano F, Humar B, Guilford P. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2003;14:1705-13.
179. Greenberg RA, Sobhian B, Pathania S, Cantor SB, Nakatani Y, Livingston DM. Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes & development* 2006;20:34-46.
180. Grenet J, Teitz T, Wei T, Valentine V, Kidd VJ. Structure and chromosome localization of the human CASP8 gene. *Gene* 1999;226:225-32.
181. Guenard F, Labrie Y, Ouellette G, et al. Germline mutations in the breast cancer susceptibility gene PTEN are rare in high-risk non-BRCA1/2 French Canadian breast cancer families. *Familial cancer* 2007;6:483-90.
182. Guo H, Wang K, Xiong G, et al. A functional variant in microRNA-146a is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han. *Familial cancer* 2010;9:599-603.
183. Gutierrez-Enriquez S, de la Hoya M, Martinez-Bouzas C, et al. Screening for large rearrangements of the BRCA2 gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Breast cancer research and treatment* 2007;103:103-7.
184. Guy CP, Bolt EL. Archaeal Hel308 helicase targets replication forks in vivo and in vitro and unwinds lagging strands. *Nucleic acids research* 2005;33:3678-90.
185. Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990;250:1684-9.
186. Han J, Haiman C, Niu T, et al. Genetic variation in DNA repair pathway genes and premenopausal breast cancer risk. *Breast cancer research and treatment* 2009;115:613-22.
187. Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast cancer research : BCR* 2004;6:213-8.
188. Hansen T, Jonson L, Albrechtsen A, Andersen MK, Ejlersen B, Nielsen FC. Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. *Breast cancer research and treatment* 2009;115:315-23.
189. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005;24:2899-908.
190. He M, Di GH, Cao AY, et al. RAD50 and NBS1 are not likely to be susceptibility genes in Chinese non-BRCA1/2 hereditary breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2012;133:111-6.
191. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:3209-15.
192. Heikkinen K, Karppinen SM, Soini Y, Makinen M, Winqvist R. Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility. *Journal of medical genetics* 2003;40:e131.
193. Heikkinen K, Rapakko K, Karppinen SM, et al. RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. *Carcinogenesis* 2006;27:1593-9.
194. Hellebrand H, Sutter C, Honisch E, et al. Germline mutations in the PALB2 gene are population specific and occur with low frequencies in familial breast cancer. *Human mutation* 2011;32:E2176-88.
195. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998;391:184-7.

196. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
197. Hill TD, Khamis HJ, Tyczynski JE, Berkel HJ. Comparison of male and female breast cancer incidence trends, tumor characteristics, and survival. *Annals of epidemiology* 2005;15:773-80.
198. Hishida A, Iwata H, Hamajima N, et al. Transforming growth factor B1 T29C polymorphism and breast cancer risk in Japanese women. *Breast Cancer* 2003;10:63-9.
199. Ho GP, Margossian S, Taniguchi T, D'Andrea AD. Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Molecular and cellular biology* 2006;26:7005-15.
200. Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer research* 2003;63:1449-53.
201. Hollestelle A, Wasielewski M, Martens JW, Schutte M. Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes. *Current opinion in genetics & development* 2010;20:268-76.
202. Houssaint E, Blanquet PR, Champion-Arnaud P, et al. Related fibroblast growth factor receptor genes exist in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87:8180-4.
203. Howlett NG. Fanconi anemia: Fanconi anemia, breast and embryonal cancer risk revisited. *European journal of human genetics : EJHG* 2007;15:715-7.
204. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 2002;297:606-9.
205. Huang WY, Berndt SI, Kang D, et al. Nucleotide excision repair gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma: XPC polymorphisms modify smoking-related risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2006;15:306-11.
206. Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, et al. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1997;278:1407-11.
207. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001;38:103-13; discussion 13-6.
208. Hung RJ, Christiani DC, Risch A, et al. International Lung Cancer Consortium: pooled analysis of sequence variants in DNA repair and cell cycle pathways. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2008;17:3081-9.
209. Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nature genetics* 2007;39:870-4.
210. Huo X, Hu Z, Zhai X, et al. Common non-synonymous polymorphisms in the BRCA1 Associated RING Domain (BARD1) gene are associated with breast cancer susceptibility: a case-control analysis. *Breast cancer research and treatment* 2007;102:329-37.
211. Huo X, Lu C, Huang X, et al. Polymorphisms in BRCA1, BRCA1-interacting genes and susceptibility of breast cancer in Chinese women. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2009;135:1569-75.
212. Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer research* 1998;58:4023-37.

213. Iau PT, Marafie M, Ali A, et al. Are medullary breast cancers an indication for BRCA1 mutation screening? A mutation analysis of 42 cases of medullary breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2004;85:81-8.
214. Irminger-Finger I, Leung WC. BRCA1-dependent and independent functions of BARD1. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2002;34:582-7.
215. Irminger-Finger I, Leung WC, Li J, et al. Identification of BARD1 as mediator between proapoptotic stress and p53-dependent apoptosis. *Molecular cell* 2001;8:1255-66.
216. Irminger-Finger I, Siegel BD, Leung WC. The functions of breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) product and its associated proteins. *Biological chemistry* 1999;380:117-28.
217. Irminger-Finger I, Soriano JV, Vaudan G, Montesano R, Sappino AP. In vitro repression of Brca1-associated RING domain gene, Bard1, induces phenotypic changes in mammary epithelial cells. *The Journal of cell biology* 1998;143:1329-39.
218. Ishitobi M, Miyoshi Y, Hasegawa S, et al. Mutational analysis of BARD1 in familial breast cancer patients in Japan. *Cancer letters* 2003;200:1-7.
219. Jakubowska A, Jaworska K, Cybulski C, et al. Do BRCA1 modifiers also affect the risk of breast cancer in non-carriers? *Eur J Cancer* 2009;45:837-42.
220. Janda E, Lehmann K, Killisch I, et al. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *The Journal of cell biology* 2002;156:299-313.
221. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:7269-74.
222. Jefford CE, Feki A, Harb J, Krause KH, Irminger-Finger I. Nuclear-cytoplasmic translocation of BARD1 is linked to its apoptotic activity. *Oncogene* 2004;23:3509-20.
223. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011;61:69-90.
224. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2010;19:1893-907.
225. Jin Q, Hemminki K, Grzybowska E, et al. Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2004;112:94-9.
226. Jin S, Levine AJ. The p53 functional circuit. *Journal of cell science* 2001;114:4139-40.
227. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nature reviews Genetics* 2001;2:446-57.
228. Johnson N, Fletcher O, Naceur-Lombardelli C, dos Santos Silva I, Ashworth A, Peto J. Interaction between CHEK2*1100delC and other low-penetrance breast-cancer susceptibility genes: a familial study. *Lancet* 2005;366:1554-7.
229. Jorgensen TJ, Visvanathan K, Ruczinski I, Thuita L, Hoffman S, Helzlsouer KJ. Breast cancer risk is not associated with polymorphic forms of xeroderma pigmentosum genes in a cohort of women from Washington County, Maryland. *Breast cancer research and treatment* 2007;101:65-71.
230. Kaklamani VG, Baddi L, Liu J, et al. Combined genetic assessment of transforming growth factor-beta signaling pathway variants may predict breast cancer risk. *Cancer research* 2005;65:3454-61.

231. Karppinen SM, Heikkinen K, Rapakko K, Winqvist R. Mutation screening of the BARD1 gene: evidence for involvement of the Cys557Ser allele in hereditary susceptibility to breast cancer. *Journal of medical genetics* 2004;41:e114.
232. Karppinen SM, Vuosku J, Heikkinen K, Allinen M, Winqvist R. No evidence of involvement of germline BACH1 mutations in Finnish breast and ovarian cancer families. *Eur J Cancer* 2003;39:366-71.
233. Kaurah P, MacMillan A, Boyd N, et al. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2007;297:2360-72.
234. Kee Y, D'Andrea AD. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes & development* 2010;24:1680-94.
235. Keller G, Vogelsang H, Becker I, et al. Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *The American journal of pathology* 1999;155:337-42.
236. Kelsey JL, Horn-Ross PL. Breast cancer: magnitude of the problem and descriptive epidemiology. *Epidemiologic reviews* 1993;15:7-16.
237. Key J, Hodgson S, Omar RZ, et al. Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. *Cancer causes & control : CCC* 2006;17:759-70.
238. Khalil AM, Gagaa MH, Alshamali AM. 8-Oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker of DNA damage by mobile phone radiation. *Human & experimental toxicology* 2012;31:734-40.
239. Kilpivaara O, Alhopuro P, Vahteristo P, Aaltonen LA, Nevanlinna H. CHEK2 I157T associates with familial and sporadic colorectal cancer. *Journal of medical genetics* 2006;43:e34.
240. Kim H, Chen J, Yu X. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science* 2007;316:1202-5.
241. Kim H, Huang J, Chen J. CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response. *Nature structural & molecular biology* 2007;14:710-5.
242. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. *Gatekeepers and caretakers. Nature* 1997;386:761, 3.
243. Koberle B, Ditz C, Kausch I, Wollenberg B, Ferris RL, Albers AE. Metastases of squamous cell carcinoma of the head and neck show increased levels of nucleotide excision repair protein XPF in vivo that correlate with increased chemoresistance ex vivo. *International journal of oncology* 2010;36:1277-84.
244. Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Archives of dermatology* 1994;130:1018-21.
245. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, et al. The L10P polymorphism of the transforming growth factor-beta 1 gene is not associated with breast cancer risk. *Cancer letters* 2003;201:181-4.
246. Kushi LH, Byers T, Doyle C, et al. American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: a cancer journal for clinicians* 2006;56:254-81; quiz 313-4.
247. Lagerros YT, Hsieh SF, Hsieh CC. Physical activity in adolescence and young adulthood and breast cancer risk: a quantitative review. *Eur J Cancer Prev* 2004;13:5-12.

248. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *International journal of cancer Journal international du cancer* 2004;111:762-71.
249. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:5175-80.
250. Lalloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clinical genetics* 2012;82:105-14.
251. Landi D, Gemignani F, Barale R, Landi S. A catalog of polymorphisms falling in microRNA-binding regions of cancer genes. *DNA and cell biology* 2008;27:35-43.
252. Langer R, Specht K, Becker K, et al. [Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in Barrett's carcinoma by quantitative gene expression analysis]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 2004;88:207-13.
253. Lavin MF. ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* 2007;26:7749-58.
254. Le Marchand L, Haiman CA, van den Berg D, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE. T29C polymorphism in the transforming growth factor beta1 gene and postmenopausal breast cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2004;13:412-5.
255. Lee E, McKean-Cowdin R, Ma H, et al. Evaluation of unclassified variants in the breast cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2 using five methods: results from a population-based study of young breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR* 2008;10:R19.
256. Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 2000;404:201-4.
257. Lee KM, Park SK, Hamajima N, et al. Genetic polymorphisms of TGF-beta1 & TNF-beta and breast cancer risk. *Breast cancer research and treatment* 2005;90:149-55.
258. Lee SA, Lee KM, Park WY, et al. Obesity and genetic polymorphism of ERCC2 and ERCC4 as modifiers of risk of breast cancer. *Experimental & molecular medicine* 2005;37:86-90.
259. Lehmann AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 2003;85:1101-11.
260. Lehmann K, Janda E, Pierreux CE, et al. Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes & development* 2000;14:2610-22.
261. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.
262. Levitus M, Joenje H, de Winter JP. The Fanconi anemia pathway of genomic maintenance. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* 2006;28:3-29.
263. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, et al. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nature genetics* 2005;37:934-5.
264. Levrán O, Attwooll C, Henry RT, et al. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nature genetics* 2005;37:931-3.
265. Levy-Lahad E. Fanconi anemia and breast cancer susceptibility meet again. *Nature genetics* 2010;42:368-9.

266. Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, et al. A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:3232-6.
267. Lewis AG, Flanagan J, Marsh A, et al. Mutation analysis of FANCD2, BRIP1/BACH1, LMO4 and SFN in familial breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2005;7:R1005-16.
268. Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997;275:1943-7.
269. Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature genetics* 1997;16:64-7.
270. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England journal of medicine* 2000;343:78-85.
271. Lim W, Hearle N, Shah B, et al. Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. *British journal of cancer* 2003;89:308-13.
272. Lim W, Olschwang S, Keller JJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. *Gastroenterology* 2004;126:1788-94.
273. Lindor NM, Greene MH. The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *Journal of the National Cancer Institute* 1998;90:1039-71.
274. Litman R, Peng M, Jin Z, et al. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCF. *Cancer cell* 2005;8:255-65.
275. Liu C, Zhou S, Begum S, et al. Increased expression and activity of repair genes TDP1 and XPF in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007;55:303-11.
276. Liu P, Siciliano J, White B, et al. Regional mapping of human DNA excision repair gene ERCC4 to chromosome 16p13.13-p13.2. *Mutagenesis* 1993;8:199-205.
277. Liu Z, Wu J, Yu X. CCDC98 targets BRCA1 to DNA damage sites. *Nature structural & molecular biology* 2007;14:716-20.
278. Lucke CD, Philpott A, Metcalfe JC, et al. Inhibiting mutations in the transforming growth factor beta type 2 receptor in recurrent human breast cancer. *Cancer research* 2001;61:482-5.
279. Luo L, Lei H, Du Q, et al. No mutations in the BACH1 gene in BRCA1 and BRCA2 negative breast-cancer families linked to 17q22. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2002;98:638-9.
280. Machado PM, Brandao RD, Cavaco BM, et al. Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:2027-34.
281. MacPherson G, Healey CS, Teare MD, et al. Association of a common variant of the CASP8 gene with reduced risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96:1866-9.
282. Mallory SB. Cowden syndrome (multiple hamartoma syndrome). *Dermatologic clinics* 1995;13:27-31.
283. Manke IA, Lowery DM, Nguyen A, Yaffe MB. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science* 2003;302:636-9.
284. Marquis ST, Rajan JV, Wynshaw-Boris A, et al. The developmental pattern of Brcal expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nature genetics* 1995;11:17-26.

285. Martin LJ, Boyd NF. Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast cancer research : BCR* 2008;10:201.
286. Masciari S, Larsson N, Senz J, et al. Germline E-cadherin mutations in familial lobular breast cancer. *Journal of medical genetics* 2007;44:726-31.
287. Mastracci TL, Tjan S, Bane AL, O'Malley FP, Andrulis IL. E-cadherin alterations in atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ of the breast. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2005;18:741-51.
288. Mateju M, Kleiblova P, Kleibl Z, et al. Germline mutations 657del5 and 643C>T (R215W) in NBN are not likely to be associated with increased risk of breast cancer in Czech women. *Breast cancer research and treatment* 2012;133:809-11.
289. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Molecular and cellular biology* 1987;7:961-3.
290. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 2007;316:1160-6.
291. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 1998;282:1893-7.
292. Maurer MH, Hoffmann K, Sperling K, Varon R. High prevalence of the NBN gene mutation c.657-661del5 in Southeast Germany. *Journal of applied genetics* 2010;51:211-4.
293. Mayo LD, Donner DB. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends in biochemical sciences* 2002;27:462-7.
294. Mazoyer S. Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Human mutation* 2005;25:415-22.
295. McDonald ER, 3rd, El-Deiry WS. Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:6170-5.
296. McTiernan A, Rajan KB, Tworoger SS, et al. Adiposity and sex hormones in postmenopausal breast cancer survivors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003;21:1961-6.
297. McWilliams RR, Bamlet WR, Cunningham JM, et al. Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *Cancer research* 2008;68:4928-35.
298. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nature genetics* 2002;31:55-9.
299. Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, et al. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *American journal of human genetics* 2003;72:1308-14.
300. Meindl A. Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2002;97:472-80.
301. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature genetics* 2010;42:410-4.
302. Melhem-Bertrandt A, Bojadzieva J, Ready KJ, et al. Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. *Cancer* 2012;118:908-13.

303. Meza JE, Brzovic PS, King MC, Klevit RE. Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:5659-65.
304. Michael D, Oren M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in cancer biology* 2003;13:49-58.
305. 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.
306. Milhas D, Cuvillier O, Therville N, et al. Caspase-10 triggers Bid cleavage and caspase cascade activation in FasL-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:19836-42.
307. Millikan RC, Heard K, Winkel S, et al. No association between the MDM2 -309 T/G promoter polymorphism and breast cancer in African-Americans or Whites. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2006;15:175-7.
308. Milne RL, Antoniou AC. Genetic modifiers of cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011;22 Suppl 1:i11-7.
309. Milne RL, Gaudet MM, Spurdle AB, et al. Assessing interactions between the associations of common genetic susceptibility variants, reproductive history and body mass index with breast cancer risk in the breast cancer association consortium: a combined case-control study. *Breast cancer research : BCR* 2010;12:R110.
310. Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, et al. ERCC4 associated with breast cancer risk: a two-stage case-control study using high-throughput genotyping. *Cancer research* 2006;66:9420-7.
311. Miramar MD, Calvo MT, Rodriguez A, et al. Genetic analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast/ovarian cancer families from Aragon (Spain): two novel truncating mutations and a large genomic deletion in BRCA1. *Breast cancer research and treatment* 2008;112:353-8.
312. Moisan AM, Fortin J, Dumont M, et al. No Evidence of BRCA1/2 genomic rearrangements in high-risk French-Canadian breast/ovarian cancer families. *Genetic testing* 2006;10:104-15.
313. Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Molecular cancer research : MCR* 2003;1:1001-8.
314. Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Molecular cell* 1999;4:511-8.
315. Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Molecular cell* 2001;7:263-72.
316. Mulligan AM, Couch FJ, Barrowdale D, et al. Common breast cancer susceptibility alleles are associated with tumour subtypes in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. *Breast cancer research : BCR* 2011;13:R110.
317. Nakanishi K, Taniguchi T, Ranganathan V, et al. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nature cell biology* 2002;4:913-20.
318. Nakanishi K, Yang YG, Pierce AJ, et al. Human Fanconi anemia monoubiquitination pathway promotes homologous DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:1110-5.
319. Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature reviews Cancer* 2004;4:665-76.

320. Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nature medicine* 2001;7:552-6.
321. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, et al. Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nature genetics* 1996;13:114-6.
322. Neuhausen SL, Mazoyer S, Friedman L, et al. Haplotype and phenotype analysis of six recurrent BRCA1 mutations in 61 families: results of an international study. *American journal of human genetics* 1996;58:271-80.
323. Nevanlinna H, Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene* 2006;25:5912-9.
324. Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, et al. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* 2004;24:5776-87.
325. Nikkila J, Coleman KA, Morrissey D, et al. Familial breast cancer screening reveals an alteration in the RAP80 UIM domain that impairs DNA damage response function. *Oncogene* 2009;28:1843-52.
326. Niu W, Qi Y, Gao P, Zhu D. Association of TGFBI -509 C>T polymorphism with breast cancer: evidence from a meta-analysis involving 23,579 subjects. *Breast cancer research and treatment* 2010;124:243-9.
327. Nordling M, Karlsson P, Wahlstrom J, Engwall Y, Wallgren A, Martinsson T. A large deletion disrupts the exon 3 transcription activation domain of the BRCA2 gene in a breast/ovarian cancer family. *Cancer research* 1998;58:1372-5.
328. Oft M, Akhurst RJ, Balmain A. Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nature cell biology* 2002;4:487-94.
329. Okubo M, Tahara T, Shibata T, et al. Association between common genetic variants in pre-microRNAs and gastric cancer risk in Japanese population. *Helicobacter* 2010;15:524-31.
330. Oldenburg RA, Kroeze-Jansema K, Kraan J, et al. The CHEK2*1100delC variant acts as a breast cancer risk modifier in non-BRCA1/BRCA2 multiple-case families. *Cancer research* 2003;63:8153-7.
331. Oldenburg RA, Meijers-Heijboer H, Cornelisse CJ, Devilee P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Critical reviews in oncology/hematology* 2007;63:125-49.
332. Osorio A, de la Hoya M, Rodriguez-Lopez R, et al. Over-representation of two specific haplotypes among chromosomes harbouring BRCA1 mutations. *European journal of human genetics : EJHG* 2003;11:489-92.
333. Osorio A, Rodriguez-Lopez R, Diez O, et al. The breast cancer low-penetrance allele 1100delC in the CHEK2 gene is not present in Spanish familial breast cancer population. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2004;108:54-6.
334. Pabalan N, Jarjanazi H, Ozcelik H. Association between BRIP1 (BACH1) polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment* 2013;137:553-8.
335. Palanca Suela S, Esteban Cardenosa E, Barragan Gonzalez E, et al. Identification of a novel BRCA1 large genomic rearrangement in a Spanish breast/ovarian cancer family. *Breast cancer research and treatment* 2008;112:63-7.
336. Palma MD, Domchek SM, Stopfer J, et al. The relative contribution of point mutations and genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in high-risk breast cancer families. *Cancer research* 2008;68:7006-14.

337. Papi L, Putignano AL, Congregati C, et al. A PALB2 germline mutation associated with hereditary breast cancer in Italy. *Familial cancer* 2010;9:181-5.
338. Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004;23:6329-40.
339. Parkin DM. Is the recent fall in incidence of post-menopausal breast cancer in UK related to changes in use of hormone replacement therapy? *Eur J Cancer* 2009;45:1649-53.
340. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 1999;49:33-64, 1.
341. Pastrello C, Polesel J, Della Puppa L, Viel A, Maestro R. Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis* 2010;31:2124-6.
342. Peixoto A, Santos C, Rocha P, et al. The c.156_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast cancer research and treatment* 2009;114:31-8.
343. Peng M, Litman R, Jin Z, Fong G, Cantor SB. BACH1 is a DNA repair protein supporting BRCA1 damage response. *Oncogene* 2006;25:2245-53.
344. Peng M, Litman R, Xie J, Sharma S, Brosh RM, Jr., Cantor SB. The FANCI/MutLalpha interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. *The EMBO journal* 2007;26:3238-49.
345. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 2001;121:1348-53.
346. Pharoah PD, Tyrer J, Dunning AM, Easton DF, Ponder BA. Association between common variation in 120 candidate genes and breast cancer risk. *PLoS genetics* 2007;3:e42.
347. Pichierri P, Rosselli F. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *The EMBO journal* 2004;23:1178-87.
348. Pietschmann A, Mehdipour P, Mehdipour P, et al. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Iranian high risk breast cancer families. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2005;131:552-8.
349. Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2004;108:196-9.
350. Pippard EC, Hall AJ, Barker DJ, Bridges BA. Cancer in homozygotes and heterozygotes of ataxia-telangiectasia and xeroderma pigmentosum in Britain. *Cancer research* 1988;48:2929-32.
351. Pohlreich P, Zikan M, Stribrna J, et al. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast cancer research : BCR* 2005;7:R728-36.
352. Puget N, Torchard D, Serova-Sinilnikova OM, et al. A 1-Kb Alu-mediated germ-line deletion removing BRCA1 exon 17. *Cancer research* 1997;57:828-31.
353. Pylkas K, Erkkö H, Nikkila J, Solyom S, Winqvist R. Analysis of large deletions in BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes in Finnish breast and ovarian cancer families. *BMC cancer* 2008;8:146.
354. Qiao F, Mi J, Wilson JB, et al. Phosphorylation of fanconi anemia (FA) complementation group G protein, FANCG, at serine 7 is important for function of the FA pathway. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:46035-45.

355. Qiu LX, Yao L, Mao C, et al. TGFB1 L10P polymorphism is associated with breast cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis involving 47,817 subjects. *Breast cancer research and treatment* 2010;123:563-7.
356. Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature genetics* 2007;39:165-7.
357. Rajaraman P, Bhatti P, Doody MM, et al. Nucleotide excision repair polymorphisms may modify ionizing radiation-related breast cancer risk in US radiologic technologists. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2008;123:2713-6.
358. Rajasekaran R, Sudandiradoss C, Doss CG, Sethumadhavan R. Identification and in silico analysis of functional SNPs of the BRCA1 gene. *Genomics* 2007;90:447-52.
359. Rapakko K, Allinen M, Syrjakoski K, et al. Germline TP53 alterations in Finnish breast cancer families are rare and occur at conserved mutation-prone sites. *British journal of cancer* 2001;84:116-9.
360. Ratajska M, Antoszevska E, Piskorz A, et al. Cancer predisposing BARD1 mutations in breast-ovarian cancer families. *Breast cancer research and treatment* 2012;131:89-97.
361. Ravdin PM, Cronin KA, Howlander N, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *The New England journal of medicine* 2007;356:1670-4.
362. Rayburn E, Zhang R, He J, Wang H. MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. *Current cancer drug targets* 2005;5:27-41.
363. Rebbeck TR, Antoniou AC, Llopis TC, et al. No association of TGFB1 L10P genotypes and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a multi-center cohort study. *Breast cancer research and treatment* 2009;115:185-92.
364. Rebbeck TR, Mitra N, Domchek SM, et al. Modification of ovarian cancer risk by BRCA1/2-interacting genes in a multicenter cohort of BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer research* 2009;69:5801-10.
365. Reeves GK, Travis RC, Green J, et al. Incidence of breast cancer and its subtypes in relation to individual and multiple low-penetrance genetic susceptibility loci. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2010;304:426-34.
366. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nature genetics* 2007;39:162-4.
367. Renwick A, Thompson D, Seal S, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nature genetics* 2006;38:873-5.
368. Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *European journal of human genetics : EJHG* 2009;17:722-31.
369. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;405:847-56.
370. Roberts MR, Shields PG, Ambrosone CB, et al. Single-nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and association with breast cancer risk in the web study. *Carcinogenesis* 2011;32:1223-30.
371. Robson M, Offit K. Clinical practice. Management of an inherited predisposition to breast cancer. *The New England journal of medicine* 2007;357:154-62.
372. Rodriguez JA, Schuchner S, Au WW, Fabbro M, Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of BARD1 contributes to its proapoptotic activity and is regulated by dimerization with BRCA1. *Oncogene* 2004;23:1809-20.

373. Rodriguez M, Yu X, Chen J, Songyang Z. Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:52914-8.
374. Rosfjord EC, Dickson RB. Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 1999;4:229-37.
375. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature reviews Cancer* 2012;12:68-78.
376. Ruiz de Garibay G, Gutierrez-Enriquez S, Garre P, et al. Characterization of four novel BRCA2 large genomic rearrangements in Spanish breast/ovarian cancer families: review of the literature, and reevaluation of the genetic mechanisms involved in their origin. *Breast cancer research and treatment* 2012;133:273-83.
377. Rutter JL, Smith AM, Davila MR, et al. Mutational analysis of the BRCA1-interacting genes ZNF350/ZBRK1 and BRIP1/BACH1 among BRCA1 and BRCA2-negative probands from breast-ovarian cancer families and among early-onset breast cancer cases and reference individuals. *Human mutation* 2003;22:121-8.
378. Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Persson C, et al. Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. *Nature genetics* 2008;40:102-7.
379. Sabatier R, Adelaide J, Finetti P, et al. BARD1 homozygous deletion, a possible alternative to BRCA1 mutation in basal breast cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 2010;49:1143-51.
380. Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC. The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 1997;15:887-98.
381. Sarrío D, Moreno-Bueno G, Hardisson D, et al. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2003;106:208-15.
382. Sauer MK, Andrulis IL. Identification and characterization of *missense* alterations in the BRCA1 associated RING domain (BARD1) gene in breast and ovarian cancer. *Journal of medical genetics* 2005;42:633-8.
383. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995;268:1749-53.
384. Scharer U, Skrzypczak-Zielinska M, Wituszynska W, et al. A simple method of investigating mutations in CHEK2 by DHPLC: a study of the German populations of Saxony, Saxony-Anhalt, and Thuringia. *Cancer genetics and cytogenetics* 2010;199:48-52.
385. Schmidt MK, Reincke S, Broeks A, et al. Do MDM2 SNP309 and TP53 R72P interact in breast cancer susceptibility? A large pooled series from the breast cancer association consortium. *Cancer research* 2007;67:9584-90.
386. Schmidt MK, Tollenaar RA, de Kemp SR, et al. Breast cancer survival and tumor characteristics in premenopausal women carrying the CHEK2*1100delC germline mutation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:64-9.
387. Schneider BL, Zhang J, Markwardt J, et al. Growth rate and cell size modulate the synthesis of, and requirement for, G1-phase cyclins at start. *Molecular and cellular biology* 2004;24:10802-13.
388. Schulze A, Lehmann K, Jefferies HB, McMahon M, Downward J. Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes & development* 2001;15:981-94.

389. Schweitzer S, Hogge JP, Grimes M, Bear HD, de Paredes ES. Cowden disease: a cutaneous marker for increased risk of breast cancer. *AJR American journal of roentgenology* 1999;172:349-51.
390. Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 2000;408:429-32.
391. Seal S, Thompson D, Renwick A, et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nature genetics* 2006;38:1239-41.
392. Sedgwick SG, Smerdon SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in biochemical sciences* 1999;24:311-6.
393. Seki M, Marini F, Wood RD. POLQ (Pol theta), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. *Nucleic acids research* 2003;31:6117-26.
394. Seradour B, Allemand H, Weill A, Ricordeau P. Changes by age in breast cancer incidence, mammography screening and hormone therapy use in France from 2000 to 2006. *Bulletin du cancer* 2009;96:E1-6.
395. Shao G, Patterson-Fortin J, Messick TE, et al. MERIT40 controls BRCA1-Rap80 complex integrity and recruitment to DNA double-strand breaks. *Genes & development* 2009;23:740-54.
396. Shao M, Ma H, Wang Y, et al. Polymorphisms in excision repair cross-complementing group 4 (ERCC4) and susceptibility to primary lung cancer in a Chinese Han population. *Lung Cancer* 2008;60:332-9.
397. Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, et al. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 1997;386:804-10.
398. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 2008;29:1963-6.
399. Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer research* 1998;58:604-8.
400. Shen WH, Balajee AS, Wang J, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 2007;128:157-70.
401. Shi TY, He J, Qiu LX, et al. Association between XPF polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *PloS one* 2012;7:e38606.
402. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews Cancer* 2003;3:155-68.
403. Shin A, Shu XO, Cai Q, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene and breast cancer risk: a possible dual role at different cancer stages. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2005;14:1567-70.
404. Shin HG, Xu Y, Lu Z. Evidence for sequential ion-binding loci along the inner pore of the IRK1 inward-rectifier K⁺ channel. *The Journal of general physiology* 2005;126:123-35.
405. Sigurdson AJ, Hauptmann M, Chatterjee N, et al. Kin-cohort estimates for familial breast cancer risk in relation to variants in DNA base excision repair, BRCA1 interacting and growth factor genes. *BMC cancer* 2004;4:9.
406. Simchoni S, Friedman E, Kaufman B, et al. Familial clustering of site-specific cancer risks associated with BRCA1 and BRCA2 mutations in the Ashkenazi Jewish population.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2006;103:3770-4.
407. Simons AM, Horwitz AA, Starita LM, et al. BRCA1 DNA-binding activity is stimulated by BARD1. *Cancer research* 2006;66:2012-8.
408. Sluiter M, Mew S, van Rensburg EJ. PALB2 sequence variants in young South African breast cancer patients. *Familial cancer* 2009;8:347-53.
409. Sluiter MD, van Rensburg EJ. Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. *Breast cancer research and treatment* 2011;125:325-49.
410. Smith A, Moran A, Boyd MC, et al. Phenocopies in BRCA1 and BRCA2 families: evidence for modifier genes and implications for screening. *Journal of medical genetics* 2007;44:10-5.
411. Smith TR, Levine EA, Freimanis RI, et al. Polygenic model of DNA repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2008;29:2132-8.
412. Smith TR, Levine EA, Perrier ND, et al. DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2003;12:1200-4.
413. Sobeck A, Stone S, Costanzo V, et al. Fanconi anemia proteins are required to prevent accumulation of replication-associated DNA double-strand breaks. *Molecular and cellular biology* 2006;26:425-37.
414. Sobhian B, Shao G, Lilli DR, et al. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science* 2007;316:1198-202.
415. Sodha N, Houlston RS, Bullock S, et al. Increasing evidence that germline mutations in CHEK2 do not cause Li-Fraumeni syndrome. *Human mutation* 2002;20:460-2.
416. Sole X, Guino E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928-9.
417. Solyom S, Aressy B, Pylkas K, et al. Breast cancer-associated ABRAXAS mutation disrupts nuclear localization and DNA damage response functions. *Science translational medicine* 2012;4:122ra23.
418. Song H, Ramus SJ, Kjaer SK, et al. Tagging single nucleotide polymorphisms in the BRIP1 gene and susceptibility to breast and ovarian cancer. *PloS one* 2007;2:e268.
419. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:10869-74.
420. Spigelman AD, Murday V, Phillips RK. Cancer and the Peutz-Jeghers syndrome. *Gut* 1989;30:1588-90.
421. Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, et al. Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nature genetics* 2007;39:865-9.
422. Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, et al. Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nature genetics* 2008;40:703-6.
423. Starink TM, van der Veen JP, Arwert F, et al. The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clinical genetics* 1986;29:222-33.

424. Steffen J, Nowakowska D, Niwinska A, et al. Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006;119:472-5.
425. Stiff T, Reis C, Alderton GK, Woodbine L, O'Driscoll M, Jeggo PA. Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *The EMBO journal* 2005;24:199-208.
426. Stone J, Dite GS, Gunasekara A, et al. The heritability of mammographically dense and nondense breast tissue. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2006;15:612-7.
427. Strong LC, Williams WR, Tainsky MA. The Li-Fraumeni syndrome: from clinical epidemiology to molecular genetics. *American journal of epidemiology* 1992;135:190-9.
428. Suriano G, Yew S, Ferreira P, et al. Characterization of a recurrent germ line mutation of the E-cadherin gene: implications for genetic testing and clinical management. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:5401-9.
429. Swift M, Chase CL, Morrell D. Cancer predisposition of ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Cancer genetics and cytogenetics* 1990;46:21-7.
430. Sy SM, Huen MS, Chen J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:7155-60.
431. Sy SM, Huen MS, Zhu Y, Chen J. PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:18302-10.
432. Taniguchi T, D'Andrea AD. Molecular pathogenesis of Fanconi anemia: recent progress. *Blood* 2006;107:4223-33.
433. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, et al. Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* 2002;109:459-72.
434. Tapper W, Hammond V, Gerty S, et al. The influence of genetic variation in 30 selected genes on the clinical characteristics of early onset breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2008;10:R108.
435. Tavgigian SV, Oefner PJ, Babikyan D, et al. Rare, evolutionarily unlikely *missense* substitutions in ATM confer increased risk of breast cancer. *American journal of human genetics* 2009;85:427-46.
436. Tavgigian SV, Simard J, Rommens J, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature genetics* 1996;12:333-7.
437. Teraoka SN, Bernstein JL, Reiner AS, et al. Single nucleotide polymorphisms associated with risk for contralateral breast cancer in the Women's Environment, Cancer, and Radiation Epidemiology (WECARE) Study. *Breast cancer research : BCR* 2011;13:R114.
438. Thai TH, Du F, Tsan JT, et al. Mutations in the BRCA1-associated RING domain (BARD1) gene in primary breast, ovarian and uterine cancers. *Human molecular genetics* 1998;7:195-202.
439. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Molecular and cellular biology* 1999;19:1092-100.
440. Thompson D, Duedal S, Kirner J, et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;97:813-22.

441. Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2004;9:221-36.
442. Thompson D, Easton DF. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute* 2002;94:1358-65.
443. Thorslund T, Esashi F, West SC. Interactions between human BRCA2 protein and the meiosis-specific recombinase DMC1. *The EMBO journal* 2007;26:2915-22.
444. Thorslund T, West SC. BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* 2007;26:7720-30.
445. Tian M, Shinkura R, Shinkura N, Alt FW. Growth retardation, early death, and DNA repair defects in mice deficient for the nucleotide excision repair enzyme XPF. *Molecular and cellular biology* 2004;24:1200-5.
446. Tischkowitz M, Xia B. PALB2/FANCN: recombining cancer and Fanconi anemia. *Cancer research* 2010;70:7353-9.
447. Tischkowitz M, Xia B, Sabbaghian N, et al. Analysis of PALB2/FANCN-associated breast cancer families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:6788-93.
448. Toi M, Saji S, Suzuki A, Yamamoto Y, Tominaga T. MDM2 in Breast Cancer. *Breast Cancer* 1997;4:264-8.
449. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, et al. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nature genetics* 2007;39:984-8.
450. Tommasi S, Pilato B, Pinto R, et al. Molecular and in silico analysis of BRCA1 and BRCA2 variants. *Mutation research* 2008;644:64-70.
451. Tommiska J, Eerola H, Heinonen M, et al. Breast cancer patients with p53 Pro72 homozygous genotype have a poorer survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005;11:5098-103.
452. Tournier I, Paillerets BB, Sobol H, et al. Significant contribution of germline BRCA2 rearrangements in male breast cancer families. *Cancer research* 2004;64:8143-7.
453. Toyama T, Zhang Z, Nishio M, et al. Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR* 2007;9:R34.
454. Travis RC, Reeves GK, Green J, et al. Gene-environment interactions in 7610 women with breast cancer: prospective evidence from the Million Women Study. *Lancet* 2010;375:2143-51.
455. Trentham-Dietz A, Newcomb PA, Egan KM, et al. Weight change and risk of postmenopausal breast cancer (United States). *Cancer causes & control : CCC* 2000;11:533-42.
456. Tripsianes K, Folkers G, Ab E, et al. The structure of the human ERCC1/XPF interaction domains reveals a complementary role for the two proteins in nucleotide excision repair. *Structure* 2005;13:1849-58.
457. Trotman LC, Wang X, Alimonti A, et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 2007;128:141-56.
458. Tsodikov OV, Enzlin JH, Scharer OD, Ellenberger T. Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:11236-41.

459. Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annual review of genomics and human genetics* 2008;9:321-45.
460. Uhrhammer N, Delort L, Bignon YJ. Rad50 c.687delT does not contribute significantly to familial breast cancer in a French population. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2009;18:684-5.
461. Vachon CM, van Gils CH, Sellers TA, et al. Mammographic density, breast cancer risk and risk prediction. *Breast cancer research : BCR* 2007;9:217.
462. Vaezi A, Wang X, Buch S, et al. XPF expression correlates with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:5513-22.
463. Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *American journal of human genetics* 2002;71:432-8.
464. Vahteristo P, Syrjakoski K, Heikkinen T, et al. BARD1 variants Cys557Ser and Val507Met in breast cancer predisposition. *European journal of human genetics : EJHG* 2006;14:167-72.
465. Vahteristo P, Yliannala K, Tamminen A, Eerola H, Blomqvist C, Nevanlinna H. BACH1 Ser919Pro variant and breast cancer risk. *BMC cancer* 2006;6:19.
466. van Asperen CJ, Brohet RM, Meijers-Heijboer EJ, et al. Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary. *Journal of medical genetics* 2005;42:711-9.
467. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *American journal of epidemiology* 2000;152:514-27.
468. van den Broek AJ, Broeks A, Horlings HM, et al. Association of the germline TP53 R72P and MDM2 SNP309 variants with breast cancer survival in specific breast tumor subgroups. *Breast cancer research and treatment* 2011;130:599-608.
469. van Gils CH, Hendriks JH, Otten JD, Holland R, Verbeek AL. Parity and mammographic breast density in relation to breast cancer risk: indication of interaction. *Eur J Cancer Prev* 2000;9:105-11.
470. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer research* 1997;57:3245-52.
471. Varon R, Seemanova E, Chrzanowska K, et al. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations. *European journal of human genetics : EJHG* 2000;8:900-2.
472. Varon R, Vissinga C, Platzer M, et al. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 1998;93:467-76.
473. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature genetics* 2010;42:406-9.
474. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002;108:171-82.
475. Venkitaraman AR. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nature reviews Cancer* 2004;4:266-76.
476. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-10.

477. Wada K, Tanaka M, Yamaguchi K, Wada K. Carcinoma and polyps of the gallbladder associated with Peutz-Jeghers syndrome. *Digestive diseases and sciences* 1987;32:943-6.
478. Walerych D, Napoli M, Collavin L, Del Sal G. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* 2012;33:2007-17.
479. Walker KK, Levine AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:15335-40.
480. Walsh T, Casadei S, Coats KH, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2006;295:1379-88.
481. Walsh T, King MC. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell* 2007;11:103-5.
482. Wang B, Hurov K, Hofmann K, Elledge SJ. NBA1, a new player in the Bracl A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control. *Genes & development* 2009;23:729-39.
483. Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, et al. ABRAXAS and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* 2007;316:1194-8.
484. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:13884-8.
485. Wang T, Lerer I, Gueta Z, et al. A deletion/insertion mutation in the BRCA2 gene in a breast cancer family: a possible role of the Alu-polyA tail in the evolution of the deletion. *Genes, chromosomes & cancer* 2001;31:91-5.
486. Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nature reviews Genetics* 2007;8:735-48.
487. Wang X, Kennedy RD, Ray K, Stuckert P, Ellenberger T, D'Andrea AD. Chk1-mediated phosphorylation of FANCD1 is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Molecular and cellular biology* 2007;27:3098-108.
488. Wang X, Trotman LC, Koppie T, et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell* 2007;128:129-39.
489. Wei Q, Wang LE, Sturgis EM, Mao L. Expression of nucleotide excision repair proteins in lymphocytes as a marker of susceptibility to squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2005;14:1961-6.
490. Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:542-8.
491. Weischer M, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Axelsson CK, Nordestgaard BG. Increased risk of breast cancer associated with CHEK2*1100delC. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:57-63.
492. Welsh PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human molecular genetics* 2001;10:705-13.
493. Westerman AM, Entius MM, de Baar E, et al. Peutz-Jeghers syndrome: 78-year follow-up of the original family. *Lancet* 1999;353:1211-5.
494. Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature reviews Cancer* 2009;9:95-107.

495. Wilkening S, Bermejo JL, Burwinkel B, et al. The single nucleotide polymorphism IVS1+309 in mouse double minute 2 does not affect risk of familial breast cancer. *Cancer research* 2006;66:646-8.
496. Winsey SL, Haldar NA, Marsh HP, et al. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer research* 2000;60:5612-6.
497. Witte JS. Multiple prostate cancer risk variants on 8q24. *Nature genetics* 2007;39:579-80.
498. Wong MW, Nordfors C, Mossman D, et al. BRIP1, PALB2, and RAD51C mutation analysis reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2011;127:853-9.
499. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science* 2001;291:1284-9.
500. Woodward AM, Davis TA, Silva AG, Kirk JA, Leary JA. Large genomic rearrangements of both BRCA2 and BRCA1 are a feature of the inherited breast/ovarian cancer phenotype in selected families. *Journal of medical genetics* 2005;42:e31.
501. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995;378:789-92.
502. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 2003;348:2339-47.
503. Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature genetics* 1996;14:430-40.
504. Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nature genetics* 2007;39:159-61.
505. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular cell* 2006;22:719-29.
506. Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, et al. Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. *Cancer research* 2002;62:497-505.
507. Xu B, Feng NH, Li PC, et al. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *The Prostate* 2010;70:467-72.
508. Yamashita T, Kupfer GM, Naf D, et al. The fanconi anemia pathway requires FAA phosphorylation and FAA/FAC nuclear accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:13085-90.
509. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 2002;297:1837-48.
510. Yoo LI, Chung DC, Yuan J. LKB1--a master tumour suppressor of the small intestine and beyond. *Nature reviews Cancer* 2002;2:529-35.
511. Yu X, Chen J. DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Molecular and cellular biology* 2004;24:9478-86.
512. Yu X, Chini CC, He M, Mer G, Chen J. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* 2003;302:639-42.
513. Yuan SS, Lee SY, Chen G, Song M, Tomlinson GE, Lee EY. BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer research* 1999;59:3547-51.

514. Zhang F, Ma J, Wu J, et al. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Current biology* : CB 2009;19:524-9.

515. Zheng Y, Zhang J, Hope K, Niu Q, Huo D, Olopade OI. Screening RAD51C nucleotide alterations in patients with a family history of breast and ovarian cancer. *Breast cancer research and treatment* 2010;124:857-61.

516. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408:433-9.