

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**NUEVAS APORTACIONES A LA
CARACTERIZACIÓN DEL CÁNCER DE
MAMA EN MUJERES JÓVENES**

**Athenea Pascual Rodríguez
2017**



EL DR. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y EL DR JUAN LUIS GARCÍA HERNÁNDEZ

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Nuevas aportaciones a la caracterización del cáncer de mama en mujeres jóvenes”, que presenta la graduada en Farmacia Dña. Athenea Pascual Rodríguez ha sido realizado bajo su dirección en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expido el presente certificado en Salamanca a 30 de junio de 2017.

Fdo.: Dr. Rogelio González Sarmiento

Fdo.: Dr. Juan Luis García Hernández

Índice

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción.....	1
1.Epidemiología del cáncer de mama	3
2. Cáncer de mama en mujeres jóvenes	3
2.1 Epidemiología.....	3
2.2 Factores de riesgo	4
2.2.1 Raza	4
2.2.3 Factores hormonales.....	4
2.2.4 Estilo de vida	5
3. Cáncer de mama hereditario.....	5
3.1 Variantes alélicas en genes relacionados con la reparación al daño del DNA.....	7
3.1.1 Reparación de roturas de doble cadena (DSBs).....	8
3.1.2 Sistema de reparación de emparejamientos erróneos (MMR)	12
3.2 Variantes alélicas identificadas por GWAS.....	14
3.2.1 FGFR2	15
3.2.2 miR146	16
3.2.3 Región 8q24.....	16
3.3 Variantes alélicas en la ruta de TP53	17
3.4 Variantes alélicas relacionadas con la actividad telomerasa	19
3.5 Variantes alélicas relacionadas con la matriz extracelular	21
4. Alteraciones citogenéticas en el cáncer de mama	22
4.1 Inestabilidad genómica y cáncer de mama.....	23
4.2 Inestabilidad genómica por ruptura cromosómica: cromotripsis.....	23
4.3 Alteraciones genómicas en el cáncer de mama	25
5. La autofagia	26
5.1 El proceso de autofagia: etapas y proteínas implicadas	26
5.2 Autofagia y cáncer.....	28
5.2.1 Autofagia como supresor tumoral en cáncer de mama.....	28
5.2.2 Autofagia como promotor tumoral en cáncer de mama	29
5.3 Variables alélicas relacionadas con la autofagia	29
5.4 Tratamiento modulador de la autofagia	30
Hipótesis y objetivos.....	32
Pacientes y métodos.....	36

1. Pacientes	38
2. Manipulación de ácidos nucleicos.....	39
2.1 Extracción de DNA a partir de sangre periférica	39
2.2 Extracción de DNA a partir de tejido tumoral parafinado	39
2.3 Extracción de DNA a partir de líneas celulares	40
3. Cuantificación de las muestras de estudio.....	40
4. Estudio de los genes BRCA1 Y BRCA2.....	40
4.1 Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR	40
4.2 Análisis de los fragmentos amplificados por PCR mediante CSGE.....	43
4.3 Análisis mediante sistemas de secuenciación masiva.....	44
5. Electroforesis de los fragmentos amplificados en gel de agarosa	46
6. Secuenciación automática.....	47
7. Discriminación alélica.....	47
7.1 Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan™	47
7.2. Discriminación alélica mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	50
8. Análisis citogenético de tumores de mama de mujeres jóvenes.....	51
8.1 Estudio citogenético en muestras tumorales mediante microarrays genómicos con la plataforma Cytoscan™	51
8.2. Estudio citogenético en muestras tumorales mediante MIP array con la plataforma Oncoscan™	53
8.3 Análisis informático de los datos obtenidos por microarrays genómicos	54
9. Estudio de modulación de la autofagia en líneas celulares	55
9.1. Ensayo de viabilidad celular	56
9.2. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	56
9.3. Análisis de extractos proteicos por Western blot.....	57
9.3.1 Extracción de proteínas.....	57
9.3.2 Análisis de expresión de proteínas de autofagia	57
10. Análisis estadístico	58
Resultados	61
1. Análisis de variantes alélicas de baja penetrancia en cáncer de mama en mujeres jóvenes. 63	
1.1 Polimorfismos en genes relacionados con las vías de reparación del DNA	64
1.2 Polimorfismos en genes identificados mediante GWAS	69
1.3 Polimorfismos en genes relacionados con TP53	73
1.4 Polimorfismos en genes relacionados con la actividad de la telomerasa.....	75
1.5 Polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular	77

1.6 Polimorfismos en genes relacionados con la autofagia	79
2. Análisis de alteraciones citogenéticas en tumores de cáncer de mama de mujeres jóvenes	87
2.1 Análisis comparativo de las alteraciones en el número de copias en tumores de mama de mujeres menores de 40 años y mayores de 40 años.....	88
2.2 Análisis de alteraciones en el número de copias en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años	89
2.3 Análisis del grado de inestabilidad genómico en las muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años	93
2.3.1 Estudio del índice de inestabilidad genómica (GII) en los tumores de mama en pacientes menores de 40 años.....	93
2.3.2 Análisis del desequilibrio alélico en la zona telomérica en tumores de mujeres con cáncer de mama menores de 40 años	96
2.4 Análisis de los patrones de cromotripsis en tumores de mujeres con cáncer de mama menores de 40 años.....	99
3. Análisis del Tratamiento con cloroquina en líneas celulares de cáncer de mama	102
3.1 Estudio del efecto de la cloroquina en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama.....	102
3.2 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo del efecto del tratamiento con cloroquina en las líneas celulares de cáncer de mama	103
3.3 Análisis del efecto del tratamiento con cloroquina en la expresión de proteínas de la ruta de la autofagia en líneas celulares de cáncer de mama	104
3.4 Análisis del efecto del tratamiento con cloroquina en la inestabilidad genómica mediante microarrays genómicos en líneas de cáncer de mama	107
Discusión	110
1. Análisis de variantes alélicas de baja penetrancia en el cáncer de mama en mujeres jóvenes	99
1.1 Polimorfismos en genes relacionados con las vías de reparación del DNA	99
1.2 Polimorfismos en genes identificados por GWAS.....	101
1.3 Polimorfismos en genes relacionados con TP53	103
1.4 Polimorfismos en genes relacionados con la actividad telomerasa	104
1.5 Polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular	106
1.6 Polimorfismos en genes relacionados con la autofagia	106
2. Análisis de alteraciones citogenéticas en tumores de cáncer de mama de mujeres jóvenes	109
2.1 El análisis de las alteraciones en el número de copias confirma la existencia de regiones diferenciales en tumores de mama de mujeres jóvenes y mayores de 40 años	109
2.2 Análisis de alteraciones en el número de copias en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años	111
2.3 Análisis del grado de inestabilidad genómico en las muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años	113

2.4 Análisis de los patrones de cromotripsis en tumores de mujeres con cáncer de mama menores de 40 años.....	115
3. Análisis del tratamiento con cloroquina en líneas celulares de cáncer de mama	117
3.1 El tratamiento con cloroquina produce una inhibición de la autofagia en líneas tumorales de mama.....	118
3.2 Las líneas celulares de cáncer de mama de mujeres jóvenes presentan mayor sensibilidad al tratamiento con cloroquina debido a la inestabilidad genómica	119
Conclusiones	100
Anexos	104
Bibliografía.....	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Daño al DNA, mecanismos reparadores y consecuencias	8
Figura 2. Esquema de los dominios funcionales de BRCA1 y BRCA2 y proteínas a las que se unen los mismos.	9
Figura 3. Esquema de reparación de DSB por recombinación homóloga.	11
Figura 4. Sistema MMR en células humanas.....	13
Figura 5. Mecanismo de regulación entre p53-MDM2	18
Figura 6. Estructura de la telomerasa y su función.	20
Figura 7. Efecto de la expresión de los miembros LOX y su relación con la carcinogénesis, la proliferación y la invasión celular.	22
Figura 8. La cromotripsis en uno o varios cromosomas	24
Figura 9. Esquema del proceso de autofagia, proteínas más importantes y distintas etapas del proceso	27
Figura 10. Programa de amplificación empleado para el gen <i>BRCA1</i>	43
Figura 11. Programa de amplificación empleado para el gen <i>BRCA2</i>	43
Figura 12. Preparación de la librería de amplicones y etiquetado de la muestra en 454 GS Junior	44
Figura 13. Resumen e secuenciación con la tecnología 454 GS Junior	46
Figura 14. Ejemplo de mutación en heterocigosis en <i>BRCA1</i>	47
Figura 15. Mecanismo de reacción de PCR con sondas Taqman y representación de los resultados	49
Figura 16. Análisis del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 y c.-309T>G del gen MDM2 mediante PCR-RFLP.	51
Figura 17. Esquema de trabajo de la plataforma de microarrays genómicos Cytoscan 750k.....	52
Figura 18. Esquema de funcionamiento de las sondas MIP. Modificado de Affymetrix.....	53
Figura 19. Esquema de trabajo y programas utilizados en el análisis de alteraciones citogenéticas en tumores de mama en mujeres jóvenes.....	55
Figura 20. Diagramas de cajas que muestran la distribución del GII^{total} según la expresión de ki67 y del grado histológico del tumor	95
Figura 21. Diagramas de cajas que muestran la distribución del $GII^{ganancias}$ según la expresión de p53, ki67 y del grado histológico del tumor.....	95
Figura 22. Diagramas de cajas que muestran la distribución del $GII^{pérdidas}$ según el estado mutacional en los genes <i>BRCA1/2</i> y la distribución teniendo en cuenta los antecedentes familiares de cáncer de mama en las mujeres <i>BRCA-</i>	96
Figura 23. Curvas de supervivencia libre de enfermedad en función del GII^{total} , $GII^{ganancia}$ y $GII^{pérdida}$ en pacientes jóvenes con cáncer de mama.....	96
Figura 24. Curvas de supervivencia libre de enfermedad en función del patrón de TAI en pacientes jóvenes con cáncer de mama	98
Figura 25. Porcentaje de pérdida en regiones focales y genes de interés entre los tumores sin y con desequilibrio alélico en la zona telomérica (TAI).....	98
Figura 26. Patrón de cromotripsis observado mediante el programa Nexus y CTLPScanner	99
Figura 27. Efecto del tratamiento con cloroquina a las concentraciones 10, 25, 50, 75, 100 y 125 μ M sobre la proliferación celular en las líneas de cáncer de mama MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937.	102
Figura 28. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937 en tratamiento con cloroquina a la concentración 25 μ M.....	103
Figura 29. Expresión de la proteína LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937 en presencia de cloroquina a la concentración 25 μ M.....	105
Figura 30. Expresión de la proteína beclin1 en las líneas celulares MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937 en presencia de cloroquina a la concentración 25 μ M.	106

Figura 31. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937 en presencia de cloroquina a la concentración 25 µM.107

Figura 32. Inestabilidad genómica en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC11937 al tiempo de tratamiento 0h (células sin tratar) y a las 72h de tratamiento con cloroquina...108

Figura 33. La autofagia puede decidir el destino de la célula regulando diversos mecanismos que puede llevar a la supervivencia o a la muerte celular. Modificado de Vessoni y colaboradores³⁶⁸120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de inclusión en los programas de consejo genético de cáncer de mama y ovario hereditario en los años 2000-2016.....38

Tabla 2. Grupos de análisis de los tejidos parafinados38

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de cada exón de BRCA1 y tamaño del fragmento que generan.....41

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de cada exón de BRCA2 y tamaño del fragmento que generan.....42

Tabla 5. Moléculas fluorescentes utilizadas en la amplificación con sondas Taqman™48

Tabla 6. SNPs estudiados en este trabajo mediante sondas Taqman.....50

Tabla 7. Especificaciones de los oligonucleótidos empleados, genotipo y tamaño del fragmento generado en los polimorfismos por PCR-RFLP50

Tabla 8. Líneas celulares utilizadas y resumen de sus mutaciones (subrayadas mutaciones confirmadas por secuenciación automática)55

Tabla 9. Anticuerpos usados en este trabajo en los experimentos de Western Blot.58

Tabla 10 . Principales características de las pacientes estudiadas.....63

Tabla 11. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en controles y pacientes65

Tabla 12. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en los grupos BRCA- y BRCA+66

Tabla 13. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en controles y pacientes BRCA-67

Tabla 14. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en los grupos RH- y RH+68

Tabla 15. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en controles y pacientes69

Tabla 16. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en los grupos BRCA- y BRCA+70

Tabla 17. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en controles y pacientes BRCA-71

Tabla 18. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en controles y pacientes BRCA+72

Tabla 19. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en los grupos RH- y RH+73

Tabla 20. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con TP53 en controles y pacientes.....74

Tabla 21. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con TP53 en controles y pacientes BRCA-74

Tabla 22. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la actividad de la telomerasa en los grupos CMF- y CMF+.....	76
Tabla 23. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos relacionados con la actividad de la telomerasa en relación con la expresión de los receptores hormonales en el tumor	76
Tabla 24. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular en controles y pacientes	77
Tabla 25. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular en controles y pacientes BRCA-.....	78
Tabla 26. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular en los grupos CMF- y CMF+.....	78
Tabla 27. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia en los grupos BRCA- y BRCA+	80
Tabla 28. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en controles y pacientes BRCA+	81
Tabla 29. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en los grupos CMF- y CMF+	82
Tabla 30. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en los grupos HER2- y HER2+.....	83
Tabla 31. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en relación con el subtipo tumoral.....	84
Tabla 32. Tabla resumen de las distribuciones de los genotipos de los polimorfismos estudiados y su implicación en el cáncer de mama	85
Tabla 33. Frecuencias de los conjuntos de alelos originados por la segregación de los polimorfismos ATG5 rs2245214 y d MLH1 rs18000374 en las pacientes BRCA- y BRCA+	86
Tabla 34. Frecuencias de los conjuntos de alelos originados por la segregación de los polimorfismos TERT rs2735940, ATG10 rs1864183 y LOXL1 rs2165241 en las pacientes CMF- y CMF+.....	86
Tabla 35. Características de los tumores embebidos en parafina estudiados por microarrays genómicos	87
Tabla 36. Comparación entre las regiones alteradas con mayor frecuencia y estadísticamente significativas entre los tumores de cáncer de mama en mujeres jóvenes y mujeres mayores. En negrita se muestran aquellos genes de interés descritos previamente en cáncer de mama	88
Tabla 37. Regiones focales y posibles genes implicados alterados con mayor frecuencia en el conjunto de mujeres con cáncer de mama menores de 40 años. En negrita se muestran genes relacionados previamente con cáncer de mama.....	90
Tabla 38. Regiones focales y posibles genes implicados alterados con mayor frecuencia (>80%) en los tumores de las pacientes con cáncer de mama jóvenes y mutación en <i>BRCA1/2</i> (BRCA+).....	91
Tabla 39. Regiones focales y genes implicados alterados con mayor frecuencia (>60%) en los tumores de las pacientes con cáncer de mama con antecedentes familiares (CMF+).....	91
Tabla 40. Regiones focales y genes implicados alterados con mayor frecuencia (>60%) en los tumores de las pacientes con cáncer de mama sin antecedentes familiares (CMF-).....	92
Tabla 41. Comparación entre las regiones alteradas con mayor frecuencia y estadísticamente significativas entre los grupos BRCA+ y BRCA-. En negrita se muestran aquellos genes de interés reportados previamente en cáncer de mama.....	92
Tabla 42. Comparación entre las regiones alteradas con mayor frecuencia y estadísticamente significativas entre los grupos CMF+ y CMF-. En negrita se muestran aquellos genes de interés reportados previamente en cáncer de mama	93
Tabla 43. Asociación de las distintas variables clínico-patológicas de los tumores de mama de mujeres jóvenes con los índices de inestabilidad genómica	94
Tabla 44. Asociación de las distintas variables clínico-patológicas de los tumores de mama de mujeres jóvenes con el desequilibrio alélico en los telómeros.....	97

Tabla 45. Genes de interés afectados con mayor frecuencia en tumores con cromotripsis en el cromosoma 17.....	100
Tabla 46. Asociación de las distintas variables clínico-patológicas de los tumores de mama de mujeres jóvenes con el patrón de cromotripsis	101

Introducción

1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común en el mundo y el cáncer más frecuente en las mujeres con una estimación de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012 (representando un 25% en relación con todos los tipos de cáncer)¹.

El cáncer de mama es la quinta causa de muerte por cáncer (552.000 muertes) y aunque es la causa de muerte más frecuente por cáncer en los países menos desarrollados, ahora es la segunda causa de muerte por cáncer en las regiones más desarrolladas después del cáncer de pulmón.

La tasa de supervivencia del cáncer de mama varía mundialmente entre un 80% en Norteamérica, Suecia y Japón hasta un 60% en países de renta media y un 40% en países de renta baja. Esta tasa tan reducida en países menos desarrollados se debe a la falta de programas de detección precoz, que conlleva una mayor proporción de mujeres con enfermedades en estadios más avanzados y a una escasez de medios adecuados para el diagnóstico y tratamiento².

En España, el cáncer de mama supone un 29% de todos los casos de cáncer diagnosticados en la mujer y, aunque la mortalidad ha descendido en los últimos años, supone la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres³.

2. CÁNCER DE MAMA EN MUJERES JÓVENES

2.1 Epidemiología

La definición de “mujer joven” en el campo de la oncología mamaria varía, comprendiendo en el término “joven” a las mujeres de edades entre 35-40 años^{4,5}.

Aproximadamente el 7% de las mujeres con cáncer de mama se diagnostican antes de los 40 años. De todos los tipos de cáncer diagnosticados en mujeres, más del 40% corresponde al cáncer de mama a la edad de 40 años, un 20% a los 30 y aproximadamente un 2% a los 20 años⁶.

En España, el 10% de los casos se diagnostican en mujeres menores de 40 años³.

La incidencia del cáncer de mama sigue una tendencia exponencial hasta los 40 años, manteniéndose después más lineal con la edad. La incidencia del cáncer de mama a nivel mundial se duplicó entre 1975-2000 debido al aumento de la esperanza de vida y la “occidentalización” en el estilo de vida, produciéndose un descenso a partir del año 2000, debido en parte a la disminución en el uso de la terapia hormonal combinada posmenopáusica. Sin embargo, estas variaciones en la incidencia no se han encontrado en el cáncer de mama en mujeres jóvenes manteniéndose estables en la mayoría de los países en los últimos años⁶⁻⁸. Esta tendencia no se confirma en España, donde la incidencia del cáncer de mama en mujeres menores de 45 años ha ido incrementando levemente en las últimas décadas, debido probablemente a las bajas tasas de natalidad que experimenta nuestro país en comparación con otros europeos⁹.

El diagnóstico de la enfermedad en mujeres jóvenes se relaciona con una menor supervivencia y peores resultados clínicos, caracterizados por fenotipos más agresivos del tumor^{10,11}. Las mujeres menores de 40 años es más probable que fallezcan de un cáncer en estadio I o II que mujeres mayores de 40 años (un 44 a un 9% respectivamente) y presentan también una menor tasa de supervivencia¹².

Por ello se debe considerar el cáncer de mama en este subgrupo de la población como una entidad distinta de la enfermedad¹³.

2.2 Factores de riesgo

2.2.1 Raza

La incidencia del cáncer de mama varía según la raza. En general la incidencia del cáncer de mama es mayor en mujeres blancas y afroamericanas que en asiáticas o hispanoamericanas. En los Estados Unidos, en mujeres mayores de 45 años, el cáncer de mama es más común en mujeres blancas que negras. Sin embargo, las mujeres afroamericanas por debajo de los 35 años presentan el doble de incidencia de cáncer de mama invasivo y tres veces más mortalidad que las mujeres blancas^{14,15}.

2.2.2 Historia familiar

Las mujeres que presentan una historia familiar de cáncer de mama, especialmente si los familiares afectados son en primer grado, tienen un riesgo incrementado de padecer la enfermedad en 1.5 veces en comparación a la población sin antecedentes familiares. Este riesgo aumenta a medida que se incrementa el número de familiares afectos y disminuye la edad a la que se diagnostica la enfermedad sugiriendo la presencia de un síndrome de cáncer familiar^{16,17}.

Los datos más importantes para elaborar la historia familiar son entre otros la edad de diagnóstico, cáncer de mama en varón, presencia de enfermedad bilateral y otros tumores relacionados como tumores de ovario, páncreas, próstata, estómago etc¹⁸.

2.2.3 Factores hormonales

La exposición a las hormonas sexuales endógenas está determinada por variables como la edad de la menarquia, la edad del primer embarazo, el número de embarazos y la edad de menopausia, de manera que la exposición a esta hormona durante períodos prolongados ininterrumpidos puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de mama¹⁹

Diversos estudios han confirmado que una menarquia precoz está asociada a un aumento del riesgo de padecer cáncer de mama. En aquellas mujeres en las que la menarquia se produjo antes de los 12 años, la expresión de estrógenos en cada ciclo menstrual es mayor que en aquellas en que a menarquia se produjo a partir de los 13 años²⁰.

El retraso de la menarquia en dos años reduce el riesgo de padecer cáncer de mama en un 10%. Estos resultados son acordes con los obtenidos en las pacientes postmenopausicas²¹.

Tener el primer embarazo a una edad temprana o tener un mayor número de embarazos está asociado a un menor riesgo en comparación con aquellas mujeres nulíparas o que

presentan embarazos a edades más tardías. Por ejemplo, las mujeres que tienen su primero hijo antes de los 20 años presentan un descenso del 50% de tener cáncer de mama en comparación a aquellas mujeres que no tienen hijos. Además, las mujeres mayores que tienen un embarazo más tardío (35 años) presentan un riesgo incrementado frente a aquellas nulíparas²².

En cuanto a los factores hormonales exógenos, el uso de los anticonceptivos orales está asociados a un pequeño incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama particularmente en aquellas mujeres que comienzan a tomarlos antes de los 20 años o antes del primer embarazo. Este riesgo parece disminuir cuando se deja el tratamiento y pasados 10 años el riesgo es el mismo que las mujeres que nunca los han tomado²³.

2.2.4 Estilo de vida

Numerosos estudios han relacionado positivamente la ingesta de alcohol y el riesgo de desarrollar cáncer de mama tanto en mujeres pre como postmenopáusicas^{24,25}.

La obesidad tiene una relación más compleja presentando una modulación por el estado menopáusico. La ganancia de peso y la obesidad aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas; debido probablemente a los niveles superiores de estrógenos a nivel endógeno ya que el tejido adiposo es una fuente importante de estrógenos tras la menopausia cuando los ovarios dejan de producir la hormona.

Por otra parte, la obesidad en las mujeres premenopáusicas se ha asociado a un descenso en el riesgo de padecer cáncer de mama por razones aún desconocidas^{7,26}.

3. CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

El factor de riesgo más importante para desarrollar cáncer de mama es la historia familiar. Como se ha descrito, el riesgo individual a padecer cáncer de mama aumenta según el número de familiares afectados¹⁷.

Mientras que estudios en gemelos indican que alrededor del 27% del cáncer de mama se debe a factores hereditarios, sólo entre un 5-10% de los casos de cáncer de mama tiene un fuerte componente hereditario^{16,15}.

Para identificar los factores genéticos asociados a la predisposición al cáncer de mama, los primeros estudios utilizaron análisis de ligamiento y clonación posicional en familias con varios individuos afectados; de esta manera se descubrieron genes de susceptibilidad de alta penetrancia (genes con variantes alélicas que confieren un alto riesgo individual) como *BRCA1* (*breast cancer 1*) y *BRCA2* (*breast cancer 2*)²⁷⁻²⁹.

El síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario causado por mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* es el desorden autosómico dominante más frecuente asociado al riesgo de padecer cáncer de mama y ovario. Aquellas mujeres portadoras de mutación en *BRCA1*, tienen un 70-80% de riesgo de desarrollar cáncer de mama y un 50% de padecer cáncer de ovario. Si la mujer es portadora de mutación en *BRCA2*, este riesgo disminuye a un 50-60% en el cáncer de mama y a un 30% de desarrollar cáncer de ovario.³⁰

La incidencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes. Por ejemplo, entre un 5.9%-12,4% de pacientes <35 años y entre un 11.6%-17% <40 años presentan mutación en *BRCA1* o *BRCA2* comparado con el 1.2-6.1% de todas las pacientes con cáncer de mama³¹.

Existen otros síndromes asociados a mutaciones en genes de alta penetrancia como el síndrome de Li-Fraumeni, causado por mutaciones en el gen *TP53* (*tumour protein 53*) con casos en edades tempranas de cáncer de mama (generalmente diagnosticado antes de los 45 años) y en los que además aparecen sarcomas, leucemias, linfomas y tumores cerebrales³². Mujeres portadoras de mutación en *TP53* presentan un riesgo del 84% de desarrollar cáncer de mama a los 45 años y se relaciona con mayor frecuencia a tumores del subtipo HER2+^{33,34}.

Mutaciones en *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) se encuentran en un 80% de los casos de síndrome de Cowden, un síndrome autosómico dominante caracterizado por múltiples hamartomas en piel, pecho, tiroides, tracto gastrointestinal, sistema nervioso y un mayor riesgo de padecer cáncer de mama, útero y de tiroides³⁵. El síndrome de Cowden se ha relacionado con una edad de aparición temprana del cáncer de mama³⁶, por lo tanto, las mujeres jóvenes portadoras de mutación en *PTEN* presentan un riesgo alto de desarrollar cáncer de mama, sugiriendo un manejo de estas pacientes similar al de las portadoras de mutación en los genes *BRCA1/2*³⁷.

El síndrome de carcinoma gástrico difuso se debe a mutaciones germinales en el gen *CDH1* (*cadherin 1*). En estas familias, las mujeres portadoras de mutación en *CDH1* presentan un riesgo acumulado de desarrollar cáncer de mama en un 60% a los 80 años. Estas mutaciones se encuentran en el subtipo lobulillar infiltrante o *in situ* y no en otros subtipos histopatológicos de cáncer de mama³⁸. Aquellos casos de cáncer de mama lobulillar infiltrante en mujeres jóvenes o una historia familiar de múltiples tumores de este subtipo a una edad temprana, incluso en ausencia de historia familiar de cáncer gástrico, se han asociado a mutaciones germinales en *CDH1* considerando de importancia su estudio en estos casos³³.

Por último, el síndrome de Peutz-Jeghers es un desorden autosómico dominante causado en la mayoría de los pacientes por mutaciones en el gen supresor de tumores *STK11* (*serine/threonine kinase 11*). Se caracteriza por la asociación de poliposis gastrointestinal, pigmentación mucocutánea y un mayor riesgo de desarrollar cáncer gastrointestinal, pancreático, de mama y tumores ginecológicos (útero, ovario y cervical)³⁹. El riesgo de desarrollar cáncer de mama en pacientes portadoras de mutación en *STK11* es similar al de las portadoras de mutación en *BRCA1/2* con una media de edad de aparición de 44 años⁴⁰.

Además de estos genes de alta penetrancia, los genes de penetrancia moderada incluyen la mutación c.1100delC en *CHEK2* (*checkpoint kinase 2*) y los genes *BRIP1* (*BRCA1 interacting protein 1*), *ATM* (*ataxia-telangiectasia mutated*) y *PALB2* (*partner and localizer of BRCA2*).

En resumen, estos genes de alta-moderada penetrancia explican menos del 25% del riesgo en el cáncer de mama hereditario, por lo que, en los últimos años, los estudios de

asociación genética de polimorfismos de único nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*), especialmente los estudios de tipo GWAS (*genome-wide association studies*) han tenido un gran éxito descubriendo variantes de baja penetrancia asociadas al riesgo de desarrollar cáncer de mama. Estas variantes por sí solas tienen un efecto individual modesto, pero el efecto combinado de múltiples variantes genéticas pueden llegar a explicar hasta el 30% del riesgo en el cáncer de mama hereditario⁴¹.

Estas variantes pueden encontrarse en distintas vías de señalización y mecanismos de carcinogénesis que en última instancia pueden contribuir al desarrollo del cáncer de mama.

3.1 Variantes alélicas en genes relacionados con la reparación al daño del DNA

El resultado producido por daño al DNA es diverso y desfavorable para la integridad celular; afectando al metabolismo del DNA, produciendo parada del ciclo celular o la propia muerte celular. Los efectos a largo plazo cursan con mutaciones irreversibles que contribuyen a la oncogénesis.

La reparación del daño al DNA radica en la existencia de mecanismos complejos en la célula que vigilan la integridad del DNA activando vías de reparación, básicamente cuando ocurren errores durante la replicación celular. Este daño al DNA puede deberse a agentes endógenos como la producción de radicales libres de oxígeno o exógenos como la radiación ionizante o ultravioleta⁴².

Existen cinco mecanismos de reparación del daño al DNA: reparación por escisión de nucleótidos (NER, *nucleotide excision repair*), reparación por escisión de bases (BER, *base excision repair*), síntesis de translesión (TLS, *translesion synthesis*), reparación de roturas de doble cadena (DSBs, *double strand breaks*) que engloba a su vez la reparación por recombinación homóloga (HR, *homologous repair*) y unión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end joining repair*), y el mecanismo reparador de emparejamientos erróneos (MMR, *mismatch repair*)⁴³. (Figura 1)

Diversas variantes alélicas en genes de reparación al daño del DNA han demostrado contribuir incrementando el riesgo de padecer cáncer debido a su papel crucial en el mantenimiento de la estabilidad genómica^{44,45}.

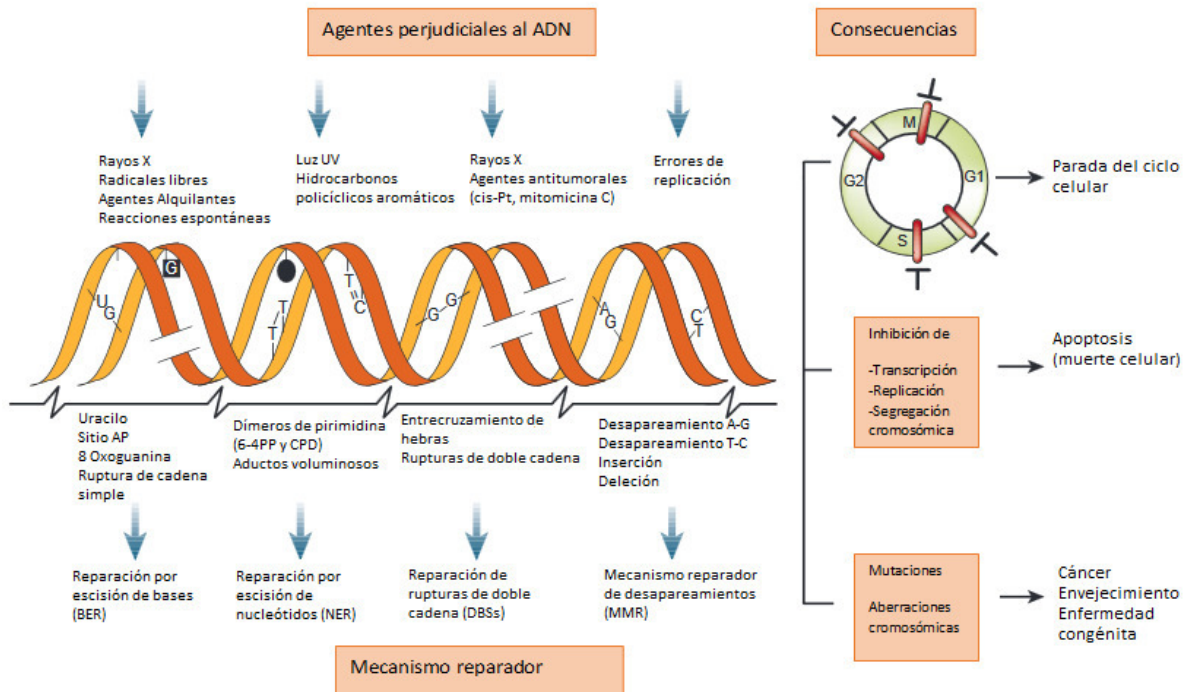


Figura 1. Daño al DNA, mecanismos reparadores y consecuencias. Modificado de Hoejmarkers y colaboradores³⁵.

3.1.1 Reparación de roturas de doble cadena (DSBs)

Las DSBs constituyen una gran amenaza para la viabilidad celular y la estabilidad genómica. Pueden producirse por la acción de diversos agentes exógenos como la radiación ionizante, luz UV o algunos agentes antitumorales o de forma natural como por ejemplo en la meiosis. La reparación ineficaz de estas DBS resulta en muerte celular o grandes reordenamientos cromosómicos que favorecen la inestabilidad genómica y la transformación neoplásica⁴⁶.

El gen *BRCA1* fue localizado en el cromosoma 17 gracias a estudios de ligamiento y, posteriormente, clonado en 1994 utilizando familias con múltiples casos de cáncer en mujeres jóvenes²⁷. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21.31) y consta de 24 exones que codifican una proteína de 1863 aminoácidos. Presenta distintos dominios estructurales entre los que destacan los localizados en el extremo amino terminal que contiene un dominio RING de unión a *BARD1* (*BRCA1-associated RING domain protein 1*), la región central que es fosforilada por ATM, importante en el papel mediador de *BRCA1* en la activación del punto de control del ciclo celular en las fases G2/M y S, y en el extremo carboxilo terminal se localizan un dominio *coiled-coil* de unión a *PALB2* y un dominio BRCT de unión a diversas proteínas⁴⁷⁻⁴⁹. (Figura 2a)

El gen *BRCA2* fue descubierto años más tarde para explicar la ausencia de mutaciones en *BRCA1* en familias de alto riesgo y con casos de cáncer de mama en varón²⁹. El gen *BRCA2* se localiza en el brazo largo del cromosoma 13 (13q13.1) y consta de 27 exones que codifican una proteína de 3418 aminoácidos con diferentes dominios funcionales. Entre estos elementos estructurales son clave el extremo amino terminal de unión a PALB2, las repeticiones BRC (ocho repeticiones conservadas de 35 aminoácidos para unirse a RAD51), un dominio de unión al DNA y el extremo carboxilo terminal que también interacciona con RAD51. (Figura 2b)

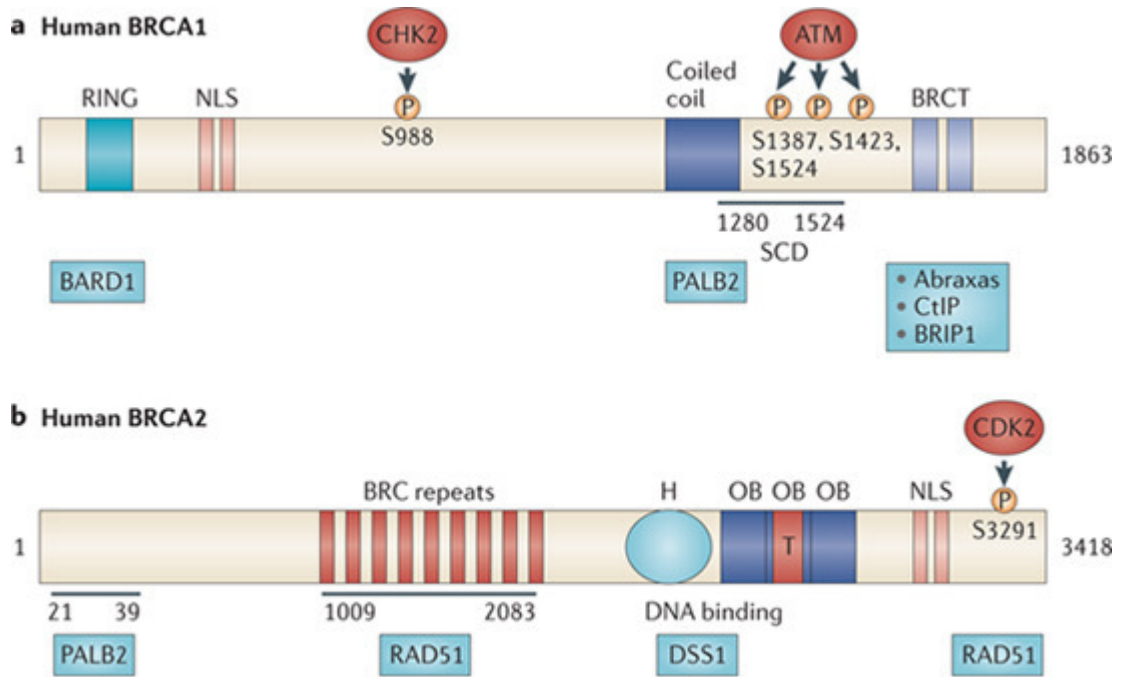


Figura 2. Esquema de los dominios funcionales de BRCA1 y BRCA2 y proteínas a las que se unen los mismos. Modificado de Roy y colaboradores⁵⁰.

Ambos genes se encuentran expresados de forma ubicua con niveles más altos en testículos, ovario y timo. A diferencia de la mayoría de los genes supresores tumorales, están poco conservados entre especies³⁵.

Las proteínas codificadas por los genes *BRCA1/2* actúan como sensores del daño al DNA e intervienen en su reparación. Pertenecen a la familia de los genes supresores de tumores, ya que su inactivación conduce a la acumulación de defecto genéticos y, finalmente, a la inestabilidad genética. Ambos juegan papeles importantes en la reparación del daño al DNA a través de la reparación de rupturas de doble cadena.

Las DSBs se consideran las lesiones al DNA más citotóxicas, ya que una única lesión de este tipo sin reparar resulta en muerte celular. Además, las DSBs generan grandes reordenamientos genómicos incluyendo pérdidas de segmentos y translocaciones cromosómicas⁵¹.

Existen dos mecanismos de reparación de roturas de doble cadena: la recombinación homóloga (HR) y la recombinación no homóloga (NHEJ). El tipo de mecanismo que actuará dependerá de la fase del ciclo celular, del tipo de daño que origine la rotura o de los niveles celulares de los componentes de cada ruta, aunque ambas vías pueden cooperar y funcionar simultáneamente⁵².

Las proteínas codificadas por los genes implicados en la susceptibilidad al cáncer de mama y ovario hereditario tienen papeles importantes en el proceso de reparación del DNA por HR. En las fases iniciales de la HR, la lesión en la doble cadena de DNA es reconocida por ATM y ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3 related*), quinasas que fosforilan CHEK2, p53, BRCA1 Y γ H2AX (*H2A histone family, member X*). BRCA1, acompañado por BARD1 y BRIP1, organiza al resto de proteínas en el sitio de reparación. El complejo MRN, que consiste en MRE11 (*mismatch repair endonuclease 11*), RAD50 y NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*) corta el DNA dejando extremos 3' de DNA de cadena sencilla que van a ser recubiertos por RPA (*replication protein A*) y protege al DNA de ser cortado por nucleasas y la formación de horquillas. En paralelo, BRCA1 influye en la acumulación de PALB2 lo que promueve la introducción de BRCA2 a la DSB.

En este punto cumple un papel crucial BRCA2 estimulando el desplazamiento de RPA y de la recombinasa RAD51 al DNA de cadena sencilla. BRCA2 se une a RAD51 a través de su extremo C-terminal y sus repeticiones BRC y transporta a RAD51 al DNA cubierto por RPA con la ayuda de RAD51B, RAD51C y RAD51D.

RAD51 forma un filamento nucleoproteico en el DNA de cadena sencilla y cataliza la invasión de la secuencia homóloga, iniciando un intercambio de hebras entre las moléculas de DNA pareadas denominado intermediario de Holliday. A medida que el DNA se va sintetizando, la ramificación de las cadenas va migrando originando una región de DNA heterodúplex formado por DNA de doble cadena de distinta procedencia. Por último, el complejo BLAP75/BLM/TopoisomerasaIII α o la Resolvasa A resuelven el heterodúplex generando productos con o sin entrecruzamiento^{51,53-58}. (Figura 3)

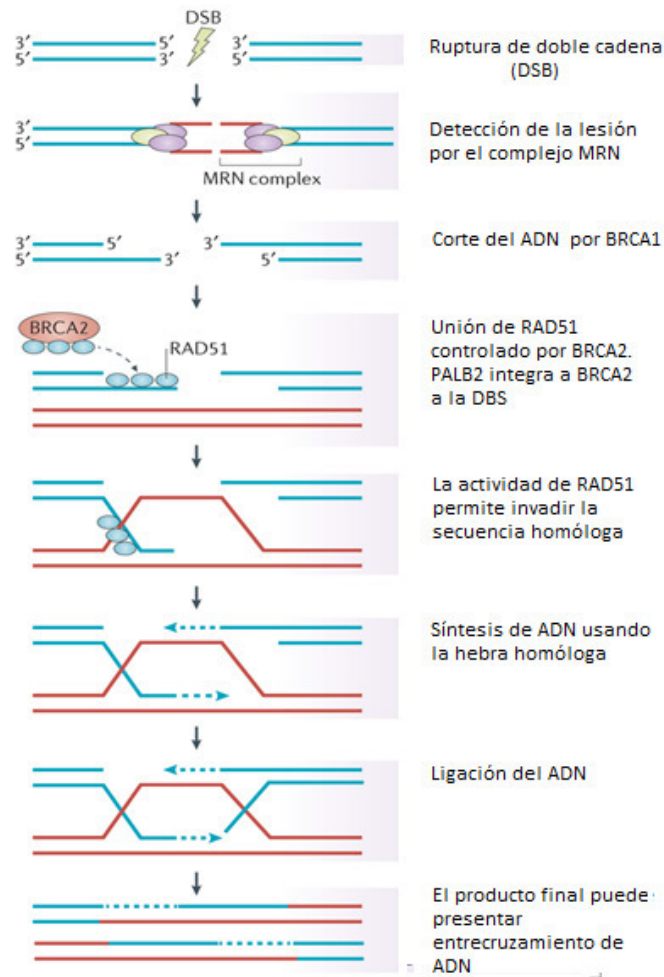


Figura 3. Esquema de reparación de DSB por recombinación homóloga.

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, *linkage disequilibrium*) 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 más de 120 SNPs, entre los cuales, se encuentran los SNPs, rs16941 (c.3232 A>G; p.Glu1038Gly), rs16942 (c.3667 A>G; p.Lys1183Arg) y rs799917 (c.2731C>T; p.Pro871Leu)⁵⁹⁻⁶². La nomenclatura anterior es la empleada en la base de datos BIC (*Breast Cancer Information Core*)

Las tres variantes indicadas forman uno de los múltiples haplotipos existentes en *BRCA1*. La presencia de estas variantes con cambio de sentido podría alterar la función o la estabilidad de la proteína *BRCA1*; sin embargo, estudios previos utilizando herramientas *in silico* no han podido concretar la patogenicidad de estas variantes que se encuentran descritas en el BIC como variantes sin importancia clínica significativa^{63,64}.

El polimorfismo rs16941, se ha asociado previamente a un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de próstata y carcinoma papilar de tiroides⁶⁵. El alelo G de este polimorfismo

se ha relacionado con un aumento de susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama en pacientes premenopáusicas que presentan un mayor hábito tabáquico y mayor índice de masa corporal⁶⁶.

El polimorfismo rs16942 se ha relacionado con pacientes portadoras de mutación en *BRCA1*; esta asociación se limita a mujeres portadoras de la variante en el alelo no mutado de *BRCA1*. También se ha asociado con la expresión de *BRCA1*, variando la cantidad de *BRCA1* biológicamente activo en distintos tipos celulares⁵⁹.

El polimorfismo rs799917, se ha incluido en diversos haplotipos de *BRCA1* estando asociado a un leve incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama esporádico⁶⁷, aunque en un reciente meta-análisis no se ha encontrado asociación entre este polimorfismo y el riesgo de desarrollar cáncer de mama⁶⁸. Otros estudios lo han relacionado con susceptibilidad a desarrollar cáncer gástrico⁶⁹ y carcinoma escamoso de esófago⁷⁰.

Los estudios iniciales acerca de los haplotipos del gen *BRCA1* llegaron a la conclusión de que en algunos casos (polimorfismo rs799917) existía una distinta distribución genotípica de los SNPs entre los grupos paciente y control, aunque este hecho no parece ser suficiente para que exista un sustancial incremento del riesgo de padecer cáncer de mama^{60,61}.

3.1.2 Sistema de reparación de emparejamientos erróneos (MMR)

La principal función de este sistema de reparación es eliminar los apareamientos erróneos entre bases y los bucles generados por pequeñas inserciones o deleciones que aparecen como consecuencia de errores durante la replicación del DNA y escapan a la función de corrección de la DNA polimerasa. También presentan otras funciones relacionadas con la estabilidad genómica, la recombinación genética o participando en los pasos iniciales de respuestas apoptóticas a distintos daños al DNA^{71,72}.

Los primeros estudios de los genes del MMR se desarrollaron en *Escherichia coli* y revelaron que el proceso de reparación comienza con la unión de la proteína MutS al DNA alterado. MutS (*Mutator S*) recluta a MutL y estimula la actividad endonucleolítica de MutH. MutH dirige el proceso de reparación a la nueva hebra sintetizada ya que distingue la hebra madre de la hija a través de la metilación parcial transitoria de secuencias GATC que se da segundos después de la replicación. MutH genera un corte en el GATC sin metilar más cercano al error a corregir y se produce la unión de una helicasa (UvrD) y algunas exonucleasas que digieren la hebra que contiene el error. El hueco generado en el DNA es finalmente reparado por una polimerasa III y una ligasa que restauran el error a su genotipo parenteral intacto⁷³.

Este es un mecanismo altamente conservado con grandes semejanzas al sistema MMR en humanos. MutS y MutL funcionan en las células humanas como heterodímeros teniendo las formas MutS α (MSH2 (*MutS protein homolog 2*)-MSH6) y MutS β (MSH2-MSH3) necesarios para el reconocimiento de la secuencia a reparar en el DNA siendo MutS α más abundante y activo. MutL α (MLH1(*MutL homolog 1*)-PMS2 (*PMS1 homolog 2*), MutL β (MLH1-PMS1) y MutL γ (MLH1-MLH3) son los tres complejos homólogos a MutL de *E.coli*, siendo MutL α el más activo en humanos y el que tiene el papel principal en la reparación post-replicación^{74,75}.

El sistema MMR en células humanas no presenta MutH a diferencia de las células procariotas, ya que la función que desempeña MutH parece estar integrada en los complejos MutL α y MutL γ , mientras que el complejo MutL β carece de actividad endonucleasa ⁷⁶.

El proceso en células humanas sería de la siguiente manera: la lesión en el DNA es reconocida por uno de los homólogos MutS que se une al DNA y favorece la unión de MutL α , que actúa como endonucleasa en un proceso bidireccional (sentido 3'-5' o 5'-3') produciendo pequeños cortes en la hebra de DNA en presencia de MutS, PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) y RFC (*Replication factor C*) en un proceso dependiente de ATP (adenosín trifostato). Estas interrupciones en la hebra de DNA sirven como punto de entrada para que la exonucleasa Exo1 comience a degradar la cadena de DNA en sentido 5'-3'. Por último, la polimerasa δ junto con PCNA se encarga de la reparación de los fragmentos que se han escindido y la DNA ligasa I termina el proceso uniendo los extremos del fragmento sintetizado ^{75,77,78}. (Figura 4)

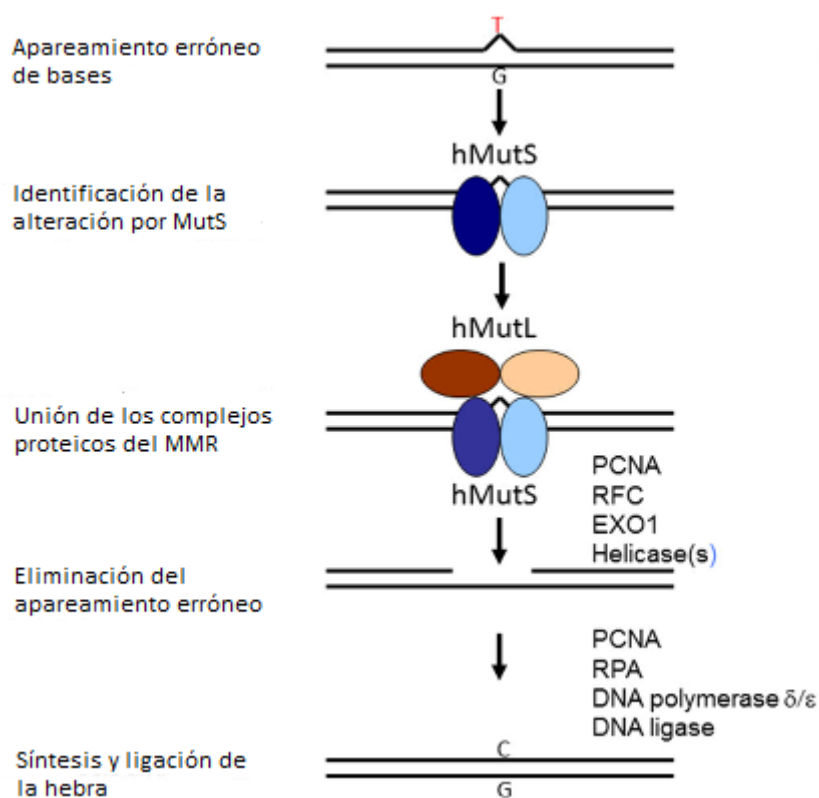


Figura 4. Sistema MMR en células humanas: MutS (MSH2-MSH6 o MSH3-MSH6) reconoce la alteración y permite la unión de MutL (MLH1-PMS2 o ML1-MLH3) y otras enzimas necesarias para la eliminación de la lesión y la obtención de la doble hélice corregida. Modificada de Peltomaki⁶².

La importancia del correcto funcionamiento del mecanismo MMR ha sido ampliamente estudiada *in vitro* e *in vivo*. Defectos en el sistema MMR en bacterias demostraron un alto nivel de mutaciones espontáneas que también se correlaciona en humanos, donde la predisposición a cáncer incrementa ampliamente ⁷⁹.

El síndrome de Lynch es la forma de cáncer colorrectal hereditario más común y aparece asociado a mutaciones germinales en al menos uno de los genes implicados en el MMR: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2*; siendo *MLH1* el gen más frecuentemente mutado en este síndrome⁸⁰. Estos defectos en el sistema de reparación de DNA tienden a ocurrir en zonas denominadas microsatélites, secuencias simples repetitivas repartidas por todo el genoma. La inestabilidad de microsatélites (IMS) es por lo tanto un evento temprano en la carcinogénesis ya que induce inestabilidad genómica y es un evento muy frecuente en los tumores asociados al síndrome de Lynch. La inactivación por cualquier mecanismo (delección, mutación o metilación) de alguno de estos genes del sistema MMR produce la incorrecta reparación de estos emparejamientos erróneos, acumulándose mutaciones en microsatélites que dará lugar a IMS. Además, diversos estudios han demostrado un mayor nivel de IMS en tumores, incluidos tumores mamarios, en comparación a tejido sano del mismo individuo, implicando un defecto de la ruta MMR en el cáncer de mama⁸¹.

La asociación entre los defectos en la ruta MMR y el cáncer de mama no ha sido del todo establecida. Diversos estudios han realizado análisis de variantes alélicas en los genes MMR sin encontrar una relación muy clara al respecto⁸²⁻⁸⁴. En un análisis realizado en población portuguesa, se reforzó la teoría de que polimorfismos en genes implicados en la ruta MMR, concretamente en los genes *MSH3*, *MLH3* y *MSH4*, podrían estar implicados en el riesgo de padecer cáncer de mama⁴⁴ mientras que esas mismas variantes no han presentado la misma relación en otros estudios⁸⁴.

El polimorfismo rs1800734 (c.-93 G>A) se localiza en el promotor del gen *MLH1* y la presencia del alelo mutado impide la correcta interacción de los factores de transcripción con el DNA, disminuyendo la expresión de *MLH1*, produciendo una disminución de la reparación post-replicativa del DNA y aumentando la IMS⁸⁵⁻⁸⁷, que es determinante en el riesgo de padecer cáncer colorrectal⁸⁸. Este polimorfismo se ha relacionado también con un aumento del riesgo de padecer cáncer de pulmón⁸⁹, ovario⁹⁰, cáncer gástrico⁹¹ y con un peor pronóstico en cáncer de cabeza y cuello⁹².

Su relación con el riesgo de padecer cáncer de mama no ha sido muy estudiada; en un análisis realizado por Kappil y colaboradores no se encontró relación entre este polimorfismo y el riesgo de padecer cáncer de mama⁸⁴, independientemente de la edad de aparición del tumor.

3.2 Variantes alélicas identificadas por GWAS

Los estudios de asociación, también denominados estudios de casos-control, son una herramienta muy útil y común para encontrar alelos de susceptibilidad de baja penetrancia y comparar las frecuencias de los genotipos o los alelos de esa variante frente a una población sana tomada como control del estudio. Los estudios de GWAS son estudios de asociación que escanean la mayor parte del genoma buscando variantes genéticas sin tener en cuenta previamente la localización o la función biológica de las variantes. Estos estudios son más sencillos y baratos que la secuenciación completa de genes candidatos y han permitido encontrar nuevos *loci* de susceptibilidad al cáncer de mama en rutas importantes, incluyendo la

regulación del ciclo celular, de la carcinogénesis, de la apoptosis, de la reparación del daño al DNA, del metabolismo tumoral y del metabolismo hormonal.^{93,94}

3.2.1 *FGFR2*

La familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (*FGFR*, *fibroblast growth factor receptor*) son receptores con actividad tirosina quinasa que participan en funciones de desarrollo, diferenciación, crecimiento y mecanismos de supervivencia. En humanos existen cinco receptores (FGR1-FGFR5) que ven transformadas sus funciones mediante amplificación génica, sobreexpresión proteica o mutaciones que generan una activación aberrante o una morfogénesis anormal tanto en enfermedades hereditarias como en neoplasias^{95,96}.

El gen *FGFR2* está ubicado en el cromosoma 10 y codifica una proteína implicada en el crecimiento de las células tumorales, la capacidad invasiva, la motilidad y la angiogénesis. La ruta de señalización FGF presenta gran importancia en la carcinogénesis mamaria en modelos animales, pero *FGFR2* en particular está involucrada en el desarrollo de la glándula mamaria y su carcinogénesis ya que se encuentra sobreexpresada o amplificada en hasta un 10% de los tumores de mama. Su expresión está relacionada con los tumores receptor de estrógenos (RE) positivos sugiriendo una acción hormono dependiente de este gen⁹⁷.

Diversos estudios de GWAS han asociado fuertemente cinco SNPs con el riesgo de padecer cáncer de mama y han identificado a *FGFR2* como un gen de susceptibilidad a este tipo de cáncer⁹⁸. Cuatro de estos SNPs se localizan en el intrón 2 de *FGFR2*, siendo el que se ha asociado con mayor importancia el polimorfismo rs2981582⁹⁹.

El alelo menos frecuente del polimorfismo rs2981582 (c.109+906 C>T) 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 %)^{98,99} 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 43% para los portadores de mutación en *BRCA2* y el genotipo CC al 63% en portadores del genotipo TT¹⁰⁰.

Este polimorfismo se ha asociado a un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama en población asiática y europea¹⁰¹ pero no en población afroamericana¹⁰².

Además, se ha relacionado el alelo T de este polimorfismo a tumores de subtipo luminal A¹⁰³, con un estado de los RE y de progesterona (RP) positivos^{97,104}, y de bajo grado^{105,106} pero no con aquellos del tipo basal-like^{103,107}.

No se ha encontrado relación con variables como la edad de la menarquia¹⁰⁸ y en cuanto a otras características clínicas, como el estado reproductivo de las pacientes, no se ha establecido una relación muy clara al respecto, habiendo estudios que no encuentran relación alguna¹⁰⁸ a aquellos que lo relacionan con el cáncer de mama en mujeres premenopáusicas en población asiática¹⁰⁹ o con cáncer de mama esporádico en mujeres posmenopáusicas europeas⁹⁸ y asiáticas¹¹⁰.

3.2.2 miR146

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA no codificante de unos 22 nucleótidos que cumplen su función al unirse por complementariedad al extremo 3' UTR de un RNA mensajero (RNAm) específico y, por lo tanto, regulan la expresión postranscripcional de ese gen. Esta unión puede ser parcial inhibiendo la traducción del RNAm o completa, dando como resultado su degradación. Se encuentran altamente conservados filogenéticamente e intervienen en la regulación de muchos procesos fisiológicos y patológicos, como diferenciación y proliferación celular, apoptosis, metabolismo lipídico etc¹¹¹.

La región crítica de unión del miRNA es conocida como *seed sequence* (las posiciones 2-7 del extremo 5' de un miRNA). De esta manera el miRNA se une al extremo 3'UTR del RNAm diana con una complementariedad perfecta Watson-Crick¹¹². Diversos estudios han demostrado que un único SNP en esta secuencia puede alterar la eficacia y la termodinámica de la unión afectando a la expresión génica y por lo tanto producir cáncer y otras enfermedades¹¹³.

El polimorfismo rs2910164 (n.60 G>C), que se localiza en el gen *MIR146*, es un cambio de una G>C localizado en la *seed sequence*¹¹⁴. Este miRNA se une al extremo 3'UTR del gen *BRCA1* regulando negativamente su expresión¹¹⁵.

El polimorfismo rs2910164 se ha estudiado ampliamente en distintos tipos de cáncer y diversos estudios encuentran que está asociado al riesgo de desarrollar cáncer de estómago¹¹⁶, papilar de tiroides¹¹⁷, hepatocelular¹¹⁸ y escamoso de esófago¹¹⁹.

Concretamente, el alelo G de este polimorfismo, se ha relacionado con un menor riesgo y mayor supervivencia en cáncer colorrectal¹²⁰ mientras que portadores del alelo C presentan un menor riesgo de desarrollar cancer escamoso de esófago, cervical, próstata y hepatocelular, concretamente en población asiática.

Esta controversia ocurre al relacionar también este polimorfismo con el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Shen y colaboradores relacionaron el alelo C con un desarrollo temprano de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama y ovario familiar independientemente de la presencia de mutaciones en *BRCA1/2*¹¹⁴. Este resultado ha sido confirmado por otros grupos en pacientes no portadoras de mutación en *BRCA1/2*¹²¹ y se ha relacionado con riesgo de padecer cáncer de mama en población caucásica en general¹²², mientras que otros grupos no han encontrado ninguna asociación entre este polimorfismo y el riesgo de desarrollar cáncer de mama¹²³⁻¹²⁶.

3.2.3 Región 8q24

La banda q24 del cromosoma 8 se encuentra frecuentemente alterada por amplificación, deleción, integración viral o translocaciones en distintos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama¹²⁷. Diversos estudios de GWAS han identificado esta región como un foco de SNPs asociados al cáncer de próstata, mama, colon, ovario, vejiga y leucemia linfocítica aguda¹²⁸⁻¹³¹ debido a la densidad, la fuerza y el alto grado de frecuencia alélica de

estos SNPs. Sin embargo, esta zona se ha considerado comúnmente un “desierto génico” debido a la ausencia de genes funcionales con la excepción del protooncogen *MYC*¹²⁹.

Actualmente, se han identificado 14 SNPs en esta región, incluyendo el polimorfismo rs13281615 (cambio de A>G), que se encuentra asociado al riesgo de padecer cáncer de mama independientemente de otras variables clínicas^{99,132–135}.

Diversos estudios coinciden en la identificación del genotipo homocigoto mutado de este polimorfismo asociado al cáncer de mama con un riesgo relativo 1.18 veces superior al de la población no portadora y relacionado con tumores mamarios RE+ y de bajo grado en población caucásica⁹⁷ pero con tumores de mayor grado y mayor índice proliferativo en población asiática¹³². El genotipo GG se ha asociado a cáncer de mama bilateral además de a un mayor número de casos afectados en la misma familia. No se ha podido relacionar con otras variables como la edad de diagnóstico¹⁰⁴, la edad de menarquia o el estado reproductivo¹⁰⁸, el estado mutacional de los genes *BRCA1* y *BRCA2*^{104,136,137}, la densidad mamaria¹³⁸ ni con enfermedad metastásica inflamatoria¹³⁹.

3.3 Variantes alélicas en la ruta de TP53

El gen *TP53*, conocido comúnmente como el “guardián del genoma”, se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica una proteína de 393 aminoácidos cuya actividad principal es actuar como factor de transcripción. Tiene un papel principal en el mantenimiento de la integridad del genoma y previene la proliferación de células con daño en el DNA, por lo tanto, es de gran importancia en la inactivación de genes que favorecen la carcinogénesis^{140,141}.

En células normales, la actividad de p53 es baja, pero en respuesta al daño al DNA y otras señales de estrés celular, los niveles de p53 se incrementan propiciando la activación y transcripción de cientos de genes relacionados con el ciclo celular, la senescencia, la apoptosis, el metabolismo y la diferenciación¹⁴². Este gen se encuentra mutado en la mitad de los cánceres esporádicos y en individuos con síndrome de Li-Fraumeni, lo que indica su importancia indiscutible como supresor tumoral¹⁴³.

Entre el 20-25% de las mutaciones somáticas encontradas en cáncer de mama son en el gen *TP53* y es el primero en la lista genes que se encuentran mutados en más del 10% de estos tumores¹⁴⁴. Estas observaciones proporcionan un fuerte razonamiento biológico a la hipótesis de que polimorfismos frecuentes en el gen *TP53* pueden variar la función de la proteína *wild type* y contribuir al riesgo de desarrollar cáncer en la población general.

El polimorfismo rs1042522 (c.215 G>C; p.Arg72Pro) se encuentra en una región rica en prolina en el exón 4 de *TP53*. Las variantes Arg72Arg y Arg72Pro presentan propiedades bioquímicas diferentes resultando en un cambio estructural en la proteína¹⁴⁵. El alelo Arg del polimorfismo es un inductor más eficiente de la apoptosis y puede incrementar la respuesta a quimioterapia pero es menos eficiente a la hora de activar la parada en ciclo celular y la reparación al daño del DNA^{146,147}.

El SNP Arg72Pro es una variable de baja penetrancia candidata como factor de riesgo del cáncer y su asociación con el cáncer de mama ha sido ampliamente estudiada. En algunos estudios, el alelo Pro se ha asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Otros estudios lo encuentran asociado a un riesgo menor^{151,152}, aunque la mayoría no lo relacionan con el riesgo de desarrollar cáncer de mama¹⁵³⁻¹⁵⁸. Tampoco se ha relacionado con pacientes portadoras de mutación en *BRCA1/2*, con la edad de diagnóstico, el estadio tumoral^{159,160} o la historia familiar¹⁶¹.

Se ha comprobado que el genotipo Pro/Pro está asociado a peores expectativas de supervivencia¹⁵⁸ y de tiempo libre de enfermedad, pudiendo ser empleado el genotipo Pro/Pro como un marcador pronóstico independiente en cáncer de mama¹⁶². El alelo Pro se ha relacionado también con un mayor desarrollo de telangiectasias después de tratamiento con radioterapia¹⁶³.

Existen varios mecanismos que mantienen p53 bajo control. Probablemente la interacción más importante de p53 fue descubierta en 1992 cuando se demostró que la proteína MDM2 (*murine doble minute 2*) se unía a p53 e inhibía su actividad bioquímica¹⁶⁴. En condiciones normales, MDM2 interacciona con p53 inhibiendo su actividad transcripcional y, además, MDM2 es una ubiquitina ligasa E3 que ubiquitina directamente a p53 promoviendo su exportación nuclear y marcándolo para su posterior degradación en el proteosoma¹⁶⁵. Existe un mecanismo de control negativo entre ambas proteínas muy importante, de manera que p53 activa la transcripción de MDM2; este aumento en la expresión de MDM2 produce una disminución en los niveles y una inactivación de p53 que genera un descenso en la cantidad de MDM2 y la transactivación de p53^{166,167}. (Figura 5)

Por ello, un mecanismo muy común por el que las células cancerígenas anulan p53 es mediante la sobreexpresión de MDM2, como se ha observado en distintos tipos tumorales. Esta sobreexpresión está además asociada a una aceleración de la progresión tumoral y a falta de respuesta terapéutica¹⁶⁸.

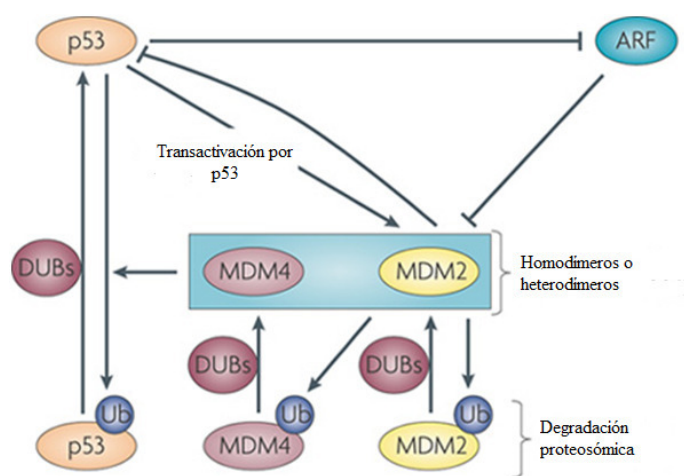


Figura 5. Mecanismo de regulación entre p53-MDM2. En células sanas, p53 incrementa la transcripción de MDM2; MDM2 inhibe la función de p53 modulando su actividad transcripcional haciendo que no interaccione con el resto de la maquinaria transcripcional y también forma un complejo heterodimérico con MDM4 que promueve la degradación de p53. Modificado de Brown y colaboradores¹⁵³.

El polimorfismo rs2279744 (c.-309 T>G) se encuentra en la zona promotora del gen *MDM2*. En estudios realizados en líneas celulares, aquellas portadoras del genotipo GG presentaban mayores niveles de actividad transcripcional de *MDM2*, lo que disminuía la respuesta apoptótica de p53¹⁶⁹.

El alelo G del polimorfismo se ha visto implicado en el desarrollo temprano del síndrome de Li-Fraumeni¹⁷⁰, en cáncer de mama esporádico y en pacientes con tumores de tipo RE+¹⁷¹. Aunque estos datos se encuentran respaldados por estudios con ratones *Mdm2*^{SNP309G/G} más propensos a desarrollar tumores que los ratones *Mdm2*^{SNP309T/T}, los estudios caso-control en humanos generan resultados variables según el grupo étnico estudiado¹⁷². Así, no presenta asociación con el riesgo de desarrollar cáncer de mama en población caucásica pero sí asiática¹⁷³⁻¹⁷⁵. También se ha relacionado con una disminución en la edad del diagnóstico¹⁷⁶ pero no con un riesgo en cáncer de mama en mujeres jóvenes¹⁷⁷. No se ha encontrado asociación entre pacientes portadoras de mutación en *BRCA1/2* y este polimorfismo¹⁵⁹, aunque sí se relacionaron en estudios previos en población ashkenazi¹⁷⁸. También se ha intentado relacionar el genotipo GG con una variación en la respuesta al tratamiento con epirrubicina o paclitaxel, encontrando relación en la supervivencia a largo plazo de las pacientes tratadas con estos fármacos¹⁷⁹.

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 tumor¹⁸⁰.

Existen estudios del efecto combinado de ambos polimorfismos y se ha relacionado con un peor pronóstico¹⁸¹ y una disminución en la edad de diagnóstico¹⁸², aunque la mayoría de los estudios no encuentran una asociación entre ambos polimorfismos^{156,157,159,183}.

3.4 Variantes alélicas relacionadas con la actividad telomerasa

El final de los cromosomas está formado por los telómeros, estructuras de cromatina especiales que son esenciales para proteger los cromosomas de la degradación y la recombinación, evitando que esta región sea reconocida como una DSB que debe ser reparada. En vertebrados, están formados por repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG, un saliente de cadena sencilla rico en G (hebra G) y un complejo de proteínas específicas asociadas^{184,185}. Esta hebra G se dobla formando una estructura "T-loop" que previene que este final de los telómeros sea reconocido por la maquinaria de reparación del DNA¹⁸⁶.

Los telómeros se van acortando con la edad y son necesarios para el mantenimiento de la longitud del cromosoma, ya que la DNA polimerasa no es capaz de replicar el final de este DNA lineal¹⁸⁷. Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, las rutas de Rb y p53 se activan y las células entran en senescencia o apoptosis. Por lo tanto, la longitud telomérica se considera un reloj biológico mitótico limitando la proliferación celular con cada ciclo de división celular (límite de Hayflick)^{188,189}.

La telomerasa es un complejo enzimático ribonucleoproteico que replica el DNA de los extremos de los cromosomas eucariotas y permite el alargamiento de los telómeros. Está formado por dos moléculas esenciales: una transcriptasa reversa codificada por el gen *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*) y una molécula de RNA codificada por el gen *TERC* (*telomerase RNA component*). TERT reconoce el grupo 3'-OH del extremo de la hebra G y utiliza a TERC como molde en la síntesis de la secuencia TTAGGG¹⁹⁰. (Figura 6)

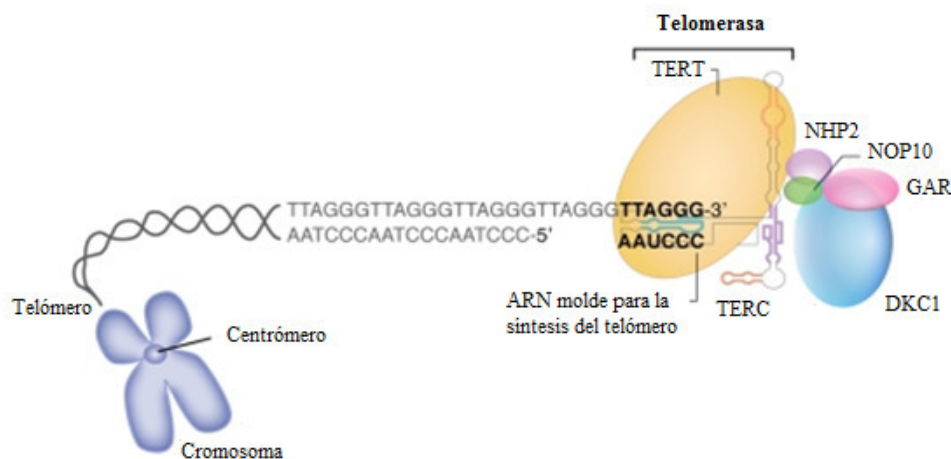


Figura 6. Estructura de la telomerasa y su función. TERT añade las repeticiones TTAGGG al extremo 3' del telómero utilizando TERC como molde. Otras proteínas, NHP2, GAR, NOP10, DKC1 (disquerina) también se unen a TERC y estabilizan el complejo. Modificado de Calado y colaboradores¹⁷⁷.

La telomerasa se encuentra silenciada en la mayoría de los tejidos humanos y sólo se expresa en un pequeño número de células proliferativas, como células germinales y células madre¹⁹¹. En las células cancerígenas, la actividad de la telomerasa se encuentra incrementada y es responsable de las múltiples divisiones y la tardía muerte celular o senescencia en estas células¹⁹². Se encuentra activada en un 90% de todos los tipos de cáncer y hasta en un 100% de los adenocarcinomas¹⁹³. La longitud telomérica también se ha relacionado con distintas enfermedades como diabetes, osteosarcoma, enfermedades vasculares y distintos tipos de cáncer¹⁹⁴.

Diversos estudios han relacionado SNPs de los genes *TERT* y *TERC* con la susceptibilidad al cáncer de mama y la longitud telomérica^{192,194-197}.

El polimorfismo rs2735940 se localiza en la región promotora de *TERT* (c.-1327 T>C) y se ha asociado a un acortamiento telomérico en linfocitos de sangre periférica, a un incremento al riesgo de desarrollar cáncer de mama en individuos con una historia familiar de cáncer de mama¹⁹⁸ y a desarrollar diversos tipos de cáncer en general¹⁹⁹.

El polimorfismo rs2293607 del gen *TERC* (c.-63 A>G) también se ha asociado a un acortamiento telomérico en linfocitos de sangre periférica²⁰⁰ pero con una mayor longitud telomérica y mayor riesgo en cáncer colorrectal²⁰¹.

3.5 Variantes alélicas relacionadas con la matriz extracelular

La proteína LOXL1 forma parte de la familia de enzimas lisil oxidasa. Esta familia está formada por cinco miembros, LOX y LOXL (*LOX like*) 1-4. Estas amino-oxidasas dependientes de cobre cumplen un papel importante en la biogénesis de las matrices de tejido conectivo mediante el entrecruzamiento de colágeno y elastina de la matriz extracelular.

La expresión de las proteínas de la familia LOX está muy controlada en el desarrollo normal; sin embargo, una actividad o expresión aberrante de estas proteínas está relacionado con enfermedades asociadas a la matriz extracelular y con algunos tipos de cáncer²⁰².

Se ha descrito un papel como supresor tumoral en esta familia de proteínas. *LOXL1* y *LOXL4* se encuentran silenciados por metilación del promotor en cáncer de vejiga resultando en una disminución de su expresión²⁰³.

Además de este papel como supresor tumoral, la familia LOX está ganando relevancia como promotor en la progresión tumoral y la metástasis haciendo de estas enzimas dianas claves en el tratamiento del cáncer metastásico²⁰⁴.

La condición de hipoxia en las células tumorales, está asociada clínicamente con metástasis y un peor pronóstico de la enfermedad. Las células tumorales de mama en hipoxia producen LOX, que promueve el cáncer de mama metastásico. Este papel de LOX fue inicialmente atribuido al remodelamiento de la matriz extracelular en el tumor primario, pero se ha comprobado que LOX puede remodelar la matriz extracelular a distancia. En el cáncer de mama, esta secreción de LOX a la circulación produce un entrecruzamiento del colágeno en los pulmones y finalmente la circulación de células cancerígenas al nicho metastásico²⁰⁵⁻²⁰⁷. (Figura 7)

Por lo tanto, la expresión de los miembros LOX está correlacionada con un incremento de la enfermedad metastásica y menor supervivencia²⁰².

La ausencia de LOXL1 está asociada con el síndrome pseudoexfoliativo, una patología de las fibras elásticas que degenera en fragilidad vascular y se asocia frecuentemente a glaucoma crónico de ángulo abierto severo y catarata. Diversos polimorfismos en el gen LOXL1, entre ellos los polimorfismos rs3825942 (c.485 G>A; p.Gly153Asp) y rs2165241 (c.-1613 C>T) han sido ampliamente estudiados en este síndrome²⁰⁸⁻²¹². También se han estudiado en la enfermedad de Alzheimer, no encontrando ninguna relación²¹³. El polimorfismo rs3825942 se ha relacionado con cambios en la función de la proteína en síndrome pseudoexfoliativo²¹⁴, por lo que es de interés su estudio en otras enfermedades.

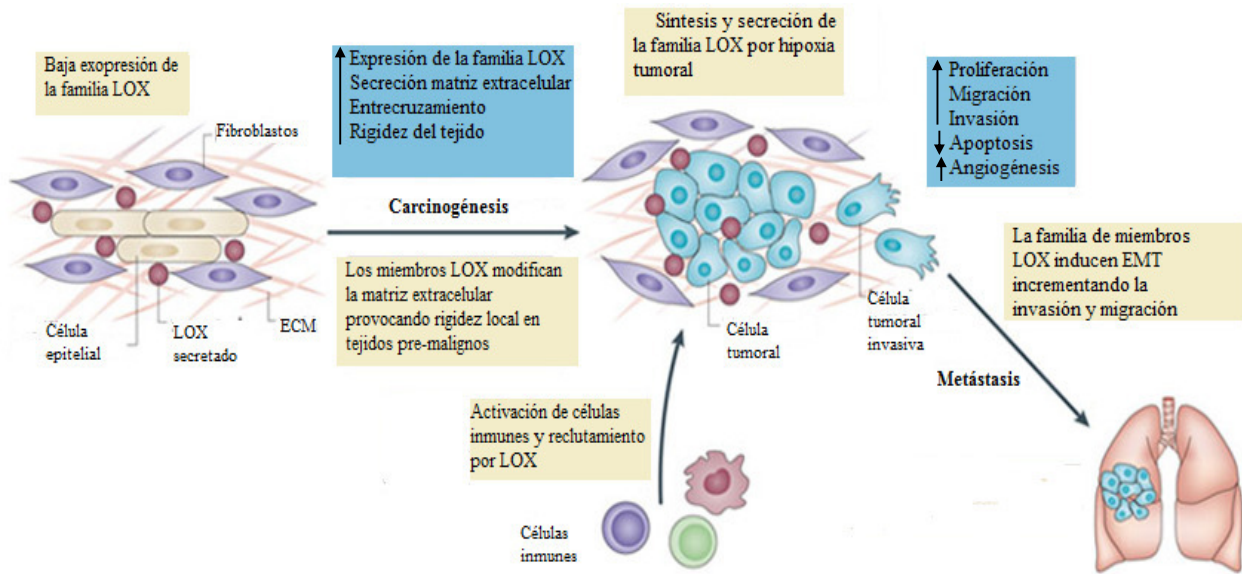


Figura 7. Efecto de la expresión de los miembros LOX y su relación con la carcinogénesis, la proliferación y la invasión celular. ECM, (*extracellular matrix*) matriz extracelular, EMT, (*epithelial mesenchyma transition*) transición epitelio-mesénquima. Modificado de Barker y colaboradores²⁰⁷.

4. ALTERACIONES CITOGENÉTICAS EN EL CÁNCER DE MAMA

Una manera de descubrir genes que presentan papeles importantes en el proceso de oncogénesis es identificando regiones genómicas que se encuentran alteradas recurrentemente en un tipo concreto de tumor. Además, la caracterización de distintas alteraciones citogenéticas ha proporcionado nueva información sobre mecanismos de carcinogénesis que podrían suponer la implementación de nuevos tratamientos que actúan sobre una alteración genética específica.

Las alteraciones en el número de copias (CNA, *copy number alteration*) hacen referencia a los cambios somáticos en el número de copias de un segmento cromosómico y se observan frecuentemente en el tejido tumoral. Estas alteraciones engloban desde deleciones y duplicaciones hasta inversiones y traslocaciones²¹⁵.

Las regiones cromosómicas en las que se encuentran las CNAs tienden a ser muy complejas, encontrando regiones de CNA que van desde unos cientos a millones de nucleótidos, produciendo ganancias en el material que conllevan un incremento de la actividad oncogénica o pérdidas que resultan en la inactivación de genes supresores tumorales, lo que se asocia al desarrollo y progresión del cáncer²¹⁶.

Además de las ganancias y pérdidas de material genómico, presentan gran importancia las regiones con desequilibrio alélico (AI, *allelic imbalance*) que hace referencia al desequilibrio entre la ratio 1:1 de los distintos alelos. La pérdida de heterocigosidad (LOH, *loss of heterozygosity*) es una forma muy común de desequilibrio alélico y conlleva la pérdida completa de un alelo en un determinado *locus*. La detección de regiones con LOH se han utilizado para identificar regiones que presentan genes supresores tumorales y caracterizar diferentes tipos tumorales, estadios y progresión de la enfermedad²¹⁷.

Distintas metodologías, como la secuenciación masiva (NGS, *Next Generation Sequencing*) y aCGH (*array-Comparative Genomic Hybridization*) se utilizan para detectar estas alteraciones. El CGH fue la primera herramienta eficaz en escanear el genoma completo en busca de variaciones en el número de copias del DNA²¹⁸. Esta técnica se basa en la hibridación fluorescente competitiva de cantidades iguales de un control o muestra de referencia normal y una muestra tumoral sobre un soporte con distintos fragmentos de DNA de interés.

Actualmente, el uso de nuevas tecnologías como los *microarrays* genómicos han conseguido una mayor resolución en el perfil genómico tumoral asociando CNAs con progresión y desarrollo del cáncer. Los *microarrays* genómicos miden la intensidad con la que se hibridan las sondas a una región específica del genoma y son capaces de detectar duplicaciones, deleciones e incluso LOH²¹⁹. Esta metodología se explicará con más detalle en el apartado de pacientes y métodos.

4.1 Inestabilidad genómica y cáncer de mama

La inestabilidad genómica hace referencia a la tendencia del genoma a adquirir mutaciones en procesos disfuncionales implicados en la reparación y el mantenimiento de genoma²²⁰. Los tumores de mama sufren múltiples reordenamientos genómicos durante su desarrollo, por lo que ha sido posible la caracterización mediante *arrays* genómicos de distintos *clusters* atendiendo a la inestabilidad genómica, que se han relacionado con la progresión de la enfermedad^{221,222}. Por ejemplo, Bonnet y colaboradores han desarrollado el índice de inestabilidad genómica (GII, *Genomic Instability Index*) y han relacionado unos GII más altos con *clusters* de tumores más alterados que presentan un mayor riesgo de recaída²²¹.

También se ha relacionado la inestabilidad genómica con posibles dianas terapéuticas; por ejemplo, el análisis del desequilibrio alélico en la zona telomérica (TAI, *telomeric allelic imbalance*), se ha relacionado con mayor inestabilidad genómica debida al mal funcionamiento de los sistemas de reparación del DNA y se ha asociado recientemente a una mejor respuesta a tratamiento con quimioterapia basada en platinos en pacientes con cáncer de mama triple negativo²²³.

4.2 Inestabilidad genómica por ruptura cromosómica: cromotripsis

La evolución de una célula sana a tumoral se produce por la acumulación de lesiones en el genoma. Además de mutaciones somáticas puntuales, estas lesiones incluyen CNAs y reordenamientos que pueden afectar tanto a genes supresores tumorales como a proto-oncogenes. Aunque ésta es la teoría más aceptada, hay razones para creer que la acumulación de lesiones en la célula podrían adquirirse de una sola vez.

Hick y colaboradores en el 2006 realizaron un estudio de las alteraciones en el genoma de tumores mamarios correlacionado con la progresión clínica de la enfermedad. Eligieron una población de mujeres con tumores diploides ya que, a pesar de presentar una progresión más favorable, muchos casos presentaban peor pronóstico. Uno de los patrones de alteración que encontraron estaba caracterizado por múltiples amplificaciones muy cercanas en la misma región que denominó como "*firestorm*". Estas amplificaciones, que aparecían con mayor

frecuencia en los cromosomas 8q y 17q, estaban relacionadas con una enfermedad más agresiva y una menor supervivencia²²⁴.

Esta alteración fue denominada posteriormente cromotripsis (del griego *chromo* de cromosoma y *thripsis* de “romperse en pedazos”) y hace referencia a un fenómeno de entre diez a cien reordenamientos que se localizan en una única región cromosómica y se originan en un único evento celular catastrófico²²⁵. La explicación más sencilla para explicar este reordenamiento, es que en algún punto del desarrollo cancerígeno distintos cromosomas o regiones cromosómicas se fragmentan y se vuelven a unir debido a los mecanismos de reparación del DNA²²⁶. (Figura 8)

La causa de su origen es muy debatida y varios mecanismos se han propuesto como la formación de micronúcleos, la condensación prematura de los cromosomas (PCC, *Premature Chromosome Condensation*) en el micronúcleo, BFB (*Breakage Fusión Bridge*) y disfunción telomérica, la radiación iónica o la “apoptosis abortiva”^{227,228}.

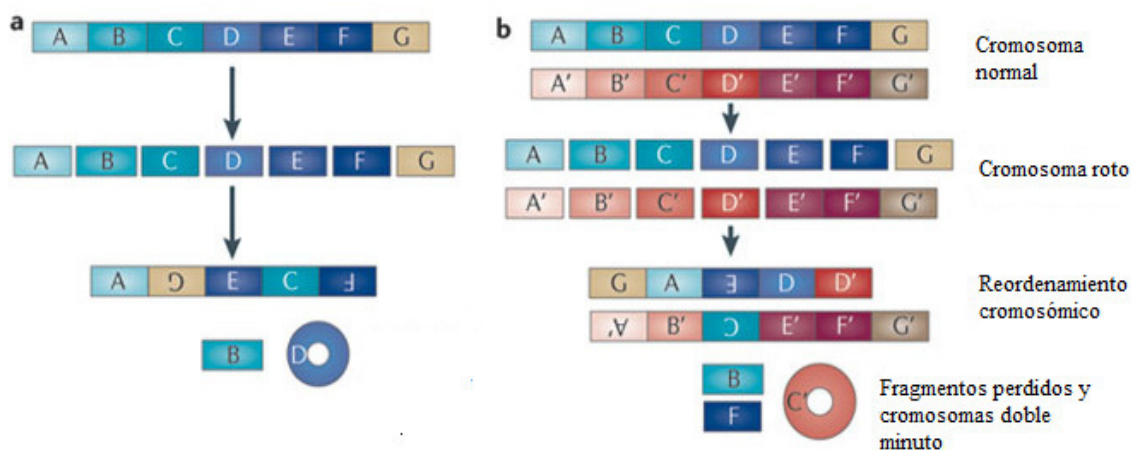


Figura 8. La cromotripsis puede ocurrir cuando los fragmentos de un único cromosoma se vuelven a unir (a) o involucrar dos cromosomas rotos (b). El resultado es un reordenamiento cromosómico complejo que genera fragmentos cromosómicos perdidos y cromosomas doble minutos (cromosomas muy pequeños que carecen de centrómero). Modificado de Forment y colaboradores²³⁸.

Esta característica se observa en un 2%–3% de los tumores, con una elevada prevalencia en cáncer de hueso, meduloblastoma infantil y neuroblastoma²²⁹. La prevalencia con la que se ha documentado varía mucho entre los distintos estudios ya que la metodología utilizada es diferente y tumores con gran inestabilidad genómica pueden presentar patrones de alteración cromosómica que pueden confundirse con cromotripsis²³⁰. Por ejemplo, en el cáncer de mama, la frecuencia varía entre un 11.1-61%^{231–233}. Es por ello que en algunos estudios prefieren utilizar el término CTLP (*Chromothripsis Like Pattern*) para hablar de estas alteraciones²³¹ además de desarrollar herramientas más fiables para detectarlas²³⁴.

4.3 Alteraciones genómicas en el cáncer de mama

El análisis genómico de muestras tumorales ha permitido identificar alteraciones recurrentes asociadas a un tipo de cáncer en concreto que, en algunos casos, han llevado a identificar genes causantes de la enfermedad y pueden sugerir aproximaciones terapéuticas específicas²³⁵.

Entre las alteraciones genómicas más comunes tanto en el cáncer de mama esporádico como en el hereditario están las pérdidas en 8p, 11q, 13q y 17p y ganancias en 1q, 8q, 17q y 20q^{236,237}. Las regiones más comunes con gran nivel de amplificación están en 17q12 (*ERBB2/HER2*), 11q13 (*CCND1*), 8q24 (*MYC*); 8p11-p12; 17q22-25; y 20q13.

Estas alteraciones difieren según el subtipo tumoral que se analice: 17q12 en tumores que sobreexpresan *HER2*, 20q13 en tumores luminal B, 11q13 en tumores luminal A y B y 13q34 en tumores *basal-like*²³⁸⁻²⁴⁰. Ésta última está asociada también a tumores de pacientes portadoras de mutación en *BRCA1*²⁴¹.

Los tumores triples negativos presentan un perfil genómico muy parecido al de portadoras de mutación en *BRCA1*, teniendo alteradas zonas comunes como 5q, 10p, 12p, 12q y 20q^{239,242}.

Los tumores de pacientes con mutación en *BRCA1/2* presentan, en general, una mayor inestabilidad genómica que los tumores esporádicos. En particular, presentan pérdida en 5q12-q14 más frecuentemente que los esporádicos y, contrariamente, amplificación del 16p con menor recurrencia. Estos tumores también presentan frecuentemente LOH en 13q (*BRCA2*) y 17q (*BRCA1*), de manera que permanece el alelo mutado y se pierde el alelo no mutado en el tumor. Esta pérdida de heterocigosidad en 17q también se ha descrito con mayor recurrencia en casos de cáncer de mama familiar que en tumores esporádicos

En el caso de tumores pertenecientes a pacientes con gran carga familiar, pero sin mutación en *BRCA1/2* (denominadas comúnmente BRCAX), las alteraciones encontradas con más frecuencia fueron ganancias en 8q, 19q, 19p, 20q, 1q, 17q y pérdidas de 8p, 11q y 13q, en comparación con aquellos casos esporádicos y sin antecedentes que mostraron ganancias en 1q, 8q, 17q, 16p, 19q y pérdidas de 11q, 8 p y 16q. Las alteraciones comunes se detectaron en menor frecuencia en el cáncer de mama esporádico que en los tumores de pacientes BRCAX²⁴³. También se ha descrito pérdida de 17p y 6q en casos de cáncer de mama familiar²⁴⁴.

En relación con las alteraciones en pacientes jóvenes, un estudio previo en menores de 35 años analizó por aCGH este subgrupo encontrando que las alteraciones más recurrentes eran similares a aquellas que presentaban las pacientes con cáncer de mama sin discriminar por la edad. Las alteraciones más específicas fueron pérdida de 8p22-p23 y ganancia de 8q23-8q24 relacionada con tumores con peor pronóstico²⁴⁵.

Las anomalías más frecuentes a nivel de LOH fueron las CN-LOH (LOH neutrales) y se localizan en los brazos de los cromosomas 14q23.1, 3p21.3, 5q33.2 y 12q24.12-q24.13. Las

regiones más afectadas por LOH asociados a CNAS fueron regiones comúnmente afectadas en cáncer de mama como 1q y 8q (LOH-ganancias) y 8p,16q, y 17 (LOH-pérdida)²⁴⁶.

5. LA AUTOFAGIA

La macroautofagia (que a partir de ahora se denominará simplemente autofagia) es un mecanismo homeostático que degrada proteínas de larga vida o dañadas y orgánulos, con lo que se amortigua el estrés metabólico en condiciones de privación de nutrientes mediante el reciclado de constituyentes intracelulares. Este proceso se lleva a cabo mediante una ruta en la que se fusionan el autofagosoma y el lisosoma, degradando el contenido incluido en su interior²⁴⁷.

La desregulación de la autofagia está asociada a diversas enfermedades, incluyendo miocardiopatías, enfermedades musculares, neurodegenerativas y cáncer. En las células cancerígenas presenta un rol dual, ya que puede promover o inhibir la carcinogénesis^{248,249}.

Este proceso ocurre a nivel basal en las células en condiciones ricas en nutrientes, manteniendo la homeostasis celular mediante la degradación de orgánulos dañados, agregados proteicos anormales etc. Se encuentra sobreexpresada en diferentes situaciones de estrés metabólico como privación de nutrientes y factores de crecimiento, estrés del retículo endoplasmático, presencia de citocinas, acumulación de calcio intracelular o hipoxia²⁵⁰.

5.1 El proceso de autofagia: etapas y proteínas implicadas

El proceso de autofagia se divide en distintas etapas: inducción mediante la formación del fagoforo o membrana de aislamiento, nucleación y expansión de la doble membrana seguido de la elongación y cierre del autofagosoma, la formación del autofagolisosoma y la degradación del material celular.

El principal regulador inicial de la autofagia es la serina/treonina quinasa mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*). mTOR es un importante represor de la autofagia y controla el crecimiento y la proliferación celular. En condiciones ricas en nutrientes, el complejo mTORC1; formado por mTOR, RPTOR (*regulatory associated protein of mTOR Complex 1*) y la proteína MLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*), se activa e inhibe la autofagia y la degradación proteica. En condiciones de falta de nutrientes, mTORC1 se inactiva permitiendo la fosforilación del complejo ULK1 (ULK1 es capaz de fosforilar a los otros componentes del complejo, ATG13 y FIP200/RB1CC1) que se dirige al sitio de ensamblaje del fagoforo e induce la nucleación²⁵¹⁻²⁵⁴.

La nucleación del autofagosoma es un proceso altamente regulado que está controlado por el complejo PI3K (fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa) de clase 3. Este complejo se forma con la interacción de las proteínas Vps34, p150, Beclin 1 y mATG14.

Beclin 1 es el ortólogo en mamíferos del gen *ATG6/VSP30* en levaduras y es muy importante en la formación del autofagosoma. Beclin1 interactúa con Vps34 que fosforila PI a PI3P (fosfatidilinositol 3-fosfato), reclutando proteínas al fagoforo para guiar la expansión de la membrana^{255,256}.

Una vez incluida la carga a degradar en las inmediaciones de la membrana, comienza su expansión, que está mediada por dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina:

- **Complejo ATG12–ATG5-ATG16L1:** ATG12 es activado por ATG7, en una reacción dependiente de ATP, y después es conjugado con ATG5 a través de ATG10. ATG16L1 interacciona con el conjugado ATG12-ATG5 formando un complejo dimérico. Este complejo se disocia del autofagosoma y vuelve al citoplasma cuando la elongación se completa^{251,253}.
- **Complejo LC3:** este segundo sistema de conjugación que contribuye a la elongación de la membrana se basa en la modificación de LC3 (ATG8 en levaduras). LC3 se sintetiza inicialmente como pro-LC3, que se procesa por la cisteína proteasa ATG4 para obtener su forma citosólica LC3-I. LC3-I se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) a través de ATG7 y ATG3 produciendo LC3 II (LC3 en forma lipidada). LC3-II se incorpora a la membrana en formación del autofagosoma y se mantiene unido hasta la fusión con el lisosoma^{257,258}. En mamíferos LC3 se expresa como tres isoformas, A, B y C siendo la isoforma B la más utilizada en los estudios de autofagia²⁵⁹

Por último, se produce la fusión del autofagosoma al lisosoma formando el autolisosoma para la posterior degradación lisosomal., En este proceso se requiere de las proteínas de la membrana lisosomal LAMP2, CLN3 y RAB7 ^{250,260,261}, el complejo PI3K de clase III ²⁶², así como del sistema ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) ²⁶³, proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor*) y el complejo HOPS (*homotypic fusion and vacuole protein sorting*). (Figura 9)

Esta fusión produce la ruptura de la membrana interna del autofagosoma y la degradación de la carga celular por enzimas hidrolíticas y el reciclaje de macromoléculas.

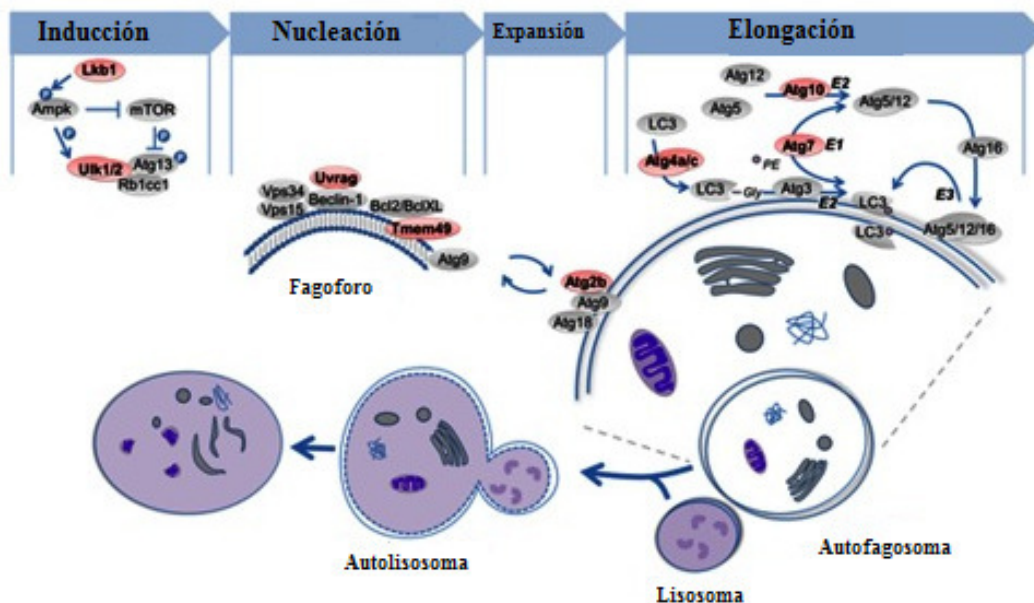


Figura 9. Esquema del proceso de autofagia mostrando las proteínas más importantes en las distintas etapas del proceso

5.2 Autofagia y cáncer

Como se ha indicado anteriormente, la autofagia es un mecanismo que se encuentra alterado en diversas enfermedades incluyendo el cáncer. Su papel en la enfermedad es complejo y dual y la explicación más aceptada al respecto sugiere que la autofagia puede actuar como supresor tumoral o como pro-tumorigénico dependiendo de múltiples factores, entre los que se incluyen el estadio tumoral, el contexto celular y el tejido de origen²⁶⁴.

5.2.1 Autofagia como supresor tumoral en cáncer de mama

Actualmente se piensa que la autofagia tiene un papel supresor en los primeros estadios del desarrollo tumoral y que defectos en el proceso contribuyen a su progresión. De hecho, se ha demostrado que células pre-malignas muestran niveles basales de autofagia más bajos que en células normales²⁶⁵.

BECN1 (beclin 1, autophagy related), que codifica la proteína Beclin 1, fue descubierto durante la clonación posicional de *BRCA1* como un gen con función desconocida y, más tarde, redescubierto en levaduras como una proteína que interacciona con Bcl-2. En condiciones normales BCL-2 inhibe a Beclin 1, mientras que, en condiciones de estrés, Beclin 1 se disocia de BCL-2, permitiendo la activación de Vps34 y estimulando consecuentemente la autofagia^{266,267}.

La relación entre Beclin 1 y Bcl-2 es importante ya que Bcl-2 se encuentra sobreexpresado en el 50-70% de los tumores, incluidos los mamarios. Se ha descrito una correlación inversa entre la expresión de Beclin 1 y BCL-2 y la expresión de Bcl-2 se correlaciona con el grado histológico, pleomorfismo nuclear, receptor de estrógenos y metástasis en cáncer de mama²⁶⁸.

El gen *BECN1* se encuentra en el cromosoma 17q21 en una región comúnmente delecionada en un 40-75% de los tumores de próstata, de ovario y mama. Muchas líneas tumorales de cáncer de mama, incluso poliploides, muestran la pérdida de algún alelo de beclin1 y tumores de mama en humanos muestran niveles más bajos de Beclin 1 en comparación con el tejido sano adyacente²⁶⁹. Por todo esto se consideró que Beclin 1 podía actuar como supresor tumoral, hipótesis que se confirmó en estudios con ratones *knockout*.

La cercanía entre *BECN1* y *BRCA1* complica el saber si el alto porcentaje de pérdida de la región en tumores de mama y ovario se debe a que la pérdida de *BRCA1* sería el primer evento en estos cánceres, sugiriendo que Beclin 1 como tal no actuaría como supresor tumoral²⁷⁰.

Otras proteínas de la maquinaria autofágica como ATG5 y ATG7 se han identificado como supresores tumorales pero con menor relevancia que Beclin 1^{265,269}. Asimismo, se han encontrado mutaciones de cambio de fase de lectura en los genes *ATG2B*, *ATG5*, *ATG9* y *ATG12*, en cáncer gástrico y colorrectal con MSI; mutaciones puntuales o deleciones en varios reguladores autofágicos y la deleción hemicigota de *BECN1* en un alto número de tumores humanos²⁷¹.

5.2.2 Autofagia como promotor tumoral en cáncer de mama

Debido a su papel en la supervivencia celular, se considera que la autofagia también actúa en la transformación oncogénica, otorgando a la célula con ciertas ventajas selectivas, en condiciones de estrés o hipoxia, tanto en el microambiente del tumor primario como en la progresión de la metástasis.

La delección de FIP200 en modelo de ratón con cáncer de mama produce múltiples defectos en la autofagia como acumulación de agregados proteicos ubiquitinados y de p62/SQSTM1, conversión deficiente de LC3 y un aumento de mitocondrias con morfología aberrante. No afecta a la apoptosis de las células tumorales pero sí disminuye su proliferación, metastatización e incremento la supervivencia en estos ratones²⁷².

5.3 Variables alélicas relacionadas con la autofagia

Aunque el estudio de la autofagia se conoce desde hace muchos años, el conocimiento del mecanismo molecular se describió por primera vez con el descubrimiento de los genes *ATGs* (*autophagy-related*) en experimentos con levaduras, y hasta la fecha se han identificado unos 32 genes *ATG*²⁷³.

La proteína ATG2B es fundamental en la formación del autofagosoma y la regulación de la morfología, el tamaño y la distribución de los agregados lipídicos²⁷⁴. El polimorfismo rs3759601 (c.4512C>G, p.Q1383E) se ha relacionado con la progresión y recurrencia en cáncer de vejiga después de tratamiento con terapia intravesical BCG (terapia del bacilo de Calmette-Guérin) debido a una disminución en la formación del autofagosoma para individuos portadores del genotipo CC²⁷⁵. También se ha estudiado previamente en tuberculosis y en enfermedad ósea de Paget no encontrando ninguna asociación^{276,277}.

La proteína ATG5 forma parte del complejo ATG12-ATG5-ATG16L necesario para la formación del autofagosoma. El polimorfismo rs2245214 (cambio en el intrón 6 de C>G) de *ATG5* ha sido estudiado previamente en cáncer de tiroides²⁷⁸, lupus eritematoso²⁷⁹, enfermedad ósea de Paget²⁷⁶ y melanoma de cabeza y cuello²⁸⁰. A excepción de ésta última, en todas ellas se relaciona el alelo G con un aumento de riesgo de padecer la enfermedad. También se ha estudiado en tuberculosis, aunque no se encontró ninguna relación con la susceptibilidad a padecer la enfermedad²⁷⁷.

La proteína ATG10 es una enzima tipo E2 que interacciona con ATG7 y permite la conjugación de ATG5 con ATG12 para que, posteriormente, éstas puedan formar el complejo ATG12-ATG5-ATG16L²⁸¹. El polimorfismo rs1864183 (c.929C>T p.T212M) se ha estudiado en cáncer de mama sugiriendo que esta variante podría estar relacionada con la susceptibilidad a padecer la enfermedad²⁸². Este polimorfismo ha sido estudiado también en pacientes con tuberculosis, aunque no se encontró ninguna relación²⁷⁷.

La proteína ATG16L1 es importante en la formación del complejo ATG12-ATG5-ATG16L para la expansión de la membrana del autofagosoma²⁸³. El polimorfismo rs2241880 (c.1153 A>G p.T300A) se encuentra en un dominio de unión a caspasa de manera que la variante

300Ala produce una activación de la caspasa3 lo que conlleva la degradación de ATG16L1 y por ello a la disminución de la autofagia²⁸⁴. Esta variante ha sido muy estudiada en la enfermedad de Crohn^{283,285} y se ha relacionado con la susceptibilidad a desarrollar enfermedad ósea de Paget²⁷⁶ y cáncer gástrico²⁸⁶. Recientemente se ha asociado con una disminución de metástasis cerebrales en pacientes con cáncer de pulmón²⁸⁷ y con un aumento de supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal²⁸⁸.

5.4 Tratamiento modulador de la autofagia

Hasta el momento la cloroquina ha sido usada como fármaco contra la malaria y en el tratamiento de la artritis reumatoide, aunque estudios preclínicos y clínicos demuestran que es un fármaco antitumoral prometedor²⁸⁹. Este fármaco es un agente alcalinizante del lumen lisosomal que bloquea la autofagia²⁹⁰; aumentando el pH del lisosoma, inhibiendo la actividad de las hidrolasas y del autofagolisosoma en última instancia.

El tratamiento con cloroquina disminuye el crecimiento tumoral, las metástasis y aumenta la supervivencia en modelo murino de cáncer de mama²⁹¹. Además, la mayoría de los tumores de mama suelen presentar mutaciones en reguladores importantes de la ruta de la autofagia como alteraciones en PI3K, p53, EGFR y Bcl-2.

Diversos ensayos clínicos se encuentran abiertos en la actualidad combinando cloroquina con quimio, radio o inmunoterapia. Específicamente se está probando la eficacia y seguridad de la cloroquina en pacientes con cáncer de mama metastásico resistentes a antraciclinas en combinación con fármacos de la familia de los taxanos o eotilonas²⁹².

Hipótesis y objetivos

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común en el mundo y el tipo de cáncer más frecuente en las mujeres. Aproximadamente el 7% de las mujeres con cáncer de mama se diagnostican antes de los 40 años. El diagnóstico de la enfermedad en mujeres jóvenes se relaciona con una menor supervivencia y peores resultados clínicos, caracterizados por fenotipos más agresivos del tumor⁷. Por estos motivos es por ello que se debe considerar el cáncer de mama en este subgrupo de la población como una entidad distinta de la enfermedad¹³.

El síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario causado por mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* es el desorden autosómico dominante más frecuente asociado al riesgo de padecer cáncer de mama y ovario¹⁰⁰, pero la incidencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* en este grupo de pacientes es muy bajo y explica un porcentaje muy pequeño de los casos³¹.

Por tanto, el cáncer de mama se considera una enfermedad compleja cuyo riesgo se puede determinar gracias a la contribución de distintas variantes alélicas en genes implicados en diversos procesos de la carcinogénesis mamaria^{94,99}.

El análisis genómico de muestras tumorales permite identificar alteraciones recurrentes asociadas a un tipo de cáncer en concreto²³⁵. El estudio de los perfiles tumorales de las pacientes jóvenes²²⁶ puede permitir la identificación de regiones con genes implicados en el desarrollo temprano de la enfermedad y de interés como posibles dianas terapéuticas.

La autofagia también desempeña un papel importante en el cáncer, siendo de especial interés las últimas aproximaciones terapéuticas con fármacos moduladores de la autofagia como la cloroquina en cáncer de mama^{289,292}.

Por todo ello, en nuestro trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Estudiar los genes de alta penetrancia *BRCA1/2* en mujeres con cáncer de mama menores de 40 años para determinar su incidencia.
2. Determinar si el estudio de variantes alélicas en genes relacionados con rutas de reparación del DNA, en genes identificados por estudios de GWAS, en genes de la ruta de TP53, en genes con función sobre la telomerasa, en genes implicados en la autofagia y en genes relacionados con la matriz extracelular podrían estar relacionados con el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes.
3. Caracterizar los perfiles genómicos de muestras tumorales de pacientes jóvenes y compararlos con los de tumores de cáncer de mama en mujeres mayores.
4. Analizar el efecto del tratamiento con cloroquina sobre el proceso de autofagia en líneas celulares de cáncer de mama de pacientes mayores y menores de 40 años.

Pacientes y métodos

1. PACIENTES

Para la realización de este trabajo se seleccionaron 230 pacientes con cáncer de mama menores de 40 años remitidas 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 2003 y 2013. En todos los casos se obtuvieron muestras de sangre periférica de los probandos previa información y bajo consentimiento informado para los estudios genéticos. La selección de los pacientes se basó en el cumplimiento de al menos el criterio de inclusión B del programa de Consejo Genético establecido por la Junta de Castilla y León. (Tabla 1)

Tabla 1. Criterios de inclusión en los programas de consejo genético de cáncer de mama y ovario hereditario en los años 2000-2016

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	
ÚNICO CASO	A.-cáncer de mama bilateral, 2 primarios ipsilaterales o mama y ovario en el mismo individuo
	B.-cáncer de mama u ovario diagnosticado antes de los 40 años
	C.-cáncer de mama en el varón
DOS CASOS	D.-2 cánceres de mama, uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años, (familiares de 1º grado)
	E.-cáncer de mama antes de los 50 y ovario en la misma familia (1º y 2º grado)
	F.-2 casos de cáncer de ovario a cualquier edad (1º y 2º grado)
TRES CASOS	G.-3 o más casos de cáncer de mama (2 en 1º grado) y/o ovario (1º y 2º grado), diagnosticados a cualquier edad.

Para la realización de los estudios de asociación de polimorfismos se analizaron como grupo control muestras de DNA de sangre periférica de 131 mujeres sanas mayores de 60 años que no tenían historia personal ni familiar de cáncer. En el caso de los polimorfismos en los genes *TP53*, *MDM2* y *BRCA1*, se utilizó como grupo control 116 mujeres sanas mayores de 60 años sin historial personal ni familiar de cáncer estudiadas previamente a este trabajo.

El análisis de anomalías genómicas mediante microarray cromosómico se realizó en 58 muestras tumorales en bloques FFPE (fijado en formol y embebido en parafina) procedentes del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Estas muestras se dividieron en tres grupos siguiendo las siguientes características (Tabla 2).

Tabla 2. Grupos de análisis de los tejidos parafinados

Características		Número de muestra
Pacientes portadoras de mutación germinal en <i>BRCA1/2</i>		12
Pacientes no portadoras de mutación germinal en <i>BRCA1/2</i>	sin antecedentes de CM en familiar de 1 y/o 2 grado	26
	con antecedentes de CM en familiar de 1 y/o 2 grado	20

Desde el departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca se obtuvieron los siguientes datos biológicos de los tumores de las pacientes de la provincia de Salamanca: expresión de receptor de estrógenos, expresión de receptor de progesterona y expresión de la proteína HER2. En función de los datos biológicos del tumor, los tumores de mama se clasificaron, en cuatro subtipos: luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo²⁹³. En total se obtuvieron estos datos de 177 pacientes con cáncer de mama y de 56 tumores en parafina. Además, en estos últimos también se utilizaron los datos de expresión de p53 y el factor de proliferación ki67. 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 o en aquellas muestras más antiguas en las que no se realizaba todavía el estudio de sobreexpresión de la proteína HER2. También se obtuvieron los datos de variables de seguimiento de la enfermedad en 57 de los tumores en bloques FFPE.

2. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de DNA se llevó a cabo en las muestras de sangre periférica, en las muestras de tejido tumoral en parafina y en líneas celulares.

2.1 Extracción de DNA a partir de sangre periférica

El DNA genómico de alto peso molecular fue extraído a partir de sangre periférica de los pacientes recogida en tubos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

Para la extracción de DNA a partir de sangre periférica, se aisló la interfase de células nucleadas mediante centrifugación repetida y lisis osmótica de los eritrocitos con $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ estéril. El botón celular, que contiene únicamente las células nucleadas, se resuspendió en tampón Fornace (0.25M Sacarosa, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM KCl, 5mM MgCl_2) y se centrifugó a 15000r.p.m. 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió nuevamente en tampón Fornace, al que se le añadió EDTA 10mM pH 8.0 para posibilitar la inactivación de las nucleasas, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K (ApliChem) para degradar las proteínas y SDS (dodecilsulfato sódico) a una concentración final del 1% para romper las membranas celulares. La mezcla se incubó a 55 $^\circ\text{C}$ durante 8-16 horas. Tras ello se procedió a la extracción y purificación del DNA tratándolo con una mezcla de fenol tamponado a pH 8.0 y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y se sometió a centrifugación para separar las fases. El DNA atrapado en la fase acuosa se limpió de otros residuos celulares mezclándolo con CIAA y centrifugándolo nuevamente para separar las fases. Tras esto, se añadió etanol absoluto frío a la fase acuosa para precipitar el DNA. Tras un lavado con etanol al 70%, finalmente se resuspendió en 200 μl $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ estéril.

2.2 Extracción de DNA a partir de tejido tumoral parafinado

En el caso del tejido tumoral parafinado, se realizaron 3-4 cortes de 10 μm de los bloques FFPE y se extrajo el DNA de la muestra utilizando el kit BiOstic[®] FFPE Tissue DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, California, USA)²⁹⁴ siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución final de la muestra se realizó en 40 μl $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ estéril.

2.3 Extracción de DNA a partir de líneas celulares

En el caso de las líneas celulares, las células se recogieron de las placas de cultivo usando 1.5ml del agente de disociación TrypLE™ 1X (Gibco), se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1200 r.p.m. tres minutos. El precipitado celular se resuspendió en tampón Fornace, EDTA, proteinasa K y SDS, siguiendo el mismo procedimiento que para la extracción de DNA a partir de sangre periférica. Se realizó la extracción de DNA tanto en líneas celulares sin tratar (usadas como control negativo) y tratadas con cloroquina 72 horas.

3. CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO

La concentración y el grado de contenido proteico de DNA se calcula tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, en un espectrofotómetro *NanoDrop*® 2000 (Thermo Fisher Scientific). El cociente entre las absorbancias A260/A280 permitió determinar el grado de pureza de las muestras, estando los valores adecuados comprendidos entre 1.8-2.0. Si en algún caso la relación se salía de ese margen se procedió a realizar una nueva purificación del DNA, ya que esto indicaría la presencia de contaminación por proteínas o solventes orgánicos si los valores son inferiores, mientras que valores superiores indicarían un exceso de RNA.

La concentración de DNA de los tejidos tumorales parafinados se midió con un fluorómetro *Qubit*® 3.0 (Life Technologies). La concentración de las muestras procede de la señal que emite una molécula fluorescente sólo cuando se encuentra unida al DNA, minimizando el efecto de contaminantes o de DNA o RNA degradado y obteniendo medidas más fiables al ser un método más específico que las mediciones de absorbancia en UV²⁹⁵.

Todas las muestras de DNA se almacenaron en tubos Eppendorf® a -20°C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como una posible contaminación.

4. ESTUDIO DE LOS GENES BRCA1 Y BRCA2

4.1 Amplificación de fragmentos de DNA 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 *BRCA1* y *BRCA2*, así como las zonas de unión intrón-exón mediante cebadores específicos que anillaban en la zona intrónica. La amplificación del exón 11 del gen *BRCA1*, los exones 10, 11 y 27 del gen *BRCA2*, debido a su gran tamaño, fueron amplificados en varios fragmentos ordenados alfabéticamente de 5' a 3'. Al contrario, la amplificación de los exones 5, 6 y 7 y el 23 y 24 de *BRCA2* se llevaron a cabo en un mismo fragmento por ser de pequeño tamaño tanto los exones como los intrones. El exón1 de ambos genes y el 4 de *BRCA1* no se analizaron por no ser codificantes.

Las reacciones de amplificación se llevaron a un volumen final de 13µl utilizando 5µL del sistema PCR Master Mix 2X (Promega) (22mM tris-HCL a pH 8.4, 55mM KCl, 1.65mM de MgCl₂, 220µM de dNTP, y 22U de Taq DNA polimerasa), 5µl de agua libre de nucleasas, 0.5µl de cada uno de los oligonucleótidos (*forward* y *reverse*) a 10ng/µL y 2µl de DNA molde a concentración de 100ng/ml. Como control negativo se preparó en paralelo un tubo de reacción con todos los componentes excepto DNA.

Los oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación de estos genes y los tamaños de los fragmentos se detallan en la siguiente tablas. (Tabla 3 y Tabla 4)

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de cada exón de *BRCA1* y tamaño del fragmento que generan.

BRCA1			
Exón	Cebador sentido	Cebador anti sentido	Tamaño amplificado
2	5'-GACGTTGTCATTAGTTCTTTGG-3'	5'-GGTCAATTCTGTTTCATTTC-3'	315 pb
3	5'-AACGAAGCTGAGGCCTTATG-3'	5'-TTGGATTTTCGTTCTCACTT-3'	308 pb
5	5'-CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG-3'	5'-ATGGTTTTATAGGAACGCTATG-3'	278 pb
6	5'-CTTATTTTAGTGCTCTTAAAAGG-3'	5'-GGTCTTATCACCACGTCATAG-3'	251 pb
7	5'-CACAAAGAGCATACATAGGG-3'	5'-AGGAGGACTGCTTCTAGCTG-3'	350 pb
8	5'-GGTGTCAAGTTTCTTCAGG-3'	5'-AATCCAGCAATTATTATTAATAC-3'	230 pb
9	5'-GAATATCTGTTTTCAACAAGTACA-3'	5'-TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA-3'	179 pb
10	5'-GATCTTGGTCATTTGACAGTTC-3'	5'-CCCAAATGGTCTTCAGAATA-3'	240 pb
11A	5'-AGTTGGTTGATTTCCACCTC-3'	5'-AGCCTCATGAGGATCACTGG-3'	739 pb
11B	5'-ATTTGCTCCGTTTTCAAATC-3'	5'-CGGCTAATTGTGCTCACTGT-3'	480 pb
11C	5'-CTGAAGTTAACAATGCACCTGG-5'	5'-TTCTTTAAGGACCCAGAGTGG-3'	584 pb
11D	5'-TCCAAGTACAGTGAGCACAATTA-3'	5'-AACAAGTGTGGGAGCAGGG-3'	633 pb
11E	5'-TTTGGCAGTTCAAAGACTCC-3'	5'-CTCTTGAAGGCTAGGATTGA-3'	620 pb
11F	5'-GCCAAAGTAGCTGATGTATTGG-3'	5'-ATTCATCACTTGACCATTCTGC-3'	423 pb
11G	5'-AGGGGCCAAGAAATTAGAGT-3'	5'-GTGCTCCAAAAGCATAAA-3'	564 pb
12	5'-GCGTTTATAGTCTGCTTTTACA-3'	5'-TGTCAGCAAACCTAAGAATGT-3'	227 pb
13	5'-AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA-3'	5'-TGTTGGAGCTAGGTCTTAC-3'	319 pb
14	5'-TTTGTGTATCATAGATTGATGC-3'	5'-AACAAAAGAAGTATCCTAGAGC-3'	387 pb
15	5'-CAGACTTCTAGGCTGTCTTG-3'	5'-GTGTTTGTCCAATACAGCAG-3'	378 pb
16	5'-AATTCTTAACAGAGACCAGAAC-3'	5'-AAAACCTTTCCAGAATGTTGT-3'	450 pb
17	5'-AGCTGTGTGCTAGAGGTAAGT-3'	5'-GTGGTTTTATGCAGCAGATG-3'	190 pb
18	5'-ATCCAGATTGATCTTGGGAG-3'	5'-CTCAGACTCAGCATCAGC-3'	312 pb
19	5'-ATCTCCGTGAAAAAGAGC-3'	5'-CATTGTTAAGGAAAGTGGAGCA-3'	208 pb
20	5'-ATATGACGTGTCTGCTCCAC-3'	5'-TGCAAAGGGGAGTGAATAC-3'	229 pb
21	5'-AAGCTCTCTTTTTGAAAGTC-3'	5'-GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT-3'	298 pb
22	5'-AGTGTAGGGTAGAGGGCTG-3'	5'-AGTCTTGCTCACAGGAGAGA-3'	207 pb
23	5'-CAGAGCAAGACCCTGTCTC-3'	5'-ACTGTGCTACTCAAGCACCA-3'	255 pb
24	5'-ATGAATTGACACTAATCTCTGC-3'	5'-GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA-3'	280 pb

Pacientes y métodos

Tabla 4: Secuencia de oligonucleótidos cebadores para la amplificación de cada exón de *BRCA2* y tamaño del fragmento que generan.

BRCA2			
Exón	Cebador sentido	Cebador anti sentido	Tamaño amplificado
2	5'-CTCAGTCACATAATAAGGAAT-3'	5'-ACACTCTGACGTACTGGGTTTT-3'	256 pb
3	5'-TCTGGGTCACAAATTTGTCTGTCA-3'	5'-TTCCTAGTTTGTAGTTCTCCCAGTC-3'	356 pb
4	5'-AGAATGCAAAATTTATAATCCAGAGTA-3'	5'-AATCAGATTCATCTTTATAGAACAAA-3'	249 pb
5,6,7	5'-AACAAATTTATATGAATGAGAATC-3'	5'-AACAGAAGTATTAGAGATGAC-3'	686 pb
8	5'-AATAGTAGATGTGCTTTTTGA-3'	5'-ACATATAGGACCAGGTTTAGAGAC-3'	285 pb
9	5'-CTAGTGATTTTAAACTATAATTTTTG-3'	5'-GTTCAACTAAACAGAGGACT-3'	164 pb
10A	5'-TATAAAATATTAATGTGCTTCTGTT-3'	5'-AAAGGGCTTCTGATTGCTAC-3'	374 pb
10B	5'-ATCTGAAGTGGAAACCAATGATAC-3'	5'-GTGGATATTAACCTGCATTCTTCAA-3'	681 pb
10E	5'-TATGTCCAAATTTAATTGATAAT-3'	5'-AAACACAGAAGGAATCGTCATC-3'	320 pb
11A	5'-GATGGTACTTTAATTTGTCACTTTG-3'	5'-TTTCATGATCATATAAAAGAC-3'	425 pb
11C	5'-CAAAAGTGGAAATACAGTGATAC-3'	5'-ATAATTTTCATTTAAAGCACATACAT-3'	254 pb
11D	5'-TCTAGAGGCAAAGAAATCATA-3'	5'-TCATTGTCTGAGAAAAGTTC-3'	305 pb
11E	5'-TTCAAAAATAACTGTCAATCC-3'	5'-CTGAAGCTACCTCCAAAAGTGTG-3'	430 pb
11G	5'-ACAAATGGGCAGGACTCTTAGG-3'	5'-GCTGCTGTCTACCTGACCAA-3'	566 pb
11I	5'-GATGCTGATCTTCATGTCATAA-3'	5'-AAAAAGTTAAATCTGACAAATCT-3'	688 pb
11M	5'-TTTATGAAGGAGGGAAACACTCA-3'	5'-CATTGATGGCTAAAAGTGGTG-3'	575 pb
11P	5'-TCATACAGCTAGCGGGAAAAA-3'	5'-AATGACTGAATAAGGGGACTGAT-3'	421 pb
11R	5'-GTCCTGCACTTGTACAC-3'	5'-GATTTTTGTCAATTTTCAGC-3'	243 pb
11S	5'-AACCAGAAAGAATAAATACT-3'	5'-ATTTTTGATTTATTCTCGTTGTT-3'	550 pb
11U	5'-AAGACATATTTACAGACAGT-3'	5'-TTGGGATATTAATGTTCTGGAGTA-3'	539 pb
11W	5'-AAAGTAACGAACATTCAGACCA-3'	5'-GTGAGACTTTGGTTCCTAAT-3'	468 pb
11Y	5'-TTCAACAAGACAAACAACAGT-3'	5'-AGCATACCAAGTCTACTGAATAAAC-3'	443 pb
12	5'-AGGTCATATTTGTTGTAAG-3'	5'-AGTGGCTCATGTCTGTAAT-3'	358 pb
13	5'-TAAAGCCTATAATTGTCTCA-3'	5'-CTTCTTAACGTTAGTGTCATT-3'	271 pb
14	5'-ATGTAGCAAATGAGGGTCTG-3'	5'-CAAAGGGGGAAAACCATCAG-3'	609 pb
15	5'-GGCCAGGGGTTGTGCTTTTT-3'	5'-AGGATACTAGTTAATGAAATA-3'	314 pb
16	5'-TTTGTTAAATTCAGTTTTGGTTT-3'	5'-AACACACAATCTTTTTGCATAGA-3'	330 pb
17	5'-CAGAGAATAGTTGTAGTTGTTGAA-3'	5'-AGAAACCTTAACCCATACTGC-3'	306 pb
18	5'-ATTCAGTTTTTATTCTCAGTTATTC-3'	5'-TTTAACTGAATCAATGACTG-3'	500pb
19	5'-AAGTGAATATTTTTAAGGCAGTT-3'	5'-TATATGGTAAGTTCAAGAAT-3'	249 pb
20	5'-CACTGTGCCTGGCCTGATAC-3'	5'-ATGTTAAATTCAAAGTCTCTA-3'	296 pb
21	5'-GGGTGTTTTATGCTTGGTTCT-3'	5'-CATTTCAACATATTCCTCCTG-3'	304 pb
22	5'-TTTTGTTGATGCTTTTTATTCT-3'	5'-AATCATTTTGTAGTAAGGTCAT-3'	314 pb
23-24	5'-ACTTCTCCATGTCATCTTCTCA-3'	5'-AGCTCCAATAATCATAAGA-3'	520 pb
25	5'-TAAAATTCATCTAACACATCTAT-3'	5'-ATTTCCCATTCCTCCATCT-3'	450 pb
26	5'-AAGGAAATACTTTGGAAACATAA-3'	5'-TTTACTAGGTATACAACAGAA-3'	299 pb
27A	5'-TAGGAGTTAGGGGAGGGAGACTGTGT-3'	5'-TTTTTAAATGGAGTCATCTGAGGAGA-3'	462 pb
27B	5'-AAGGCATTCAGCCACCAAGGAGT-3'	5'-GTGGTTTGAATTATATCCAGTCTT-3'	450 pb

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador (Life Technologies-Invitrogen) utilizando un programa de PCR convencional adaptado a la temperatura de anillamiento de la pareja de oligonucleótidos. (Figura 10 y Figura 11)

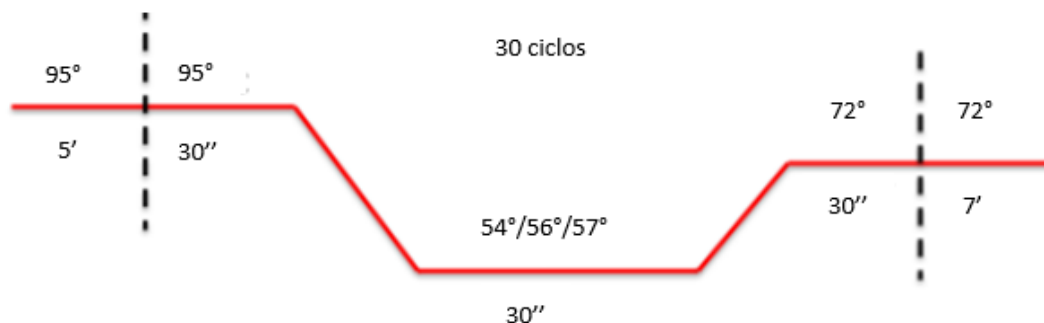


Figura 10: Programa de amplificación empleado para el gen *BRCA1*: 54° exones 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21 y 22; 56° exones 2, 1.11A, 1.11B, 1.11C, 1.11G, 20, 23 y 24; 57° exones 7, 11F, 11D y 11E.

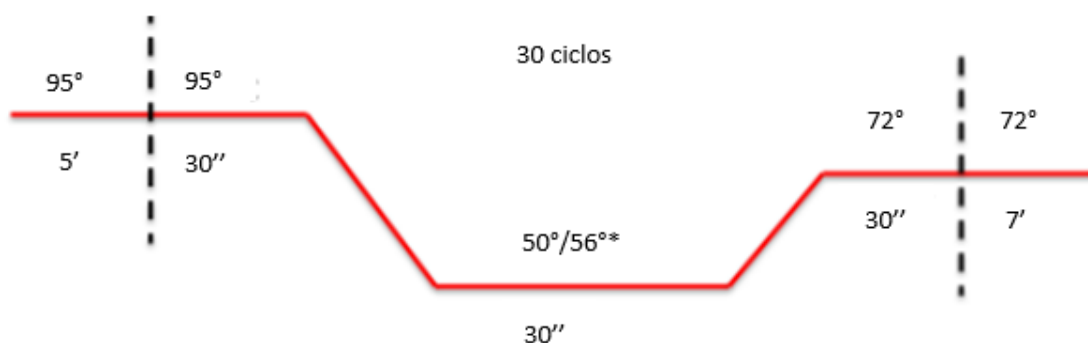


Figura 11: Programa de amplificación empleado para el gen *BRCA2*: 50° exones 11S, 15 y 20; 56° (*la temperatura de anillamiento desciende 0, 3° por ciclo hasta los 50°) en el resto de exones.

4.2 Análisis de los fragmentos amplificados por PCR mediante CSGE

Los fragmentos amplificados fueron sometidos a un análisis por CSGE (electroforesis en gel sensible a la conformación) siguiendo la técnica descrita por Ganguly, con algunas modificaciones²⁹⁶. Mediante esta técnica se estudiaron 154 de las pacientes incluidas.

Esta técnica requiere una desnaturalización previa de los fragmentos de DNA amplificados por PCR a 95°C y una lenta re-naturalización posterior que permite la formación de heterodúplex (combinación entre una hebra de DNA mutada y otra hebra de DNA no mutada) y homodúplex en el caso de los individuos heterocigotos; y homodúplex en individuos portadores de una mutación en heterocigosis (figura 14). Heterodúplex y homodúplex presentan un patrón de migración diferente en una electroforesis en un gel de acrilamida.

Los geles para electroforesis fueron hechos con 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 µL, APS 25% (Persulfato de amonio): 138 µL.

La electroforesis se llevó a cabo a 180 voltios durante aproximadamente 21 horas. El gel fue teñido con nitrato de plata. Para ello se utilizó un kit comercial DNA Silver Staining Kit (GE Healthcare®), siguiendo las instrucciones del comerciante.

Posteriormente, los fragmentos de DNA con patrones diferentes de migración fueron secuenciados para conocer la naturaleza de la alteración.

4.3 Análisis mediante sistemas de secuenciación masiva

El estudio de 39 pacientes se realizó a través de sistema de NGS basados en la generación de librería de amplicones utilizando la tecnología 454 GS Junior.

En primer lugar, se procede a la amplificación dirigida de los genes *BRCA1* y *BRCA2* utilizando el kit *BRCA MASTR™ Dx* siguiendo las instrucciones del fabricante (Multiplicom, Niel, Bélgica). En resumen, se genera una librería de amplicones realizando dos rondas de PCR: una primera PCR multiplex que permite amplificar la zona de interés y una segunda PCR de etiquetado de los amplicones utilizando kit 454 MID Dx, resultando en la incorporación de un identificador molecular (MID) y los adaptadores A y B, necesarios para la secuenciación en el instrumento. (Figura 12)

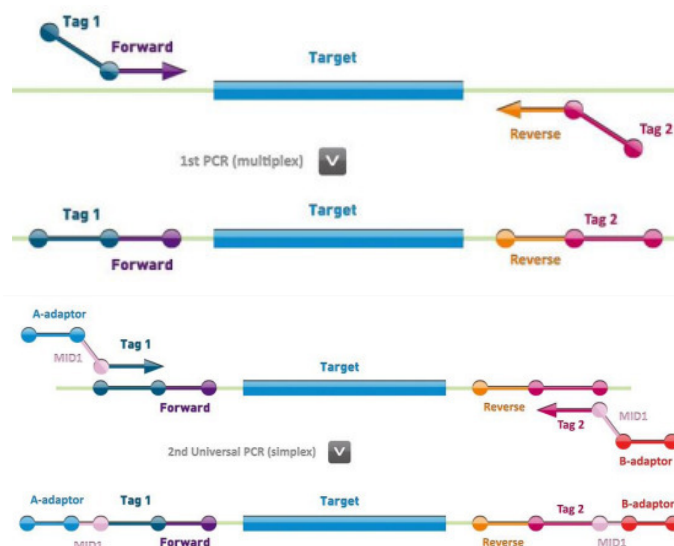


Figura 12. Preparación de la librería de amplicones mediante la amplificación por PCR multiplex de la muestra de estudio (arriba) y etiquetado de la muestra con MID específicos (abajo)

Posteriormente, se procede a la mezcla de los “mixes” de cada paciente de manera equimolar y se purifican con *AgencourtAMPure XP Beads* (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania). Este sistema remueve de manera eficiente los fragmentos cortos y contaminantes mediante el uso de bolas magnéticas que se unen de manera específica al DNA de doble cadena de más de

100pb. La cuantificación de las muestras purificadas se realiza con un colorante específico de ácidos nucleicos sensible a la fluorescencia que mide el DNA de doble cadena utilizando el kit *Quant-iT PicoGreen dsDNA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las muestras se mezclan y se ajustan a una concentración final de 10^6 moléculas/ μ L.

Para el proceso de secuenciación en el secuenciador GS Junior 454 es necesario un proceso de amplificación de las muestras mediante PCR en emulsión. De esta forma, la librería de amplicones mediante el adaptador A unido al MID se combina con una esfera sobre la que se produce un proceso de amplificación optimizado para que sólo se una un fragmento a una esfera. Una vez unidos los fragmentos a las esferas se introducen en una emulsión de agua y aceite de forma que cada esfera quede dentro de una gota con todos los reactivos y enzimas necesarios para la PCR. Tras una serie de ciclos de PCR se habrán generado en cada esfera un gran número de secuencias de doble cadena idénticas y unidas por el adaptador A. Este proceso de amplificación, la ruptura de la emulsión y el enriquecimiento y purificación posterior de las esferas unidas al DNA se realizó con los kit *GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A)* siguiendo los protocolos del fabricante.

Finalmente, la muestra se prepara para su posterior secuenciación con el kit *GS Junior Titanium Sequencing* y se carga en la PTP (*PicoTiterPlate*), un soporte de micropocillos donde entra una esfera con el DNA amplificado y sobre la que se añaden los reactivos necesarios para llevar a cabo la pirosecuenciación de las muestras.

Este tipo de secuenciación se basa en la generación de luz a través de la liberación de pirofosfato al unirse cada uno de los nucleótidos en la secuenciación. Por cada nucleótido que se une por complementariedad a la hebra de DNA molde el pirofosfato liberado se convierte en ATP gracias a la enzima ATP sulfurilasa y posteriormente este ATP se convierte en luz visible mediada esta conversión por la luciferasa. Esta reacción quimioluminiscente es grabada por la cámara y la información procesada y alineada al genoma de referencia con el software *GS Run Browser* (versión 2.9, Roche Applied Science). Para el análisis de las variantes se utilizó el programa *GS Amplicon Variant Analyzer* (versión 2.9, Roche Applied Science) y se estimó un umbral de 40 lecturas por secuencia para su posterior análisis .

En la siguiente se figura se muestra un resumen de todo el proceso (Figura 13).

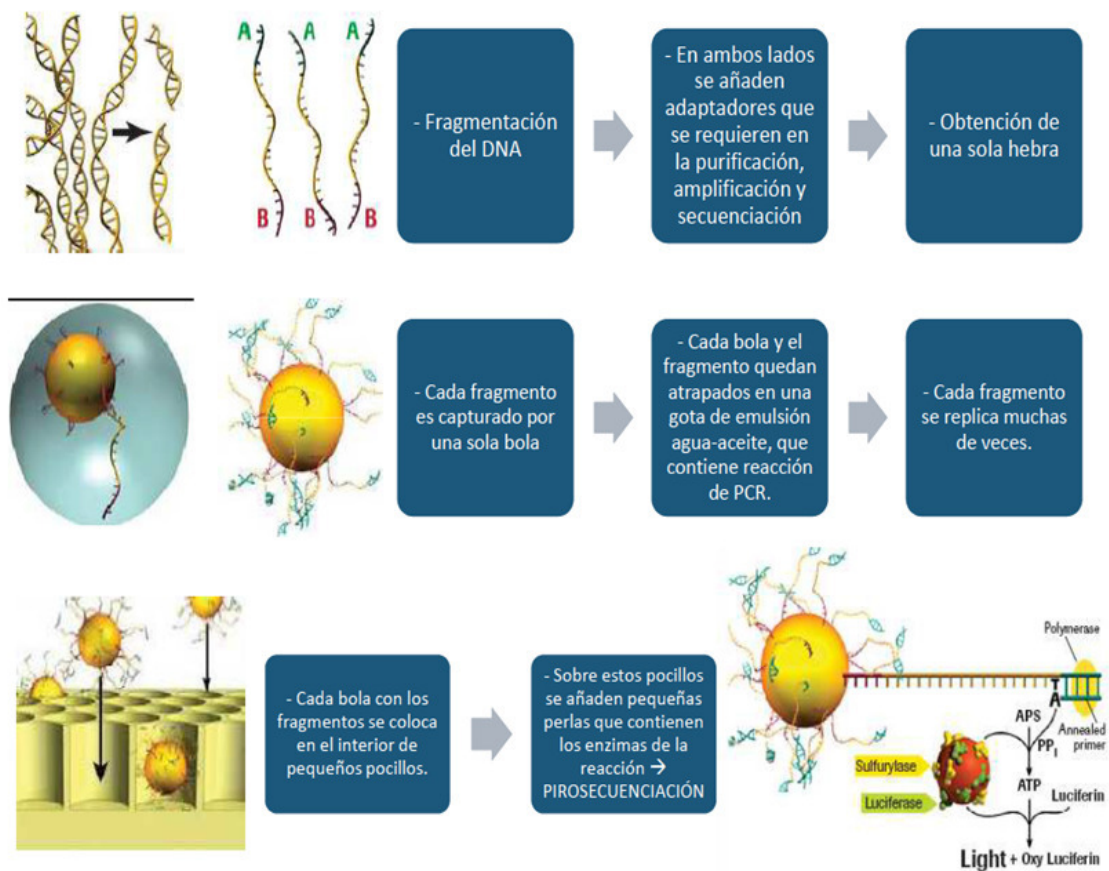


Figura 13. Resumen de la preparación de la librería de amplicones, amplificación por PCR en emulsión y posterior pirosecuenciación siguiendo la tecnología 454 GS Junior.

5. ELECTROFORESIS DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS EN GEL DE AGAROSA

El tamaño del producto amplificado se analizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% en tampón TBE 0.5X (Tris 0.045M, ácido bórico 0.045M, EDTA 1.0mM pH 8.0) y teñido con bromuro de etidio. Las muestras migraron en paralelo con un marcador de tamaño molecular derivado del DNA del fago Φ X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII que genera fragmentos de 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.

Los DNA extraídos de las muestras en parafina se cargaron en geles de agarosa al 1% en tampón TBE 0,5X para comprobar cualitativamente su calidad. Estas muestras migraron en paralelo con un marcador de tamaño molecular derivado del DNA del fago lambda Hind III- Φ X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII que genera fragmentos de los siguientes tamaños: 22.130, 9.416, 6.557, 4.381, 2.322, 2.207, 1.353, 1.078, 0.872, 0.603, 0.310, 0.281, 0.271, 0.234, 0.194, 0.118, 0.072 Kb

La migración del DNA en el gel se monitorizó utilizando dos colorantes incluidos en el tampón de carga: el xileno cianol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 5Kb en un gel de agarosa al 0.8%, y el azul de bromofenol, que migra aproximadamente con los fragmentos de 0.5Kb. La electroforesis se llevó a cabo con un potencial constante de 120 voltios

durante 40 minutos. Los resultados obtenidos fueron capturados gracias al programa Gel Doc 2000 (Biorad).

6. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Se analizaron 35 pacientes mediante secuenciación automática de los productos de PCR purificados de los genes BRCA1 y BRCA2.

También se secuenciaron tanto todos los productos de PCR analizados a través de CGSE y que mostraban un patrón de migración diferente como aquellos fragmentos analizados con el AVA que presentaran regiones de homopolímeros o un número bajo de lecturas (menor de 40) que pudieran dificultar su análisis.

La purificación de los fragmentos de DNA procedentes de la amplificación fue realizada usando *PureLink® PCR Purification Kit* (Invitrogen, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la secuenciación automática, las muestras se prepararon a una concentración de 40-60ng de DNA purificado con 3pmol del oligonucleótido sentido o antisentido correspondiente, llevado a un volumen final de 8µL. La reacción de secuenciación por Sanger se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI PRISM 377 *DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Inc.) en la unidad de Proteómica y Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-Universidad de Salamanca), usando el kit *BigDye Terminator®* v.3.1.

La lectura y tratamiento de las secuencias automáticas se realizó con ayuda del programa *Chromas lite 2.01* (Figura 14). La homología con las secuencias de referencia se realizó con el programa Serial Cloner.

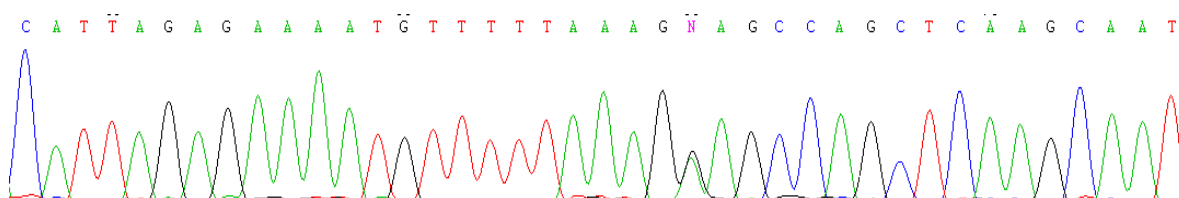


Figura 14. Ejemplo de mutación en heterocigosis en *BRCA1*.

7. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA

7.1 Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan™

Las sondas Taqman o sondas de hidrólisis permiten medir la producción de producto de PCR mediante un sistema de sondas marcadas con dos fluorocromos distintos. En esta PCR, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial y mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA 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.

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 ("quencher") 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 (tablaX). En todos nuestros ensayos de discriminación alélica los fluorocromos empleados fueron VIC (unido al extremo 5' de la sonda del alelo 1) y FAM (unido al extremo 5' de la sonda del alelo 2. (Tabla 5)

Tabla 5. Moléculas fluorescentes utilizadas en la amplificación con sondas Taqman™

Fluorocromo	Máx. λ_{abs} (nm)	Máx. λ_{em} (nm)
VIC	538	554
FAM	495	435

Durante la amplificación del DNA diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria y la DNA polimerasa, que tiene actividad 5'-3' exonucleasa, al desplazarse a lo largo de la cadena, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Al quedar separados los fluorocromos donador y el aceptor, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector. Los datos resultantes suelen verse como una representación gráfica con tres nubes de puntos correspondiente a cada uno de los genotipos posible. (Figura 15)

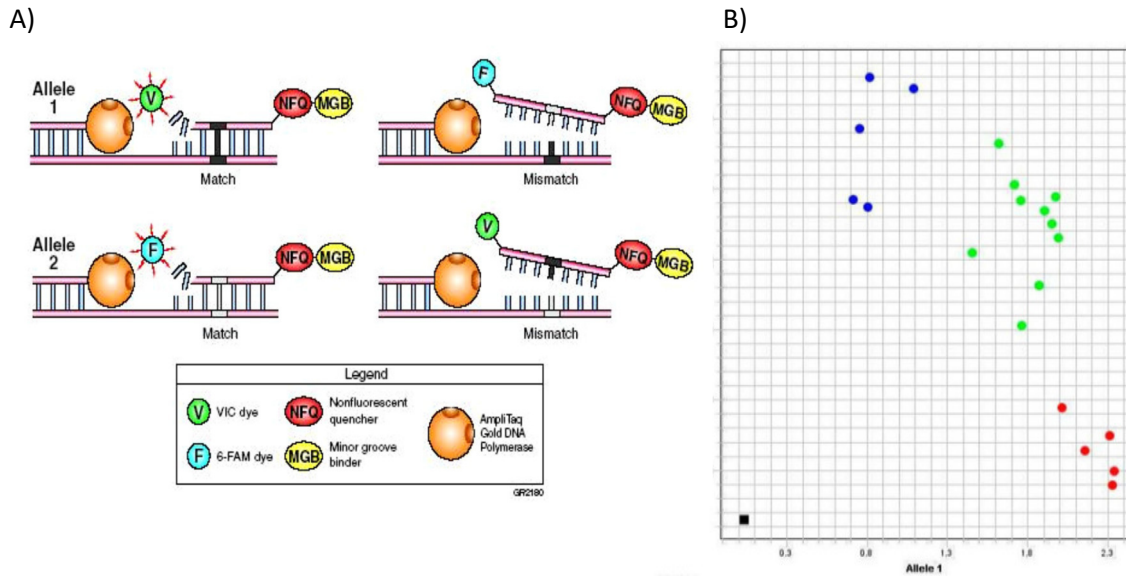


Figura 15. A) Mecanismo de reacción de PCR con sondas Taqman B y C. Representación de los resultados según el aumento de fluorescencia en VIC o FAM.

La reacción de PCR requiere además los mismos componentes que una reacción de PCR convencional (Taq polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$ y oligonucleótidos *forward* y *reverse*) y se lleva a cabo en termocicladores que incorporan un lector de fluorescencia. En nuestro caso la reacción de genotipado se llevó a cabo con el sistema *TaqMan Genotyping Master Mix 2x* (Applied Biosystems), en un volumen final de $10\mu L$, y se realizó en el equipo *Step One Plus Real Time PCR™* (Applied Biosystems) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. Los polimorfismos analizados mediante esta técnica de detallan en la tabla 6.

Pacientes y métodos

Tabla 6. SNPs estudiados en este trabajo mediante sondas Taqman

GRUPO	GEN	SNP ID	REFERENCIA COMERCIAL	CAMBIO DNA	CAMBIO PROTEÍNA	SONDA VIC	SONDA FAM
Reparación del DNA	BRCA1	rs16941	C_2287888_10	c.3232 A>G	G1038E	C	T
	BRCA1	rs16942	C_2287889_20	c.3667 A>G	K1183R	C	T
	BRCA1	rs799917	C_2287943_10	c.2731 C>T	P871L	A	G
	MLH1	rs1800734	C_7535141_1	c.-93 G>A		A	G
GWAS	FGFR2	rs2981582	C_2917302_10	c.109+906T>C		A	G
	MIR146	rs2910164	C_15946974_10	n.60 G>C		C	G
	8q24	rs13281615	C_1332250_10			A	G
Telomerasa	TERT	rs2735940	C_1839086_10	c.-1327 T>C		A	G
	TERC	rs2293607	C_16184740_10	c.-63 A>G		C	T
Lisil oxidasa	LOXL1	rs3825942	C_27506631_10	c.458 G>A	G153D	A	G
	LOXL1	rs2165241	C_43559411_10	c.-1613 C>T		C	T
Autofagia	ATG2B	rs3759601	C_9690160_20	c.4512 C>G	Q1383E	C	G
	ATG5	rs2245214	C_3001905_20		-	C	G
	ATG10	rs1864183	C_11953871_10	c.929 C>T	T212M	C	T
	ATG16L1	rs2241880	C_9095577_20	c.1153 A>G	T300A	A	G

7.2. Discriminación alélica 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. Los oligonucleótidos empleados para estas amplificaciones se describen en la Tabla 7

Tabla 7. Especificaciones de los oligonucleótidos empleados, genotipo y tamaño del fragmento generado

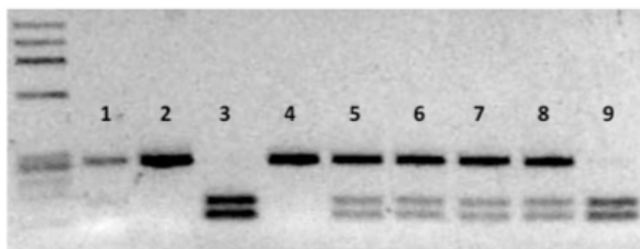
Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Genotipo	Tamaño (pb)
TP53	5' TCTACAGTCCCCCTTGCCGT 3'	5' CTGACCGTGCAAGTCACAGA 3'	GG	165 y 126
			GC	291,165 y 126
			CC	291
MDM2	5' GAGGTCTCCGCGGGAGTTC 3'	5'CGTGTCTGAACTTGACCAGC 3'	TT	190
			TG	190, 144 y 46
			GG	144 y 46

Para detectar la variante p.Arg72Pro (c.215 G>C; rs1042522) del gen *TP53* se amplificó mediante PCR el exón 4 del gen y digirió el producto de PCR con la enzima de restricción BstUI (Bsh1236I, Fermentas), que reconoce el sitio de corte CGCG. Posteriormente se analizaron los patrones generados al cargar los productos en un gel de agarosa al 3% y posterior electroforesis.

El polimorfismo c.-309 T>G ubicado en la región promotora del gen *MDM2*, se analizó mediante la digestión del producto de PCR con la enzima de restricción MspA1I (*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 166)

A)



B)

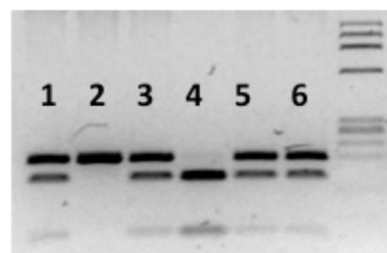


Figura 16. Análisis del polimorfismo p.Arg72Pro del gen TP53 mediante PCR-RFLP. Electroforesis del producto de digestión con la enzima Bsh1236I: carriles 1,2, y 4 homocigoto CC; carriles 3 y 9 homocigoto GG; Carriles 5, 6, 7 y 8 heterocigoto GC. B) Análisis del polimorfismo c.-309T>G del gen MDM2 mediante PCR-RFLP. Electroforesis del producto de digestión con la enzima MspA1I: carril 2: homocigoto TT; carril 4 homocigoto GG; carriles 1, 3, 5 y 6 heterocigoto TG.

8. ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO DE TUMORES DE MAMA DE MUJERES JÓVENES

8.1 Estudio citogenético en muestras tumorales mediante *microarrays* genómicos con la plataforma Cytoscan™

Se realizó el estudio citogenético de 58 muestras de DNA obtenido de tumores embebidos en parafina mediante *microarrays* genómico con dos plataformas diferentes según la calidad del DNA extraído de estas muestras.

Aquellos DNAs menos fragmentados y de mayor calidad y concentración se analizaron con la plataforma Affymetrix® CytoScan™ 750k Assay (Affymetrix, Santa Clara, California, USA). Se realizó en un total de 26 tumores de pacientes y en las líneas celulares utilizadas en los estudios de modulación de autofagia.

El análisis con esta técnica otorga información sobre CNAs de alta resolución además de una gran cobertura de SNPs que permiten detectar fiablemente LOH. Para ello, esta plataforma está compuesta por 550000 sondas y más de 200000 sondas de SNP con una media de resolución de 100kb.

En primer lugar, la muestra de DNA fue digerida con la endonucleasa de restricción NspI, se ligó al adaptador y amplificó por PCR. El producto de PCR fue purificado usando bolas magnéticas y después fragmentado, marcado y posteriormente hibridado al microarray durante 16-18 horas. Posteriormente el chip se lavó y tiñó en el Affymetrix 450 fluidic station y se escanearon en el Affymetrix 3000 GeneChip Scanner para obtener los datos a analizar. Se siguieron las instrucciones del fabricante con ciertas modificaciones²⁹⁷. (Figura 17)

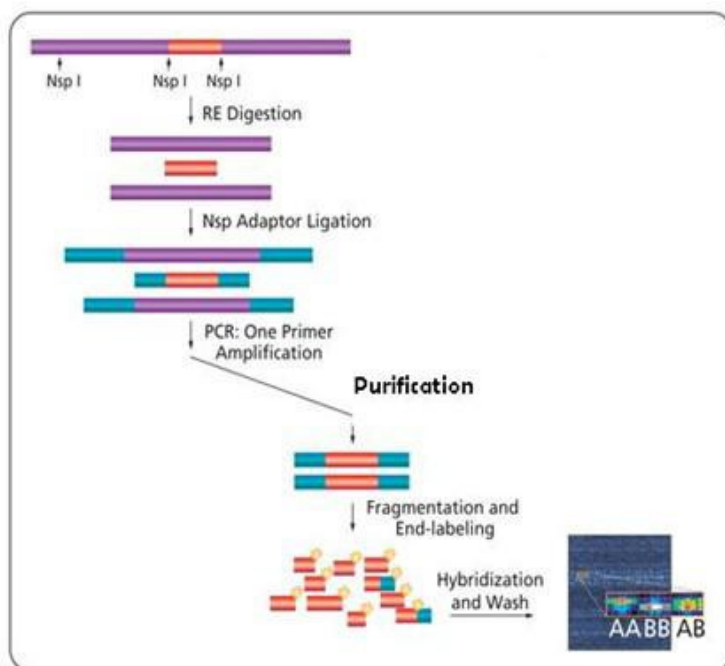


Figura 17. Esquema de trabajo de la plataforma de *microarrays* genómicos *CytoScan 750k*.

Se procesaron y analizaron los ficheros .CEL CytoScan 750 k correspondientes a las 26 muestras pareadas en la consola ChAS (*Chromosome Analysis Suite*) v3.1.0.15 de Affymetrix. Estos ficheros son archivos de intensidad de fluorescencia utilizados para el análisis. Los archivos CEL sin procesar se compararon con una referencia proporcionada por el fabricante que consta de 284 muestras de HapMap (*haplotype map*) La referencia del genoma humano utilizada fue GRCh37/Hg19 y la opción de análisis de muestra única (SSA).

El análisis elegido comienza con un preprocesamiento que se realiza mediante una doble normalización de la señal por cuartiles, obteniendo log ratios de las señales. Después, se calculan los picos por alelo específicos para cada SNP y, por último, para analizar el número de copias (CN, *copy number*) se realiza una segmentación del genoma que nos va a permitir obtener finalmente un valor de CN para un determinado segmento; es decir, se decide si un determinado grupo de sondas pertenecen a un segmento resultando en un CN o si pertenece al conjunto próximo de sondas en otro segmento. Los log ratios se asignan a los segmentos mediante un modelo oculto de Markov (HMM, *Hidden Markov Model*) que va a permitir detectar las regiones ganadas o perdidas. Para prevenir detectar falsos positivos, este modelo utiliza el log ratio esperado asociado a un número de copia para asignar un punto de corte al segmento teniendo en cuenta lo observado. La mediana de la diferencia entre pares absolutos (MAPD), que mide la variabilidad de la matriz en log ratios, se utilizó para evaluar la calidad de la matriz, teniendo en cuenta como muestras de buena calidad aquellas con un MAPD <0,35.

8.2. Estudio citogenético en muestras tumorales mediante MIP array con la plataforma OncoScan™

El estudio citogenético mediante *microarrays* genómicos con tecnología MIP (Molecular Inversion Probe) se realizó en 32 tumores de mama en parafina. Esta técnica permite obtener alteraciones en el número de copias a nivel genómico y LOH a partir de concentraciones bajas y de DNA degradado procedente de tumores de FFPE. Esta tecnología que utiliza la plataforma *OncoScan™ FFPE Assay* permite detectar 220000 SNPs en localizaciones genómicas distribuidas por todo el genoma y está enriquecida con sondas para detectar 74 mutaciones somáticas frecuentes en genes de interés en cáncer (BRAF, KRAS, EGFR, IDH1, IDH2, PTEN, PIK3CA, NRAS and TP53). (Figura 18)

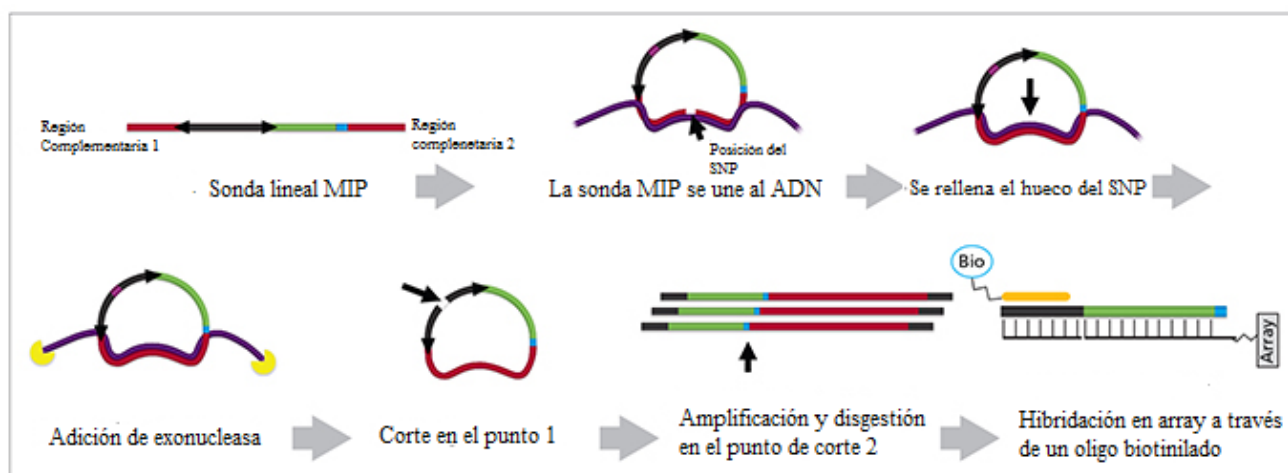


Figura 18. Esquema de funcionamiento de las sondas MIP. Modificado de Affymetrix.

En primer lugar, se añadieron las sondas a las muestras y se dejaron anillando a 58° (16-18h) después de una desnaturalización inicial. Después, cada muestra se dividió en dos para llenar el hueco del SNP mediante la adición de dATP (A) y dTTP (T) (A/T) en una reacción y dGTP (G) y dCTP (C) (G/C) en la otra. A continuación se procede a la digestión mediante exonucleasas dejando sólo aquellas sondas que han llenado el hueco con los nucleótidos A/T o G/C. Se produce así un cambio en la forma de la sonda (circular a lineal) mediante digestión con enzima de restricción y se amplifica por PCR. En una segunda ronda de PCR, los amplicones vuelven a cortarse generando dos fragmentos, de los cuales el más pequeño es el que se hibrida en el array. Las muestras se mezclaron con el buffer de hibridación y se inyectaron en los *arrays* donde hibrida durante 16-18h. Al final de la hibridación, los *arrays* se tiñeron y lavaron en la *GeneChip® Fluidics Station 450* y cargados en el *GeneChip® Scanner 3000 7G* (Affymetrix) donde se escanea la fluorescencia del array y se generan las imágenes. El escaneo genera archivos DAT (de imágenes) que los convierte a CEL. El procedimiento de análisis de OncoScan es similar al anterior e incluye la obtención de datos almacenados en archivos CEL, normalización de señales, determinación de CNAs y cálculo del BAF o la frecuencia del alelo B (para un SNP determinado se miden las intensidades de los dos alelos y es un ratio que indica la cantidad de un alelo

comparado con el otro). La referencia de Oncoscan utiliza un conjunto de datos de referencia de 400 muestras embebidas en parafinas normales de diversas fuentes, localizaciones geográficas, géneros y grupos de edad y tejidos.

8.3 Análisis informático de los datos obtenidos por *microarrays* genómicos

El análisis del número de copias se realizó con el software *Nexus Express 3.0* (BioDiscovery Inc., CA, EE.UU.). Este software proporciona el número de copias de cada sonda a partir de los datos bruto proporcionados por el scanner de Affymetrix, tras realizar un proceso de “smoothing” o suavización de los datos y una corrección cuadrática.

Además todos los casos han podido ser analizados mediante SNP-FASST2 (*SNP-Fast Adaptive States Segmentation Technique 2*) (BioDiscovery Inc., CA, EE.UU.) Esta aproximación está basada en un HMM y permitió analizar las alteraciones en el número de copias. Los valores de ganancias y pérdidas están previamente definidos

Los log ratios ponderados de ChAS y Nexus se procesaron usando el paquete *copynumber R* versión 1.12.0. Este paquete realiza un paso de preprocesamiento de detección y modificación de valores extremos a través de un método denominado “winsorización” y un único paso de segmentación de muestra utilizando algoritmos de PCF (*Piecewise Constant Fitting*, ajuste constante por pieza). El valor gamma, que es la penalización por cada discontinuidad en la curva, se estableció en 40 y el número mínimo de sondas permitido en cada segmento se estableció en 5. Las parcelas de frecuencia CN fueron construidas usando este paquete, estableciendo el umbral de log para las ganancias y las pérdidas en 0,1 y -0,1, respectivamente²⁹⁸. Con este análisis conseguimos unificar los datos obtenidos de cada plataforma de microarray genómico pudiendo realizar el estudio de las CN de manera conjunta.

Para detectar cambios focales se utilizó el programa GISTIC 2.0 (*Genomic Identification of Significant Targets in Cancer*) que utiliza un q-valor de corte asociado con la amplitud de la alteración y la frecuencia en la que ocurre. Sólo las alteraciones que presentan un log ratio positivo se consideran ganancias; aquellas negativas son pérdidas²⁹⁹. Posteriormente, se realizó un análisis no paramétrico entre las alteraciones obtenidas con GISTIC de los distintos grupos obteniendo así aquellas regiones focales y genes de interés que presentaban cambios significativos en cada grupo de pacientes.

El índice de inestabilidad genómica, GII, se calculó partiendo del número de regiones alteradas totales en relación con el número de sondas totales analizadas (GII^{total}). Estas regiones alteradas se pueden dividir a su vez en regiones ganadas o perdidas en relación a las sondas totales, obteniendo respectivamente los índices $GII^{ganancia}$ y $GII^{pérdida}$. Se calculó la mediana de cada uno de los índices permitiendo dividir los tumores en aquellos que presentaban un GII alto (GII^{total} , $GII^{ganancia}$ y $GII^{pérdida} > Med$) o tumores con GII bajo (GII^{total} , $GII^{ganancia}$ y $GII^{pérdida} < Med$).

También se analizaron mediante el programa CTLPScanner las muestras de los pacientes cuyo patrón de alteración era compatible con el de cromotripsis²³⁴. Basándose en los datos de la matriz genómica segmentada, para cada cromosoma, el algoritmo en el que se basa el

programa utiliza un protocolo de ventanas deslizantes (protocolo de transmisión de datos bidireccional) para identificar la región genómica con el mayor índice de probabilidad como la región con CTLP candidata. De esta forma el algoritmo es capaz tanto de determinar la localización cromosómica como el tamaño de la alteración encontrada²³¹.

En la figura 19 se resume el proceso de estudio y análisis de alteraciones citogenéticas en tumores de mama embebidos en parafina.

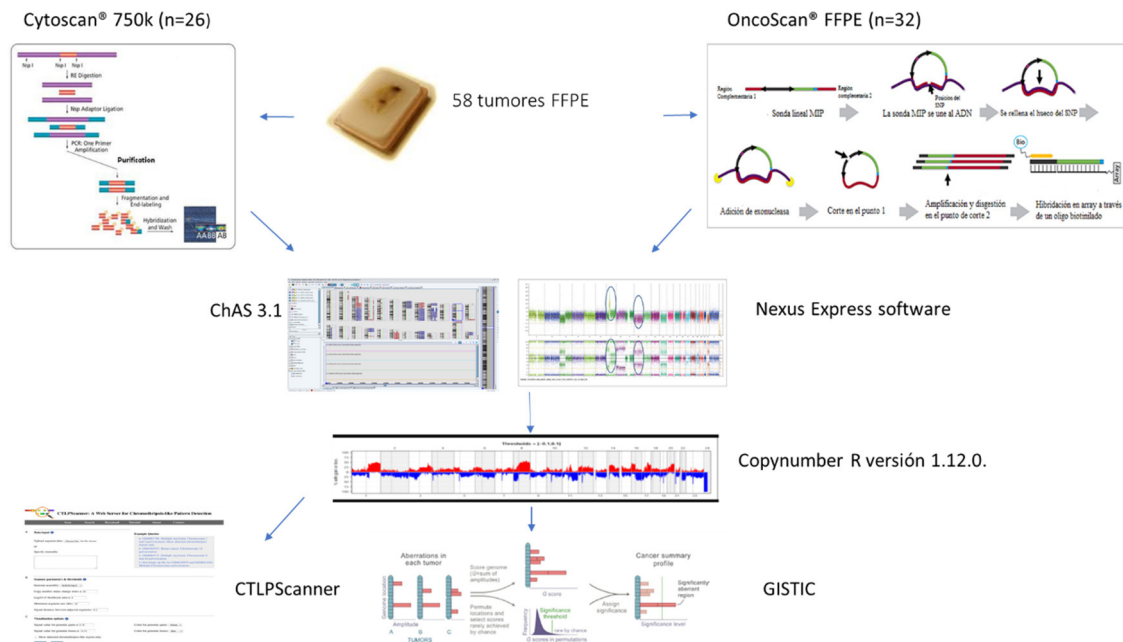


Figura 19. Esquema de trabajo y programas utilizados en el análisis de alteraciones citogenéticas en tumores de mama en mujeres jóvenes.

9. ESTUDIO DE MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS CELULARES

Se eligieron cuatro líneas celulares de cáncer de mama según la edad de diagnóstico de la enfermedad y si eran mayores o menores de 40 años. Las cuatro líneas celulares usadas en este trabajo se detallan en la siguiente tabla. (Tabla 8)

Tabla 8. Líneas celulares utilizadas y resumen de sus mutaciones (subrayadas mutaciones confirmadas por secuenciación automática).

Línea celular	ATCC® No	Subtipo tumoral	Edad	Genes mutados	Mutaciones
MCF7	HTB-22™	Luminal A	69	PIK3CA CDKN2A	<u>c.1633G>A</u> p.E545K <u>c.1_471del471</u> p.0?
BT-549	HTB-122™	Triple Negativa	72	PTEN RB1 TP53	c.823delG p.V275fs*1 c.265_607del343 p.0? <u>c.747G>C</u> p.R249S
MDA-MB-415	HTB-128™	Luminal A	38	PTEN TP53	c.407G>A p.C136Y <u>c.707A>G</u> p.Y236C
HCC1937	CRL-2611™	Triple Negativa	23	<u>BRCA1</u> TP53	<u>c.5266_5267insC</u> <u>p.Q1756fs*74</u> c.916C>T p.R306*

Todas las líneas celulares se cultivaron en un incubador (Cultek S.L.U., Madrid, España) a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ y un 95% de aire. Para el cultivo de las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-415 se utilizó el medio Gibco™ DMEM (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado con glucosa (4.5g/L), L-glutamina y L-piruvato. Para el cultivo de las líneas celulares BT549 y HCC1937 se utilizó medio Gibco™ RPMI 1640 (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado con glucosa (4.5g/L), L-glutamina y L-piruvato.

Ambos medios de cultivo se suplementaron con suero bovino fetal al 10% (FBS) y antibióticos (penicilina/estreptomicina) al 1% (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Las líneas se cultivaron en presencia de cloroquina (Sigma-Aldrich); se preparó una solución de 50mM del fármaco disolviendo la droga en polvo en d_4H_2O al 0,5% de DMSO. Se usaron las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 125µM.

9.1. Ensayo de viabilidad celular

El crecimiento y la supervivencia celular al tratamiento con cloroquina a las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 125µM en las líneas celulares de cáncer de mama usadas en este trabajo se evaluó mediante el ensayo de viabilidad MTT³⁰⁰. Esta técnica consiste en el marcaje de células metabólicamente activas con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich). Se trata de compuesto de color amarillento que, al ser reducido por la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) celular, da lugar a un compuesto hidrofóbico de color azul oscuro, el formazán. El formazán se solubiliza con DMSO y, posteriormente, se mide la intensidad de color con un espectrofotómetro, lo que permite determinar la tasa de proliferación. La absorbancia se correlaciona con el color e, indirectamente, con la cantidad de células en cultivo metabólicamente activas.

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron un total de 10.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se las dejó crecer toda la noche. Tras esto, se sustituyó el medio por uno nuevo con diferentes concentraciones de fármaco, dejando siempre células sin tratamiento como control. A continuación se incubaron las placas multipocillo durante 24, 48, o 72 horas, utilizando también una placa previa (tiempo 0) sin ningún tipo de fármaco como control. Una vez transcurridos los tiempos se añadió a cada pocillo 1mg/ml de MTT y se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras esto, se eliminó el medio y se añadió DMSO para disolver los cristales de formazán depositados en cada pocillo. La absorbancia de los mismo se determinó en el lector de microplacas *UltraEvolution* (Tecan®) a 570nm.

De cada experimento se realizaron dos réplicas para confirmar los resultados

9.2. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

El estudio del ciclo celular se realizó cuantificando el contenido de DNA de éstas por citometría de flujo.

Para ello, las células fueron tratadas con cloroquina a la concentración de 25uM durante 24, 48 y 72h respectivamente, tomando un tiempo 0 como control. Tras la exposición al compuesto, las células tratadas se recogieron y se fijaron en etanol 70% helado. Una vez fijadas,

se lavaron repetidamente con PBS para eliminar los residuos de etanol, centrifugando a 1500 r.p.m. durante 3 minutos. Después, se añadió a cada muestra 0.05% de RNAasa A y 7.5µl de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) y los tubos se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad toda la noche. Tras esto, las muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), cuantificando el DNA de un total de 30000 células por muestra.

Los resultados se obtienen utilizando el programa asociado al citómetro CellQuest Pro® (BD Bioscience) y analizados con el programa WINMDI 2.9., el cual permite hacer una discriminación y cuantificación del número de células en cada estado del ciclo celular.

En todos los casos se realizaron dos réplicas de cada experimento para verificar los resultados.

9.3. Análisis de extractos proteicos por Western blot

9.3.1 Extracción de proteínas

Para la obtención de los extractos proteicos, cada una de las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas se cultivaron con cloroquina a 25µM durante 24, 48 y 72 horas. Como control también se recogieron los extractos proteicos de células sin tratar. Las células se recogieron de las placas de cultivo usando 1.5ml del agente de disociación TrypLE 1X (Gibco), se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1500r.p.m. tres minutos. Los precipitados se incubaron durante 30 minutos con buffer de lisis en frío y en agitación (NaCl 140mM, EDTA 10mM, 10% glicerina, 1% Nonidet P-40, Tris 20mM pH 8.0), al que se le añadieron los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 1mM, pepstatina 1µM, aprotinina 1µg/ml, leupeptina 1µg/ml y ortovanadato sodico 1mM. Tras centrifugar los tubos durante 10 minutos a 4°C y 12000 r.p.m. se transfirieron los sobrenadantes resultantes a un nuevo tubo Eppendorf® y se almacenaron a -80°C.

9.3.2 Análisis de expresión de proteínas de autofagia

Mediante la técnica de Western Blot analizamos la expresión de las proteínas LC3B, p62/SQSTM1 y Beclin1. Para ello, las muestras de proteína total se prepararon mezclando 200µg de cada extracto proteico con tampón de carga (Tris 100mM pH 6.8, 20% glicerol, 4% SDS, 0.05% azul de bromofenol y 2% β- mercaptoetanol) y se desnaturalizaron durante 5-10 minutos a 100°C en un baño seco. Tras esto, se procedió a la carga de las muestras en geles SDS-PAGE para su separación en función del tamaño mediante electroforesis vertical con minigeles discontinuos (*Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) siguiendo el protocolo de Laemmli³⁰¹. El gel separador se preparó a un porcentaje de acrilamida adecuado al tamaño de las proteínas a separar (8-12% acrilamida/bis-acrilamida 30%) (BioRad) en tampón Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 y SDS al 10%. Encima del gel separador, se preparó un gel concentrador al 4% acrilamida/bis acrilamida 30% en tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y SDS al 10%. Para la polimerización de los geles se utilizó APS y TEMED.

La electroforesis se realizó a 150 voltios en condiciones desnaturizantes en tampón de electroforesis (Tris 20mM, Glicina 192mM y SDS al 1%) y como marcador de peso molecular se

utilizó el marcador *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* (Thermo Fisher Scientific) en el que los tamaños que muestra en kDa son: 170, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15 y 10.

Una vez separadas por tamaño, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF *Immobilon-P* (Millipore Corporation) utilizando el sistema de transferencia semiseca TRANS BLOT® SD (BioRad) durante 45 minutos a 15 voltios en tampón 25mM Tris-HCl pH 8.5, 192mM Glicina y 20% metanol. Posteriormente, la membrana fue bloqueada durante 1 hora en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (0.1 % Tween-20 en TBS) para saturar todos los sitios inespecíficos de unión a proteínas. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés a la dilución adecuada en TBS-T con BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) al 3% toda la noche a 4°C. Tras varios lavados con TBS-T en agitación, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 45 minutos a temperatura ambiente (Tabla 9). Tras nuevos lavados de la membrana con TBS-T, se utilizó el sistema de quimioluminiscencia basado en la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrogeno *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific), según las especificaciones del fabricante y se expuso la membrana a películas fotosensibles de autorradiografía (FUJIFILM) para la detección de proteínas.

Tabla 9. Anticuerpos usados en este trabajo en los experimentos de Western Blot.

Anticuerpo	Tipo	Origen	Concentración WB	Casa comercial	Tamaño proteína (KDa)
Anti-LC3B	Primario	Conejo	1:1000	Novus Biologicals (NB600-1384)	17 (LC3-II) 19 (LC3-I)
Anti-p62	Primario	Conejo	1:2000	Abcam® (ab109012)	62
Anti-beclin1	Primario	Ratón	1:500-1:2000	Abcam® (ab114071)	70
Anti-β-actina	Primario	Ratón	1:10000	Sigma-Aldrich	42
Anti-Rabbit (HRP)	Secundario	Cabra	1:10000	Millipore (AP307P)	
Anti-Mouse (HRP)	Secundario	Cabra	1:10000	GE Healthcare (NXA931)	

Los fragmentos correspondientes a las proteínas de interés se cuantificaron usando el programa de análisis de imagen Scion Image.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los distintos experimentos se analizaron usando el software *IBM SPSS Statistics 23.0.0.0*.

En los estudios de asociación de polimorfismos, se analizó la distribución de genotipos entre pacientes y controles mediante el test χ^2 de Pearson. En los casos en los que la frecuencia de alguno de los grupos fue menor del 5%, se empleo el test exacto de Fisher. Se analizaron los modelos de herencia realizando una regresión logística multivariante y para todas las variantes se estimaron los Odd ratios (ORs) e intervalos de confianza del 95% .

Los estudios de desequilibrio de ligamiento se llevaron a cabo con el programa SNPStats³⁰².

La asociación entre las variables clínicas con los distintos índices de inestabilidad analizados en los tumores de mama se realizaron mediante el test χ^2 de Pearson o el test de Fisher. En los análisis de supervivencia, el tiempo de supervivencia libre de enfermedad se estimó como el tiempo desde el diagnóstico hasta la primera fecha de recaída del paciente o el último seguimiento. Las diferencias entre los tiempos de supervivencia se estimaron por el método Kaplan-Meier y la comparación entre grupos se realizó usando el test log-rank.

Los datos obtenidos en el estudio del ciclo celular se analizaron mediante el análisis de la varianza de un factor (*one-way ANOVA*) para cada una de las fases.

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

Resultados

1. ANÁLISIS DE VARIANTES ALÉLICAS DE BAJA PENETRANCIA EN CÁNCER DE MAMA EN MUJERES JÓVENES

El riesgo de desarrollar cáncer de mama, sigue, según los últimos estudios, un modelo de susceptibilidad poligénico; es decir, el riesgo puede asociarse a diferentes SNPs en distintos genes que por sí solos no representan un gran riesgo de padecer la enfermedad. Estos SNPs pueden localizarse en zonas tanto codificantes como no codificantes, de manera que pueden afectar a la función de la proteína, la transcripción del mRNA etc.

En este trabajo hemos seleccionado polimorfismos de distintas rutas que pueden contribuir al proceso de oncogénesis mamaria y se han estudiado sobre 230 pacientes con cáncer de mama menores de 40 años cuyas características clínicas se recogen en la tabla 10.

Tabla 10 . Principales características de las pacientes estudiadas.

Pacientes (n=230)	
Mediana de edad, años [IQR]	35 [21-39]
Antecedentes familiares de CM grado 1 y/o 2	
Con antecedentes (CMF+)	105 (47.5%)
Sin antecedentes (CMF-)	125 (54.3)
Mutación en <i>BRCA1/2</i>	
Con mutación (BRCA+)	22 (10%)
<i>BRCA1</i>	15 (69.6%)
<i>BRCA2</i>	7 (30.4%)
Sin mutación (BRCA-)	208 (90%)
Expresión de receptores hormonales (RH)	n=194 (84.3%)
RH+	141 (72.7%)
RH-	53 (27.3%)
Expresión de HER2	n=178 (77.4%)
HER2+	46 (25.8%)
HER2-	132 (74.2%)
Subtipo de tumor	n=178 (77.4%)
Luminal A	96 (54.2%)
Luminal B	33 (18.5%)
Triple Negativo	36 (20.2%)
HER2	13 (7.3%)

Se han estudiado un total de 17 polimorfismos que podrían estar relacionados con el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes. Para ello se compararon las frecuencias de distribución de los polimorfismos en las pacientes con una población control formada por 131 mujeres sanas sin antecedentes personales o familiares de cáncer. En el caso del análisis de los polimorfismos de los genes *BRCA1*, *TP53* y *MDM2* se utilizó una población control formada por 116 mujeres con las mismas características del grupo control anterior. La distribución de los genotipos en cada uno de los polimorfismos analizados en ambos grupos de controles cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.1$).

También se ha analizado la frecuencia genotípica según las características clínicas detalladas en la tabla 10. Se consideró para el análisis la expresión tumoral conjunta de los receptores de estrógenos y progesterona como expresión de receptores hormonales (RH). La clasificación del subtipo biológico tumoral se realizó teniendo en cuenta la expresión de los receptores de estrógenos, progesterona y HER2.

En aquellos casos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas se analizaron los modelos de herencia mediante una regresión logística multivariante y, en caso de haber diferencias estadísticamente significativas, se determinaron las frecuencias alélicas.

1.1 Polimorfismos en genes relacionados con las vías de reparación del DNA

1.1.1 Distribución de genotipos en controles y pacientes

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs16941, rs16942 y rs799917 del gen *BRCA1* y el polimorfismo rs1800734 del gen *MLH1* en mujeres sanas y pacientes mostró que el polimorfismo rs1800734 del gen *MLH1* y el polimorfismo rs799917 del gen *BRCA1* presentan una distribución diferente entre casos y controles. (Tabla 11)

En el caso del polimorfismo rs799917 del gen *BRCA1*, la frecuencia de homocigotos TT fue significativamente mayor en el grupo de pacientes que en el de controles (OR= 2.426 (1.034-5.691; p= 0.042)). Al realizar el análisis de las frecuencias alélicas no se encontraron resultados estadísticamente significativos, por lo tanto, estos resultados indican que el ser portador de dos copias del alelo T podría conferir un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama.

En cuanto al polimorfismo rs1800734 del gen *MLH1*, la frecuencia de distribución del genotipo GA fue significativamente mayor en el grupo de controles que en el de pacientes (OR= 0.424 (0.27-0.66); p= <0,001). Analizando las frecuencias alélicas se observa que el alelo A está asociado a un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes (OR= 0.604 (0.432-0.843); p= 0.002).

Resultados

Tabla 11. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en controles y pacientes.

	Genotipo	Controles	Pacientes	OR (IC 95%)	p-valor	
<i>BRCA1</i> <i>rs16941</i>	Codominante	AA	56 (48.3%)	94 (40.9%)	1	0.176
		AG	53 (45.7%)	109 (47.4%)	1.225 (0.769-1.953)	0.393
		GG	7 (6.0%)	27 (11.7%)	2.298 (0.939-5.622)	0.068
	Dominante	AA	56 (48.3%)	94 (40.9%)	1	/
		AG+GG	60 (51.7%)	136 (59.1%)	1.350 (0.862-2.116)	0.190
	Recesiva	GG	7 (6.0%)	27 (11.7%)	2.071 (0.874-4.910)	0.092
		AA+AG	109 (94.0%)	203 (88.3%)	1	/
<i>BRCA1</i> <i>rs16942</i>	Codominante	AA	56 (48.3%)	95 (41.3%)	1	
		AG	53 (45.7%)	108 (47.0%)	1.201 (0.754-1.914)	0.441
		GG	7 (6.0%)	27 (11.7%)	2.274 (0.930-5.562)	0.072
	Dominante	AA	56 (48.3%)	95 (41.3%)	1	/
		AG+GG	60 (51.7%)	135 (58.7%)	1.326 (0.847-2.078)	0.218
	Recesiva	GG	7 (6.0%)	27 (11.7%)	2.071 (0.874-4.910)	0.098
		AA+AG	109 (94.0%)	203 (88.3%)	1	/
<i>BRCA1</i> <i>rs799917</i>	Codominante	CC	54 (46.6%)	91 (39.6%)	1	0.102
		CT	55 (47.4%)	108 (47.0%)	1.165 (0.730-1.860)	0.522
		TT	7 (6.0%)	31 (13.5%)	2.628 (1.038-6.378)	0.033
	Dominante	CC	54 (46.6%)	91 (39.6%)	1	/
		CT+TT	62 (53.4%)	139 (60.4%)	1.330 (0.848-2.087)	0.214
	Recesiva	TT	7 (6.0%)	31 (13.5%)	2.426 (1.034-5.691)	0.042
		CC+CT	109 (94.0%)	199 (86.5%)	1	/
Alelos	C	163 (70.3%)	290 (63.0%)	1	/	
	T	69 (29.7)	170 (37.0%)	1.385 (0.986-1.944)	0.060	
<i>MLH1</i> <i>rs1800734</i>	Codominante	GG	50 (38.2%)	134 (58.3%)	1	0.001
		GA	73 (55.7%)	83 (36.1%)	0.424 (0.270-0.660)	<0.001
		AA	8 (6.1%)	13 (5.7%)	0.606 (0.237-1.550)	0.296
	Dominante	GG	50 (38.2%)	134 (58.3%)	1	/
		GA+AA	81 (61.8%)	96 (41.7%)	0.442 (0.285-0.686)	<0.001
	Recesiva	AA	8 (6.1%)	13 (5.7%)	1.429 (0.561-3.641)	0.454
		GG+GA	123 (93.8%)	217 (94.3%)	1	/
Alelos	G	173 (66.0%)	351 (76.3%)	1	/	
	A	89 (34.0%)	109 (23.7%)	0.604 (0.432-0.843)	0.002	

1.1.2 Distribución de genotipos en relación con el estado mutacional de *BRCA1/2*

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs16941, rs16942 y rs799917 del gen *BRCA1* y el polimorfismo rs1800734 del gen *MLH1* en pacientes jóvenes con cáncer de mama agrupadas de acuerdo a si son portadoras o no de mutación patogénica en *BRCA1/2* mostró que el polimorfismo rs1800734 del gen *MLH1* presenta distinta distribución de los genotipos. (Tabla 12)

La frecuencia de distribución del genotipo AA fue significativamente mayor en el grupo de pacientes *BRCA+*. El análisis de riesgo confirmó esta observación mostrando que el genotipo AA está relacionado con un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama en presencia de mutación en los genes *BRCA1/2* (OR= 4.914 (1.376-17.545); p= 0.018). El análisis de las frecuencias alélicas no fue significativo lo que puede deberse al pequeño tamaño de muestra del subgrupo de pacientes jóvenes portadoras de mutación en *BRCA1/2* (p=0.091).

Resultados

Tabla 12. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en los grupos BRCA- y BRCA+.

	<i>Genotipo</i>	<i>BRCA-</i>	<i>BRCA+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>BRCA1</i> <i>rs16941</i>	Codominante	AA	83 (39.9%)	11 (50.0%)	1	0.651
		AG	100 (48.1%)	9 (40.9%)	0.679 (0.269-1.717)	0.414
		GG	25 (12.0%)	2 (9.1%)	0.604 (0.125-2.906)	0.529
	Dominante	AA	83 (39.9%)	11 (50.0%)	1	/
		AG+GG	125 (60.1%)	11 (50.0%)	0.664 (0.275-1.602)	0.362
	Recesiva	GG	25 (12.0%)	2 (9.1%)	0.732 (0.161-3.222)	0.686
		AA+AG	183 (88%)	20 (90.9%)	1	/
<i>BRCA1</i> <i>rs16942</i>	Codominante	AA	86 (41.3%)	9 (40.9%)	1	0.908
		AG	97 (46.6%)	11 (50.0%)	1.084(0.429-2.740)	0.865
		GG	25 (12.0%)	2 (9.1%)	0.764 (0.155-3.770)	0.741
	Dominante	AA	86 (41.3%)	9 (40.9%)	1	/
		AG+GG	122 (58.7%)	13 (58.7%)	1.018 (0.417-2.488)	0.968
	Recesiva	GG	25 (12.0%)	2 (9.1%)	0.732 (.0161.3.322)	0.686
		AA+AG	183 (88%)	20 (90.9%)	1	/
<i>BRCA1</i> <i>rs799917</i>	Codominante	CC	82 (39.4%)	9 (40.9%)	1	0.819
		CT	97 (46.6%)	11 (50%)	1.033 (0.408-2.615)	0.945
		TT	29 (13.9%)	2 (9.1%)	0.628 (0.128-3.080)	0.567
	Dominante	CC	82 (39.4%)	9 (40.9%)	1	/
		CT+TT	126 (60.6%)	13 (59.1%)	0.940 (0.384-2.299)	0.892
	Recesiva	TT	29 (13.9%)	2 (9.1%)	0.617 (0.137-2.782)	0.530
		CC+CT	179 (86.1%)	20 (90.9%)	1	/
<i>MLH1</i> <i>rs1800734</i>	Codominante	GG	123 (59.1%)	11 (50%)	1	0.049
		GA	76 (36.5%)	7 (31.8%)	1.030 (0.38-2.77)	0.953
		AA	9 (4.3%)	4 (18.2%)	4.970 (1.315-18.78)	0.018
	Dominante	GG	123 (59.1%)	11 (50%)	1	/
		GA+AA	85 (40.9%)	11 (50%)	1.447 (0.600-3.490)	0.411
	Recesiva	AA	9 (4.3%)	4 (18.2%)	4.914 (1.376-17.545)	0.014
		GG+GA	199 (95.7%)	18 (5.7%)	1	/
Alelos	G	322 (77.4%)	29 (65.9%)	1	/	
	A	94 (22.6%)	15 (34.1%)	1.772 (0.912-3.443)	0.091	

Se realizó también un análisis de riesgo al comparar la distribución de los polimorfismos en las pacientes según presentaran o no mutación en *BRCA1/2* frente al grupo control. Se observó que los resultados descritos en la tabla 11 se relacionan con las pacientes BRCA-; es decir, se relaciona el genotipo TT del polimorfismo rs799917 con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en pacientes BRCA- y el alelo A del polimorfismo rs18000374 con un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes comparado con las pacientes BRCA- (Tabla 13)

Resultados

Tabla 13. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en controles y pacientes BRCA-.

		Genotipo	Controles	BRCA-	OR (IC 95%)	p-valor
<i>BRCA1</i> <i>rs16941</i>	Codominante	AA	56 (48.3%)	83 (39.9%)	1	0.143
		AG	53 (45.7%)	100 (48.1%)	1.273 (0.762-2.047)	0.319
		GG	7 (6.0%)	25 (12.0%)	2.410 (0.976-5.951)	0.057
	Dominante	AA	56 (48.3%)	83 (39.9%)	1	/
		AG+GG	60 (51.7%)	125 (60.1%)	1.406 (0.889-2.222)	0.145
	Recesiva	GG	7 (6.0%)	25 (12.0%)	2.127 (0.890-5.083)	0.089
		AA+AG	109 (94.0%)	183 (88%)	1	/
<i>BRCA1</i> <i>rs16942</i>	Codominante	AA	56 (48.3%)	86 (41.3%)	1	0.181
		AG	53 (45.7%)	97 (46.6%)	1.192 (0.741-1.916)	0.469
		GG	7 (6.0%)	25 (12.0%)	2.274 (0.943-5.738)	0.067
	Dominante	AA	56 (48.3%)	86 (41.3%)	1	/
		AG+GG	60 (51.7%)	122 (58.7%)	1.324 (0.838-2.091)	0.229
	Recesiva	GG	7 (6.0%)	25 (12.0%)	2.127 (0.890-5.083)	0.089
		AA+AG	109 (94.0%)	183 (88%)	1	/
<i>BRCA1</i> <i>rs799917</i>	Codominante	CC	54 (46.6%)	82 (39.4%)	1	0.089
		CT	55 (47.4%)	97 (46.6%)	1.161 (0.721-1.871)	0.539
		TT	7 (6.0%)	29 (13.9%)	2.728 (1.116-6.670)	0.028
	Dominante	CC	54 (46.6%)	82 (39.4%)	1	/
		CT+TT	62 (53.4%)	126 (60.6%)	1.338 (0.846-2.117)	0.213
	Recesiva	TT	7 (6.0%)	29 (13.9%)	2.523 (1.069-5.956)	0.035
		CC+CT	109 (94.0%)	179 (86.1%)	1	/
Alelos	C	163 (70.3%)	261 (62.7%)	1	/	
	T	69 (29.7)	155 (37.3%)	1.403 (0.994-1.980)	0.054	
<i>MLH1</i> <i>rs1800734</i>	Codominante	GG	50 (38.2%)	123 (59.1%)	1	0.001
		GA	73 (55.7%)	76 (36.5%)	0.423 (0.267-0.670)	<0.001
		AA	8 (6.1%)	9 (4.3%)	0.457 (0.167-1.252)	0.128
	Dominante	GG	50 (38.2%)	123 (59.1%)	1	/
		GA+AA	81 (61.8%)	85 (40.9%)	0.427 (0.273-0.668)	<0.001
	Recesiva	AA	8 (6.1%)	9 (4.3%)	0.695 (0.261-1.850)	0.467
		GG+GA	123 (93.8%)	199 (95.7%)	1	/
Alelos	G	173 (66.0%)	322 (77.4%)	1	/	
	A	89 (34.0%)	94 (22.6%)	0.567 (0.402-0.800)	0.002	

1.1.3 Distribución de genotipos en relación con la historia familiar de cáncer de mama

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs16941, rs16942 y rs799917 del gen *BRCA1* y el polimorfismo rs1800734 del gen *MLH1* en pacientes jóvenes con cáncer de mama en relación con la presencia o ausencia de familiares afectados de cáncer de mama en primer y/o segundo grado no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. (Tabla A 2)

1.1.4 Distribución de genotipos en relación con el subtipo biológico del tumor

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs16941, rs16942 y rs799917 del gen *BRCA1* y el polimorfismo rs1800734 del gen *MLH1* en pacientes jóvenes con cáncer de mama en relación con el estado de los receptores hormonales no mostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 14).

Resultados

Tabla 14. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en los grupos RH- y RH+.

		Genotipo	RH-	RH+	OR (IC 95%)	p-valor
<i>BRCA1</i> <i>rs16941</i>	Codominante	AA	27 (50.9%)	53 (37.6%)	1	0.215
		AG	20 (37.7%)	72 (51.1%)	1.834 (0.931-3.614)	0.080
		GG	6 (11.3%)	16 (11.3%)	1.358 (0.477-3.868)	0.566
	Dominante	AA	27 (50.9%)	53 (37.6%)	1	/
		AG+GG	26 (49.1%)	88 (62.4%)	1.724 (0.912-3.261)	0.094
	Recesiva	GG	6 (11.3%)	16 (11.3%)	1.003 (0.379-2.716)	0.996
AA+AG		47 (88.7%)	125 (88.7%)	1	/	
<i>BRCA1</i> <i>rs16942</i>	Codominante	AA	28 (52.8%)	52 (36.9%)	1	0.136
		AG	20 (37.7%)	72 (51.1%)	1.938 (0.986-3.810)	0.055
		GG	5 (9.4%)	17 (12.1%)	1.831 (0.611-5.488)	0.280
	Dominante	AA	28 (52.8%)	52 (36.9%)	1	/
		AG+GG	25 (47.2%)	89 (63.1%)	1.917 (1.012-3.631)	0.046
	Recesiva	GG	5 (9.4%)	17 (12.1%)	1.316 (0.460-3.766)	0.609
		AA+AG	48 (90.6%)	124 (87.9%)	1	/
	Alelos	A	76 (71.7%)	176 (62.4%)	1	/
		G	30 (28.3%)	106 (31.6%)	1.526 (0.938-2.482)	0.089
<i>BRCA1</i> <i>rs799917</i>	Codominante	CC	26 (49.1%)	51 (36.2%)	1	0.164
		CT	19 (35.8%)	72 (51.1%)	1.932 (0.967-3.859)	0.062
		TT	8 (15.1%)	18 (12.8%)	1.147 (0.440-2.988)	0.779
	Dominante	CC	26 (49.1%)	51 (36.2%)	1	/
		CT+TT	27 (50.9%)	90 (63.8%)	1.699 (0.897-3.219)	0.104
	Recesiva	TT	8 (15.1%)	18 (15.1%)	0.823 (0.335-2.025)	0.672
CC+CT		45 (84.9%)	123 (87.2%)	1	/	
<i>MLH1</i> <i>rs1800734</i>	Codominante	GG	34 (64.2%)	85 (60.3%)	1	0.885
		GA	16 (30.2%)	47 (33.3%)	1.175 (0.588-2.349)	0.648
		AA	3 (5.7%)	9 (6.4%)	1.200(0.306-4.703)	0.794
	Dominante	GG	34 (64.2%)	85 (60.3%)	1	/
		GA+AA	19 (35.8%)	56 (39.7%)	1.179 (0.612-2.270)	0.622
	Recesiva	AA	3 (5.7%)	9 (6.4%)	1.136 (0.296-4.368)	0.852
GG+GA		50 (94.3%)	132 (93.6%)	1	/	

Sin embargo, las frecuencias de los genotipos heterocigotos de los polimorfismos rs16941, rs16942 y rs799917 del gen BRCA1 muestran una mayor frecuencia en el grupo RH+ con valores muy próximos a la significación ($p= 0.080$, 0.055 y 0.062 respectivamente). Únicamente en el caso del polimorfismo rs16942 mediante el análisis del modelo de herencia dominante, se relaciona los genotipos recesivos AG+GG con aquellas pacientes con cáncer de mama y tumores RH+ (OR=1.917 (1.012-3.631); $p= 0.046$). Al realizar el análisis de las frecuencias alélicas no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Tampoco se mostraron diferencias estadísticamente significativas en el estudio de los polimorfismos en genes relacionados con la reparación del DNA y la expresión de la proteína HER2 ni la clasificación del subtipo biológico del tumor. (Tabla A 3- Tabla A 4)

Resultados

1.2 Polimorfismos en genes identificados mediante GWAS

1.2.1 Distribución de genotipos en controles y pacientes

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen *FGFR2*, rs2910164 del gen *MIR146* y rs13281615 de la región 8q24 en 131 mujeres sanas y 230 pacientes jóvenes con cáncer de mama mostró que sólo el polimorfismo rs2981382 del gen *FGFR2* presenta una distribución diferente. (Tabla 15)

Al realizar el análisis de riesgo, se observa que el genotipo TT del gen *FGFR2* está relacionado con un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes ya que este genotipo se encuentra en mayor frecuencia en este grupo (OR= 4.162 (1.905-9.095); p= <0.001). Analizando las frecuencias alélicas se observa que el alelo T está asociado a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (OR= 1.751 (1.279-2.398); p= 0.001)

Tabla 15. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en controles y pacientes.

	Genotipo	Controles	Pacientes	OR (IC 95%)	p-valor	
FGFR2 rs2981582	Codominante	CC	50 (38.2%)	61 (26.5)	1	0.001
		CT	73 (55.7%)	120 (52.2%)	1.347 (0.839-2.164)	0.217
		TT	8 (6.1%)	49 (21.3%)	5.020 (2.177-11.579)	<0.001
	Dominante	CC	50 (38.2%)	61 (26.5%)	1	/
		CT+TT	81 (61.8%)	169 (73.5%)	1.710 (1.082-2.704)	0.022
		TT	8 (6.1%)	49 (21.3%)	4.162 (1.905-9.095)	<0.001
	Recesiva	CC+CT	123 (93.9%)	181 (78.7%)	1	/
		C	173 (66.0%)	242 (52.6%)	1	/
T		89 (34.0%)	218 (47.4%)	1.751 (1.279-2.398)	0.001	
MIR146 rs2910164	Codominante	GG	75 (57.3%)	134 (58.3%)	1	0.759
		GC	46 (35.1%)	83 (36.1%)	1.010 (0.639-1.596)	0.966
	Dominante	CC	10 (7.6%)	13 (5.7%)	0.728 (0.304-1.739)	0.475
		GG	75 (57.3%)	134 (58.3%)	1	/
		GC+CC	56 (42.7%)	96 (41.7%)	0.959 (0.622-1.481)	0.852
	Recesiva	CC	10 (7.6%)	13 (5.7%)	0.725 (0.309-1.703)	0.460
		GG+GC	121 (92.4%)	217 (94.3%)	1	/
8q24 rs13281615	Codominante	AA	37 (28.2%)	54 (23.5%)	1	0.583
		AG	62 (47.3%)	119 (21.7%)	1.315 (0.783-2.210)	0.301
		GG	32 (24.4%)	57 (24.8%)	1.220 (0.668-2.228)	0.517
	Dominante	AA	37 (28.2%)	54 (23.5%)	1	/
		AG+GG	94 (71.6%)	176 (76.5%)	1.283 (0.788-2.089)	0.316
	Recesiva	GG	32 (24.4%)	57 (24.8%)	1.019 (0.619-1.678)	0.940
		AA+AG	99 (75.6%)	173 (75.2%)	1	/

1.2.2 Distribución de genotipos en relación con el estado mutacional de BRCA1/2

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen *FGFR2*, rs2910164 del gen *MIR146* y rs13281615 de la región 8q24 en las pacientes con cáncer de mama al agruparlas de acuerdo con si son portadoras o no de mutación patogénica en *BRCA1/2* mostró que sólo el polimorfismo rs2910164 del gen *MIR146* presenta una distinta distribución.

En la tabla 16 se puede observar cómo la frecuencia del genotipo heterocigoto GC y de los genotipos conjuntos GC+CC del polimorfismo rs2910164 del gen *MIR146* se encuentra en

Resultados

menor frecuencia en pacientes con mutación en *BRCA1/2* que en aquellas no portadoras de mutación. Analizando las frecuencias alélicas se observa que el alelo C está relacionado con una disminución del riesgo de desarrollar cáncer de mama en aquellas pacientes no portadoras de mutación en *BRCA1/2* (OR=0.214 (0.065-0.705) ; p= 0.011).

Tabla 16. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en los grupos BRCA- y BRCA+.

	<i>Genotipo</i>	<i>BRCA-</i>	<i>BRCA+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>
<i>FGFR2</i> <i>rs2981582</i>	Codominante				
	CC	54 (26.0%)	7 (31.8%)	1	0.824
	CT	109 (52.4%)	11 (50%)	0.779 (0.286-2.121)	0.624
	TT	45 (21.6%)	4 (18.2%)	0.686 (0.189-2.493)	0.567
	Dominante				
	CC	54 (26.0%)	7 (31.8%)	1	/
Recesiva	CT+TT	154 (74%)	15 (68.2%)	0.751 (0.291-1.941)	0.555
	TT	45 (21.6%)	4 (18.2%)	0.805 (0.259-2.498)	0.707
<i>miR146</i> <i>rs2910164</i>	Codominante				
	CC+CT	163 (78.4%)	18 (81.8%)	1	/
	GG	114 (54.8%)	20 (90.9%)	1	0.031
	GC	82 (39.4%)	1 (4.5%)	0.070 (0.009-0.528)	0.010
	CC	12 (5.8%)	1 (4.5%)	0.475 (0.058-3.858)	0.486
	Dominante				
	GG	114 (54.8%)	20 (90.9%)	1	/
	GC+CC	94 (45.2%)	2 (9.1%)	0.121 (0.028-0.532)	0.005
	Recesiva				
	CC	12 (5.8%)	1 (4.5%)	0.778 (0.096-6.282)	0.814
Alelos	GG+GC	196 (94.2%)	21 (95.5%)	1	/
	G	310 (74.5%)	41 (93.2%)	1	/
	C	106 (25.5%)	3 (6.8%)	0.214 (0.065-0.705)	0.011
<i>8q24</i> <i>rs13281615</i>	Codominante				
	AA	53 (25%)	1 (4.5%)	1	0.150
	AG	104 (50.0%)	15 (68.2%)	7.644 (0.983-59.444)	0.052
	GG	51 (24.5%)	6 (27.3%)	6.235 (0.725-53.616)	0.095
	Dominante				
	AA	53 (25%)	1 (4.5%)	1	/
Recesiva	AG+GG	155 (74.5%)	21 (95.5%)	7.181 (0.943-54.684)	0.057
	GG	51 (24.5%)	6 (27.3%)	1.154 (0.429-3.107)	0.776
	AA+AG	157 (75.5%)	16 (72.7%)	1	/

Al realizar el análisis de riesgo de acuerdo al estado mutacional de *BRCA1/2* frente al grupo control, podemos observar que las pacientes BRCA- presentan una distribución diferente del polimorfismo del gen *FGFR2* relacionando el genotipo TT y el alelo T con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes no portadoras de mutación en *BRCA*. (Tabla 17)

Resultados

Tabla 17. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en controles y pacientes BRCA-.

	<i>Genotipo</i>	<i>Controles</i>	<i>BRCA-</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>FGFR2</i> <i>rs2981582</i>	Codominante	CC	50 (38.2%)	54 (26.0%)	1	0.001
		CT	73 (55.7%)	109 (52.4%)	1.383 (0.851-2.247)	0.191
		TT	8 (6.1%)	45 (21.6%)	5.208 (2.238-12.121)	<0.001
	Dominante	CC	50 (38.2%)	54 (26.0%)	1	/
		CT+TT	81 (61.8%)	154 (74%)	1.760 (1.101-2.815)	0.018
	Recesiva	TT	8 (6.1%)	45 (21.6%)	4.245 (1.931-9.330)	<0.001
		CC+CT	123 (93.9%)	163 (78.4%)	1	/
	Alelos	C	173 (41.7%)	217 (52.2%)	1	/
		T	89 (29%)	199 (47.8%)	1.783 (1.294-2.455)	<0.001
	<i>miR146</i> <i>rs2910164</i>	Codominante	GG	75 (57.3%)	114 (54.8%)	1
GC			46 (35.1%)	82 (39.4%)	1.173 (0.737-1.865)	0.501
Dominante		CC	10 (7.6%)	12 (5.8%)	0.789 (0.325-1.919)	0.602
		GG	75 (57.3%)	114 (54.8%)	1	/
Recesiva		GC+CC	56 (42.7%)	94 (45.2%)	1.104 (0.711-1.716)	0.659
		CC	10 (7.6%)	12 (5.8%)	0.741 (0.311-1.767)	0.499
		GG+GC	121 (92.4%)	196 (94.2%)	1	/
<i>8q24</i> <i>rs13281615</i>		Codominante	AA	37 (28.2%)	53 (25%)	1
	AG		62 (47.3%)	104 (50.0%)	1.171 (0.693-1.979)	0.555
	Dominante	GG	32 (24.4%)	51 (24.5%)	1.113 (0.605-2.047)	0.517
		AA	37 (28.2%)	53 (25%)	1	/
		AG+GG	94 (71.6%)	155 (74.5%)	1.151 (0.704-1.883)	0.575
	Recesiva	GG	32 (24.4%)	51 (24.5%)	1.005 (0.604-1.671)	0.985
		AA+AG	99 (75.6%)	157 (75.5%)	1	/

En el caso de las pacientes BRCA+, existen diferencias en la distribución de los genotipos de los polimorfismos del gen *MIR146* y de la región 8q24 en comparación a la población control. Los controles presentan con mayor frecuencia el genotipo GC rs2910164 del gen *MIR146*, relacionándose con un menor riesgo de desarrollar la enfermedad en este subgrupo de pacientes. Realizando el análisis por modelo de herencia dominante, los genotipos GC y CC del polimorfismo se encuentran con mayor frecuencia en el grupo control lo que se relaciona con un menor riesgo de desarrollar la enfermedad en controles frente a las pacientes BRCA+. También se encontraron diferencias en la distribución alélica ya que se portador del alelo C disminuye el riesgo de desarrollar la enfermedad (OR= 0.217 (0.650-0.725), p= 0.013).

Las frecuencias de la distribución del polimorfismo rs1328165 de la región 8q24 fueron diferentes entre los controles y las pacientes BRCA+, asociándose el genotipo AG a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes portadoras de mutación en los genes *BRCA1/2*. Al realizar el análisis por modelo de herencia dominante, los genotipos AG y GG se asocian por tanto a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (OR= 8.266 (1.073-63.687) p=0.043) (Tabla 18).

Resultados

Tabla 18. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en controles y pacientes BRCA+.

	<i>Genotipo</i>	<i>Controles</i>	<i>BRCA+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>FGFR2</i> <i>rs2981582</i>	Codominante	CC	50 (38.2%)	7 (31.8%)	1	0.177
		CT	73 (55.7%)	11 (50%)	1.076 (0.391-2.966)	0.887
		TT	8 (6.1%)	4 (18.2%)	3.571 (0.848-15.035)	0.083
	Dominante	CC	50 (38.2%)	7 (31.8%)	1	/
		CT+TT	81 (61.8%)	15 (68.2%)	1.323 (0.504-3.468)	0.570
	Recesiva	TT	8 (6.1%)	4 (18.2%)	3.417 (0.933-12.514)	0.064
CC+CT		123 (93.9%)	18 (81.8%)	1	/	
<i>miR146</i> <i>rs2910164</i>	Codominante	GG	75 (57.3%)	20 (90.9%)	1	0.041
		GC	46 (35.1%)	1 (4.5%)	0.082 (0.011-0.628)	0.016
		CC	10 (7.6%)	1 (4.5%)	0.375 (0.045-3.105)	0.363
	Dominante	GG	75 (57.3%)	20 (90.9%)	1	/
		GC+CC	56 (42.7%)	2 (9.1%)	0.134 (0.030-0.597)	0.008
	Recesiva	CC	10 (7.6%)	1 (4.5%)	0.576 (0.070-4.739)	0.608
		GG+GC	121 (92.4%)	21 (95.5%)	1	/
	Alelos	G	196 (74.7%)	41 (93.2%)	1	/
		C	66 (25.3%)	3 (6.8%)	0.217 (0.650-0.725)	0.013
<i>8q24</i> <i>rs13281615</i>	Codominante	AA	37 (28.2%)	1 (4.5%)	1	0.113
		AG	62 (47.3%)	15 (68.2%)	8.952 (1.135-70.571)	0.037
		GG	32 (24.4%)	6 (27.3%)	6.937 (0.793-60.714)	0.080
	Dominante	AA	37 (28.2%)	1 (4.5%)	1	/
		AG+GG	94 (71.6%)	21 (95.5%)	8.266 (1.073-63.687)	0.043
	Recesiva	GG	32 (24.4%)	6 (27.3%)	1.160 (0.419-3.215)	0.775
		AA+AG	99 (75.6%)	16 (72.7%)	1	/
	Alelos	A	136 (51.9%)	17 (28.7%)	1	/
G		126 (49.1%)	27 (61.3%)	1.714 (0.892-3.295)	0.106	

1.2.3 Distribución de genotipos en relación con la historia familiar de cáncer de mama.

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen *FGFR2*, rs2910164 del gen *MIR146* y rs13281615 de la región 8q24 en pacientes jóvenes con cáncer de mama en relación con la presencia o ausencia de familiares con cáncer de mama en primer y/o segundo grado no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. (Tabla A 5)

1.2.4 Distribución de genotipos en relación con el subtipo biológico del tumor

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2981582 del gen *FGFR2*, rs2910164 del gen *MIR146* y rs13281615 de la región 8q24 en pacientes jóvenes con cáncer de mama en relación con la expresión de los receptores de hormonas (RH), mostró diferencias estadísticamente significativas en el caso del polimorfismo del gen *FGFR2* (Tabla 19).

La frecuencia de la distribución del genotipo TT del polimorfismo rs2981582 fue menor en el grupo de pacientes con tumores sin expresión de los receptores hormonales (OR= 2.857 (1.072-7.613); p= 0.036). Por lo tanto, el alelo T es más frecuente en tumores con expresión RH+ en pacientes con cáncer de mama jóvenes (OR= 1.692 (1.069-2.680); p= 0.025)

Resultados

Tabla 19. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en los grupos RH- y RH+.

	<i>Genotipo</i>	<i>RH-</i>	<i>RH+</i>	<i>OR (IC95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>FGFR2</i> <i>rs2981582</i>	Codominante	CC	20 (37.7%)	35 (24.8%)	1	0.105
		CT	26 (49.1%)	71 (50.4%)	1.560 (0.767-3.173)	0.219
		TT	7 (13.2%)	35 (24.8%)	2.857 (1.072-7.613)	0.036
	Dominante	CC	20 (37.7%)	35 (24.8%)	1	/
		CT+TT	33 (62.3%)	106 (75.2%)	1.835 (0.935-3.602)	0.077
	Recesiva	TT	7 (13.2%)	35 (24.8%)	2.170 (0.898-5.243)	0.085
		CC+CT	46 (86.8%)	106 (75.2%)	1	/
	Alelos	C	66 (62.9%)	141 (50.0%)	1	/
		T	39 (37.1%)	141 (50.0%)	1.692 (1.069-2.680)	0.025
	<i>MIR146</i> <i>rs2910164</i>	Codominante	GG	33 (62.3%)	81 (57.4%)	1
GC			15 (28.3%)	54 (38.3%)	1.467 (0.728-2.956)	0.284
CC			5 (9.4%)	6 (4.3%)	0.489 (0.140-1.713)	0.263
Dominante		GG	33 (62.3%)	81 (57.4%)	1	/
		GC+CC	20 (37.7%)	60 (42.6%)	1.222 (0.639-2.337)	0.544
Recesiva		CC	5 (9.4%)	6 (4.3%)	0.427 (0.125-1.462)	0.175
		GG+GC	48 (90.6%)	135 (95.7%)	1	/
		AA	11 (20.8%)	34 (24.1%)	1	0.870
<i>8q24</i> <i>rs13281615</i>	Codominante	AG	28 (52.8%)	73 (51.8%)	0.843 (0.376-1.891)	0.680
		GG	14 (26.4%)	34 (24.1%)	0.786 (0.313-1.975)	0.608
		AA	11 (20.8%)	34 (24.1%)	1	/
	Dominante	AG+GG	42 (79.2%)	107 (75.9%)	0.824 (0.382-1.776)	0.622
		GG	14 (26.4%)	34 (24.1%)	0.885 (0.430-1.823)	0.741
	Recesiva	AA+AG	39 (73.6%)	107 (75.9%)	1	/

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos identificados mediante GWAS y la expresión del receptor HER2 o los distintos subtipos tumorales. (Tabla A 6- Tabla A 7)

1.3 Polimorfismos en genes relacionados con TP53

1.3.1 Distribución de genotipos en controles y pacientes

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs1042522 del gen *TP53* y rs2279744 del gen *MDM2* en 116 mujeres y en 230 pacientes jóvenes con cáncer de mama mostró que sólo el polimorfismo del gen *TP53* presenta una distribución distinta.

La distribución del genotipo homocigoto CC es mayor en mujeres sanas que en las pacientes jóvenes con cáncer de mama. Esta relación se ve confirmada en el análisis de riesgo por modelo de herencia recesivo y al analizar las frecuencias alélicas, de manera que ser portador del genotipo CC está relacionado con un menor riesgo de padecer cáncer de mama (OR= 0.401 (0.179-0.898); p= 0.026) (Tabla 20)

Resultados

Tabla 20. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con TP53 en controles y pacientes.

	<i>Genotipo</i>	<i>Controles</i>	<i>Pacientes</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
TP53 <i>rs1042522</i>	Codominante	GG	53 (45.7%)	129 (56.1%)	1	0.042
		GC	49 (42.2%)	89 (38.7%)	0.746 (0.465-1.198)	0.225
		CC	14 (12.1%)	12 (5.2%)	0.352 (0.153-0.811)	0.014
	Dominante	GG	53 (45.7%)	129 (56.1%)	1	/
		GC+CC	63 (54.3%)	101 (43.9%)	0.659 (0.421-1.032)	0.082
	Recesiva	CC	14 (12.1%)	12 (5.2%)	0.401 (0.179-0.898)	0.026
		GG+GC	102 (87.9%)	218 (94.8%)	1	/
	Alelos	G	155 (66.8%)	347 (75.4%)	1	/
		C	77 (33.2%)	113 (24.6%)	0.656 (0.464-0.927)	0.017
	MDM2 <i>rs2279744</i>	Codominante	TT	40 (34.5%)	101 (43.9%)	1
TG			54 (46.6%)	95 (41.3%)	0.697 (0.424-1.144)	0.153
GG			22 (19.0%)	34 (14.8%)	0.612 (0.320-1.172)	0.138
Dominante		TT	40 (34.5%)	101 (43.9%)	1	/
		TG+GG	76 (65.5%)	129 (56.1%)	0.672 (0.423-1.068)	0.092
Recesiva		GG	22 (19.0%)	34 (14.8%)	0.741 (0.411-1.337)	0.354
		TT+TG	94 (81.0%)	196 (85.2%)	1	/

1.3.2 Distribución de genotipos en relación con el estado mutacional de BRCA1/2

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs1042522 del gen *TP53* y rs2279744 del gen *MDM2* en las pacientes con cáncer de mama jóvenes dependiendo de si son portadoras o no de mutación patológica en *BRCA1/2*. (Tabla A 8)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos del polimorfismo del gen *TP53* al comparar las pacientes BRCA- frente al grupo control. Ser portador del genotipo CC se asoció con un menor riesgo de desarrollar la enfermedad. También se encontraron diferencias en la distribución alélica de forma que ser portador del alelo C se relacionó con un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes. (Tabla21)

Tabla 21. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con TP53 en controles y pacientes BRCA-.

	<i>Genotipo</i>	<i>Controles</i>	<i>BRCA-</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
TP53 <i>rs1042522</i>	Codominante	GG	53 (45.7%)	115 (55.3%)	1	0.028
		GC	49 (42.2%)	84 (40.4%)	0.790 (0.489-1.276)	0.336
		CC	14 (12.1%)	9 (4.3%)	0.296 (0.121-0.728)	0.008
	Dominante	GG	53 (45.7%)	115 (55.3%)	1	/
		GC+CC	63 (54.3%)	93 (44.7%)	0.680 (0.432-1.074)	0.098
	Recesiva	CC	14 (12.1%)	9 (4.3%)	0.330 (0.138-0.787)	0.012
		GG+GC	102 (87.9%)	199 (95.7%)	1	/
	Alelos	G	155 (66.8%)	314 (75.5%)	1	/
		C	77 (33.2%)	102 (24.5%)	0.654 (0.459-0.931)	0.018
	MDM2 <i>rs2279744</i>	Codominante	TT	40 (34.5%)	10 (45.5%)	1
TG			54 (46.6%)	8 (36.4%)	0.708 (0.428-1.172)	0.179
GG			22 (19.0%)	4 (18.2%)	0.599 (0.309-1.164)	0.131
Dominante		TT	40 (34.5%)	10 (45.5%)	1	/
		TG+GG	76 (65.5%)	12 (54.5%)	0.677 (0.423-1.084)	0.104
Recesiva		GG	22 (19.0%)	4 (18.2%)	0.720 (0.394-1.318)	0.287
		TT+TG	94 (81.0%)	18 (81.8%)	1	/

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis de la distribución de los genotipos entre controles y pacientes BRCA+. (Tabla A 9)

1.3.3 Distribución de genotipos en relación con la historia familiar de cáncer de mama.

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs1042522 del gen *TP53* y rs2279744 del gen *MDM2* en pacientes jóvenes con cáncer de mama en relación con la presencia o ausencia de familiares afectados de cáncer de mama en primer y/o segundo grado no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. (Tabla A 10)

1.3.4 Distribución de genotipos en relación con el subtipo biológico del tumor

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs1042522 del gen *TP53* y rs2279744 del gen *MDM2* en pacientes jóvenes con cáncer de mama en relación con la expresión de los receptores hormonales, la expresión de HER2 y el subtipo tumoral. (Tabla A 11- Tabla A 13)

1.4 Polimorfismos en genes relacionados con la actividad de la telomerasa

1.4.1 Distribución de genotipos en controles y pacientes

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2735940 del gen *TERT* y rs2293607 del gen *TERC* en el grupo de controles y pacientes jóvenes con cáncer de mama. (Tabla A 14)

1.4.2 Distribución de genotipos en relación con el estado mutacional de BRCA1/2

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2735940 del gen *TERT* y rs2293607 del gen *TERC* en las pacientes jóvenes con cáncer de mama dependiendo de si son portadoras o no de mutación patogénica en *BRCA1/2*. Tampoco al comparar los grupos BRCA- y BRCA+ frente a controles. (Tabla A 15-Tabla A 17)

1.4.3 Distribución de genotipos en relación con la historia familiar de cáncer de mama

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2735940 del gen *TERT* y rs2293607 del gen *TERC* en relación con los antecedentes familiares de cáncer de mama en primer y/o segundo grado mostró las siguientes diferencias (Tabla 22)

El genotipo CC del polimorfismo rs2735940 del gen *TERT* se encontró en mayor frecuencia en el grupo de pacientes con antecedentes familiares de la enfermedad. Al realizar el análisis del modelo de herencia recesivo y de las frecuencias alélicas se confirma esta observación, relacionando el alelo C con un mayor riesgo de padecer la enfermedad en aquellas pacientes con historia familiar de cáncer de mama en primer y/o segundo grado (OR= 1.532 (1.054-2.225); p= 0.025).

Resultados

Tabla 22. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la actividad de la telomerasa en los grupos CMF- y CMF+

	Genotipo	CMF-	CMF+	OR (IC95%)	p-valor	
<i>TERT</i> rs2735940	Codominante	TT	50 (40.0%)	31 (29.5%)	1	0.085
		TC	58 (46.4%)	49 (46.7%)	1.363 (0.757-2.452)	0.302
		CC	17 (13.6%)	25 (23.8%)	2.372 (1.107-5.081)	0.026
	Dominante	TT	50 (40.0%)	31 (29.5%)	1	/
		TC+CC	75 (60.0%)	74 (70.5%)	1.591 (0.917-2.762)	0.098
	Recesiva	CC	17 (13.6%)	25 (23.8%)	1.985 (1.005-3.921)	0.048
		TT+TC	108 (86.4%)	80 (76.2%)	1	/
	Alelos	T	158 (63.2%)	111 (52.9%)	1	/
		C	92 (36.8%)	99 (47.1%)	1.532 (1.054-2.225)	0.025
<i>TERC</i> rs2293607	Codominante	AA	78 (62.4%)	67 (63.8%)	1	0.971
		AG	43 (34.4%)	35 (33.3%)	0.948 (0.545-1.647)	0.849
		GG	4 (3.2%)	3 (2.9%)	0.873 (0.189-4.041)	0.862
	Dominante	AA	78 (62.4%)	67 (63.8%)	1	/
		AG+GG	47 (37.6%)	38 (36.2%)	0.941 (0.550-1.612)	0.825
	Recesiva	GG	4 (3.2%)	3 (2.9%)	0.890 (0.195-4.068)	0.88
		AA+AG	121 (96.8%)	102 (97.1%)	1	/

1.4.4 Distribución de genotipos en relación con el subtipo biológico del tumor

El análisis de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2735940 del gen *TERT* y rs2293607 del gen *TERC* en relación con las características biológicas del tumor como a expresión de los receptores hormonales, HER2 y la clasificación tumoral mostró sólo diferencias en el polimorfismo del gen *TERT*. (Tabla 23)

El genotipo TC del polimorfismo rs2735940 del gen *TERT* se encontró en mayor frecuencia en el grupo de pacientes con tumores RH-. Aunque no es una diferencia estadísticamente significativa, está muy próxima ($p=0.057$) y al realizar el análisis de riesgo por modelo dominante, se relaciona con los genotipos recesivos (TC y CC, $OR= 0.472 (0.228-0.97)$; $p= 0.036$), pudiendo sugerir la relación del alelo C con tumores que no expresan receptores hormonales ($p=0.069$).

Tabla 23. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos relacionados con la actividad de la telomerasa en relación con la expresión de los receptores hormonales en el tumor

	Genotipo	RH-	RH+	OR (IC95%)	p-valor	
<i>TERT</i> rs2735940	Codominante	TT	12 (22.6%)	54 (38.3%)	1	0.128
		TC	29 (54.7%)	62 (44.0%)	0.475 (0.221-1.021)	0.057
		CC	12 (22.6%)	25 (17.7%)	0.463 (0.183-1.173)	0.105
	Dominante	TT	12 (22.6%)	54 (38.3%)	1	/
		TC+CC	41 (77.4%)	87 (61.7%)	0.472 (0.228-0.97)	0.036
	Recesiva	CC	12 (22.6%)	25 (17.7%)	0.736 (0.339-1.598)	0.440
		TT+TC	41 (77.4%)	116 (82.3%)	1	/
	Alelos	T	53 (50.0%)	170 (57.5%)	1	/
		C	53 (50.0%)	112 (39.7%)	0.659 (0.420-1.033)	0.069
<i>TERC</i> rs2293607	Codominante	AA	31 (58.5%)	88 (62.4%)	1	0.464
		AG	19 (35.8%)	50 (35.5%)	0.927 (0.475-1.809)	0.824
		GG	3 (5.7%)	3 (2.1%)	0.352 (0.068-1.838)	0.216
	Dominante	AA	31 (58.5%)	88 (62.4%)	1	/
		AG+GG	22 (41.5%)	53 (37.6%)	0.849 (0.446-1.616)	0.617
	Recesiva	GG	3 (5.7%)	3 (2.1%)	0.362 (0.071-1.854)	0.223
		AA+AG	50 (94.3%)	138 (97.9%)	1	/

Resultados

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al relacionar la expresión del receptor HER2 o el subtipo tumoral con ninguno de los polimorfismos. (Tabla A 18-Tabla A 19)

1.5 Polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular

1.5.1 Distribución de genotipos en controles y pacientes

Se analizaron los polimorfismos rs2165241 y rs3825942 del gen *LOXL1* en 131 mujeres sanas sin antecedentes personales ni familiares de cáncer y en 230 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama antes de los 40 años encontrando las siguientes diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 24)

Únicamente se ha relacionado el genotipo TT del polimorfismo rs2165241 con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres jóvenes al realizar el análisis de riesgo por modelo de herencia recesivo (OR=1.719 (1.013-2.915); $p=0.044$).

Tabla 24. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular en controles y pacientes.

	Genotipo	Control	Pacientes	OR (IC95%)	p-valor	
<i>LOXL1</i> rs2165241	Codominante	CC	37 (28.2%)	56 (24.3%)	1	0.179
		CT	69 (52.7%)	110 (47.8%)	1.053 (0.631-1.759)	0.843
		TT	25 (19.1%)	64 (27.8%)	1.691 (0.909-3.149)	0.097
	Dominante	CC	37 (28.2%)	56 (24.3%)	1	/
		CT+TT	94 (71.8%)	174 (75.7%)	1.223 (0.753-1.987)	0.416
	Recesiva	TT	25 (19.1%)	64 (27.8%)	1.719 (1.013-2.915)	0.044
	Alelos	CC+CT	106 (80.9%)	166 (72.2%)	1	/
		C	143 (54.6%)	222 (48.3%)	1	/
	T	119 (45.4%)	238 (36.6%)	1.288 (0.950-1.746)	0.103	
<i>LOXL1</i> rs3825942	Codominante	GG	88 (67.2%)	158 (68.7%)	1	0.808
		GA	38 (29%)	66 (28.7%)	0.967 (0.601-1.558)	0.891
		AA	5 (3.8%)	6 (2.6%)	0.668 (0.198-2.253)	0.516
	Dominante	GG	88 (67.2%)	158 (68.7%)	1	/
		GA+AA	43 (32.8%)	72 (31.3%)	0.933 (0.589-1.476)	0.766
	Recesiva	AA	5 (3.8%)	6 (2.6%)	0.675 (0.202-2.256)	0.523
		GG+GA	126 (96.2%)	224 (97.2%)	1	/

1.5.2 Distribución de genotipos en relación con el estado mutacional de *BRCA1/2*

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los polimorfismos en las pacientes con cáncer de mama jóvenes en relación con la presencia de mutación en los genes *BRCA1/2*. (Tabla A 20)

Sin embargo, al subdividir el grupo de pacientes menores de 40 años según presenten o no mutación en los genes *BRCA1/2* en comparación al grupo control, encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución del polimorfismo rs2165241 en el grupo BRCA-. El estudio por codominancia recesiva mostró que ser portador del genotipo TT confiere mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en pacientes BRCA-. (Tabla 25)

Resultados

Tabla 25. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular en controles y pacientes BRCA-.

	Genotipo	Control	BRCA-	OR (IC95%)	p-valor	
LOXL1 rs2165241	Codominante	CC	37 (28.2%)	51 (24.5%)	1	0.187
		CT	69 (52.7%)	99 (47.6%)	1.041 (0.617-1.756)	0.881
		TT	25 (19.1%)	58 (27.9%)	1.683 (0.895-3.166)	0.106
	Dominante	CC	37 (28.2%)	51 (24.5%)	1	/
		CT+TT	94 (71.8%)	157 (75.5%)	1.212 (0.739-1.987)	0.447
	Recesiva	TT	25 (19.1%)	58 (27.9%)	1.724 (1.008-2.948)	0.047
	Alelos	CC+CT	106 (80.9%)	150 (72.1%)	1	/
		C	143 (54.6%)	201 (48.3%)	1	/
	T	119 (45.4%)	215(51.7%)	1.285 (0.943-1.753)	0.112	
LOXL1 rs3825942	Codominante	GG	88 (67.2%)	6 (2.9%)	1	0.880
		GA	38 (29%)	143 (68.8%)	0.955 (0.587-1.554)	0.854
		AA	5 (3.8%)	65 (31.3%)	0.738 (0.219-2.492)	0.625
	Dominante	GG	88 (67.2%)	6 (2.9%)	1	/
		GA+AA	43 (32.8%)	202 (97.1%)	0.930 (0.583-1.485)	0.762
	Recesiva	AA	5 (3.8%)	51 (24.5%)	0.749 (0.224-2.504)	0.638
		GG+GA	126 (96.2%)	99 (47.6%)	1	/

1.5.3 Distribución de genotipos en relación con la historia familiar de cáncer de mama

El estudio de la distribución de los genotipos de los polimorfismos rs2165241 y rs3825942 del gen LOXL1 en cuanto a la relación de los antecedentes familiares de cáncer de mama de las pacientes con cáncer de mama jóvenes, se han encontrado las siguientes diferencias en la frecuencia de las distribuciones genotípicas en el polimorfismo rs2165241 (Tabla 26)

Tabla 26. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular en los grupos CMF- y CMF+.

	Genotipo	CMF-	CMF+	OR (IC 95%)	p-valor	
LOXL1 rs2165241	Codominante	CC	40 (32.0%)	16 (15.2%)	1	0.012
		CT	55 (44.0%)	55 (52.4%)	2.5 (1.254-4.980)	0.009
		TT	30 (24.0%)	34 (32.4%)	2.833 (1.235-6.05)	0.007
	Dominante	CC	40 (32.0%)	16 (15.2%)	1	/
		CT+TT	85 (68.0%)	89 (84.8%)	2.618 (1.384-5.023)	0.004
	Recesiva	TT	30 (24.0%)	34 (32.4%)	1.516 (0.850-2.706)	0.159
	Alelos	CC+CT	95 (76.0%)	71 (67.6%)	1	/
		C	143 (54.6%)	87 (48.7%)	1	/
	T	119 (48.7%)	123 (58.6%)	1.699 (1.177-2.452)	0.005	
LOXL1 rs3825942	Codominante	GG	83 (66.4%)	75 (71.4%)	1	0.653
		GA	39 (31.2%)	27 (25.7%)	0.766 (0.428-1.371)	0.369
		AA	3 (2.4%)	3 (2.9%)	1.107 (0.217-5.651)	0.903
	Dominante	GG	83 (66.4%)	75 (71.4%)	1	/
		GA+AA	42 (33.6%)	30 (28.6%)	0.790 (0.450-1.388)	0.413
	Recesiva	AA	3 (2.4%)	3 (2.9%)	1.196 (0.236-6.055)	0.829
	GG+GA	122 (97.6%)	102 (97.1%)	1	/	

La frecuencia del genotipo homocigoto CC fue mayor en el grupo CMF-. Al realizar el análisis de riesgo por modelo de herencia dominante, los genotipos CT+TT se relacionaron con un aumento del riesgo de la enfermedad en aquellas pacientes con antecedentes familiares en primer y/o segundo grado de la enfermedad. Al realizar el análisis de las frecuencias alélicas se

confirma que es el alelo T el que se encuentra relacionado con un mayor riesgo de cáncer de mama en pacientes jóvenes e historia familiar de la enfermedad (OR= 1.699 (1.177-2.452); p=0.005).

1.5.4 Distribución de genotipos en relación con el subtipo biológico del tumor

En cuanto a la relación con variables clínicas como expresión tumoral de receptores hormonales, HER2 o el subtipo biológico de tumor, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los polimorfismos del gen *LOXL1*. (Tabla A 22-Tabla A 24)

1.6 Polimorfismos en genes relacionados con la autofagia

1.6.1 Distribución de genotipos en controles y pacientes

Se analizaron los polimorfismos rs3759601 del gen *ATG2B*, rs2245214 del gen *ATG5*, rs2241880 del gen *ATG16L1* y rs1864183 del gen *ATG10* en 131 mujeres sanas sin antecedentes personales ni familiares de cáncer y en 230 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama antes de los 40 años sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los polimorfismos estudiados de la vía de la autofagia. (Tabla A 25)

1.6.2 Distribución de genotipos en relación con el estado mutacional de BRCA1/2

Al realizar el análisis de los polimorfismos en genes implicados en la autofagia y el estado mutacional de *BRCA1/2* en las pacientes jóvenes con cáncer de mama sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el polimorfismo rs2245214 del gen *ATG5*. En la Tabla 27 se observa una menor frecuencia del genotipo homocigoto GG en el grupo de pacientes no portadoras de mutación. Al realizar el análisis por modelo de herencia recesivo y de frecuencia alélica, se confirma que ser portador del genotipo GG y del alelo G incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad en presencia de mutación en los genes *BRCA1/2* (GG; OR= 4.900 (1.484-16.17); p= 0.009).

Resultados

Tabla 27. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia en los grupos BRCA- y BRCA+.

	Genotipo	BRCA-	BRCA+	OR (IC 95%)	p-valor	
<i>ATG2B</i> <i>rs3759601</i>	Codominante	CC	98 (47.1%)	12 (54.5%)	1	0.656
		CG	89 (42.8%)	9 (40.9%)	0.826 (0.332-2.053)	0.680
		GG	21 (10.1%)	1 (4.5%)	0.389 (0.048-3.156)	0.377
	Dominante	CC	98 (47.1%)	12 (54.5%)	1	/
		CG+GG	110 (52.9%)	10 (45.5%)	0.742 (0.307-1.794)	0.508
	Recesiva	GG	21 (10.1%)	1 (4.5%)	0.424 (0.054-3.314)	0.413
<i>ATG5</i> <i>rs2245214</i>	Codominante	CC	84 (40.4%)	6 (27.3%)	1	0.008
		CG	104 (50.0%)	9 (40.9%)	1.212 (0.415-3.54)	0.726
		GG	20 (9.6%)	7 (31.8%)	4.900 (1.484-16.17)	0.009
	Dominante	CC	84 (40.4%)	6 (27.3%)	1	/
		CG+GG	124 (59.6%)	16 (72.7%)	1.806 (0.679-4.805)	0.236
	Recesiva	GG	20 (9.6%)	7 (31.8%)	4.387 (1.600-12.028)	0.004
Alelos	CC+CG	188 (90.4%)	15 (68.2%)	1	/	
	C	272 (65.4%)	21 (47.7%)	1	/	
	G	144 (36.6%)	23 (52.3%)	2.069 (1.107-3.865)	0.022	
<i>ATG16L1</i> <i>rs2241880</i>	Codominante	TT	60 (28.8%)	8 (36.4%)	1	0.745
		TC	112 (53.8%)	11 (50.0%)	0.737 (0.281-1.930)	0.534
		CC	36 (17.3%)	3 (13.6%)	0.625 (0.156-2.509)	0.507
	Dominante	TT	60 (28.8%)	8 (36.4%)	1	/
		TC+CC	148 (71.2%)	14 (63.6%)	0.709 (0.283-1.778)	0.464
	Recesiva	CC	36 (17.3%)	3 (13.6%)	0.754 (0.212-2.685)	0.663
<i>ATG10</i> <i>rs1864183</i>	Codominante	CC	68 (32.7%)	7 (31.8%)	1	0.578
		CT	104 (50.0%)	13 (59.1%)	1.214 (0.461-3.198)	0.694
		TT	36 (17.3%)	2 (9.1%)	0.540 (0.107-2.734)	0.456
	Dominante	CC	68 (32.7%)	7 (31.8%)	1	/
		CT+TT	98 (74.8%)	155 (67.4%)	1.041 (0.405-2.672)	0.934
	Recesiva	TT	23 (17.6%)	38 (16.5%)	0.478 (0.107-2.135)	0.334
	CC+CT	108 (82.4%)	192 (83.5%)	1	/	

Se analizó a los pacientes BRCA- y BRCA+, por separado, frente a controles asociándose el genotipo GG con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en las pacientes BRCA+ (OR=6.045 (1.703-21.465); p= 0.005). (Tabla 28)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los controles y las pacientes BRCA-. (Tabla A 26)

Resultados

Tabla 28. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en controles y pacientes BRCA+.

	Genotipo	Control	BRCA+	OR (IC 95%)	p-valor	
<i>ATG2B</i> <i>rs3759601</i>	Codominante	CC	56 (42.7%)	12 (54.5%)	1	0.381
		CG	55 (42.0%)	9 (40.9%)	0.764 (0.298-1.957)	0.761
		GG	20 (15.3%)	1 (4.5%)	0.233 (0.028-1.911)	0.175
	Dominante	CC	56 (42.7%)	12 (54.5%)	1	/
		CG+GG	75 (57.3%)	10 (45.5%)	0.622 (0.251-1.542)	0.306
	Recesiva	GG	20 (15.3%)	1 (4.5%)	0.264 (0.034-2.077)	0.206
<i>ATG5</i> <i>rs2245214</i>	Codominante	CC	57 (43.5%)	6 (27.3%)	1	0.012
		CG	63 (48.1%)	9 (40.9%)	1.357 (0.455-4.050)	0.584
		GG	11 (8.4%)	7 (31.8%)	6.045 (1.703-21.465)	0.005
	Dominante	CC	57 (43.5%)	6 (27.3%)	1	/
		CG+GG	74 (56.5%)	16 (72.7%)	2.054 (0.756-5.582)	0.158
	Recesiva	GG	11 (8.4%)	7 (31.8%)	5.091 (1.713-15.128)	0.003
Alelos	CC+CG	120 (91.6%)	15 (68.2%)	1	/	
	C	177 (67.6%)	21 (47.7%)	1	/	
	G	85 (32.4%)	23 (52.3%)	2.281 (1.196-4.350)	0.012	
<i>ATG16L1</i> <i>rs2241880</i>	Codominante	TT	34 (26.0%)	8 (36.4%)	1	0.417
		TC	64 (48.9%)	11 (50.0%)	0.730 (268-1.988)	0.539
		CC	33 (25.2%)	3 (13.6%)	0.386 (0.094-1.584)	0.186
	Dominante	TT	34 (26.0%)	8 (36.4%)	1	/
		TC+CC	97 (74.0%)	14 (63.6%)	0.613 (0.237-1.590)	0.315
	Recesiva	CC	33 (25.2%)	3 (13.6%)	0.469 (0.130-1.686)	0.264
<i>ATG10</i> <i>rs1864183</i>	Codominante	CC	33 (25.2%)	7 (31.8%)	1	0.574
		CT	75 (57.3%)	13 (59.1%)	0.817 (0.299-2.2344)	0.694
		TT	23 (17.6%)	2 (9.1%)	0.410 (0.410-0.078)	0.202
	Dominante	CC	33 (25.2%)	7 (31.8%)	1	/
		CT+TT	98 (74.8%)	155 (67.4%)	0.722 (0.271-1.1923)	0.514
	Recesiva	TT	23 (17.6%)	38 (16.5%)	0.470 (0.103-2.150)	0.330
	CC+CT	108 (82.4%)	192 (83.5%)	1	/	

1.6.3 Distribución de genotipos en relación con la historia familiar de cáncer de mama

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas a la hora de asociar los antecedentes familiares de cáncer de mama y los distintos polimorfismos de la ruta de autofagia. Se han encontrado distintas distribuciones genotípicas en los polimorfismos rs2241880 del gen *ATG16L1* y rs1864183 de *ATG10*. (Tabla 29)

La frecuencia del genotipo TC del polimorfismo rs2241880 del gen *ATG16L1* se encontró ligeramente en mayor frecuencia en el grupo de pacientes sin antecedentes familiares de la enfermedad. Aunque no es una diferencia estadísticamente significativa, al realizar el análisis de riesgo del modelo de herencia dominante, se relaciona el genotipo TT con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en pacientes jóvenes con cáncer de mama con antecedentes familiares (OR= 1.796 (1.014-3.181); p= 0.045).

Al analizar el polimorfismo rs1864183 del gen *ATG10* ocurre algo similar. La frecuencia del genotipo heterocigoto CT es mayor en el grupo CMF+ frente al CMF-. Aunque se encuentra muy cercano a ser un valor estadísticamente significativo (p=0.051), al realizar el análisis de riesgo se relacionan los genotipos CT y TT con el grupo de pacientes con antecedentes familiares de la enfermedad OR= 1.801 (1.022-3.175); p= 0.042).

Resultados

Tabla 29. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en los grupos CMF- y CMF+

	Genotipo	CMF-	CMF+	OR (IC 95%)	p-valor	
ATG2B <i>rs3759601</i>	Codominante	CC	53 (42.4%)	57 (54.3%)	1	0.171
		CG	60 (48.0%)	38 (36.2%)	0.589 (0.339-1.023)	0.060
		GG	12 (9.6%)	10 (9.5%)	0.775 (0.309-1.942)	0.586
	Dominante	CC	53 (42.4%)	57 (54.3%)	1	/
		CG+GG	72 (57.6%)	48 (45.7%)	0.620 (0.368-1.046)	0.073
	Recesiva	GG	12 (9.6%)	10 (9.5%)	0.991 (0.410-2.396)	0.984
CC+CG		113 (90.4%)	95 (90.5%)	1	/	
ATG5 <i>rs2245214</i>	Codominante	CC	48 (38.4%)	42 (40.0%)	1	0.907
		CG	63 (50.4%)	50 (47.6%)	0.907 (0.520-1.582)	0.731
		GG	14 (11.2%)	13 (12.4%)	1.061 (0.449-2.510)	0.892
	Dominante	CC	48 (38.4%)	42 (40.0%)	1	/
		CG+GG	77 (61.6%)	63 (60.0%)	0.935 (0.550-1.591)	0.804
	Recesiva	GG	14 (11.2%)	13 (12.4%)	1.120 (0.501-2.503)	0.782
CC+CG		111 (88.8%)	92 (87.6%)	1	/	
ATG16L1 <i>rs2241880</i>	Codominante	TT	30 (24.0%)	38 (36.2%)	1	0.123
		TC	71 (56.8%)	52 (49.5%)	0.578 (0.318-1.051)	0.072
		CC	24 (19.2%)	15 (14.3%)	0.493 (0.221-1.102)	0.085
	Dominante	TT	30 (24.0%)	38 (36.2%)	1.796 (1.014-3.181)	0.045
		TC+CC	95 (76.0%)	67 (63.8%)	1	/
	Recesiva	CC	24 (19.2%)	15 (14.3%)	0.701 (0.347-1.419)	0.324
		TT+TC	101 (80.8%)	90 (85.7%)	1	/
	Alelos	T	131 (52.4%)	128 (61.0%)	1.418 (0.977-2.057)	0.066
C		119 (47.6%)	82 (39.0%)	1	/	
ATG10 <i>rs1864183</i>	Codominante	CC	48 (38.4)	27 (25.7%)	1	0.126
		CT	58 (46.4%)	59 (56.2%)	1.808 (0.998-3.278)	0.051
		TT	19 (15.2%)	19 (18.1%)	1.778 (0.806-3.924)	0.154
	Dominante	CC	48 (38.4)	27 (25.7%)	1	/
		CT+TT	77 (61.6%)	78 (74.3%)	1.801 (1.022-3.175)	0.042
	Recesiva	TT	19 (15.2%)	19 (18.1%)	1.233 (0.614-2.474)	0.556
CC+CT		106 (84.8%)	86 (81.9%)	1	/	
C		154 (61.6%)	113 (53.8%)	1	/	
Alelos	T	96 (38.4%)	97 (46.2%)	1.377 (0.949-1.998)	0.092	

1.6.4 Distribución de genotipos en relación con el subtipo biológico del tumor

Al analizar los polimorfismos rs3759601 del gen *ATG2B*, rs22452 del gen *ATG5*, rs1864183 del gen *ATG10* y rs2241880 del gen *ATG16L1* se ha relacionado el polimorfismo del gen *ATG16* con la expresión del receptor HER2. La frecuencia del genotipo homocigoto CC del polimorfismo rs2241880 es mayor en el grupo de pacientes con tumores que sobreexpresan HER2. Al realizar el análisis de riesgo y de frecuencias alélicas se confirma que el genotipo CC (OR= 3.172 (1.456-6.901); p= 0.004) y el alelo C (OR=1.688 (1.047-2.723); p= 0.032) están relacionadas con tumores de pacientes jóvenes HER2+. (Tabla 30)

Resultados

Tabla 30. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en los grupos HER2- y HER2+

	Genotipo	HER2-	HER2+	OR (IC 95%)	p-valor	
ATG2B <i>rs3759601</i>	Codominante	CC	63 (47.7%)	21 (45.7%)	1	0.788
		CG	59 (44.7%)	20 (43.5%)	1.017 (0.501-2.064)	0.963
		GG	10 (7.6%)	5 (10.9%)	1.500 (0.460-4.890)	0.501
	Dominante	CC	63 (47.7%)	21 (45.7%)	1	/
		CG+GG	69 (52.3%)	25 (54.3%)	10.87 (0.554-2.131)	0.808
	Recesiva	GG	10 (7.6%)	5 (10.9%)	1.488 (0.480-4.607)	0.491
CC+CG		122 (92.4%)	41 (89.1%)	1	/	
ATG5 <i>rs2245214</i>	Codominante	CC	50 (37.9%)	19 (41.3%)	1	0.787
		CG	65 (49.2%)	20 (43.5%)	0.810 (0.391-1.677)	0.570
		GG	17 (12.9%)	7 (15.2%)	1.084 (0.388-3.025)	0.878
	Dominante	CC	50 (37.9%)	19 (41.3%)	1	/
		CG+GG	82 (62.1%)	27 (58.7%)	1.090 (0.570-2.082)	0.795
	Recesiva	GG	17 (12.9%)	7 (15.2%)	0.715 (0.299-1.710)	0.451
	CC+CG	115 (87.1%)	39 (84.8%)	1	/	
ATG16L1 <i>rs2241880</i>	Codominante	TT	39 (29.5%)	11 (23.9%)	1	0.014
		TC	74 (56.1%)	19 (41.3%)	0.910 (0.394-2.104)	0.826
		CC	19 (14.4%)	16 (34.8%)	2.986 (1.162-7.665)	0.023
	Dominante	TT	39 (29.5%)	11 (23.9%)	1	/
		TC+CC	93 (70.5%)	35 (76.1%)	1.334 (0.615-2.893)	0.465
	Recesiva	CC	19 (14.4%)	16 (34.8%)	3.172 (1.456-6.901)	0.004
		TT+TC	113 (85.6%)	30 (65.2%)	1	/
	Alelos	T	152(57.6%)	41 (44.6%)	1	/
C		112 (42.4%)	51 (55.4%)	1.688 (1.047-2.723)	0.032	
ATG10 <i>rs1864183</i>	Codominante	CC	152(57.6%)	41 (44.6%)	1	0.996
		CT	112 (42.4%)	51 (55.4%)	1.035 (0.490-2.188)	0.928
		TT	44 (33.3%)	15 (32.6%)	1.027 (0.362-2.908)	0.960
	Dominante	CC	68 (51.5%)	24 (52.2%)	1	/
		CT+TT	20 (15.2%)	7 (15.2%)	1.033 (0.506-2.112)	0.928
	Recesiva	TT	44 (33.3%)	15 (32.6%)	1.005 (0.395-2.559)	0.991
	CC+CT	88 (66.7%)	31 (67.4%)	1	/	

Aunque no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos en los genes relacionados con la autofagia y la expresión tumoral de los receptores hormonales sí se han encontrado diferencias en las distribuciones de los genotipos del polimorfismo de ATG16L1 y el subtipo tumoral ($p=0.008$). (Tabla 31)

El genotipo CC del polimorfismo rs2241880 se encuentra en mayor proporción en tumores del tipo luminal B (RE+, RP+, HER2+), lo que se confirma al realizar el análisis por modelo de herencia recesivo ($p=0.016$)

Resultados

Tabla 31. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en relación con el subtipo tumoral

	<i>Genotipo</i>	<i>Luminal A</i>	<i>Luminal B</i>	<i>Triple negativo</i>	<i>HER2</i>	<i>p-valor</i>		
<i>ATG2B</i> <i>rs3759601</i>	Codominante	CC	48 (50.0%)	14 (42.4%)	15 (42.9%)	7 (53.8%)	0.722	
		CG	43 (44.8%)	16 (48.5%)	16 (45.7%)	4 (30.8%)		
		GG	5 (5.2%)	3 (9.1%)	4 (11.4%)	2 (15.4%)		
	Dominante	CC	48 (50.0%)	14 (42.4%)	15 (42.9%)	7 (53.8%)		/
		CG+GG	48 (50.0%)	19 (57.6%)	20 (57.1%)	6 (46.2%)		0.779
		GG	5 (5.2%)	3 (9.1%)	4 (11.4%)	2 (15.4%)		0.454
Recesiva	CC+CG	91 (94.8%)	30 (90.3%)	31 (88.6%)	11 (84.6%)	/		
	CC	38 (39.6%)	13 (39.4%)	11 (31.4%)	6 (46.2%)	0.788		
	Codominante	CG	47 (49.0%)	16 (48.5%)	18 (51.4%)		4 (30.8%)	
GG		11 (11.5%)	4 (12.1%)	6 (17.1%)	3 (23.1%)			
Dominante		CC	38 (39.6%)	13 (39.4%)	11 (31.4%)		6 (46.2%)	/
	CG+GG	58 (60.4%)	20 (60.6%)	24 (68.6%)	7 (53.8%)		0.772	
	Recesiva	GG	11 (11.5%)	4 (12.1%)	6 (17.1%)		3 (23.1%)	0.613
CC+CG		85 (88.5%)	29 (87.9%)	29 (82.6%)	10 (76.9%)	/		
<i>ATG16L1</i> <i>rs2241880</i>		Codominante	TT	33 (34.4%)	6 (18.2%)	5 (14.3%)	5 (38.5%)	0.008
	TC		49 (51.0%)	14 (42.4%)	25 (71.4%)	5 (38.5%)		
	CC		14 (14.6%)	13 (39.4%)	5 (14.3%)	3 (23.1%)		
	Dominante	TT	33 (34.4%)	6 (18.2%)	5 (14.3%)	5 (38.5%)	/	
		TC+CC	63 (65.6%)	27 (81.8%)	30 (85.7%)	8 (61.5%)	0.056	
		Recesiva	CC	14 (14.6%)	13 (39.4%)	5 (14.3%)	3 (23.1%)	
TT+TC	82 (85.4%)		20 (60.6%)	30 (85.7%)	10 (76.9%)	/		
<i>ATG10</i> <i>rs1864183</i>	Codominante		CC	29 (30.2%)	12 (36.4%)	15 (42.9%)	3 (23.1%)	0.662
		CT	52 (54.2%)	15 (45.5%)	15 (42.9%)	9 (69.2%)		
		TT	15 (15.6%)	6 (18.2%)	5 (14.3%)	1 (7.7%)		
	Dominante	CC	29 (30.2%)	12 (36.4%)	15 (42.9%)	3 (23.1%)	0.566	
		CT+TT	49 (51.0%)	15 (45.5%)	13 (37.1%)	6 (46.2%)		
		Recesiva	TT	15 (15.6%)	6 (18.2%)	5 (14.3%)		
CC+CT	91 (94.8%)		33 (100%)	31 (88.6%)	12 (92.3%)	0.230		

A modo de resumen, en la tabla 32 mostramos los resultados significativos del análisis de las distribuciones de los genotipos de los polimorfismos estudiados.

Resultados

Tabla 32. Tabla resumen de las distribuciones de los genotipos de los polimorfismos estudiados y su implicación en el cáncer de mama. CM (cáncer de mama).

	<i>SNP</i>	<i>Asociación</i>
Controles vs Pacientes	BRCA1 rs799917	TT mayor riesgo CM
	MLH1 rs1800734	Alelo A menor riesgo CM
	FGFR2 rs2981582	TT y alelo T mayor riesgo CM
	TP53 rs1042522	CC menor riesgo CM
	LOXL1 rs2165241	TT mayor riesgo CM
BRCA- vs BRCA+	MLH1 rs1800734	AA asociado a CM en BRCA+
	MIR146 rs2910164	Alelo G asociado CM en BRCA+
	ATG5 rs2245214	GG y alelo G asociado a CM en BRCA+
Controles vs BRCA-	BRCA1 rs799917	TT mayor riesgo CM en BRCA-
	MLH1 rs1800734	Alelo A menor riesgo CM
	FGFR2 rs2981582	TT y alelo T mayor riesgo CM en BRCA-
	TP53 rs1042522	CC menor riesgo CM
	LOXL1 rs2165241	TT mayor riesgo CM en BRCA-
Controles vs BRCA+	MLH1 rs1800734	Alelo A asociado CM en BRCA+
	MIR146 rs2910164	Alelo G asociado CM en BRCA+
	8q24 rs13281615	AG asociado a CM en BRCA+
	ATG5 rs2245214	GG y alelo G asociado a CM en BRCA+
CMF- vs CMF+	TERT rs2735940	CC y alelo C asociado a CMF+
	LOXL1 rs2165241	Alelo T asociado a CMF+
	ATG16L1 rs2241880	TT modelo dominante asociado a CMF-
	ATG10 rs1864183	CT y TT asociado a riesgo de CMF+
Subtipo tumoral	BRCA1 rs16942	AG y GG asociado a tumores RH+
	FGFR2 rs2981582	TT y alelo T asociado a tumores RH+
	TERT rs2735940	TC y CC dominante asociado a RH+
	ATG16L1 rs224188	CC y alelo C asociado a HER2+ y subtipo Luminal B

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se quiso determinar la posible asociación entre la segregación conjunta de los alelos de los polimorfismos del gen *ATG5* rs2245214 y del gen *MLH1* rs18000374 entre las pacientes BRCA- y BRCA+ y de lo polimorfismos *TERT* rs2735940, *ATG10* rs1864183 y *LOXL1* rs2165241 entre las pacientes CMF- y CMF+. No se pudo realizar el análisis de segregación conjunta entre pacientes y controles al tener dos poblaciones control distintas.

En la Tabla 33 se muestran las frecuencias relativas de cada conjunto de alelos de los polimorfismos del gen *ATG5* rs2245214 y del gen *MLH1* rs18000374. Como referencia se toma el conjunto más frecuente que se muestra en primer lugar. Se observó que la segregación conjunta de los alelos mutados, GA, se relacionó con el cáncer de mama en mujeres jóvenes portadoras de mutación en los genes *BRCA1/2* (OR= 3.71 (1.43-9.58); p= 0.007).

Resultados

Tabla 33. Frecuencias de los conjuntos de alelos originados por la segregación de los polimorfismos *ATG5* rs2245214 y *MLH1* rs18000374 en las pacientes BRCA- y BRCA+.

Alelos	<i>ATG5</i>	<i>MLH1</i>	BRCA-	BRCA+	OR (IC 95%)	p-valor
C G	C	G	0.5172	0.3445	1	/
G G	G	G	0.2568	0.3146	2.01 (0.83-4.83)	0.12
C A	C	A	0.1366	0.1327	1.48 (0.41-5.27)	0.55
G A	G	A	0.1027	0.2082	3.71 (1.43-9.58)	0.007

También se realizó el análisis entre los grupos CMF- y CMF+ de la segregación conjunta de los polimorfismos *TERT* rs2735940, *ATG10* rs1864183 y *LOXL1* rs2165241. Al igual que en la tabla 33, el conjunto más frecuente se muestra en la primera línea. La única asociación de alelos que segrega con distinta frecuencia entre ambos grupos es el CTC, que encontramos relacionado con el cáncer de mama en aquellas pacientes con antecedentes familiares de la enfermedad (OR= 3.49 (1.28 - 9.49); p= 0.015). (Tabla 34)

Tabla 34. Frecuencias de los conjuntos de alelos originados por la segregación de los polimorfismos *TERT* rs2735940, *ATG10* rs1864183 y *LOXL1* rs2165241 en las pacientes CMF- y CMF+

Alelos	<i>TERT</i>	<i>ATG10</i>	<i>LOXL1</i>	CMF-	CMF+	OR (IC 95%)	p-valor
T C C	T	C	C	0.1987	0.1912	1	/
T C T	T	C	T	0.1878	0.1234	0.82 (0.34 - 1.97)	0.65
T T T	T	T	T	0.1477	0.1375	1.02 (0.45 - 2.29)	0.97
C C C	C	C	C	0.1115	0.1513	1.63 (0.65 - 4.06)	0.3
C T C	C	T	C	0.052	0.1668	3.49 (1.28 - 9.49)	0.015
C C T	C	C	T	0.1179	0.0723	0.64 (0.25 - 1.64)	0.35
T T C	T	T	C	0.0978	0.0765	0.99 (0.32 - 3.09)	0.99
C T T	C	T	T	0.0866	0.0811	1.22 (0.42 - 3.52)	0.71

2. ANÁLISIS DE ALTERACIONES CITOGENÉTICAS EN TUMORES DE CÁNCER DE MAMA DE MUJERES JÓVENES

Las nuevas plataformas de *microarrays* genómicos permiten el estudio de alteraciones genómicas en el tumor con una mayor resolución que técnicas convencionales utilizadas anteriormente como los aCGH.

Se analizaron las alteraciones citogenéticas de 58 tumores procedentes de mujeres con cáncer de mama diagnosticado antes de los 40 años mediante dos plataformas de *microarrays* genómicos. Las características clinicopatológicas se resumen en la Tabla 35.

Tabla 35. Características de los tumores embebidos en parafina estudiados por *microarrays* genómicos.

	Pacientes (n=58)
Mediana de edad, años [IQR]	34 [23-39]
Expresión de p53	n=50
Negativa	23 (46%)
<50%	15 (30%)
≥50%	12 (24%)
Expresión de ki67	n=54
<15%	15 (27.7%)
≥15%	39 (72.2%)
Grado del tumor	n=50
I	5 (10%)
II	16 (32%)
III	29 (58%)
Expresión de receptores hormonales (RH)	n=58
RH+	42 (72.4%)
RH-	16 (27.5%)
Expresión de HER2	n=54
HER2+	19 (35.2%)
HER2-	35 (64.8%)
Subtipo de tumor	n=55
Luminal A	26 (47.2%)
Luminal B	15 (27.23%)
Triple Negativo	10 (18.2%)
Her2	4 (7.3%)

En primer lugar, se procedió a la comparación de las alteraciones encontradas a nivel de CNAs entre las mujeres con cáncer de mama jóvenes y las mujeres con cáncer de mama entre 40-70 años.

Posteriormente se procedió a la caracterización de los tumores de mujeres jóvenes mediante el análisis de CNAs e inestabilidad genómica.

En el estudio de CNAs, nos hemos centrado preferiblemente en el estudio de aquellas alteraciones focales, es decir, aquellas CNAs de un tamaño limitado, menor de 3Mb, que frecuentemente se encuentran enriquecidas con genes *driver* en el desarrollo tumoral.

Resultados

2.1 Análisis comparativo de las alteraciones en el número de copias en tumores de mama de mujeres menores de 40 años y mayores de 40 años

Se procedió a realizar un análisis comparativo entre las alteraciones publicadas en tumores de pacientes con edades comprendidas entre 40-70 años y las alteraciones analizadas en nuestra cohorte de pacientes menores de 40 años. La base de datos pública que ofrece METABRIC presenta información sobre CNAs, SNPs y datos clinicopatológicos del tumor en aproximadamente 2000 pacientes.

De este grupo de 2000 pacientes se seleccionaron 1398 mujeres diagnosticadas entre los 40-70 años de edad y se obtuvieron los datos a nivel de alteraciones genómicas somáticas y se compararon con los datos obtenidos en nuestro grupo de pacientes menores de 40 años. Previo a este análisis comparativo se realizó un tratamiento de los datos segmentados para obtener los datos con los mismos puntos de corte que los usados en METABRIC.

Tabla 36. Comparación entre las regiones alteradas con mayor frecuencia y estadísticamente significativas entre los tumores de cáncer de mama en mujeres jóvenes y mujeres mayores. En negrita se muestran aquellos genes de interés descritos previamente en cáncer de mama.

	% Mujeres jóvenes (<40 años, n=58)	% Mujeres mayores (40-70 años, n=1398)	Posibles genes implicados	p-valor	
GANANCIAS	1p12	39	4	NOTCH2	<0.001
	1q21	15	40	SHC1, S100A, RNAT1	0.002
	1q23-q25	15	40	ETV3, CRP, PRDX6	0.002
	1q32	15	40	MDM4,ELK4	0.002
	1q42-q44	12	40	EGLN1	<0.001
	12q24.13	33	3	PTPN11	<0.001
	18p11.31	24	3	TGIF1	<0.001
	20q13.2	47	17	ZNF217	<0.001
	20q13.32	32	16	GNAS	0.016
	4q12	18	2	KDR	<0.001
PÉRDIDAS	8p11.22	22	4	ADAM3A	<0.001
	8p23.2	8	37	CSMD1	<0.001
	15q11.2	3	31		<0.001
	16q12-q24	2	26	CDH1, TOX3, BCAR1,NOD2	<0.001

Las diferencias más frecuentes y estadísticamente significativas se dan en regiones alteradas comunmente en cáncer de mama como las ganancias en 1q y 20q y específicas en los tumores de mujeres jóvenes en 1p12, 12q24 y 18p11. En cuanto a las pérdidas, solo en dos regiones focales encontramos mayor pérdida de material genómico en los tumores de mujeres jóvenes; en la región 4q12 y 8p11, mientras que parte del brazo corto del cromosoma 8 se encuentra perdido con mayor recurrencia en las mujeres mayores, además de pérdida en casi todo el brazo largo del cromosoma 16.

Estas regiones focales perdidas con mayor frecuencia en los tumores de mujeres jóvenes podrían sugerir la presencia de genes supresores tumorales como se ha descrito previamente en el brazo 8p.

2.2 Análisis de alteraciones en el número de copias en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años

El estudio de las ganancias y las pérdidas de material genómico en regiones de interés ha permitido obtener mayor información y por ello mejorar la caracterización de una enfermedad tan heterogénea como el cáncer de mama. Además, el estudio de CNAs recurrentes han permitido encontrar nuevos genes de susceptibilidad implicados en los procesos de oncogénesis²³⁵.

La información obtenida del DNA de las 58 muestras tumorales de las dos plataformas de microarrays genómicos tuvo que ser segmentada, normalizada y posteriormente analizada conjuntamente con el programa GISTIC, que identifica regiones del genoma que se encuentran significativamente amplificadas o delecionadas en un conjunto de muestras. Para la identificación de genes implicados en el inicio y progresión tumoral es necesario analizar aquellas regiones focales más pequeñas (en vez de aquellas que engloban cromosomas completos) que se encuentren alteradas con cierta recurrencia.

Las regiones focales más frecuentemente alteradas en nuestra cohorte de pacientes se resumen en la Tabla 37. El porcentaje de región alterada se muestra también en cada subgrupo (atendiendo al estado mutacional de *BRCA1/2* y los antecedentes de cáncer de mama familiar) y se corresponde en este caso a la parte de la región con la mayor amplitud y frecuencia de alteración con aquellos genes de interés contenidos en ellas.

Resultados

Tabla 37. Regiones focales y posibles genes implicados alterados con mayor frecuencia en el conjunto de mujeres con cáncer de mama menores de 40 años. En negrita se muestran genes relacionados previamente con cáncer de mama.

	Región	% Alterado				Posibles genes implicados
		Total (n=58)	BRCA+ (n=12)	CMF+ (n=20)	CMF- (n=26)	
GANANCIAS	8q24.11	79	100	75	73	EXT1, RAD21
	8q23.3	77	92	75	73	TRPS1
	1q21.1	75	86	55	77	TXNIP
	1q32.1	73	83	65	73	ZBED6, MDM4, ELK4 LGR6, ZC3H11A
	1q42.3	73	87	58	65	ARID4B
	8q24.21-q24.22	73	83	75	65	MYC , NRDG1
	1q44	71	92	62	54	SMYD3
	1q25	64	66	60	70	LAMC2
	1q21.2	64	75	50	69	SHC1, S100A2
	20q13.13	60	83	60	57	PTPN1, SNAI1
	5q35.3	56	100	35	54	GNB2L1
	16p13.11	56	75	50	50	NOMO
	17q23	56	71	50	50	RPS6KB1
	PÉRDIDAS	22q11	62	75	50	65
21p11.1		60	42	65	65	BAGE
8p23		59	71	60	41	GATA4, ANGPT2, PINX1, TNKS
22q12.1		57	100	45	46	SEZ6L
11p15		55	75	40	53	AP2A2, MUC6
17p12		53	66	53	48	ELAC2, SHISA6
17p13		52	66	50	46	GAS7, MYH1, SCO1
22q13.31-13.33		50	66	40	50	PARVB, MLC1

Las CNAs en forma de ganancias son más frecuentes y se localizan principalmente en las regiones 1q, 8q, 20q, 5q, 16p y 17q mientras que las pérdidas de material genómico son con mayor recurrencia en 22q, 21p, 8p, 11p, 17p. También se observa que los mayores porcentajes de regiones alteradas pertenecen a los tumores BRCA+, lo que indica una mayor inestabilidad genómica en estos tumores.

En las siguientes tablas se muestran para cada subgrupo de análisis aquellas regiones alteradas con mayor frecuencia. En aquellas alteraciones no focales que son de un tamaño mayor se muestra además el porcentaje de mayor alteración en el gen implicado.

Las anomalías más frecuentes propias en los tumores BRCA+ se localizan como ganancias en 3p, 3q, 5q, 6p, 7q y 15q y pérdidas en 15q, 7q, 14q y 18q (Tabla 38). Además encontramos genes en regiones concretas alterados en el 100% de los casos como GNBL2, EXT1, TRPS o SEZ6L .

Resultados

Tabla 38. Regiones focales y posibles genes implicados alterados con mayor frecuencia (>80%) en los tumores de las pacientes con cáncer de mama jóvenes y mutación en *BRCA1/2* (BRCA+).

	Región	BRCA+ (%)	Posibles genes implicados
GANANCIAS	1p12	92	NOTCH2
	12q24.13	92	PTPN11
	5q35.3	88	GNB2L1 (100%)
	17q23-q25	88	
	1q21.1-q21.2	87	
	8q22.3-q24.3	85	EXT1(100%), RAD21, TRPS, MYC
	1q23.3	83	PBX1
	3q27.3	83	BCL6
	6p25.2	83	
	7q11.23	83	
	15q26	83	IGFR1, BLM
	20q13.13	83	PTPN1, SNAI1
	1q32.1-1q44	82	PARP1, PSEN2, MDM4, AKT3
	22q12.1	95	SEZ6L (100%)
PÉRDIDAS	15q11.2	87	
	3p13	83	
	7q11.22	83	CALN1
	14q32.13	83	
	15q25.1	83	RNAT2
	18q23	83	GALR1

En el caso de los tumores BRCA-, independientemente de los antecedentes familiares, presentan pérdida en 21p como alteración más recurrente en comparación a los tumores BRCA+. Las regiones alteradas con mayor frecuencia tanto en el grupo CMF+ como CMF- fueron las regiones alteradas recurrentemente en cáncer de mama .(Tablas 39 y 40)

Tabla 39. Regiones focales y genes implicados alteradas con mayor frecuencia (>60%) en los tumores de las pacientes con cáncer de mama con antecedentes familiares (CMF+).

	Región	CMF+ (%)	Posibles genes implicados
GANANCIAS	8q23.3	75	TRPS1, EXT1, WISP1
	1q42.2-1q44	63	SMYD3
	1q25.3	65	GLUL
	1q32.1-q42.11	65	NAV1, LF3, ADIPOR1, ENY2,
	16p13.12	60	PRNA
PÉRDIDAS	8p23.1	65	GATA4
	21p11.1-11.2	65	BAGE
	8p12	60	NRG1

Resultados

Tabla 40. Regiones focales y genes implicados alteradas con mayor frecuencia (>60%) en los tumores de las pacientes con cáncer de mama sin antecedentes familiares (CMF-).

	Región	CMF- (%)	Posibles genes implicados
GANANCIAS	1q21.1-21.3	77	TXNIP
	20q13.2	67	ZNZ217
	20q13.32	65	
	8q23.3-24.3	65	MYC, EXT1, USP1
	1q22	62	RAB25, MUC1
	1q23.3-q44	62	MDM4, PSEN2, ELK4, NEK2, NAV1
	20q13.13	60	PTPN1, SNAI1
PÉRDIDAS	21p11.1-11.2	65	BAGE
	22q11.1	65	BAG4

Se realizó un análisis comparativo entre los distintos grupos encontrando distintas regiones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) que se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 41. Comparación entre las regiones alteradas con mayor frecuencia y estadísticamente significativas entre los grupos BRCA+ y BRCA-. En negrita se muestran aquellos genes de interés reportados previamente en cáncer de mama.

	% BRCA+ (n=12)	% BRCA- (n=46)	Genes de interés	p-valor
GANANCIAS	8q24.3	92		0.012
	12q21	16	DUSP6 , KITLG	0.025
PÉRDIDAS	22q12.1	100	SEZ6L	<0.001
	3p13	83		0.002
	7q11.22	83	CALN1	<0.001
	14q32	83	TCL6	<0.001
	15q25	83	RNAT2	0.002
	18q23	83	GALR1	0.002
	8p23.3	79	GATA4	0.026
	5q12.3	75	ADAMTS6	0.006
	15q11.2	75	PAR1	0.004
	16q12.1	75	TOX3	0.021

Las diferencias a nivel de ganancias se localizan sólo en dos regiones, siendo la región 12q21 la única que se encuentra más alterada en el grupo BRCA-. Las pérdidas las encontramos fundamentalmente en regiones alteradas en tumores de pacientes BRCA+ destacando aquellas regiones con genes de interés en cáncer de mama como 8p23 (*GATA4*), 15q11 (*PAR1*) y 16q12 (*TOX3*). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las regiones donde se encuentran los genes *BRCA1* (17q21) y *BRCA2* (13q13).

Al realizar el mismo análisis comparando aquellas pacientes no portadoras de mutación y dividiendo según los antecedentes familiares de la enfermedad (Tabla 42), solo hemos

Resultados

encontrado diferencias estadísticamente significativas al analizar las alteraciones en forma de pérdidas entre los dos grupos. Destacamos la alteración en 4q32, alterado en la mitad de pacientes CMF- y no frecuentemente alterada generalmente en cáncer de mama.

Tabla 42. Comparación entre las regiones alteradas con mayor frecuencia y estadísticamente significativas entre los grupos CMF+ y CMF-. En negrita se muestran aquellos genes de interés reportados previamente en cáncer de mama.

	% CMF+ (n=20)	% CMF- (n=26)	Genes de interés	p-valor
PÉRDIDAS	4q32	20	TLR2	0.015
	6p21	20	HLA-DQA1	0.013
	8p12	60	PPP2CB	0.032
	11q24.3	28	FLI1	0.036
	17p13	46	CRK	0.027
	17q24.3	45	SOX9	0.018
	19p13	35	PIN1	0.026
	21q21.3	35	ADAMTS1, BACH1	0.017

2.3 Análisis del grado de inestabilidad genómico en las muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años

El grado de inestabilidad genómica se ha relacionado en los últimos años con características del fenotipo tumoral como el grado histológico y ha sido de gran ayuda a la hora de mejorar la clasificación de los distintos subtipos tumorales de cáncer de mama además de presentar un importante valor pronóstico de la enfermedad^{221,222,303,304}. En este trabajo se ha estudiado la inestabilidad genómica en tumores de mama de mujeres jóvenes mediante el análisis de distintos índices de inestabilidad genómica relacionándolo con diversas características clinicopatológicas el tumor.

2.3.1 Estudio del índice de inestabilidad genómica (GII) en los tumores de mama en pacientes menores de 40 años

Se calculó para cada paciente el índice de inestabilidad genómica (GII), descrito por Bonnet y colaboradores²²¹. Para obtenerlo se tuvo en cuenta el número de regiones alteradas totales, ganadas o perdidas en relación con el número de sondas totales analizadas obteniendo respectivamente los índices GII^{total} , $GII^{ganancia}$ y $GII^{pérdida}$. Cada uno de los grupos se dividió, en función de la mediana, en aquellos tumores que presentaban un GII alto (GII^{total} , $GII^{ganancia}$ y $GII^{pérdida} > Med$) o GII bajo (GII^{total} , $GII^{ganancia}$ y $GII^{pérdida} < Med$), y se relacionó, entre otras, con las variables recogidas en la tabla 26 obteniendo los resultados que se muestran en la

Tabla 43.

Resultados

Tabla 43. Asociación de las distintas variables clínico-patológicas de los tumores de mama de mujeres jóvenes con los índices de inestabilidad genómica.

Características	GII ^{total}			GII ^{ganancia}			GII ^{pérdida}		
	Bajo	Alto	p	Bajo	Alto	p	Bajo	Alto	p
Expresión de p53									
Negativa	14(51.9%)	9(39.1%)	0.257	14(51.9%)	9(39.1%)	0.009	12 (44.4%)	11 (47.8%)	0.873
<50%	9 (33.3%)	6 (26.1%)		11 (40.7%)	4 (17.4%)		9 (33.3%)	6 (26.1%)	
≥50%	4 (14.8%)	8(34.8%)		2 (7.4%)	10 (43.5%)		6 (22.2%)	6 (26.1%)	
Expresión de ki67									
<15%	11 (39.3%)	4 (15.4%)	0.050	12 (42.9%)	3 (11.5%)	0.010	9 (32.1%)	6 (23.1%)	0.550
≥15%	17 (60.7%)	22 (84.6%)		16 (57.1%)	23 (88.5%)		19 (67.9%)	20 (76.9%)	
Grado del tumor									
I	5 (18.5%)	0 (0.0%)	0.037	5 (18.5%)	0 (0.0%)	0.037	4 (15.4%)	1 (4.2%)	0.175
II	10 (37.0%)	6 (26.1%)		10 (37.0%)	6 (26.1%)		10 (38.5%)	6 (25.0%)	
III	12 (44.4%)	17 (73.9%)		12 (44.4%)	17 (73.9%)		12 (46.2%)	17 (70.8%)	
Expresión de RH									
RH+	21 (72.4%)	21 (72.4%)	1.000	23 (79.3%)	19 (65.5%)	0.240	23 (79.3%)	19 (65.5%)	0.240
RH-	8 (27.6%)	8 (27.6%)		6 (20.7%)	10 (34.5%)		6 (20.7%)	10 (34.5%)	
Expresión de HER2									
HER2+	10 (35.7%)	9 (34.6%)	0.933	10 (35.7%)	9 (34.6%)	0.933	10 (35.7%)	9 (34.6%)	0.933
HER2-	18 (64.3%)	17 (65.4%)		18 (64.3%)	17 (65.4%)		18 (64.3%)	17 (65.4%)	
Subtipo de tumor									
Luminal A	14 (50.0%)	11 (40.7%)	0.124	15 (53.6%)	10 (37.0%)	0.229	15 (53.6%)	10 (37.0%)	0.229
Luminal B	6 (21.4%)	9 (33.3%)		7 (25.0%)	8 (29.6%)		7 (25.0%)	8 (29.6%)	
Triple Negativo	4(14.3%)	7 (25.9%)		3 (10.7%)	8 (29.6%)		3 (10.7%)	8 (29.6%)	
Her2	4 (14.3%)	0 (0.0%)		3 (10.7%)	1 (3.7%)		3 (10.7%)	1 (3.7%)	
Mutación en BRCA1/2									
BRCA+	3 (10.3%)	9 (31.0%)	0.052	3 (10.3%)	9 (31.0%)	0.052	2 (6.9%)	10 (34.5%)	0.010
BRCA-	26 (89.7%)	20 (69.0%)		26 (89.7%)	20 (69.0%)		27 (93.1%)	19 (65.5%)	
Antecedentes familiares y estado mutacional de BRCA1/2									
BRCA+	3 (10.3%)	9 (31.0%)	0.149	3 (10.3%)	9 (31.0%)	0.137	2 (6.9%)	10 (34.5%)	0.015
CMF+	11 (37.9%)	8 (27.6%)		10 (34.5%)	9 (31.0%)		9 (31.0%)	10 (34.5%)	
CMF-	15 (51.7%)	12 (41.4%)		16 (55.2%)	11 (37.9%)		18 (62.1%)	9 (31.0%)	
Recaída									
Sí	9 (32.1%)	14(48.3%)	0.215	9 (32.1%)	14(48.3%)	0.215	9 (32.1%)	14 (48.3%)	0.215
No	19 (67.9%)	15 (51.7%)		19 (67.9%)	15 (51.7%)		19 (67.9%)	15 (51.7%)	
Progresión									
Sí	3 (10.7%)	4 (13.8%)	0.723	3 (10.7%)	4 (13.8%)	0.723	4 (14.3%)	3 (10.3%)	0.650
No	25 (89.3%)	25(86.2%)		25 (89.3%)	25(86.2%)		24 (85.7%)	26 (89.7%)	

Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos cuando se asociaron las variables relacionadas con el fenotipo del tumor como una mayor expresión del marcador de proliferación ki67 y mayor grado histológico del tumor con un mayor GII^{total}, es decir, aquellos tumores con un mayor índice de alteraciones totales presentan fenotipos más agresivos del tumor. (Figura 20)

Resultados

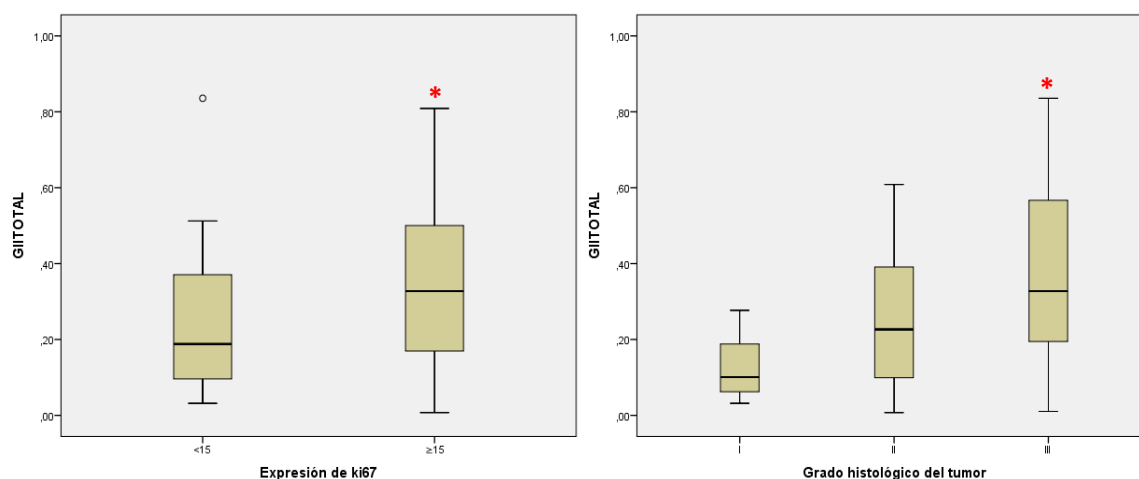


Figura 20. Diagramas de cajas que muestran la distribución del $GIIT^{total}$ según la expresión de ki67 y del grado histológico del tumor

A la hora de dividir el $GIIT^{total}$ para saber si la asociación anterior se debe a una mayor inestabilidad dada por ganancia o pérdida de material genómico se observa cómo ambos parámetros también están asociados a un mayor $GIIT^{ganancia}$ a nivel genómico al igual que aquellos tumores con niveles más altos de expresión de p53.(Figura 21)

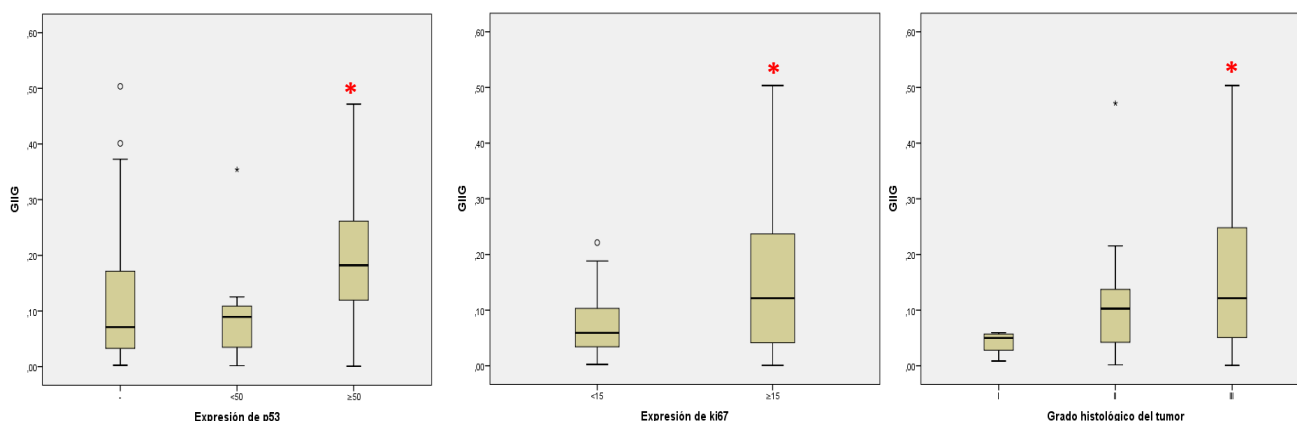


Figura 21. Diagramas de cajas que muestran la distribución del $GIIG^{ganancias}$ según la expresión de p53, ki67 y del grado histológico del tumor

Por otra parte, se ha asociado un mayor $GIIT^{pérdida}$ de material genómico con las pacientes portadoras de mutación germinal en *BRCA1/2*. Si dividimos el grupo de pacientes no portadoras de mutación en *BRCA1/2* teniendo en cuenta los antecedentes familiares de cáncer de mama, se observa una mayor proporción de tumores pertenecientes a pacientes sin antecedentes familiares de la enfermedad con un menor $GIIT^{pérdida}$ (Figura 22).

Resultados

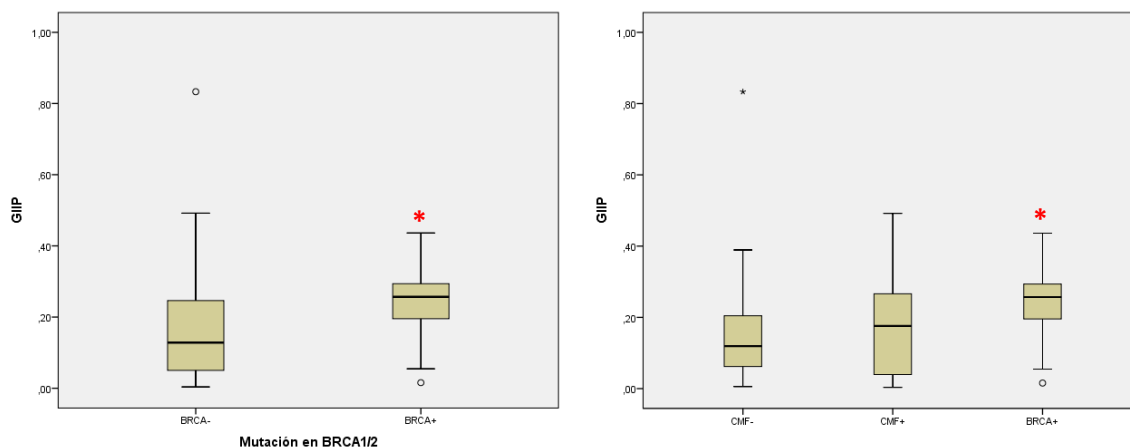


Figura 22. Diagramas de cajas que muestran la distribución del $GII_{p\acute{e}rdidas}$ según el estado mutacional en los genes $BRCA1/2$ y la distribución teniendo en cuenta los antecedentes familiares de cáncer de mama en las mujeres $BRCA-$

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas a la hora de estudiar el valor pronóstico de la inestabilidad genómica con la supervivencia libre de enfermedad (Figura 23), la recaída o la progresión de la enfermedad.

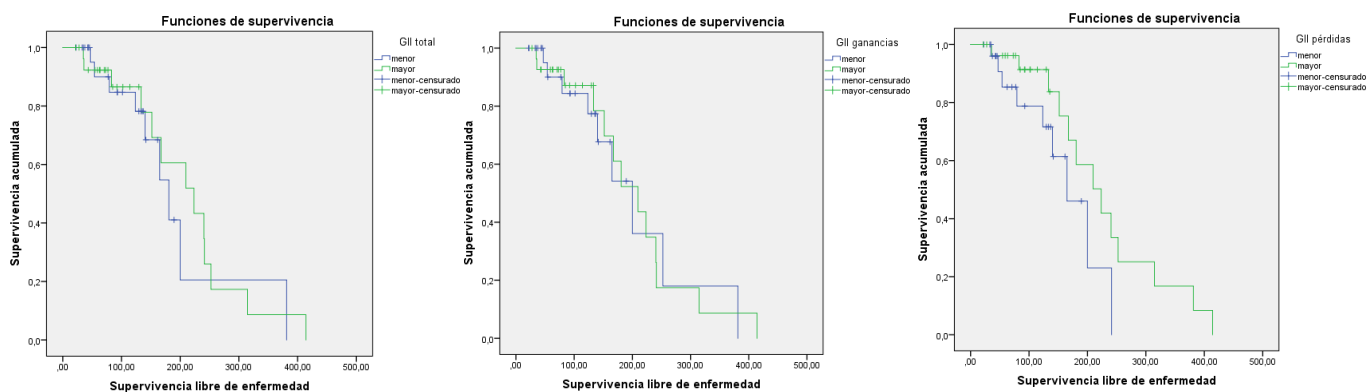


Figura 23. Curvas de supervivencia libre de enfermedad en función del GII^{total} , $GII_{ganancias}$ y $GII_{p\acute{e}rdidas}$ en pacientes jóvenes con cáncer de mama.

2.3.2 Análisis del desequilibrio alélico en la zona telomérica en tumores de mujeres con cáncer de mama menores de 40 años

El desequilibrio alélico en el telómero (*TAI*, *telomeric allelic imbalance*) es una alteración que se ha relacionado con una actuación deficiente de los sistemas de reparación del DNA y por lo tanto, con una mayor sensibilidad a aquellos tratamientos que inducen rupturas en el DNA como el cisplatino²²³.

Hemos analizado estas regiones en las muestras tumorales en las que se realizó el estudio citogenético mediante la plataforma *MIP array Oncoscan*, al proporcionar medidas más fiables de desequilibrio alélico. Las regiones con TAI se determinaron a partir del análisis realizado con el software *Nexus Copy Number v.7.5* teniendo en cuenta aquellos casos que presentaban regiones con desequilibrio alélico que se extendía hacia el telómero²²³. En total se

Resultados

analizaron 32 muestras tumorales y se relacionó ese patrón de TAI con las distintas variables clínicas tumorales y con el índice de inestabilidad genómica GII (Tabla 44).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas únicamente al relacionar aquellos tumores que presentan TAI con el índice de inestabilidad genómica GII, tanto a nivel de alteraciones totales como de ganancias y de pérdidas de material genómico. Por lo tanto, aquellos tumores que presentan desequilibrio alélico en los telómeros presentan un mayor índice de inestabilidad genómica.

Tabla 44. Asociación de las distintas variables clínico-patológicas de los tumores de mama de mujeres jóvenes con el desequilibrio alélico en los telómeros.

Características	Sin TAI (n=10)	Con TAI (n=22)	p-valor
Expresión de p53 (n=30)			
Negativa	2 (20.0%)	9 (45.0%)	0.382
<50%	5 (50.0%)	6 (30.0%)	
≥50%	3 (30.0%)	5 (25.0%)	
Expresión de ki67 (n=31)			
<15%	3 (30.0%)	6 (28.6%)	0.935
≥15%	7 (70.0%)	15 (71.4%)	
Grado del tumor (n=29)			
I	2 (20.0%)	1 (5.0%)	0.309
II	2 (20.0%)	8 (40.0%)	
III	5 (50.0%)	11 (55.0%)	
Expresión de RH (n=32)			
RH+	7 (70.0%)	20 (90.9%)	0.131
RH-	3 (30.0%)	2 (9.1%)	
Expresión de HER2) n=31)			
HER2+	2 (20.0%)	7 (33.3%)	0.445
HER2-	8 (80.0%)	14 (66.7%)	
Subtipo de tumor (n=31)			
Luminal A	7 (70.0%)	13 (61.9%)	0.090
Luminal B	0 (0.0%)	6 (28.6%)	
Triple Negativo	1 (10.0%)	1 (4.8%)	
Her2	2 (20.0%)	1 (4.8%)	
Antecedentes familiares (n=32)			
CMF+	3 (30.0%)	12 (54.5%)	0.409
CMF-	7 (70.0%)	10 (45.5%)	
GIIganancias			
Alto	1 (10.0%)	14 (63.8%)	0.005
Bajo	9 (90.0%)	8 (36.4%)	
GIIpérdidas			
Alto	1 (10.0%)	11 (50.0%)	0.03
Bajo	9 (90.0%)	11 (50.0%)	
GII totales			
Alto	0 (0.0%)	15 (68.2%)	<0.001
Bajo	10 (100.0%)	7 (31.8%)	
Recaída			
Sí	3 (30.0%)	9 (40.9%)	0.555
No	7 (70.0%)	13 (59.1%)	
Progresión			
Sí	1 (10.0%)	4 (18.2%)	0.555
No	9 (90.0%)	18 (81.8%)	

No se ha relacionado con variables clínicas como recaída, progresión o supervivencia libre de enfermedad. (Figura 24)

Resultados

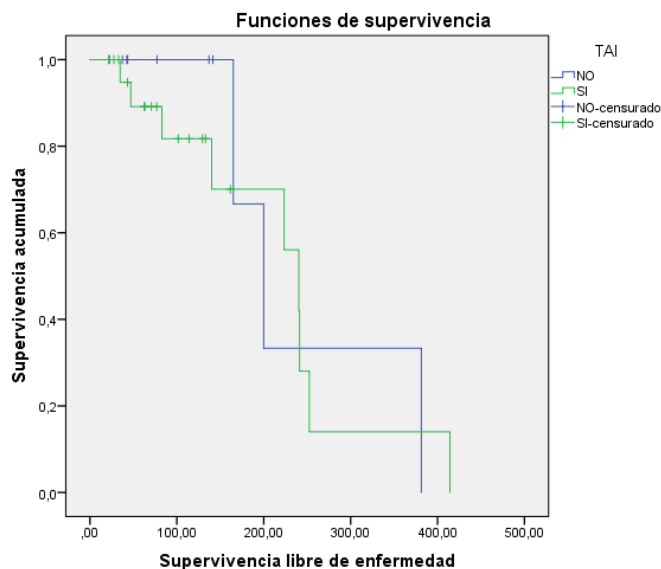


Figura 24. Curvas de supervivencia libre de enfermedad en función del patrón de TAI en pacientes jóvenes con cáncer de mama

Por otra parte, se analizó si existían diferencias entre los tumores de los grupos con y sin TAI a nivel de alteraciones del material genómico en forma de ganancias o pérdidas en regiones de interés. Los genes que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en forma de pérdida de material genómico se resumen en la figura 25.

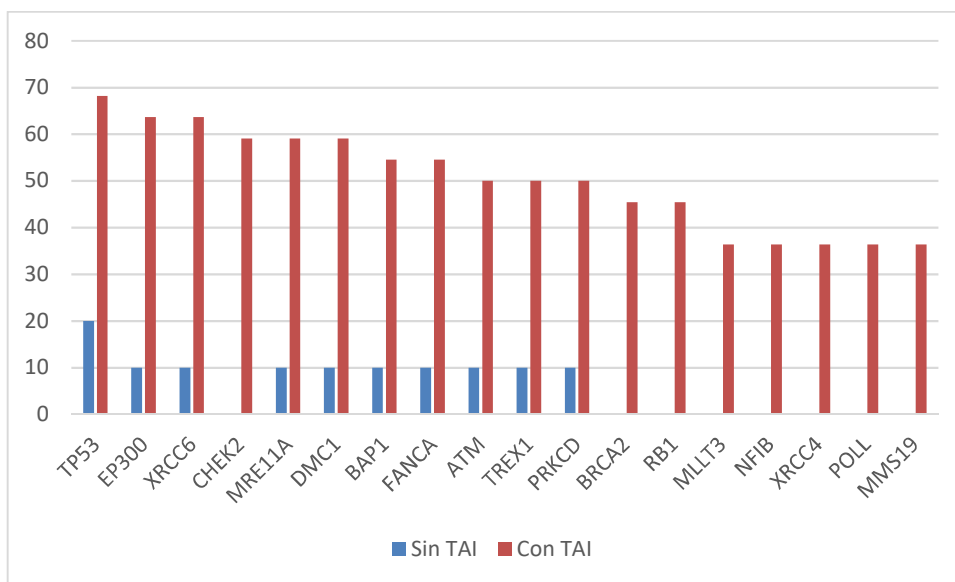


Figura 25. Porcentaje de pérdida en regiones focales y genes de interés entre los tumores sin y con desequilibrio alélico en la zona telomérica (TAI).

Los genes representados tienen papeles importantes en la estabilidad genómica (p53, RB) o se encuentran implicados en rutas de reparación de DNA, mediante reparación de DSBs (XRCC6, CHEK2, MRE11A, DMC1, BAP1, FANCA, ATM, TREX1, PRKCD, BRCA2, XRCC4) o NER

(EP300, MMS19), lo que confirma la relación de pérdida del correcto funcionamiento en los sistemas de mantenimiento del daño al DNA y estas alteraciones teloméricas.

2.4 Análisis de los patrones de cromotripsis en tumores de mujeres con cáncer de mama menores de 40 años.

La cromotripsis es un fenómeno por el cual se producen entre diez a cien reordenamientos genómicos en un único evento, pudiendo afectar a uno o varios cromosomas. El origen de este evento no se sabe con exactitud, al igual que su implicación en el fenotipo tumoral o el valor pronóstico de la enfermedad²²⁵.

Se identificaron patrones de cromotripsis (CTLPs) en un 17% (n=10) de los tumores analizados. La confirmación de estos patrones se realizó a través de la herramienta web *CTLPScanner*, que tiene en cuenta el número de CNAs y el tamaño de la región afectada para indicar si la zona analizada presentaría realmente un patrón de cromotripsis o si sería una región con una mayor inestabilidad genómica. (Figura 26)

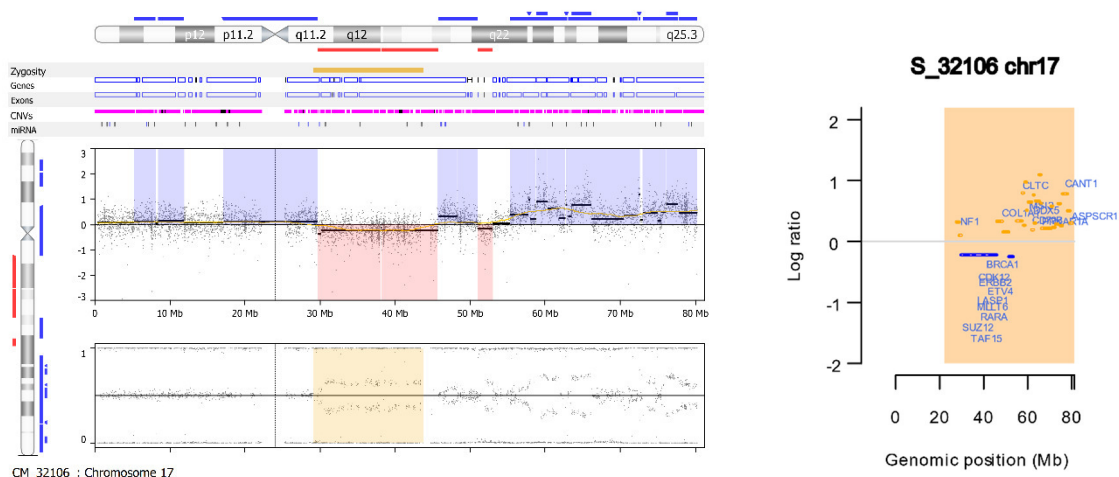


Figura 26. Patrón de cromotripsis observado mediante el programa Nexus (derecha) y confirmación por la herramienta web CTLPScanner (izquierda).

En la tabla A28 se observan los casos analizados y los cromosomas afectados por estos CTLPs. El cromosoma 17 es el que se encuentra alterado con mayor frecuencia ya que el 50% (n=5) de los pacientes con cromotripsis la presentan enfocada en este cromosoma. Dentro de este cromosoma, el brazo largo es el que se encuentra afectado principalmente, teniendo afectados con mayor recurrencia genes como *ERBB2*, *CDK12* o *BRCA1*. (Tabla 45)

Resultados

Tabla 45. Genes de interés afectados con mayor recurrencia en tumores con cromotripsis en el cromosoma 17.

Gen	Región	Casos	Pérdidas	Ganancias
CDK12	17q12	5	1	4
ERBB2	17q12	5	1	4
BRIP1	17q23.2	4	1	3
CLTC	17q23.1	4	0	4
COL1A1	17q21.33	4	1	3
LASP1	17q12	4	1	3
MLLT6	17q12	4	2	2
NF1	17q11.2	4	2	2
RARA	17q21.2	4	1	3
TAF15	17q12	4	2	2
BRCA1	17q21.31	3	3	0
ETV4	17q21.31	3	3	0
GAS7	17p13	3	2	1
MSI2	17q22	3	0	3
SUZ12	17q11.2	3	2	1
USP6	17q12	3	1	2

Con el fin de observar si el patrón de cromotripsis se encuentra relacionado con el fenotipo tumoral y con los índices de inestabilidad analizados previamente, se realizó un análisis estadístico en las muestras tumorales estudiadas según presentaran cromotripsis o no (Tabla 46). Al comparar ambos grupos sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas al relacionar los antecedentes familiares de la enfermedad y el grado de inestabilidad genómico, de manera que, aquellas muestras que tienen cromotripsis presentan mayor GII^{total} y se relacionan con la presencia de antecedentes familiares de primer y/o segundo grado de la enfermedad. También se relacionó con un menor índice de recaída de la enfermedad.

Resultados

Tabla 46. Asociación de las distintas variables clínico-patológicas de los tumores de mama de mujeres jóvenes con el patrón de cromotripsis

Características	Sin CTLP (n=48)	Con CTLP (n=10)	p-valor
Expresión de p53 (n=50)			
Negativa	20 (48.8%)	3 (33.3%)	0.663
<50%	12 (29.3%)	3 (33.3%)	
≥50%	9 (22.0%)	3 (33.3%)	
Expresión de ki67 (n=54)			
<15%	13 (29.5%)	2 (20.0%)	0.543
≥15%	31 (70.5%)	8 (80.0%)	
Grado del tumor (n=50)			
I	5 (11.9%)	0 (0.0%)	0.455
II	14 (33.3%)	2 (25.0%)	
III	23 (54.8%)	6 (75.0%)	
Expresión de RH (n=58)			
RH+	34 (70.8%)	9 (90.0%)	0.208
RH-	14 (29.2%)	1 (10.0%)	
Expresión de HER2 (n=55)			
HER2+	31 (68.9%)	5 (50.0%)	0.256
HER2-	14 (31.1%)	5 (50.0%)	
Subtipo de tumor (n=55)			
Luminal A	21 (46.7%)	4 (40.0%)	0.273
Luminal B	10 (22.2%)	5 (50.0%)	
Triple Negativo	10 (22.2%)	1 (10.0%)	
Her2	4 (8.9%)	0 (0.0%)	
Antecedentes familiares (n=58)			
CMF+	21 (43.8%)	8 (80.0%)	0.037
CMF-	27 (56.3%)	2 (20.0%)	
Desequilibrio alélico en telómeros (n=32)			
Con TAI	16 (64.0%)	6 (85.7%)	0.273
Sin TAI	9 (36.0%)	2 (14.3%)	
GII^{ganancias} (n=58)			
Alto	27 (56.3%)	8 (80.0%)	0.037
Bajo	21 (43.8%)	2 (20.0%)	
GII^{pérdidas} (n=58)			
Alto	26 (54.2%)	7 (70.0%)	0.164
Bajo	22 (45.8%)	3 (30.0%)	
GII^{totales} (n=58)			
Alto	27 (56.3%)	8 (80.0%)	0.037
Bajo	21 (43.8%)	2 (20.0%)	
Recaída			
Sí	22 (46.8%)	1 (10.0%)	0.031
No	25 (53.2%)	9 (90.0%)	
Progresión			
Sí	6 (12.8%)	1 (10.0%)	0.809
No	41 (87.2%)	9 (90.0%)	

3. ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO CON CLOROQUINA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

La cloroquina, un fármaco antimalárico, se está ensayando en los últimos tiempos como fármaco con posible uso antitumoral. Los resultados prometedores han hecho que, además de ensayos sobre modelos murinos en cáncer de mama, se haya aprobado su uso en ensayos clínicos en humanos

Se realizó un estudio en cuatro líneas celulares de cáncer de mama elegidas según la edad de diagnóstico y cuyas características se encuentran en la Tabla 8.

3.1 Estudio del efecto de la cloroquina en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama

Se analizó el efecto que la cloroquina ejerce sobre la proliferación celular mediante un ensayo de viabilidad celular colorimétrico basado en la reducción del MTT utilizando las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 125 μM a los tiempos de 0h (células sin tratamiento), 24h, 48h y 72h. Además, se calcularon las IC_{50} (concentración del fármaco necesaria para inhibir la proliferación celular al 50%) a las 48h para cada una de las líneas celulares. (Figura 27)

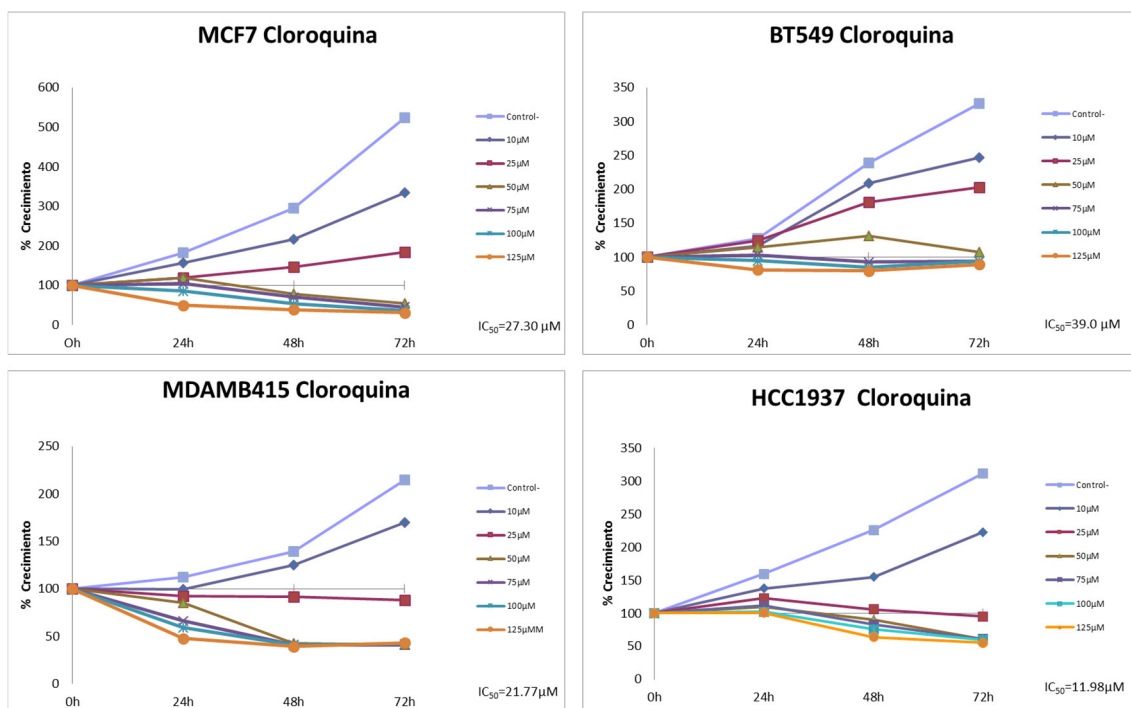


Figura 27. Efecto del tratamiento con cloroquina a las concentraciones 10, 25, 50, 75, 100 y 125 μM sobre la proliferación celular en las líneas de cáncer de mama MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937.

Las líneas celulares de cáncer de mama en mujeres menores de 40 años (MDAMB415 y HCC1937) presentaron mayor sensibilidad al tratamiento con cloroquina observándose un mayor efecto anti-proliferativo y unas IC_{50} menores a 48 horas de tratamiento. Dentro de las líneas celulares de cáncer de mama en mayores de 40 años, la línea celular MCF7 presentó mayor sensibilidad al tratamiento que la BT549. Se realizó la mediana de las IC_{50} a las 48 horas de tratamiento de las cuatro líneas para utilizar una concentración común en el resto de experimentos. Este valor fue próximo a la concentración de 25 μM ($\text{Med}=24.535 \mu\text{M}$) por lo que

se eligió esta concentración para el resto de experimentos. Esta concentración también ha sido la elegida en trabajos previos de nuestro laboratorio.

3.2 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo del efecto del tratamiento con cloroquina en las líneas celulares de cáncer de mama

El estudio del ciclo celular mediante citometría de flujo se realizó a la concentración de 25µM de cloroquina a los distintos tiempos de incubación (Figura 28). Se analizó si el tratamiento con este fármaco afectaba de alguna manera las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, G2/M, S y muerte celular) a las 24h, 48h y 72h de tratamiento mediante la cuantificación del DNA unido a yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo.

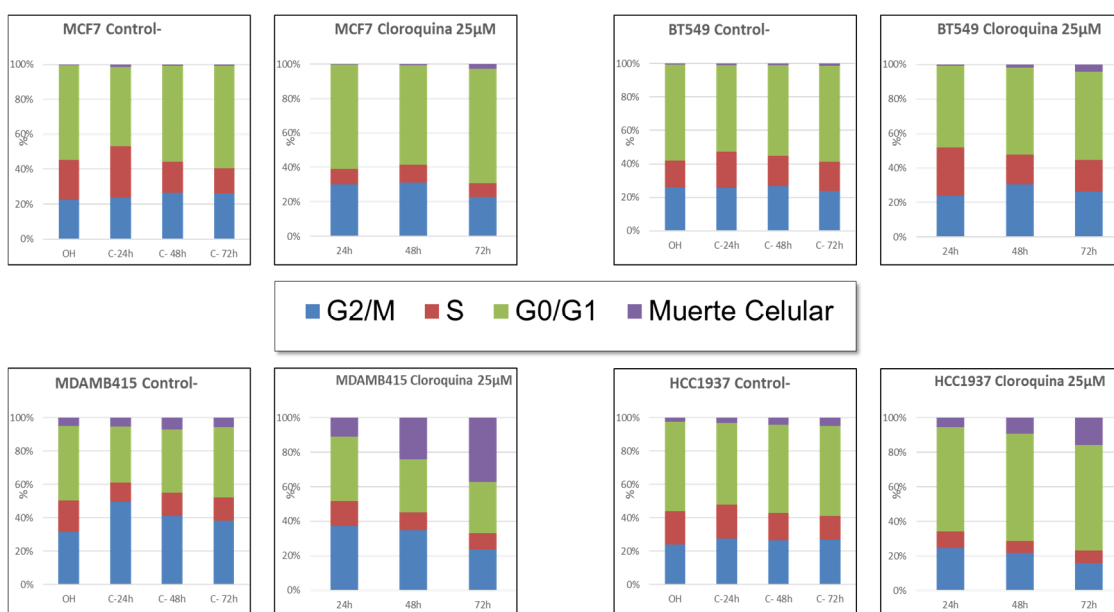


Figura 28. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937 en tratamiento con cloroquina a la concentración 25µM.

El análisis de resultados mostró cambios significativos en el ciclo celular de las líneas MDAMB415 y HCC1937. Estas líneas de cáncer de mama de mujeres jóvenes presentaron un aumento de la mortalidad celular a lo largo del tratamiento siendo la línea MDAMB415 la más sensible de todas llegando hasta un porcentaje de muerte celular del 37%. Esto conlleva una disminución del resto de las fases del ciclo a lo largo del tratamiento ($p < 0.05$)

La línea celular HCC1937 presentó una mortalidad celular máxima a 72h del 15% y una disminución estadísticamente significativa en la fase G2/M a lo largo del tratamiento ($p < 0.05$).

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y BT549 no mostraron cambios estadísticamente significativos en las distintas fases del ciclo celular a lo largo del tratamiento, siendo ligeramente mayor la mortalidad en la línea celular BT549.

3.3 Análisis del efecto del tratamiento con cloroquina en la expresión de proteínas de la ruta de la autofagia en líneas celulares de cáncer de mama

Se analizó el efecto que ejercía el tratamiento de cloroquina a 25 μ M durante 24, 48 y 72h sobre la ruta de la autofagia mediante el estudio por western blot de las proteínas LC3B, p62 y Beclin 1 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937.

Como control se utilizaron proteínas de la línea celular de estudio sin tratar a tiempo 0h y como control de carga de todos los experimentos se utilizó la actina.

El estudio de la expresión de LC3B mostró los resultados que se muestran en la Figura 29. La forma citosólica LC3B-I aumenta a los largo del tiempo en todas las líneas celulares para luego estabilizarse a las 72 horas de tratamiento. Este aumento en los niveles de proteína fue más alto en las líneas de tumores triple negativas BT549 y HCC1937.

En el caso de LC3B-II, a diferencia de LC3B-I, los niveles se mantienen cercanos a los basales, especialmente en las líneas MCF7 y BT549.

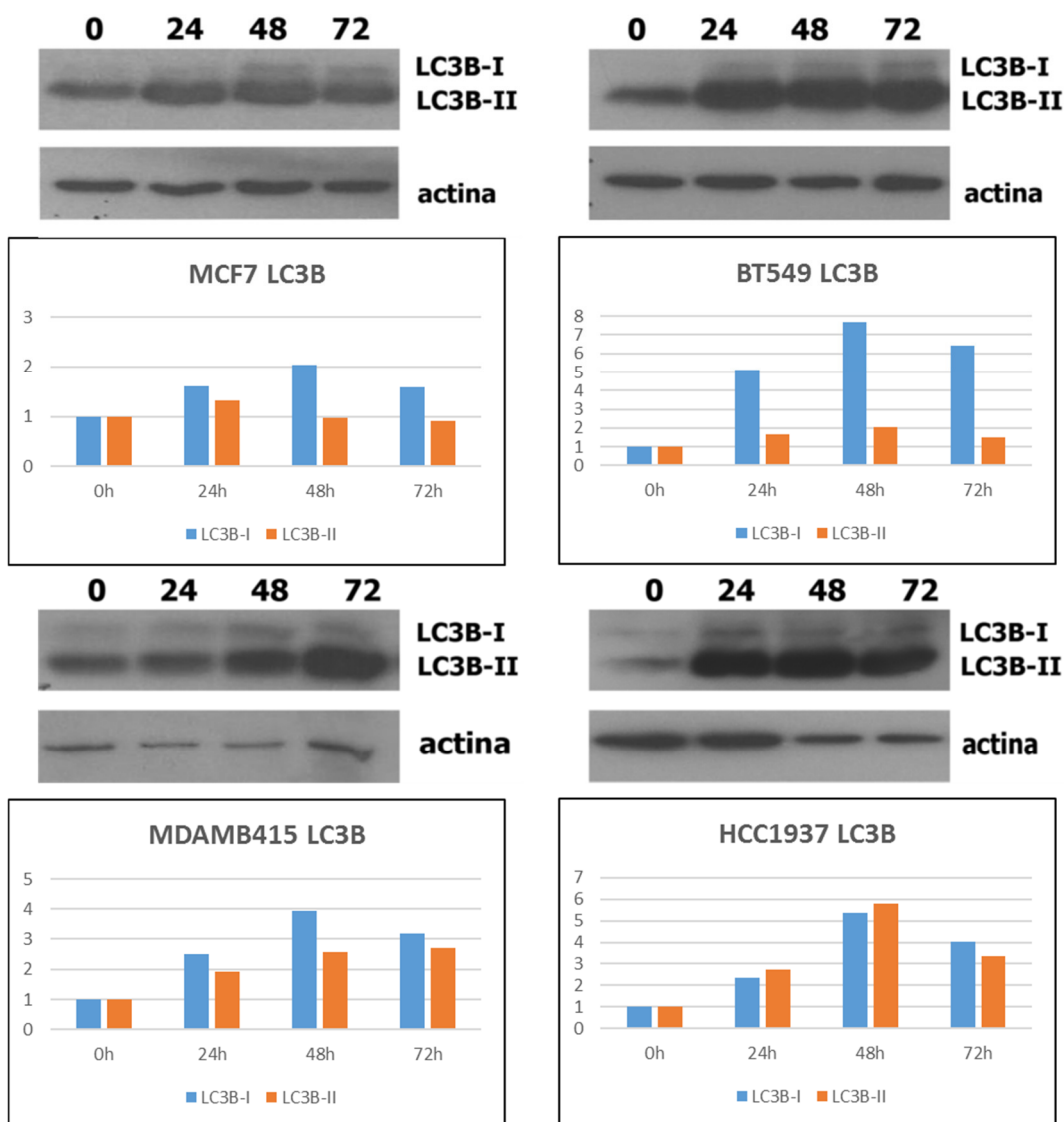


Figura 29. Expresión de la proteína LC3B-I y LC3B-II en las líneas celulares MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937 en presencia de cloroquina a la concentración 25 μM. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio proteína de interés/β-actina y comparando con el tiempo sin tratamiento 0h.

El estudio de la expresión de la proteína Beclin 1 presentó resultados homogéneos en todas las líneas, habiendo ligeras variaciones a lo largo del tiempo de tratamiento, pero teniendo un máximo de expresión a las 72 horas. Este efecto fue más evidente en las líneas celulares de cáncer de mama de mujeres mayores de 40 años MCF7 y BT549. (Figura 30)

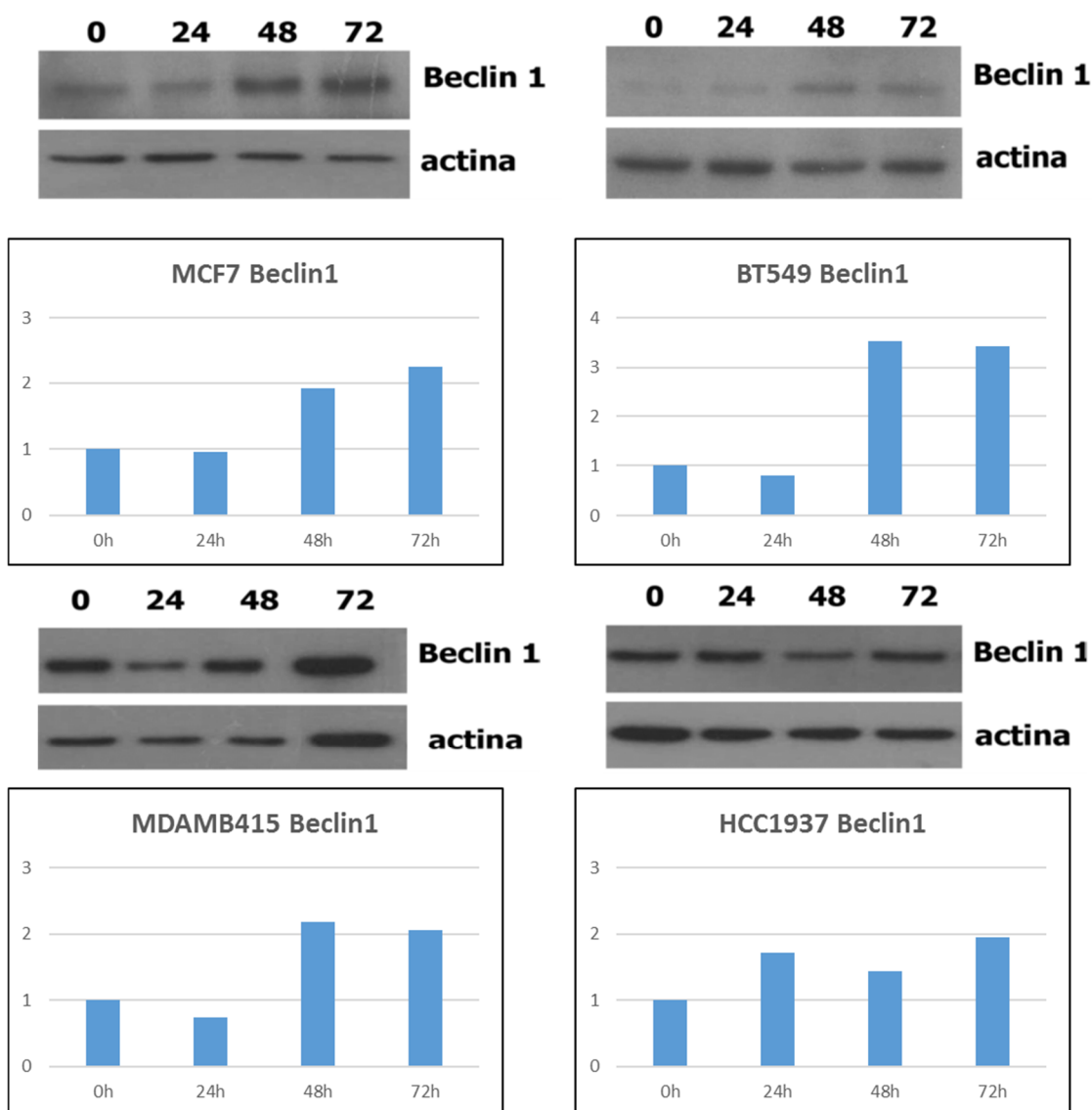


Figura 30. Expresión de la proteína beclin1 en las líneas celulares MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937 en presencia de cloroquina a la concentración 25 μ M. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio Beclin 1/ β -actina y comparando con el tiempo sin tratamiento 0h.

El análisis de la expresión de p62 mostró resultados más heterogéneos (Figura 31). En las líneas celulares MCF7 y BT549 los valores se mantienen cerca del estado basal. En el caso de MCF7 la expresión de p62 aumenta hasta las 48 horas para luego disminuir a valores levemente inferiores a los basales mientras que, por otra parte, la línea BT549 presenta un aumento a las 24 horas para luego ir disminuyendo los niveles hasta las 72 horas.

Las líneas de mama de mujeres jóvenes presentan comportamientos completamente diferentes. La línea MDAMB415 presenta un aumento de la expresión a lo largo del tratamiento teniendo una expresión más pronunciada a 72 horas. En el caso de la línea HCC1937 presenta

un aumento mayor a 24 horas que va disminuyendo hasta obtener valores menores a los basales a las 72 horas.

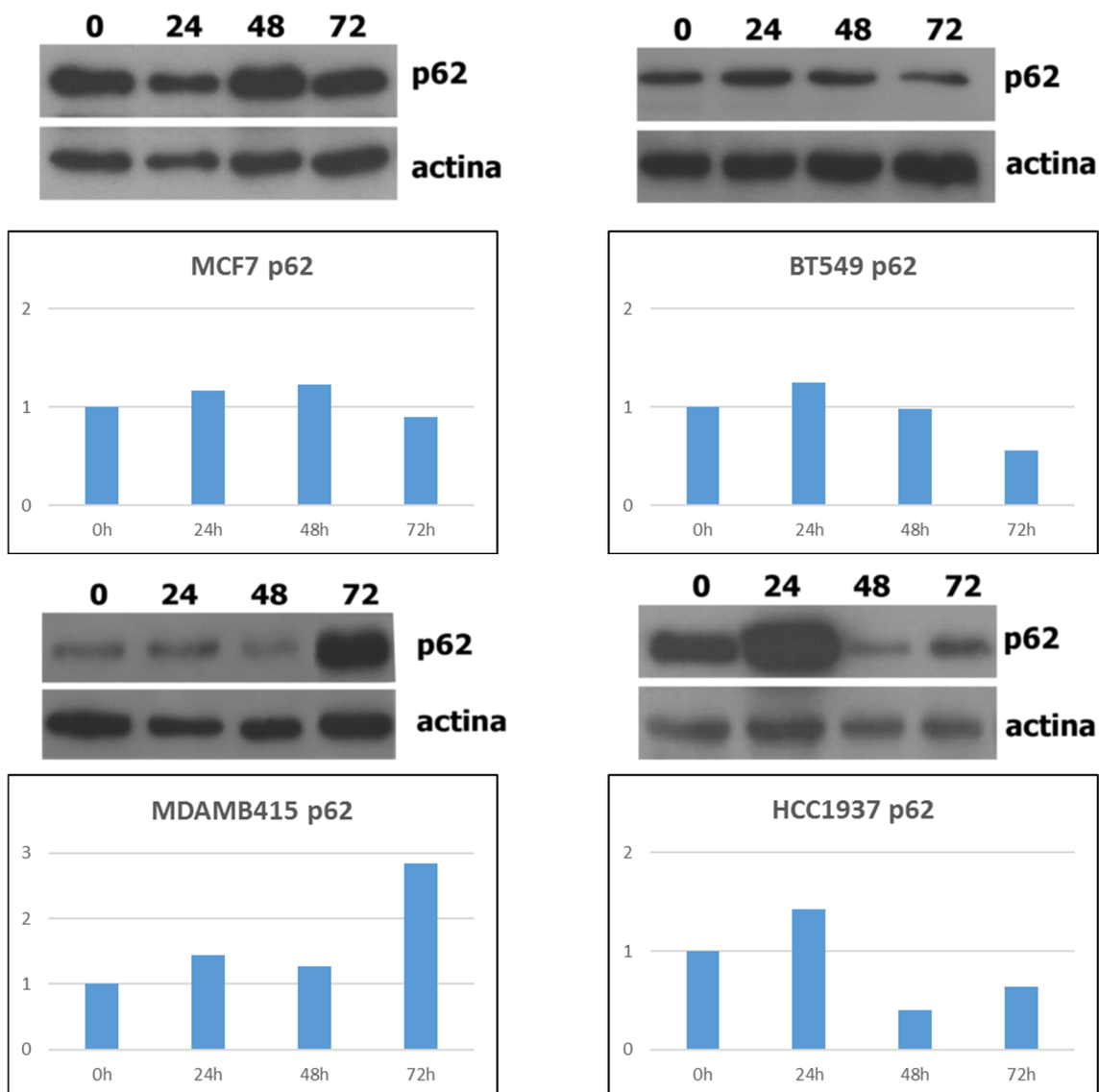


Figura 31. Expresión de la proteína p62 en las líneas celulares MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937 en presencia de cloroquina a la concentración 25 μ M. La expresión de la proteína está calculada en forma de ratio p62/ β -actina y comparando con el tiempo sin tratamiento 0h.

3.4 Análisis del efecto del tratamiento con cloroquina en la inestabilidad genómica mediante *microarrays* genómicos en líneas de cáncer de mama

El tratamiento con cloroquina a 25 μ M produce distintos efectos en las líneas celulares de cáncer de mama, siendo aquellas pertenecientes a mujeres menores de 40 años más sensibles al tratamiento. Con el fin de determinar la razón por la que se producen estas diferencias en el tratamiento con cloroquina, se realizó un estudio mediante *microarrays* genómicos sobre el DNA a los tiempos 0h (sin tratamiento) y 72 de tratamiento de las cuatro líneas celulares MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937. Aunque en la bibliografía estas líneas

Resultados

celulares se han utilizado y estudiado ampliamente tanto a nivel citogenético como molecular, las anomalías cromosómicas no han sido del todo caracterizadas y las diferencias que puedan presentar a este nivel son de gran interés a la hora de probar nuevos tratamientos. Además, recientemente se ha relacionado la autofagia con la inestabilidad cromosómica y la supervivencia celular.

Se calculó para cada una de las líneas celulares en los tiempos analizados, el $GII^{ganancias}$ y $GII^{pérdidas}$. Como se puede observar, las líneas celulares de cáncer de mama en mujeres jóvenes MDAMB415 y HCC1937 presentan una mayor inestabilidad que va disminuyendo a lo largo del tratamiento con cloroquina. Ésta disminución de la inestabilidad se observa a nivel de las pérdidas de material genómico. Por otra parte, en las líneas celulares MCF7 y BT549 esta inestabilidad es menor y se mantiene constante a lo largo del tratamiento o aumenta ligeramente como en el caso de MCF7. (Figura 32)

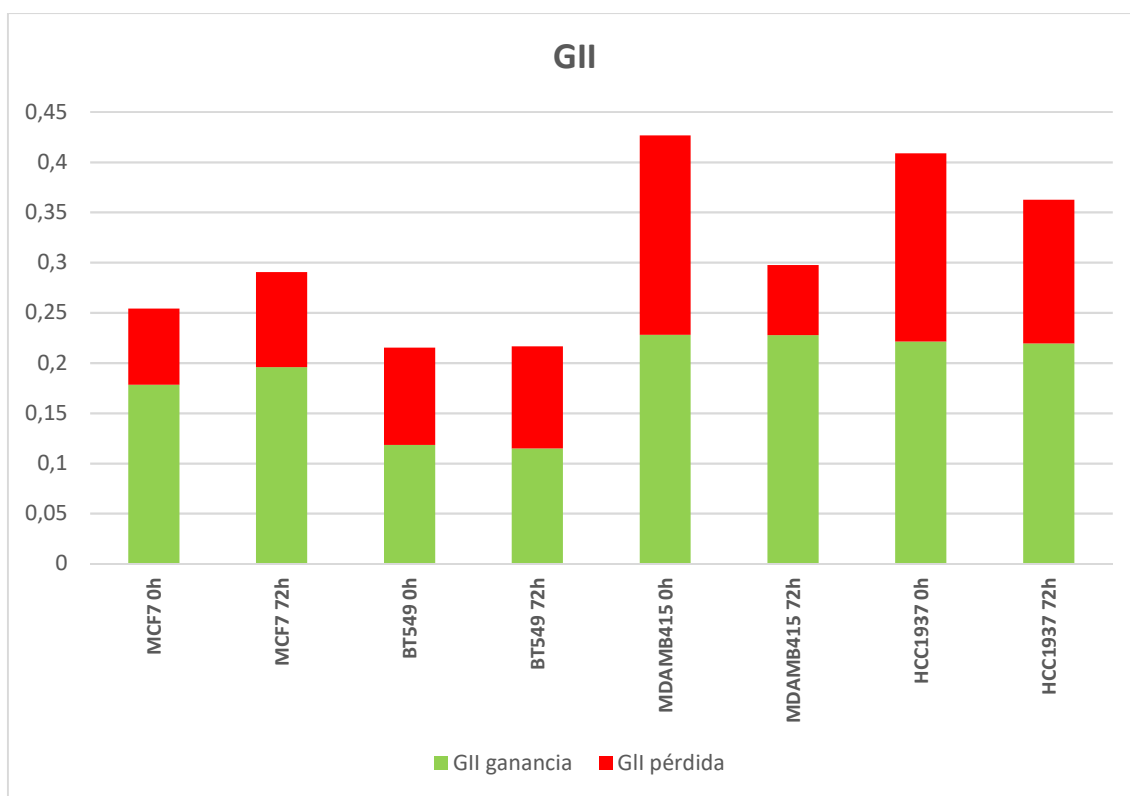


Figura 32. Inestabilidad genómica en las líneas celulares de cáncer de mama MCF7, BT549, MDAMB415 y HCC1937 al tiempo de tratamiento 0h (células sin tratar) y a las 72h de tratamiento con cloroquina 25 μ M.

Discusión

El cáncer de mama en mujeres jóvenes es una enfermedad heterogénea y poco frecuente caracterizada por fenotipos más agresivos del tumor y por un peor pronóstico. En nuestro país representan el 10% de las pacientes con cáncer de mama y aunque las tasas de mortalidad han disminuido gracias a los programas de detección precoz y a los avances en terapias dirigidas, la incidencia de esta enfermedad en mujeres jóvenes ha presentado un leve incremento en los últimos años. El cáncer de mama en mujeres jóvenes supone un reto tanto para pacientes como familiares y personal de la salud.

Entre el 5-10% del cáncer de mama presenta un componente hereditario, y se estima que alrededor del 20-25% 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*¹⁶.

En nuestro trabajo hemos estudiado 230 mujeres con cáncer de mama menores de 40 años procedentes de la Unidad de Consejo Genético del Hospital Universitario de Salamanca. De estas, 22 (10%) presentaron mutación en los genes *BRCA1/2*; 16 (69.6%) en *BRCA1* y 7 (30.4%) en *BRCA2*. Esto se corresponde a lo descrito en estudios previos donde entre un 11.6%-17% de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años presentan mutación en *BRCA1* o *BRCA2*³¹. Además, también coincide con estudios donde se encuentra una mayor proporción de mutaciones patogénicas en *BRCA1* que en *BRCA2* en pacientes jóvenes^{305,306}. La baja proporción de pacientes portadoras de mutación en los genes *BRCA1/2* llevó a pensar que la mayor parte de la susceptibilidad genética resulta de los efectos combinados de múltiples variantes genéticas. Estos SNPs, que por sí solos tienen un efecto individual modesto, presentan un efecto combinado que pueden llegar a explicar hasta el 30% del riesgo en el cáncer de mama hereditario⁴¹. Los estudios de asociación de genes candidatos son el principal enfoque usado en la búsqueda de estos alelos de susceptibilidad.

1. ANÁLISIS DE VARIANTES ALÉLICAS DE BAJA PENETRANCIA EN EL CÁNCER DE MAMA EN MUJERES JÓVENES

1.1 Polimorfismos en genes relacionados con las vías de reparación del DNA

Distintos tipos de exposición y factores producen daño al DNA que requiere de diversos sistemas de reparación para mantener la estabilidad y la integridad genómica. Por lo tanto, niveles altos de daño al DNA combinado con una disminución en el funcionamiento de los sistemas de reparación se asocia a la susceptibilidad a muchos tipos de cáncer entre los que se encuentra el cáncer de mama³⁰⁷.

Se seleccionaron los polimorfismos rs16941 (c.3232 A>G; p.Glu1038Gly), rs16942 (c.3667 A>G; p.Lys1183Arg) y rs799917 (c.2731C>T; p.Pro871Leu) del gen *BRCA1*, implicado en la vía de reparación de DSBs, y el polimorfismo rs1800734 (c.-93 G>A) del gen *MLH1*, que presenta un papel esencial en la vía MMR, para el estudio de su papel en la susceptibilidad al cáncer de mama en mujeres jóvenes. Es la primera vez que se describe el estudio de estas variantes alélicas en mujeres jóvenes con cáncer de mama.

Las tres variantes de *BRCA1* estudiadas no se encuentran en ningún dominio funcional de la proteína y forman uno de los múltiples haplotipos existentes en este gen^{63,67}.

No se ha observado asociación entre los polimorfismos rs16941 (c.3232 A>G; p.Glu1038Gly), rs16942 (c.3667 A>G; p.Lys1183Arg) y el riesgo de desarrollar cáncer de mama ni se ha encontrado asociación entre ambos SNPs y las variantes clínicas de estudio. Tampoco se ha relacionado el polimorfismo rs16942 con aquellas pacientes portadoras de mutación en *BRCA1/2* coincidiendo nuestros resultados con lo descrito previamente⁵⁹.

Únicamente en el caso del polimorfismo rs16942 se relacionan los genotipos recesivos AG+GG con las pacientes con cáncer de mama y tumores RH+. Por lo tanto, estos genotipos están asociados a fenotipos tumorales hormonodependiente que son menos agresivos. Habría que confirmar este resultado aumentando la muestra de estudio ya que el valor estadístico es muy próximo a la no significación ($p=0.046$). No se ha estudiado previamente la posible relación entre estos polimorfismos con el subtipo tumoral o el estado hormonal tumoral.

Nuestro trabajo indica que ser portador del genotipo TT del polimorfismo rs799917 (c.2731C>T; p.Pro871Leu) está asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Estos resultados son similares a los de los estudios iniciales de asociación de polimorfismos en *BRCA1* que concluyeron que el alelo T de este polimorfismo era más frecuente en pacientes con cáncer de mama que en mujeres sanas^{60,61}. Más recientemente, Nicoloso y colaboradores estudiaron el impacto que presenta esta variante relacionando también el genotipo TT con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, ya que el alelo T está asociado a una expresión más débil del miR-638, que interactúa con *BRCA1* y produce una disminución de la expresión de la proteína³⁰⁸.

También encontramos que, al subdividir el grupo de pacientes en BRCA+ o BRCA-, éste mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama está relacionado con las pacientes BRCA-. Este resultado es de gran interés ya que nos indicaría que la presencia del genotipo TT del polimorfismo rs799917 está asociado a la predisposición al cáncer de mama en mujeres jóvenes no portadoras de mutación en *BRCA1/2*, lo que podría sugerir un efecto protector frente al desarrollo de mutaciones en los genes *BRCA1/2* aunque no frente al desarrollo de la enfermedad. No obstante, sería necesario aumentar la muestra ya que el número de mujeres jóvenes BRCA+es muy pequeño.

El polimorfismo rs1800734 (c.-93 G>A) se encuentra localizado en la zona promotora del gen MLH1 y su relación con el cáncer de mama no ha sido muy estudiada. Se ha descrito una disminución de la expresión de MLH1 en cáncer colorrectal y la presencia del alelo A del polimorfismo, lo que conlleva una disminución de la reparación postreplicativa del DNA^{85,86}.

En nuestro trabajo, el alelo A aparece con mayor frecuencia en mujeres sanas que en las pacientes de estudio y se relaciona con un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes. Martínez Urueña y colaboradores, que también encontraban una mayor frecuencia del genotipo GA al estudiar este SNP en cáncer colorrectal frente a población sana como control, no pudiendo establecer ninguna asociación con la susceptibilidad a desarrollar cáncer colorrectal³⁰⁹. La relación de este polimorfismo en cáncer de mama ha sido estudiada previamente por Kappil y colaboradores no encontrando ninguna relación al respecto⁸⁴. Nuestro

resultado no se corresponde con lo observado en otros tipos de tumores, donde se relaciona el alelo A con un mayor riesgo de padecer cáncer colorrectal⁸⁸, de pulmón⁸⁹, de ovario⁹⁰ o cáncer gástrico⁹¹ entre otros. Esta contradicción en nuestros resultados podría indicar que una disminución en la expresión del gen *MLH1* no es suficiente para producir un aumento de la susceptibilidad al cáncer de mama en mujeres sanas. Se propone el estudio en una muestra más amplia y en otra población control para confirmar este resultado.

Además, hemos observado que el genotipo AA se relaciona con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama en presencia de mutación en los genes *BRCA1/2*. Aunque el subgrupo de pacientes portadoras de mutación es pequeño sería de interés confirmar este resultado, ya que el genotipo AA de este polimorfismo podría definir un subgrupo de pacientes en las que hacer el estudio de los genes *BRCA1/2* en las pacientes con cáncer de mama jóvenes. De esta forma, la aparición simultánea de mutaciones inactivantes en los genes *BRCA1/2* y la presencia del alelo A del SNP rs1800734 de *MLH1* produciría mayor acumulación de errores en el DNA y por consiguiente la anticipación del cáncer de mama en estas mujeres al estar menos activas dos vías diferentes de reparación del DNA.

1.2 Polimorfismos en genes identificados por GWAS

Los estudios GWAS han permitido encontrar nuevos loci de susceptibilidad al cáncer de mama incluyendo la identificación de los polimorfismos rs2981582 (c.109+906 C>T) del gen *FGFR2*, rs2910164 (c.+60 G>C) del gen *MIR146* y rs13281615 de la región cromosómica 8q24.

Diversos estudios de GWAS han identificado al gen *FGFR2* como un gen de susceptibilidad al cáncer de mama⁹⁸, siendo el polimorfismo rs2981582 el que se ha asociado con mayor fuerza al riesgo de desarrollar esta enfermedad. La presencia del alelo minoritario de este polimorfismo se ha relacionado con una disminución de la expresión de *FGFR2*¹⁰⁹.

En nuestro trabajo hemos observado una relación entre el genotipo TT y el alelo T del polimorfismo rs2981582 con un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes. Esta relación se produce también al separar a las pacientes según sean o no portadoras de mutación en los genes *BRCA1/2*, asociándose con las pacientes BRCA-. Los estudios iniciales que permitieron la identificación de este SNP además de un reciente meta-análisis realizado por Zhang y colaboradores¹⁰¹, relacionan también el alelo menos frecuente con el cáncer de mama en no portadores de mutación en los genes *BRCA1/2*^{98,99}. Sólo un estudio previo ha relacionado el genotipo mutado con el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres premenopáusicas en población asiática¹⁰⁹. En nuestro trabajo hemos asociado el genotipo TT del polimorfismo con la susceptibilidad al cáncer de mama en mujeres jóvenes, estableciendo un riesgo relativo de 5,02 frente a la población control, mientras que, los estudios anteriormente descritos indican un riesgo más bajo. Este riesgo es similar en las pacientes BRCA- frente a la población control, por lo que consideramos interesante su estudio en mujeres no portadoras de mutación en los genes *BRCA1/2* procedentes de familias BRCA+, ya que presentarían una mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad.

También se han asociado estos resultados con cáncer de mama en individuos portadores de mutación en *BRCA2*¹⁰⁰. En nuestro trabajo no hemos encontrado ninguna relación al realizar el estudio atendiendo al estado mutacional de *BRCA1/2*. Antoniou y colaboradores analizaban en su trabajo estas variantes en 1983 pacientes portadoras de mutación en *BRCA2*¹⁰⁰; en nuestro trabajo el número de pacientes con mutación en *BRCA1/2* es pequeño, especialmente en *BRCA2* (n=7) por lo que no se ha realizado el análisis en este subgrupo.

Además, en nuestro trabajo, el genotipo TT y el alelo T de este polimorfismo se han relacionado con la expresión de receptores hormonales positivos en los tumores de las pacientes jóvenes con cáncer de mama. Estudios previos han relacionado también el alelo T con la expresión de receptores hormonales positivos^{97,104} y un subtipo luminal A^{105,181}. Al realizar el estudio por subtipo tumoral en nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas debido al tamaño de la población de estudio. Al comparar los distintos subtipos, los genotipos CT y TT se encuentran en un porcentaje mayor en el subtipo luminal A presentando una diferencia cercana a la significación estadística (p=0.077) por lo que es probable que al aumentar el tamaño de muestra o al agrupar los subtipos luminal A y B en uno único se encuentre esta asociación.

Recientemente se ha estudiado la acción hormono dependiente del gen *FGFR2*. La presencia del alelo minoritario del polimorfismo rs2981582 en líneas celulares hormono dependientes reduce la expresión de *FGFR2* lo que produce un incremento en los niveles de estrógeno, y por consiguiente un aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama debido a la mayor exposición a estrógenos³¹⁰.

El polimorfismo rs2910164 (n.60 G>C) se localiza en el gen *MIR146* y se une al extremo 3'UTR del gen *BRCA1* regulando negativamente su expresión¹¹⁵. El alelo C de este polimorfismo cambia la conformación de la estructura secundaria, haciendo que sea menos estable lo que conlleva un aumento de la expresión del miR-146 maduro, descrita previamente en tumores de mama, próstata y páncreas¹¹⁴

En nuestro trabajo, el alelo G del polimorfismo rs2910164 se ha asociado a las pacientes jóvenes portadoras de mutación en *BRCA1/2* en comparación a las *BRCA*- y también frente a la población control. Este resultado concuerda con la función reguladora que ejercen los miRNAs, ya que el polimorfismo rs2910164 va a alterar la función reguladora de la expresión de la proteína *BRCA1* independientemente de la presencia de mutación en *BRCA1/2*. Existen grandes diferencias entre los distintos estudios de este polimorfismo y su relación con la susceptibilidad al cáncer de mama. Shen y colaboradores relacionaron el alelo C con el desarrollo de la enfermedad en mujeres jóvenes³¹¹ y en pacientes no portadoras de mutación en *BRCA1/2*¹²¹. Otros trabajos no han relacionado este polimorfismo con el riesgo de desarrollar cáncer de mama^{124,125,312,313}. Hay que tener en cuenta que las poblaciones analizadas en los estudios que indican que no existe relación entre este polimorfismo y la susceptibilidad al cáncer de mama presentan mayor tamaño de muestra que aquellos que sí que la encuentran.

La región 8q24 se encuentra frecuentemente amplificada en cáncer de mama y se han identificado diversos SNPs, como el rs13281615, implicados en la predisposición al cáncer de mama^{99,132-135}. En nuestro trabajo, hemos asociado la susceptibilidad al cáncer de mama en pacientes jóvenes portadoras del genotipo heterocigoto GA y mutación en *BRCA1/2* con un riesgo relativo de 8.9 frente a la población control. Al realizar el análisis por modelo de herencia dominante encontramos que las portadoras de los genotipos GA y GG presentan este mismo riesgo de desarrollar la enfermedad. El estudio de esta variante es de interés en mujeres jóvenes sanas que presenten mutación germinal en los genes *BRCA1/2* ya que es indicativa de un alto riesgo de desarrollar la enfermedad. En otros trabajos no se ha podido relacionar con el cáncer de mama en mujeres jóvenes¹⁰⁴ ni el estado mutacional de los genes *BRCA1* y *BRCA2*^{104,136,137}.

Diversos estudios coinciden en la asociación del genotipo homocigoto mutado de este polimorfismo y el cáncer de mama de bajo grado en población caucásica⁹⁷ y de mayor grado y población asiática¹³². Por ello, debido a las diferencias étnicas y geográficas de los distintos estudios sobre el polimorfismo rs13281615, las conclusiones establecidas al respecto no son muy consistentes al relacionar la región 8q24 y el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

1.3 Polimorfismos en genes relacionados con TP53

El gen supresor tumoral *TP53*, y su regulador, el gen *MDM2*, son de gran importancia en diversas rutas implicadas en la estabilidad genómica, ciclo celular y reparación del daño al DNA; su incorrecto funcionamiento está relacionado en los procesos de carcinogénesis¹⁶⁶.

Se analizó el papel de los polimorfismos rs1042522 (c.215 G>C; p.Arg72Pro) del gen *TP53* y rs2279744 (c.-309 T>G) del gen *MDM2* en la susceptibilidad al cáncer de mama en mujeres jóvenes.

Nuestros resultados mostraron la presencia del genotipo CC del polimorfismo rs1042522 de *TP53* con mayor frecuencia en los controles que en las pacientes de estudio y, dentro de éstas, en las pacientes no portadoras de mutación en *BRCA1/2*. Por lo tanto, el genotipo CC o la variante proteica Pro/Pro está relacionada con un menor riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres sanas. Este polimorfismo ha sido ampliamente estudiado en distintos tipos de cáncer³¹⁴ y su estudio en cáncer de mama presenta resultados contradictorios. Algunos de estos estudios confirman nuestros resultados, encontrando la variante Pro asociada a un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama^{151,152}.

Otros estudios lo encuentran asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ y relacionan el genotipo Pro/Pro con peores expectativas de supervivencia¹⁵⁸.

Las variantes del polimorfismo, Arg72Arg y Arg72Pro, confieren distintas propiedades a la proteína p53¹⁴⁵. El alelo Arg presenta una capacidad 5 veces mayor para inducir apoptosis¹⁴⁷ mientras que el alelo Pro produce una mayor parada del ciclo celular en fase G1 y es más eficiente a la hora de activar aquellos genes de reparación del DNA dependientes de p53, por lo tanto, la reparación es mucho más eficiente¹⁴⁶. En este mismo trabajo también indican que,

aunque la variante Arg presenta mayor capacidad de inducir apoptosis, no es suficiente para detener el desarrollo tumoral.

No hemos encontrado en nuestro trabajo ni en trabajos previos, relación al estudiar la asociación del polimorfismo con otras variables como mutaciones en *BRCA1/2*^{159,160}, historia familiar¹⁶¹ o las características del fenotipo tumoral.

El polimorfismo rs2279744 (c.-309 T>G) se encuentra en la zona promotora del gen *MDM2*. *MDM2* interacciona con p53 inhibiendo su actividad transcripcional mediante un mecanismo de control negativo entre ambas proteínas. El análisis de este SNP en el cáncer de mama también ha generado distintas opiniones según el grupo étnico estudiado¹⁷².

El estudio de este polimorfismo no mostró ninguna relación con el riesgo de cáncer de mama en ninguna de las variables analizadas. En estudios previos no se ha relacionado con un riesgo de desarrollar cáncer de mama en población caucásica pero sí asiática¹⁷³⁻¹⁷⁵; tampoco se ha relacionado con pacientes portadoras de mutación en *BRCA1/2*¹⁵⁹, ni con un diagnóstico en mujeres jóvenes¹⁷⁶.

1.4 Polimorfismos en genes relacionados con la actividad telomerasa

Los telómeros son estructuras, que se encuentran al final del cromosoma, esenciales para protegerlos de la degradación y la recombinación.

La telomerasa es un complejo enzimático ribonucleoproteico formado por dos moléculas esenciales, TERT y TERC, cuya función es el alargamiento de los telómeros en las células germinales, células madre y tejidos en desarrollo. La actividad de la telomerasa se encuentra incrementada en las células cancerígenas y es responsable de la inmortalización en estas células¹⁹².

Se ha estudiado la implicación de los polimorfismos rs2735940 (c.-1327 T>C) del gen *TERT* y rs2293607 (c.-63 A>G) del gen *TERC* en la susceptibilidad al cáncer de mama en mujeres jóvenes.

Hemos observado una asociación entre el genotipo CC y el alelo C del polimorfismo rs2735940 del gen *TERT* y el grupo de pacientes con antecedentes familiares de la enfermedad, presentando un riesgo de 1.53 en comparación a las pacientes que no presentan historia familiar. Este resultado coincide con el análisis realizado en mujeres posmenopáusicas de Savage y colaboradores que relacionan el alelo C con historia familiar de cáncer de mama¹⁹⁸. Otros estudios no han encontrado relación con el riesgo de desarrollar cáncer de mama^{194,197,199}. Por lo tanto, es la primera vez que se describe la asociación entre la variante menos frecuente del polimorfismo rs2735940 con el riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes con antecedentes de la enfermedad.

El polimorfismo rs2735940 se encuentra en la zona promotora del gen y se ha asociado la variante -1327C con menor actividad transcripcional, una disminución de la actividad de la enzima y por ello un acortamiento telomérico en linfocitos de sangre periférica en individuos sanos³¹⁵. Los telómeros son estructuras que encapsulan el final de los cromosomas cuya función

es proporcionar y mantener la estabilidad cromosómica; por lo tanto, una menor longitud telomérica se ha relacionado con una mayor inestabilidad cromosómica. Aunque este papel de la telomerasa parece contradictorio porque se encuentra activada en la mayor parte de los tumores humanos¹⁹³, se ha propuesto un papel dual de la telomerasa. Por una parte la telomerasa presenta un papel promotor de la carcinogénesis cuando se encuentra activada en células que presentan pérdida de supresores tumorales como p53 y Rb, de manera que los telómeros se estabilizan e inmortalizan provocando la malignización de la célula. Por otra parte, presenta un papel protector cuando los telómeros presentan una longitud crítica, evitando que sean procesados por la maquinaria NHEJ y, por lo tanto, suprimen la acumulación de anomalías cromosómicas y la inestabilidad genómica^{316,317}.

La relación del alelo C del polimorfismo con historia familiar de la enfermedad podría sugerir una mayor susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad debido a que estas pacientes ya presentan un riesgo genético incrementado. De esta forma, aquellas pacientes que presentan la variante -1327C relacionada con un mayor acortamiento telomérico y por lo tanto, una mayor inestabilidad cromosómica tienen más riesgo. Sería de interés el estudio de la longitud telomérica en los linfocitos de sangre periférica de estas pacientes para establecer una relación más clara al respecto.

En nuestra cohorte hemos encontrado además los genotipos TC y CC del polimorfismo rs2735940 del gen *TERT* con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con tumores RH-. El único estudio que presenta una relación entre el estado de los receptores hormonales y distintos polimorfismos en la telomerasa también relaciona el polimorfismo rs2735940 con tumores del tipo RE-/RP-, aunque no concluyen que papel podría tener el estado de estos receptores con la longitud telomérica¹⁹⁴. Diversos estudios han demostrado una mayor actividad de la telomerasa en cáncer de mama y próstata debido a la acción de los estrógenos. El promotor de *TERT* presenta dos elementos de unión a estrógenos (*ERE*, *Estrogen-response element*) de manera que el receptor de estrógenos se une a los ERE y se activa la transcripción de *TERT*, lo que confirma la idea de que el receptor de estrógenos sobrerregula la actividad de la telomerasa³¹⁸.

El papel de *TERT* en los tumores ER-/PR- y triple negativo se ha establecido anteriormente al asociar por GWAS variantes en el locus de *TERT* en el cromosoma 5p15 con tumores triples negativos en mujeres premenopausias africanas³¹⁹. La explicación a la conexión entre *TERT* y los tumores triples negativos podría ser que al igual que *locus* como el receptor de estrógenos ESR1 puede predisponer el epitelio de la mama para desarrollar cáncer en general, otros como *TERT* podrían actuar después de iniciarse la tumorigénesis mamaria hacia un tumor triple negativo³²⁰.

Por otra parte, en este trabajo no hemos encontrado asociación entre el polimorfismo rs2293607 del gen *TERC* con el cáncer de mama en mujeres jóvenes. Se ha relacionado este polimorfismo con un mayor riesgo en cáncer colorrectal y mayor longitud telomérica²⁰¹ pero su papel en la susceptibilidad al cáncer de mama no había sido estudiada hasta ahora.

1.5 Polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular

La proteína LOXL1 es una enzima lisil oxidasa importante en la formación del tejido conectivo. Recientemente se está estudiando la relevancia de la familia de miembros LOX en la progresión tumoral y el cáncer metastásico²⁰⁴.

Se eligieron los polimorfismos rs2165241 (c.-1613 C>T) rs3825942 (c.485 G>A; p.Gly153Asp) para su estudio en mujeres jóvenes con cáncer de mama. Ambos polimorfismos han sido ampliamente estudiados en enfermedades como el glaucoma pseudoexfoliativo²⁰⁸⁻²¹².

En este trabajo hemos asociado el genotipo TT del polimorfismo rs2165241 con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres jóvenes en comparación a mujeres sanas. También se asocia este genotipo a una mayor susceptibilidad al cáncer de mama en pacientes BRCA- y, por último, el genotipo TT y el alelo T se han relacionado con mayor susceptibilidad al cáncer de mama en aquellas mujeres jóvenes que presentan un historial de cáncer de mama familiar.

No se ha encontrado ninguna relación entre el polimorfismo rs3825942 y el riesgo de desarrollar cáncer de mama con ninguna de las variables de estudio.

Estos polimorfismos no se han estudiado previamente en cáncer por lo que no se puede establecer un papel claro en la susceptibilidad de la enfermedad. El genotipo TT del polimorfismo rs2165241 aumentaría levemente el riesgo de padecer la enfermedad en estas pacientes con antecedentes de la enfermedad. Habría que realizar más estudios para confirmar su importancia en el cáncer de mama familiar. Además, al estar relacionado, hasta el momento, la actividad de la enzima lisil oxidasa y el cáncer metastásico, sería de interés su estudio y comparación con pacientes que debutan con o presentan metástasis.

1.6 Polimorfismos en genes relacionados con la autofagia

La autofagia es un mecanismo de mantenimiento de homeostasis celular que permite la degradación de proteínas y orgánulos que se activa tanto en condiciones normales como en situaciones de estrés celular²⁴⁷. Los genes *ATGs* presentan papeles importantes durante la activación de la autofagia por lo que pequeñas variaciones en estos genes pueden relacionarse con un mal funcionamiento de la ruta²⁸⁰.

Hemos analizado los polimorfismos rs3759601 (c.4512C>G, p.Q1383E) del gen *ATG2B*, rs22452 del gen *ATG5*, rs2241880 (c.1153 T>C p.T300A) del gen *ATG16L1* y rs1864183 (c.929C>T p.T212M) del gen *ATG10* en pacientes jóvenes con cáncer de mama.

No se ha encontrado ninguna asociación entre el polimorfismo rs3759601 del gen *ATG2B* con ninguna de las variables de estudio en la susceptibilidad al cáncer de mama. Esta proteína es clave en la formación del autofagosoma y se ha relacionado el genotipo CC del polimorfismo rs3759601 con una disminución de la formación del autofagosoma en cáncer de vejiga²⁷⁵. También ha sido estudiado previamente en tuberculosis y en enfermedad ósea de Paget no encontrando ninguna asociación^{276,277}.

En nuestro trabajo hemos observado una mayor frecuencia del genotipo GG y del alelo G del polimorfismo rs2245214 del gen *ATG5* en aquellas pacientes portadoras de mutación en *BRCA1/2*. Estas pacientes portadoras del genotipo GG y BRCA+ presentan un riesgo aumentado de 4.9 en comparación con las pacientes BRCA-. El alelo G de este polimorfismo se ha relacionado previamente con mayor riesgo de cáncer de tiroides²⁷⁸, lupus eritematoso²⁷⁹ y enfermedad ósea de Paget²⁷⁶, aunque el efecto que produciría este cambio intrónico a nivel de la autofagia no ha sido estudiado. La proteína ATG5 forma parte del complejo ATG12-ATG5-ATG16L necesario para la formación del autofagosoma, por lo tanto, se plantea la hipótesis de que el polimorfismo rs2245214 produzca una desregulación en la formación del autofagosoma lo que resultaría en un descenso de la autofagia.

El estudio del polimorfismo rs2241880 del gen *ATG16L1* mostró una relación entre el genotipo TT y, aunque no presente diferencia estadísticamente significativa ($p=0.066$), se sugiere la relación del alelo T con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en las pacientes que presentan antecedentes familiares de la enfermedad. Además, se ha encontrado asociación entre el genotipo CC y el alelo C de este polimorfismo con aquellos tumores que sobreexpresan HER2 y por ello al analizar el subtipo tumoral, se relaciona también con tumores del tipo luminal B (RE+, RP+, HER2+).

La proteína ATG16L1 forma parte del complejo ATG12-ATG5-ATG16L que interviene en la expansión de la membrana del autofagosoma²⁸³. El polimorfismo rs2241880 ha sido estudiado en otras enfermedades, encontrándose relacionado con la susceptibilidad a desarrollar enfermedad ósea de Paget²⁷⁶, cáncer gástrico²⁸⁶ y enfermedad de Crohn^{283,285}. Este polimorfismo produce un cambio de treonina por alanina (p.Thr300Ala), cambiando la polaridad de la proteína y produce una activación de la caspasa3, lo que conlleva la degradación de ATG16L1 y disminución de la autofagia²⁸⁴. En nuestro estudio, los tumores HER2+ y los luminales B presentarían con más frecuencia la variante Ala/Ala relacionándose con una disminución de la autofagia y por ello, con un aumento del proceso oncogénico que favorecería un fenotipo más agresivo de la enfermedad.

Al analizar el polimorfismo rs1864183 del gen *ATG10* observamos relación entre los genotipos CT y TT, y una tendencia del alelo T ($p=0.092$), con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en las pacientes con antecedentes familiares de la enfermedad. Este polimorfismo es el único que se ha estudiado previamente en cáncer de mama, sugiriendo que esta variante podría estar relacionada con la susceptibilidad a padecer la enfermedad²⁸². La proteína ATG10 es una enzima tipo E2 que interacciona con ATG7 y permite la conjugación de ATG5 con ATG12 para que, posteriormente, éstas puedan formar el complejo ATG12-ATG5-ATG16L²⁸¹.

Los polimorfismos relacionados con la autofagia se analizan por primera vez en mujeres jóvenes con cáncer de mama en este trabajo. Estas variantes no se encuentran todavía ampliamente estudiadas por lo que se recomienda su estudio en el cáncer de mama para poder profundizar en la relación que pueda existir entre los procesos de autofagia y el cáncer de mama.

Por último, se procedió al estudio conjunto de distintos SNPs que habíamos relacionado con el desarrollo de la enfermedad individualmente.

Hemos relacionado, por primera vez en este trabajo, los alelos minoritarios de los polimorfismos rs2245214 del gen *ATG5* y rs18000734 del gen *MLH1* con una mayor susceptibilidad al cáncer de mama en mujeres jóvenes BRCA+. La asociación de los alelos minoritarios GA define un grupo de pacientes en los que sería de interés el estudio de los genes *BRCA1/2* y, en el caso de mujeres portadoras que no hayan desarrollado la enfermedad, supondrían un grupo de mayor seguimiento al presentar un riesgo acumulado de 3.7 frente a mujeres sanas. La aparición combinada de mutaciones inactivantes de *BRCA1/2* con el alelo G del gen *ATG5*, que podría estar involucrado en una desregulación de la autofagia, y el alelo A del gen *MLH1*, que produce una disminución de la expresión en *MLH1*, produciría una mayor acumulación de errores en la reparación del DNA y un aumento de la inestabilidad genómica y, por consiguiente, la anticipación del cáncer de mama en estas mujeres.

También hemos analizado la segregación conjunta de los polimorfismos rs2735940 del gen *TERT*, rs1864183 del gen *ATG10* y rs2165241 del gen *LOXL1* atendiendo a los antecedentes familiares de la enfermedad. La asociación de los alelos CTC se asocia con un riesgo de la enfermedad en pacientes jóvenes con antecedentes de la enfermedad. Estas pacientes, que podrían presentar una mayor susceptibilidad debido a una mayor carga hereditaria de la enfermedad, presentan los alelos minoritarios de los genes *TERT* y *ATG10*, relacionados con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.

Los estudios de asociación de genes candidatos son de gran importancia en la búsqueda de alelos de susceptibilidad en el cáncer de mama. En el cáncer de mama en mujeres jóvenes en particular, existen pocos estudios de asociación de SNPs que permitan establecer variantes de interés que se relacionen con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. En este trabajo hemos estudiado por primera vez distintos SNPs que hemos relacionado con un gran riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes y su estudio se considera de interés en las unidades de consejo genético para completar los estudios de los genes de alta penetrancia *BRCA1/2*, tanto en los probandos como en las familiares, ya que podrían permitir un mayor seguimiento de estas pacientes en las que se podría dar anticipación de la enfermedad.

2. ANÁLISIS DE ALTERACIONES CITOGENÉTICAS EN TUMORES DE CÁNCER DE MAMA DE MUJERES JÓVENES

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y compleja en la que, además de mutaciones en genes de susceptibilidad de alta penetrancia, existen otras alteraciones genómicas que podrían explicar su aparición en mujeres jóvenes. Los estudios genéticos empleando nuevas plataformas para el análisis de alteraciones genómicas son vitales para descubrir regiones comúnmente alteradas que puedan albergar oncogenes o genes supresores tumorales con un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

La caracterización genómica del cáncer de mama ha demostrado que existen distintos subtipos de la enfermedad, con diferentes perfiles de inestabilidad genómica y *loci* afectados^{321,322}. En los últimos años se han desarrollado múltiples plataformas de *microarrays* y NGS que han permitido el estudio y un mejor entendimiento de las alteraciones genéticas con un mayor poder de resolución y una mayor relación con el ámbito clínico³²³.

En nuestro trabajo, hemos analizado las anomalías genómicas en tumores de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años. Estos tumores se clasificaron atendiendo al estado mutacional en los genes *BRCA1/2* y los antecedentes familiares de primer y/o segundo grado de la enfermedad para su posterior análisis, y establecer si alguna de estas alteraciones genómicas podría estar relacionada con alguna de las características anteriormente expuestas. Se analizaron 58 tumores embebidos en parafina con dos plataformas de *microarrays* genómicos.

Los avances en *arrays* genómicos han hecho posible el uso de DNA extraído de parafina, lo que anteriormente era una gran limitación en los estudios, no sólo porque este DNA obtenido es de peor calidad, sino que se encuentra degradado por la inclusión del tejido en parafina. La plataforma *Oncoscan* presenta una tecnología indicada expresamente para su uso en este DNA procedente de bloques FFPE, mientras que en el caso de los *microarrays* con la tecnología *Cytoscan*, han sido necesarias modificaciones en el protocolo²⁹⁷ para su uso en este DNA degradado. Por lo tanto, una limitación del estudio es el uso de dos plataformas distintas de *microarrays* genómicos, lo que hizo necesaria la utilización de herramientas informáticas para la segmentación y normalización de la información obtenida y llevar a cabo el análisis conjunto de las alteraciones como se ha explicado anteriormente.

2.1 El análisis de las alteraciones en el número de copias confirma la existencia de regiones diferenciales en tumores de mama de mujeres jóvenes y mayores de 40 años

En un primer análisis se compararon las alteraciones a nivel genómico que había entre las pacientes jóvenes menores de 40 años incluidas en este trabajo y un grupo de pacientes entre 40-70 años. Esta primera observación podría indicar si el cáncer de mama en mujeres jóvenes constituye, a nivel de alteraciones genómicas, una entidad diferente. Este análisis se realizó comparando con los resultados obtenidos de la base de datos METABRIC

Las mayores diferencias entre ambos grupos se observaron a nivel de ganancias en las regiones cromosómicas 1p, 1q, 12q, 18p y 20q y pérdidas en 4q, 8p, 15q y 16q. Las ganancias en

1q y 20q y las pérdidas en 8p y 16q son alteraciones frecuentes tanto en cáncer de mama esporádico como hereditario^{236,237}. Las CNAs que hemos considerado de mayor interés fueron aquellas regiones no comunmente alteradas (12q24, 18p11, 4q12) y aquellas que se vieron alteradas con mayor frecuencia en nuestra cohorte de mujeres jóvenes (1p12 y 20q13).

La ganancia de la región 1p12, donde se encuentra el gen *NOTCH2* (*neurogenic locus Notch homolog protein 2*), es la alteración más frecuente en nuestra cohorte al compararlo con tumores de pacientes mayores. Este gen codifica una proteína de la familia Notch, proteínas transmembrana que tiene un papel en diferenciación, proliferación y supervivencia celular. En mamíferos existen cuatro miembros en la familia Notch (Notch1-4) que forman parte de una ruta de señalización que se encuentra altamente conservada entre especies, por lo que una desregulación de esta vía está asociada a fenotipos malignos tanto en tumores hematológicos como sólidos³²⁴. Numerosos estudios han relacionado el papel de Notch con el desarrollo de cáncer de mama a través de estudios en modelos murinos donde la activación de Notch 4 (y posteriormente Notch1 y 3) producía el desarrollo de cáncer de mama³²⁵. Contrariamente, la expresión de NOTCH2 se relaciona con un mejor pronóstico en cáncer de mama³²⁶. Sin embargo, otros trabajos han descrito mutaciones en *NOTCH2* relacionadas con resistencia al tratamiento con tamoxifeno³²⁷, además de fusión entre genes dentro de la misma región cromosómica. La fusión entre *NOTCH2-SEC22B* o *SEC16A* es una de las más frecuentes en cáncer de mama y, aunque es necesario profundizar en su estudio, ha demostrado presentar actividad oncogénica a través del aumento de la proliferación y/o la migración celular³²⁸. Estas fusiones, que podrían ser indicativas de una activación de NOTCH2, serían una buena diana terapéutica para el tratamiento con inhibidores de la familia NOTCH que actualmente se encuentran en estudio³²⁹.

La región 20q13 se encuentra comunmente alterada en cáncer de mama y es la que se encuentra más frecuentemente ganada en los tumores de las pacientes jóvenes de estudio. La ganancia de la región 20q13 se ha asociado a una disminución de la supervivencia libre de enfermedad, de la supervivencia global, a un aumento de la proliferación celular y a fenotipos más agresivos del tumor³³⁰. Esta alteración ocurre en los estadios iniciales del desarrollo del cáncer de mama y podemos relacionarlo por tanto con una anticipación de la enfermedad al asociarlo a las pacientes con cáncer de mama jóvenes. Esta región ha sido objeto de estudio por estar ubicado en ella el gen *ZNF217* (*zinc-finger 217*), frecuentemente amplificado en distintos tipos de cáncer. La proteína ZNF217 es un factor de transcripción de la familia KLF (*Krüppel-like family of transcription factors*) que se une a secuencias específicas de DNA para regular la expresión de genes como *ERBB3*³³¹ y forma parte del complejo de desacetilación de histonas. También se ha descrito su papel como factor de transcripción represor (interaccionando con E-cadherina) haciendo de ZNF217 un factor de transcripción dual y complejo³³². Recientemente se ha relacionado con la aparición de metástasis óseas y presenta además gran interés ya que se están desarrollando terapias que actúan sobre ZNF217³³³.

La ganancia de la región 18p11 ocurre también con mayor recurrencia en pacientes jóvenes. En esta región se encuentra el gen *TGIF* (*transforming growth factor-beta induced factor*), que puede promover la formación de tumores mamarios mediante la inducción de la vía

Wnt- β -catenina^{334,335}. La vía de señalización Wnt- β -catenina juega un papel decisivo en los procesos de diferenciación, proliferación y muerte celular y, en consecuencia, está involucrada en anomalías del desarrollo embrionario, del crecimiento y la homeostasis. La actividad de la vía de señalización Wnt- β -catenina depende de la concentración citoplasmática de β -catenina. En condiciones normales esta proteína se mantiene a concentraciones bajas pero la acumulación de β -catenina por una activación anormal de la vía Wnt desencadena la expresión de genes que conducen a la proliferación neoplásica³³⁶. Recientemente se ha descubierto que TGIF actúa regulando la vía impidiendo la degradación de la β -catenina y por ello promoviendo el desarrollo del cáncer de mama³³⁵.

La región 12q24 se encuentra ganada en un 33% de las pacientes jóvenes con cáncer de mama, y en ella se localiza el gen *PTPN11* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*) Este gen se encuentra activado en cáncer de mama, pudiendo actuar como oncogén, y está implicado en procesos relacionados con el desarrollo tumoral como metástasis, daño al DNA, proliferación celular etc. Recientemente, se están desarrollando compuestos que actúen como inhibidores de esta diana específica³³⁷.

La pérdida en 4q se observa frecuentemente en los tumores triples negativos y en tumores de pacientes BRCA+³³⁸, pero también se han observado en casos esporádicos de la enfermedad. La edad temprana en el diagnóstico es un factor de riesgo conocido en las portadoras de mutación en *BRCA1/2*, por lo que, la pérdida en 4q, que aparece descrita asociada a distintos subtipos tumorales, podría ser indicativa de una progresión más agresiva y también de una aparición temprana de la enfermedad³³⁹. En nuestro trabajo, la encontramos en un 22% de los casos, aunque en un estudio previo en mujeres menores de 35 años con cáncer de mama mediante aCGH esta región no se encontró deletada²⁴⁵.

Teniendo en cuenta estos resultados, concluimos que existen diferencias en la frecuencia de aparición de las alteraciones genómicas entre las pacientes jóvenes y las de edad más avanzada ya que hemos encontrado regiones diferentes con genes de interés que se podrían confirmar mediante qPCR (PCR cuantitativa o en tiempo real) o FISH (hibridación fluorescente *in situ*). Sin embargo, para una mejor comparación sería recomendable realizar estos experimentos en una cohorte de pacientes mayores y proceder a un análisis conjunto. Aunque es una herramienta fiable y muy eficaz, los datos obtenidos de METABRIC proceden de múltiples estudios en los que se han utilizado metodologías diferentes, además de tener un número mucho mayor de casos comparados con nuestra población de análisis (1398 frente a 58).

2.2 Análisis de alteraciones en el número de copias en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años

Las CNAs en forma de ganancias son más frecuentes y se centran principalmente en las regiones 1q, 8q, 20q, 5q, 16p y 17q mientras que las pérdidas de material genómico son con mayor frecuencia en 22q, 21p, 8p, 11p, 17p. Estos resultados se relacionan con lo descrito previamente sobre CNAs recurrentes en cáncer de mama independientemente de la edad de

aparición de la enfermedad^{237,245}. Estas regiones frecuentemente alteradas podrían representar un conjunto de anomalías comunes que incluirían genes de importancia en el desarrollo del cáncer de mama en general.

Los tumores pertenecientes a pacientes con mutación germinal en *BRCA1/2* presentan mayores porcentajes de regiones alteradas, lo que indica una mayor inestabilidad genómica. Las regiones más frecuentemente alteradas por ganancias son 3p, 3q, 5q, 6p, 7q, y 15q y pérdidas en 15q, 7q, 14q y 18q, lo que concuerda con lo descrito previamente^{239,242}. Al analizar estos tumores encontramos una serie de regiones focales con genes de interés que se encuentran alteradas exclusivamente en todos los tumores BRCA+, como son la ganancia en 5q35.5 (*GNB2L1/RACK1*) y la pérdida en 22q12 (*SEZ6L*).

La ganancia de la región 5q35 es frecuente tanto en tumores BRCA+ como en los tumores triples negativos. En esta región se encuentra el gen *RACK1* (*receptor for activated C kinase 1*), que codifica una proteína que facilita la accesibilidad de PKC (*protein kinase C*) a la membrana plasmática. No está claro su papel en el desarrollo del cáncer de mama ya que se ha descrito tanto una función pro-apoptótica como su relación con un peor pronóstico³⁴⁰.

La pérdida de la región 22q12, donde se encuentra el gen *SEZ6L*, es una región que se ha encontrado delecionada previamente en cáncer de colon y pulmón. El gen *SEZ6L* se ha postulado como gen candidato asociado al cáncer de pulmón, aunque se cree que se encuentra implicado en la maduración y plasticidad neuronal³⁴¹.

Estas alteraciones deberían confirmar mediante qPCR o FISH, ya que de estar confirmadas en los tumores BRCA+ podrían ser regiones de interés en el desarrollo de la enfermedad dependiente de mutaciones en línea germinal en *BRCA1/2*.

Al comparar las alteraciones de los tumores BRCA+ con las de tumores procedentes de pacientes BRCA- cabe destacar la ganancia en la región 12q21, no descrita previamente, con genes de interés como *DUSP6*. Este gen codifica una fosfatasa dual específica responsable de desfosforilar la familia de las MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*), que están asociadas con procesos de proliferación y diferenciación, implicada en el cáncer de mama metastásico y la resistencia al tratamiento con tamoxifeno³⁴².

La pérdida de la región 7q11 tampoco se ha descrito previamente en tumores BRCA+ ni en pacientes jóvenes. Trabajos previos han descrito varios puntos frágiles comunes en el cromosoma 7q, frecuentemente alterado por LOH en cáncer de mama. Estos puntos frágiles son regiones susceptibles a sufrir reordenamientos genómicos y que se han asociado al desarrollo tumoral^{343,344}, lo que podría explicar el alto porcentaje de pacientes BRCA+ que presentan esta alteración.

En nuestro trabajo también quisimos analizar las alteraciones de las pacientes no portadoras de mutación dividiéndolas según los antecedentes familiares de la enfermedad. Las mayores diferencias se dan en regiones previamente descritas en tumores sin mutación germinal en *BRCA1/2* y carga familiar como las pérdidas en 8p, 11q, 17p, 19q²⁴⁴. Destacamos la pérdida en las regiones 4q32 y 6p21, alteradas en la mitad de pacientes CMF- y que no están

comunmente alteradas en cáncer de mama. Se ha descrito la pérdida de 4q31-q35 tanto en tumores esporádicos con expresión de receptor de estrógenos negativo como tumores BRCA+³⁴⁵ y, como se ha explicado anteriormente, esta región podría contener genes de interés en el desarrollo del cáncer de mama en mujeres jóvenes³³⁹. En el caso de la pérdida en 6p21, se ha descrito previamente en tumores triples negativos³⁴⁶.

La pérdida en la región 21q21 no se ha descrito anteriormente en cáncer de mama. El estudio del brazo largo del cromosoma 21 en cáncer de mama mediante análisis de topología de aCGH (TAaCGH) sugiere que este brazo contiene zonas de CNAs muy heterogéneas que podrían ser comunes a muchos subtipos de cáncer de mama, haciendo que su análisis no sea concluyente³⁴⁷.

El estudio de CNAs mediante *microarrays* genómicos nos ha permitido encontrar diferencias a nivel genómico, confirmando la clasificación propuesta inicialmente de nuestra cohorte para su posterior análisis, de los grupos de estudio atendiendo tanto al estado mutacional a nivel germinal de los genes *BRCA1/2* como la presencia/ausencia de antecedentes familiares de la enfermedad en primer y/o segundo grado (BRCA+, CMF+ y CMF-). De esta manera, hemos encontrado diferencias en distintas regiones que podrían presentar genes de susceptibilidad que produzcan la anticipación de la enfermedad en pacientes jóvenes según las características anteriormente descritas.

2.3 Análisis del grado de inestabilidad genómico en las muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años

El conocimiento del estado del genoma en el cáncer es fundamental para alcanzar un diagnóstico rápido y preciso, nuevas estrategias terapéuticas y una estimación de la recurrencia y de la supervivencia. La pérdida de estabilidad genómica es un signo inequívoco del cáncer y debido a que la inestabilidad cromosómica y los perfiles de expresión génica han mostrados un valor predictivo en la recaída en distintos tipos de cáncer, se han desarrollado diversos índices de inestabilidad que presentan valor pronóstico de la enfermedad^{221,222,303,304}.

En nuestro trabajo hemos estudiado la inestabilidad genómica de los tumores de pacientes con cáncer de mama menores de 40 años. Se calculó para cada paciente el GII descrito por Bonnet y colaboradores²²¹. Hemos relacionado una mayor inestabilidad global con mayor expresión del marcador de proliferación Ki-67 y mayor grado histológico del tumor y por ello con tumores más agresivos. Esta inestabilidad global viene dada sobre todo por ganancias de material genómico, que también se asociaron con una mayor expresión de p53 en el tumor. La proteína Ki-67 es un marcador de proliferación celular que está presente en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2-M) pero no en células quiescentes (G0) y en células de tejido de mama sano³⁴⁸. Una mayor expresión de Ki-67 y p53 está asociada a fenotipos más agresivos del tumor y peor pronóstico de la enfermedad³⁴⁹, por lo tanto, se relaciona el mayor nivel de inestabilidad genómica determinado por el aumento de estos dos marcadores y un mayor grado tumoral.

Por último, se asoció un GII^{pérdida} tanto a las pacientes portadoras de mutación en *BRCA1/2* como a pacientes con antecedentes familiares de la enfermedad. Aunque estos datos no se han relacionado previamente con el GII, los tumores procedentes de pacientes portadoras de mutación germinal en *BRCA1/2* presentan defectos en los mecanismos de reparación de DSBs que conducen a una mayor inestabilidad genómica. No hemos podido relacionarlo con la supervivencia libre de enfermedad, la recaída o la progresión de la enfermedad.

Bonnet y colaboradores concluyen que este índice presenta un fuerte valor predictivo tanto en desarrollo de la enfermedad como en el grado y el estado del receptor hormonal. Aunque se encuentra todavía en estudio, este valor podría tener mayores implicaciones como la indicación de terapia adyuvante²²¹.

Por otra parte, se analizó el desequilibrio alélico en el telómero (TAI). Las regiones de desequilibrio alélico suelen producirse más por errores en los sistemas de reparación de DSBs del DNA que por ganancias o pérdidas de material cromosómico durante el desarrollo tumoral. Por lo tanto, la presencia del TAI podría ser indicativo del grado de disfunción en los sistemas de reparación DNA lo que se ha relacionado con una mayor sensibilidad a fármacos que inducen enlaces cruzados en el DNA como el cisplatino²²³

En nuestro estudio analizamos 32 muestras tumorales de las cuales el 69% mostraron desequilibrio alélico en el telómero. Se relacionó el patrón de TAI con un mayor índice de inestabilidad genómica, lo que indica que las muestras tumorales de mujeres menores de 40 años presentan con mayor frecuencia perfiles de desequilibrio alélico en el telómero y de inestabilidad genómica. Al comparar las CNAs en relación a la presencia/ausencia del patrón de TAI, las mayores diferencias se dieron a nivel de pérdidas en genes implicados en la reparación del DNA como *BRCA2*, *ATM* o *CHECK2* en aquellos pacientes que presentan estas alteraciones teloméricas.

Además, Birback y colaboradores llegaron a la conclusión de que podían utilizar el TAI para determinar la sensibilidad al tratamiento con agentes alquilantes del DNA. Se ha observado que la sensibilidad a ciertos fármacos como el cisplatino depende del correcto funcionamiento de los mecanismos de reparación del DNA, de manera que, las células que presentan estos mecanismos intactos van a ser capaces de evitar la acumulación de daños genómicos y, por lo tanto, de reparar los daños producidos al DNA por los medicamentos basados en el platino. Utilizando el TAI como índice de inestabilidad para caracterizar a la población de estudio, no sólo las pacientes que presentan mutaciones germinales en *BRCA1/2* y por ello defectos en la reparación del DNA se beneficiarían del tratamiento con cisplatino, sino que, las pacientes no portadoras de mutación en estos genes pero que presenten TAI es probable que también se beneficien de este tratamiento²²³.

Por lo tanto, el estudio de la inestabilidad genómica es muy importante ya que presenta en algunos casos valor pronóstico o de progresión de la enfermedad, además del beneficio que supondría el tratamiento con fármacos específicos de aquellos tumores con perfiles de inestabilidad mayores. Estos datos deberían confirmarse en una cohorte mayor de pacientes

jóvenes ya que debido a las limitaciones antes expuestas sobre el uso de plataformas genómicas distintas, sólo hemos podido estudiar el TAI en 32 de los 58 pacientes analizados. Esto se debe a que los datos sobre desequilibrio alélico con *Oncoscan* son más fiables al realizarse con una plataforma que presenta mayor resolución y optimizada para realizarse sobre DNA de tejido parafinado.

2.4 Análisis de los patrones de cromotripsis en tumores de mujeres con cáncer de mama menores de 40 años.

El modelo más establecido en la explicación del desarrollo del cáncer establece una acumulación progresiva de cambios en el genoma que resultaría de la pérdida de función de genes supresores tumorales o la activación de oncogenes que producirían cambios en las funciones celulares, produciendo una expansión clonal que en último lugar produciría un fenotipo maligno de células cancerígenas²²⁶.

La cromotripsis es un tipo de inestabilidad cromosómica que puede afectar tanto a una región cromosómica como darse entre varios cromosomas. Este fenómeno en el que los cromosomas “se rompen en pedazos”, se caracteriza por presentar de entre diez a cien reordenamientos genómicos en un único evento, de manera que las lesiones no se acumularían progresivamente en la célula sino que ocurrirían a la vez²²⁵.

En nuestro trabajo hemos encontrado y confirmado patrones de cromotripsis en un 17% de las pacientes con cáncer de mama menores de 40 años. Es la primera vez que se confirman estos patrones en mujeres jóvenes a través de herramientas desarrolladas para ello ya que fácilmente puede confundirse con patrones de inestabilidad genómica²³⁴. La prevalencia con la que se han descrito anteriormente en el cáncer de mama varía entre un 11,1%²³¹ a un 41.4%^{232-61%}²³³ en cáncer de mama en estadios avanzados. Estas diferencias en la prevalencia de cromotripsis se debe al uso de distintas metodologías de trabajo (secuenciación masiva²³¹, aCGH²³² y SNParrays²³³ respectivamente) y a la ausencia de análisis estadísticos que confirmen estos patrones.

En nuestro trabajo, el cromosoma en el que se encontraron patrones de cromotripsis con mayor frecuencia fue el 17 (50% de los casos), en la región 17q12-q23 donde se encuentran genes de interés como *ERBB2*, *CDK12*, *BRIP1* o *BRCA1*. Se ha descrito previamente una mayor frecuencia de recurrencia de este fenómeno en el cromosoma 17^{224,232,233}. Este cromosoma presenta características únicas, como abundantes microduplicaciones, gran densidad de genes implicados en procesos de importancia en el desarrollo tumoral y mayor acortamiento telomérico en cáncer de mama que en tejido sano. También se ha descrito un mayor acortamiento del telómero en el cromosoma 17 en comparación con otros cromosomas, sugiriendo un papel de la longitud de 17q en la progresión del cáncer de mama posiblemente debido a una inestabilidad cromosómica acompañada de una mayor susceptibilidad del 17q al acortamiento telomérico³⁵⁰

En nuestro trabajo, hemos relacionado la cromotripsis con un mayor índice de inestabilidad genómica (GI) y con los antecedentes familiares de la enfermedad. Las pacientes

con antecedentes de cáncer de mama familiar podrían presentar una mayor predisposición genética a desarrollar la enfermedad que los casos esporádicos y, por lo tanto, una mayor inestabilidad genómica que puede estar implicada en el desarrollo de la cromotripsis. Aunque existen distintas teorías sobre el origen de la cromotripsis, la explicación más sencilla para explicar este reordenamiento es que a partir de la ruptura de uno o pocos cromosomas se producen DSBs que vuelven a unirse erróneamente por los mecanismos de reparación del DNA²²⁶

En nuestro trabajo, no se ha relacionado la cromotripsis con la progresión de la enfermedad o con una mayor supervivencia libre de enfermedad, pero sí con una menor tasa de recaída en las pacientes con cromotripsis. Los patrones de cromotripsis han sido relacionados anteriormente con tumores más agresivos y con un peor pronóstico en distintos tipos de cáncer^{226,232} pero mayor supervivencia libre de enfermedad en cáncer colorrectal metastásico³⁵¹ y remisión del síndrome de WHIM³⁵², por lo tanto, no está del todo claro si la cromotripsis presenta algún tipo de valor pronóstico de la enfermedad.

No se sabe con certeza el origen de la cromotripsis ni su implicación en el desarrollo ni pronóstico de la enfermedad. Es necesario un mayor estudio de este fenómeno para esclarecer su papel en los procesos de carcinogénesis y su implicación en el cáncer de mama. En este trabajo se ha descrito por primera vez este evento en el cáncer de mama en mujeres jóvenes y podría presentar implicación en el desarrollo de la enfermedad en aquellas mujeres con antecedentes de cáncer de mama familiar. También se ha asociado a una mayor supervivencia libre de enfermedad que debería confirmarse aumentando la muestra de estudio.

3. ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO CON CLOROQUINA EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

La autofagia es un proceso catabólico altamente regulado y conservado en todas las células eucariotas que consiste en la degradación de material celular (proteínas de vida larga y orgánulos) a través de la formación del autofagosoma y su posterior fusión al lisosoma. Esta unión lleva a la degradación del material contenido en el interior del autofagolisosoma gracias a las enzimas lisosomales²⁵³.

La activación de la autofagia depende de diversos estímulos que afectan al estrés celular como la falta de nutrientes, hipoxia, etc; por lo tanto, el papel principal de la autofagia es el mantenimiento de la homeostasis celular. Aunque no se sabe completamente cómo se produce este proceso, la autofagia es de gran interés en la actualidad debido a que también se encuentra implicada en algunas enfermedades humanas como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas^{250,271}.

La cloroquina es un fármaco utilizado para tratar o prevenir la malaria y, debido a sus propiedades inmunosupresoras, también se utiliza en el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes como la artritis. La cloroquina es una 4-aminoquinolona que actúa en etapas tardías de la autofagia³⁵³. Cuando la cloroquina atraviesa la membrana del lisosoma, se protona debido al bajo pH del interior del lisosoma y se acumula, produciendo una subida del pH que lleva a la reducción de la actividad de las enzimas lisosomales y por lo tanto a la inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma y su posterior degradación³⁵⁴.

Recientemente, se ha analizado la capacidad antitumoral de la cloroquina en combinación con radioterapia o agentes quimioterápicos^{354,355} y diversos ensayos clínicos están obteniendo resultados prometedores en distintos tipos de cáncer³⁵⁶. La combinación de inhibidores de la autofagia con terapias utilizadas ampliamente en el tratamiento del cáncer de mama (taxanos o epotilonas) han demostrado una mejora de la progresión clínica de la enfermedad²⁹².

En nuestro trabajo hemos analizado el efecto de la cloroquina sobre cuatro líneas celulares de cáncer de mama.

El tratamiento con distintas dosis de cloroquina puso de manifiesto su efecto antiproliferativo, dependiente del tiempo y dosis de tratamiento, en las cuatro líneas utilizadas (Figura 27). Las líneas celulares de mujeres jóvenes MDAMB415 y HCC1937 presentaron mayor sensibilidad al tratamiento y se estipuló una concentración de 25 μ M para llevar a cabo los estudios posteriores. Estudios previos indican que esta concentración *in vitro* no es tóxica y es suficiente para estudiar la inhibición de la autofagia, ya que concentraciones de entre 0,25-32 μ M muestran inhibición de la proliferación celular, pero no apoptosis ni muerte celular hasta que se aumenta la dosis hasta 64 μ M³⁵⁵.

El estudio del ciclo celular a la concentración de 25 μ M confirmó las diferencias a nivel de la sensibilidad al tratamiento en las líneas celulares de mujeres jóvenes MDAMB415 y

HCC1937 ya que se produjo un aumento de la muerte celular a las 72 horas y, por consiguiente, la reducción del resto de fases del ciclo celular en comparación a los controles sin tratar. Nuestros resultados concuerdan en parte con los publicados anteriormente por Jiang y colaboradores³⁵⁷ que muestran un aumento de la fase G2/M acompañada de una disminución de células en fases G0/G1 y S. Este experimento se realizó al tratar la línea de cáncer de mama Bcap-37 con cloroquina a unas concentraciones menores a las usadas en nuestro trabajo (8 y 16 μM), por lo tanto, es probable que el aumento de células en G2/M sea previa al aumento que observamos en nuestro trabajo en la muerte celular al aumentar la dosis del tratamiento.

En las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y BT549 se observa un pequeño aumento de la fase G0/G1 y una mortalidad celular muy baja. Aunque tampoco encontramos la acumulación de células en G2/M descrita anteriormente³⁵⁷, la parada del ciclo en G0/G1 se ha descrito anteriormente en carcinoma hepatocelular³⁵⁸.

3.1 El tratamiento con cloroquina produce una inhibición de la autofagia en líneas tumorales de mama

El tratamiento de las líneas celulares de cáncer de mama con cloroquina a la concentración de 25 μM mostró una inhibición de la autofagia que se comprobó por un aumento de la expresión de las proteínas autofágicas LC3B, Beclin 1 y p62.

La proteína LC3 se localiza en la membrana del autofagosoma y se considera el marcador más específico de la autofagia. La síntesis y activación de LC3 está regulado por los genes *ATG3*, *ATG7* y *ATG8* y se basa en la transformación de la forma soluble LC3B-I a LC3B-II. En mamíferos LC3 se expresa como tres isoformas, A, B y C siendo la isoforma B la más utilizada en los estudios de autofagia²⁵⁹.

En nuestro trabajo todas las líneas celulares presentaron un aumento de LC3B a lo largo del tratamiento con cloroquina, teniendo una expresión máxima a las 48h. El aumento a nivel de LC3B-II fue mayor en las líneas de cáncer de mama jóvenes MDAMB415 y HCC1937. Este aumento de la expresión en LC3B se ha descrito anteriormente en líneas de cáncer de mama triple negativas, presentando altos nivel de LC3B a nivel basal. Aunque en general las líneas utilizadas en este trabajo han presentado todas unos niveles similares basales de LC3B, el efecto de la cloroquina en la línea triple negativa HCC1937 fue mayor, lo que se ha relacionado con un mayor beneficio en el tratamiento combinado con otros agentes quimioterápicos en este tipo de tumor³⁵⁹.

La proteína Beclin 1 presenta un papel clave en el inicio de la formación y maduración del autofagosoma. Su expresión varía entre las células epiteliales sanas de mama, donde se encuentra sobreexpresada, y líneas tumorales de mama, donde se observa una disminución de la expresión que se ha relacionado con el cáncer de mama invasivo, un peor pronóstico de la enfermedad y mayor proliferación celular³⁶⁰. Lo mismo ocurre en mieloma múltiple³⁶¹, el carcinoma de laringe de células escamosas³⁶², carcinoma hepatocelular³⁶³ o el carcinoma de ovario³⁶⁴ entre otros.

En nuestro trabajo, la expresión de Beclin 1 en las líneas de cáncer de mama tratadas con cloroquina aumenta lo largo del tiempo de tratamiento. Aunque la sobreexpresión de Beclin 1 está relacionada con un aumento de la autofagia, en este caso su acumulación se debe a la inhibición de la formación del autofagolisosoma debido al efecto de la cloroquina, por ello es normal encontrar una acumulación de las proteínas que funcionan en puntos anteriores. Cabe destacar que este aumento en la expresión de Beclin 1 fue mayor en la línea BT549.

Por último, se analizó la expresión de la proteína p62. p62 es un modulador implicado en múltiples rutas de señalización como la ruta de NFκB y la autofagia. Presenta dominios de unión a LC3B y a proteínas ubiquitinadas para degradarlos selectivamente por la maquinaria autofágica. Se ha observado que la autofagia es responsable de la degradación de p62 y que el bloqueo de este proceso conlleva a la acumulación de la proteína y, por lo tanto, la expresión de p62 se correlaciona inversamente al estado de la autofagia^{365,366}.

El tratamiento con cloroquina en las líneas celulares de cáncer de mama muestra un aumento de la expresión de p62 en comparación al tiempo sin tratamiento. Esta acumulación se produce de manera más gradual y con un máximo de 72 horas en la línea celular MDAMB415, lo que indica el bloqueo de la autofagia durante todo el tratamiento con cloroquina.

En el resto de líneas tratadas, se produce un aumento a las 24 y 48 horas de tratamiento para luego disminuir hasta niveles más bajos que los basales. Este efecto es indicativo de una inhibición de la autofagia por la cloroquina hasta las 48 horas y la posterior disminución se debe a un mecanismo compensador en el que la célula aumenta la autofagia y por ello disminuyen los niveles de p62.

3.2 Las líneas celulares de cáncer de mama de mujeres jóvenes presentan mayor sensibilidad al tratamiento con cloroquina debido a la inestabilidad genómica

La inestabilidad genómica es un evento que se observa en la mayoría de los tumores sólidos y las variaciones genéticas que produce se han relacionado con la resistencia a quimioterapia y un peor pronóstico de estos tumores. Defectos en la autofagia se relacionan con el inicio del desarrollo tumoral, posiblemente porque la autofagia regula el estrés oxidativo y el daño al DNA por eliminación de orgánulos defectuosos, sin embargo, los tumores en etapas más desarrolladas presentan un mayor estrés metabólico, relacionándose con un aumento de la autofagia necesario para el desarrollo tumoral.

En nuestro estudio, el análisis de la inestabilidad genómica mostró que las líneas de cáncer de mama de mujeres menores de 40 años, MDAMB415 y HCC1937 presentaban una mayor inestabilidad genómica antes del tratamiento que disminuye a lo largo de las 72 horas de tratamiento con cloroquina (Figura 32). La mayor inestabilidad hace que estas células presenten una mayor sensibilidad al tratamiento con cloroquina al presentar una autofagia basal elevada como mecanismo compensador de la inestabilidad genómica. Recientemente se ha estudiado el papel de la autofagia en células con inestabilidad cromosómica o CIN (*chromosome instability*) en *Drosophilla* proponiendo que los tejidos que presentan CIN tienen una activación de la autofagia como mecanismo protector ante esta inestabilidad. Estas células también presentan

mayor daño al DNA y aneuploidias³⁶⁷. Además, como se ha descrito anteriormente, la autofagia presenta un papel dual ante el daño genético, de manera que puede tener una acción protectora que lleva a la supervivencia celular o citotóxico produciendo muerte celular³⁶⁸ (Figura 33)

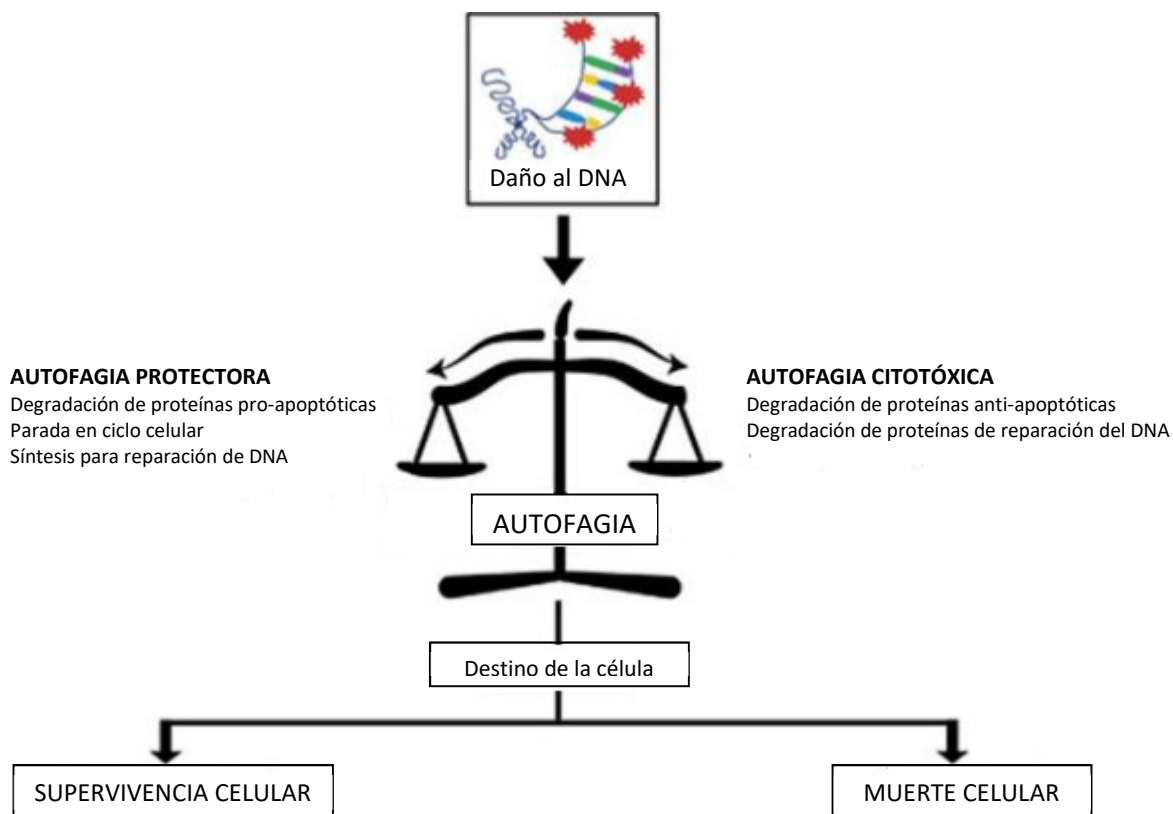


Figura 33. La autofagia puede decidir el destino de la célula regulando diversos mecanismos que puede llevar a la supervivencia o a la muerte celular. Modificado de Vessoni y colaboradores³⁶⁸.

Por tanto, ante la inestabilidad genómica, la autofagia se activa llevando a cabo su papel “protector”, promoviendo la generación de dNTPs y/o ATP necesarios para la reparación del daño al DNA y la degradación de proteínas pro-apoptóticas como la caspasa 8 . La cloroquina presenta un mayor efecto en las líneas que presentan la autofagia activada, bloqueando la ruta y produciendo una disminución de la inestabilidad genómica y un aumento de la apoptosis. También hay que tener en cuenta que recientes estudios indican que la cloroquina podría sensibilizar las líneas tumorales a través de otras vías que no son la autofagia como, por ejemplo, por su habilidad de intercalarse en el DNA o la activación de ATM o p53³⁶⁹. Estas últimas funciones son de gran interés viendo que las líneas tumorales de paciente jóvenes tratadas con cloroquina presentan una mayor inestabilidad genómica basal que se relacionaría con un mal funcionamiento de los sistemas de reparación del DNA como se ha descrito anteriormente.

En este trabajo se ha mostrado con el estudio mediante microarrays genómicos que las líneas celulares de pacientes jóvenes utilizadas en este trabajo presentaron mayor inestabilidad genómica, lo que podría considerarse una característica propia de los tumores procedentes de mujeres jóvenes. En el caso de la línea tumoral HCC1937, esta inestabilidad se debe a la

presencia de mutación germinal inactivante en *BRCA1* produciendo una disminución o peor funcionamiento en los sistemas de reparación de DSB. Se ha relacionado que la pérdida de *BRCA1* promueve el papel protector de la autofagia para mitigar el estrés celular y por consiguiente la supervivencia celular³⁷⁰.

En resumen, el tratamiento con cloroquina, fármaco inhibidor de la autofagia a nivel de la formación del autofagolisosoma, en las líneas celulares de cáncer de mama produce una inhibición de la autofagia que observamos por el aumento de la expresión de proteínas autofágicas que se encuentran en pasos previos a la formación del autofagolisosoma como son LC3B, Beclin 1 y p62. Este efecto fue mayor en las líneas celulares tumorales de mujeres menores de 40 años donde se ha observado una mayor inestabilidad genómica. Es la primera vez que se realiza el estudio del efecto que produce la cloroquina en cáncer de mama atendiendo a la edad de diagnóstico. Por lo tanto, sería de interés el uso de la cloroquina en combinación con otros agentes como fármacos que actúan sobre el daño al DNA (como el cisplatino) ya que podría ser beneficioso en las líneas tumorales de pacientes jóvenes donde se ha observado una mayor inestabilidad genómica.

Conclusiones

Primera. El estudio de los genes de alta penetrancia *BRCA1* y *BRCA2* en mujeres jóvenes con cáncer de mama confirma la baja incidencia de mutaciones patogénicas en estos genes. Por lo tanto, se confirma la necesidad de nuevos criterios más estrictos a la hora de incluir a mujeres jóvenes en los estudios en programas de Consejo Genético en cáncer hereditario.

Segunda. El estudio de las variantes alélicas de baja penetrancia seleccionadas, analizadas por primera vez en este trabajo en mujeres jóvenes con cáncer de mama, ha permitido establecer las siguientes asociaciones:

- a) El genotipo TT del polimorfismo *BRCA1* rs799917, el genotipo TT y el alelo T de *FGFR2* rs2981582 y el genotipo TT de *LOXL1* rs2165241 confieren mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes; mientras que el alelo A de *MLH1* rs18000375 y el genotipo CC de *TP53* rs1042522 confieren menor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres jóvenes.
- b) Los alelos G de *ATG5* rs2245214 y A de *MLH1* rs18000734 segregan juntos asociándose al riesgo de cáncer de mama en mujeres jóvenes BRCA+ y podrían ser indicativos de pacientes que presentan mutación germinal en estos genes.
- c) Los alelos C de *TERT* rs2735940, T de *ATG10* rs1864183 y C de *LOXL1* rs2165241 segregan conjuntamente asociándose al cáncer de mama en mujeres jóvenes con antecedentes familiares de la enfermedad.

Tercera. El estudio de alteraciones genómicas de tumores de mama en mujeres jóvenes ha puesto de manifiesto

- a) La existencia de regiones diferenciales en cancer de mama en jóvenes respecto a los tumores de adultos.
- b) La existencia de alteraciones genómicas diferenciales entre los grupos de estudio atendiendo al estado mutacional germinal de los genes *BRCA1/2* y antecedentes familiares de la enfermedad.
- c) El aumento de inestabilidad genómica se relaciona con patrones de desequilibrio alélico en el telómero, mayor expresión de p53, mayor índice proliferativo, y mayor grado tumoral, lo cual indica una asociación a defectos en los sistemas de reparación del DNA.
- d) La cromotripsis es una alteración cromosómica, confirmada por primera vez en este trabajo en pacientes jóvenes, que ocurre con mayor frecuencia en el cromosoma 17 y que hemos asociado al cáncer de mama familiar y a una menor frecuencia de recaída en estas pacientes.

Cuarta. El tratamiento de líneas celulares de cáncer de mama con cloroquina produce una inhibición de la autofagia, siendo más pronunciada en las líneas tumorales de mujeres jóvenes. Este efecto se debe a una mayor inestabilidad genómica observada en estas líneas celulares, pudiendo considerar de interés el estudio de la combinación de cloroquina con agentes que se beneficien de la inestabilidad genómica en el tratamiento del cáncer de mama.

Anexos

Tabla A 1. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA entre controles y pacientes BRCA+.

		<i>Genotipo</i>	<i>Controles</i>	<i>BRCA+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>
<i>BRCA1</i> <i>rs16941</i>	Codominante	AA	56 (48.3%)	11 (50.0%)	1	0.833
		AG	53 (45.7%)	9 (40.9%)	0.864 (0.332-2.253)	0.766
		GG	7 (6.0%)	2 (9.1%)	1.455 (0.266-7.956)	0.666
	Dominante	AA	56 (48.3%)	11 (50.0%)	1	/
		AG+GG	60 (51.7%)	11 (50.0%)	0.933 (0.375-2.322)	0.882
	Recesiva	GG	7 (6.0%)	2 (9.1%)	1.557 (0.301-8.045)	0.597
AA+AG		109 (94.0%)	20 (90.9%)	1	/	
<i>BRCA1</i> <i>rs16942</i>	Codominante	AA	56 (48.3%)	9 (40.9%)	1	0.761
		AG	53 (45.7%)	11 (50.0%)	1.291 (0.496-3.365)	0.601
		GG	7 (6.0%)	2 (9.1%)	1.778 (0.318-9.947)	0.513
	Dominante	AA	56 (48.3%)	9 (40.9%)	1	/
		AG+GG	60 (51.7%)	13 (58.7%)	1.348 (0.535-3.399)	0.527
	Recesiva	GG	7 (6.0%)	2 (9.1%)	1.557 (0.301-8.045)	0.597
AA+AG		109 (94.0%)	20 (90.9%)	1	/	
<i>BRCA1</i> <i>rs799917</i>	Codominante	CC	54 (46.6%)	9 (40.9%)	1	0.813
		CT	55 (47.4%)	11 (50%)	1.200 (0.461-2.127)	0.709
		TT	7 (6.0%)	2 (9.1%)	1.714 (0.306-9.599)	0.540
	Dominante	CC	54 (46.6%)	9 (40.9%)	1	/
		CT+TT	62 (53.4%)	13 (59.1%)	1.258 (0.499-3.172)	0.627
	Recesiva	TT	7 (6.0%)	2 (9.1%)	1.557 (0.301-8.045)	0.597
CC+CT		109 (94.0%)	20 (90.9%)	1	/	
<i>MLH1</i> <i>rs1800734</i>	Codominante	GG	50 (38.2%)	11 (50%)	1	0.059
		GA	73 (55.7%)	7 (31.8%)	0.436 (0.158-1.201)	0.108
		AA	8 (6.1%)	4 (18.2%)	2.273 (0.580-8.910)	0.239
	Dominante	GG	50 (38.2%)	11 (50%)	1	/
		GA+AA	81 (61.8%)	11 (50%)	0.617 (0.249-1.529)	0.297
	Recesiva	AA	8 (6.1%)	4 (18.2%)	3.417 (0.933-12.514)	0.064
GG+GA		123 (93.8%)	18 (5.7%)	1	/	

Anexos

Tabla A 2. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en los grupos CMF- y CMF+.

	<i>Genotipo</i>	<i>CMF-</i>	<i>CMF+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>BRCA1</i> <i>rs16941</i>	Codominante	AA	49 (39.2%)	45 (42.9%)	1	0.790
		AG	60 (48.0%)	49 (46.7%)	0.889 (0.511-1.546)	0.678
		GG	16 (12.8%)	11 (10.5%)	0.749 (0.314-1.783)	0.749
	Dominante	AA	49 (39.2%)	45 (42.9%)	1	/
		AG+GG	76 (60.8%)	60 (57.1%)	0.860 (0.507-1.457)	0.574
	Recesiva	GG	16 (12.8%)	11 (10.5%)	0.797 (0.353-1.802)	0.586
AA+AG		109 (87.2%)	94 (89.5%)	1	/	
<i>BRCA1</i> <i>rs16942</i>	Codominante	AA	52 (41.6%)	43 (41.0%)	1	0.980
		AG	58 (46.4%)	50 (47.6%)	1.043 (0.599-1.813)	0.883
		GG	15 (12.0%)	12 (11.4%)	0.967 (0.409-2.286)	0.940
	Dominante	AA	52 (41.6%)	43 (41.0%)	1	/
		AG+GG	73 (58.4%)	62 (59.0%)	1.027 (0.606-1.740)	0.921
	Recesiva	GG	15 (12.0%)	12 (11.4%)	0.946 (0.422-2.122)	0.893
AA+AG		110 (88.0%)	93 (88.6%)	1	/	
<i>BRCA1</i> <i>rs799917</i>	Codominante	CC	48 (38.4%)	43 (41.0%)	1	0.701
		CT	58 (46.4%)	50 (47.6%)	0.962 (0.550-1.683)	0.893
		TT	19 (15.2%)	12 (11.4%)	0.705 (0.307-1.620)	0.410
	Dominante	CC	48 (38.4%)	43 (41.0%)	1	/
		CT+TT	77 (61.6%)	62 (59.0%)	0.899 (0.529-1.527)	0.693
	Recesiva	TT	19 (15.2%)	12 (11.4%)	0.720 /0.332-1.562)	0.404
CC+CT		106 (84.8%)	93 (88.6%)	1	/	
<i>MLH1</i> <i>rs1800734</i>	Codominante	GG	72 (57.6%)	62 (59.0%)	1	0.427
		GA	48 (38.4%)	35 (33.3%)	0.847 (0.487-1.471)	0.555
		AA	5 (4.0%)	8 (7.6%)	1.858 (0.578-5.974)	0.298
	Dominante	GG	72 (57.6%)	62 (59.0%)	1	/
		GA+AA	53 (42.4%)	43 (41.0%)	0.942 (0.557-1.595)	0.825
	Recesiva	AA	5 (4.0%)	8 (7.6%)	1.979 (0.627-6.245)	0.244
GG+GA		120 (96.0%)	97 (92.4%)	1	/	

Anexos

Tabla A 3. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en los grupos HER2- y HER2+.

	<i>Genotipo</i>	<i>HER2-</i>	<i>HER2+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>BRCA1</i> <i>rs16941</i>	Codominante	AA	52 (39.4%)	22 (47.8%)	1	0.410
		AG	63 (47.7%)	21 (45.7%)	0.788 (0.391-1.589)	0.505
		GG	17 (12.9%)	3 (6.5%)	0.417 (0.111-1.569)	0.196
	Dominante	AA	52 (39.4%)	22 (47.8%)	1	/
		AG+GG	80 (60.6%)	24 (52.2%)	0.709 (0.361-1.394)	0.319
	Recesiva	GG	17 (12.9%)	3 (6.5%)	10.472 (0.132-1.691)	0.249
AA+AG		115 (87.1%)	43 (93.5%)	1	/	
<i>BRCA1</i> <i>rs16942</i>	Codominante	AA	52 (39.4%)	23 (50.0%)	1	0.222
		AG	63 (47.7%)	21 (45.7%)	0.754 (0.376-1.512)	0.426
		GG	17 (12.9%)	2 (4.3%)	0.266 (0.057-1.247)	0.093
	Dominante	AA	52 (39.4%)	23 (50.0%)	1	/
		AG+GG	80 (60.6%)	23 (50.0%)	0.650 (0.331-1.277)	0.211
	Recesiva	GG	17 (12.9%)	2 (4.3%)	0.307 (0.068-1.386)	0.125
AA+AG		115 (87.1%)	44 (95.7%)	1	/	
<i>BRCA1</i> <i>rs799917</i>	Codominante	CC	50 (37.9%)	21 (45.7%)	1	0.639
		CT	64 (48.5%)	20 (43.5%)	0.744 (0.364-1.522)	0.418
		TT	18 (13.6%)	5 (10.9%)	0.661 (0.217-2.015)	0.467
	Dominante	CC	50 (37.9%)	21 (45.7%)	1	/
		CT+TT	82 (32.1%)	25 (54.3%)	0.726 (0.368-1.431)	0.355
	Recesiva	TT	18 (13.6%)	5 (10.9%)	0.772 (0.269-2.214)	0.631
CC+CT		114 (86.4%)	41 (89.1%)	1	/	
<i>MLH1</i> <i>rs1800734</i>	Codominante	GG	78 (59.1%)	33 (71.7%)	1	0.316
		GA	45 (34.1%)	11 (23.9%)	0.578 (0.266-1.254)	0.165
		AA	9 (6.8%)	2 (4.3%)	0.525 (0.108-2.564)	0.426
	Dominante	GG	78 (59.1%)	33 (71.7%)	1	/
		GA+AA	54 (40.9%)	13 (28.3%)	0.569 (0.274-1.180)	0.130
	Recesiva	AA	9 (6.8%)	2 (4.3%)	0.621 (0.129-2.987)	0.552
GG+GA		123 (93.2%)	44 (95.7%)	1	/	

Tabla A 4. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con vías de reparación del DNA en los distintos subtipos tumorales.

	<i>Genotipo</i>	<i>Luminal A</i>	<i>Luminal B</i>	<i>Triple negativo</i>	<i>HER2</i>	<i>p-valor</i>	
<i>BRCA1</i> <i>rs16941</i>	Codominante	AA	35 (36.5%)	15 (45.5%)	16 (45.7%)	7 (53.8%)	
		AG	49 (51.0%)	16 (48.5%)	14 (40.0%)	5 (38.5%)	
		GG	12 (12.5%)	2 (6.1%)	5 (14.3%)	1 (7.7%)	
	Dominante	AA	35 (36.5%)	15 (45.5%)	16 (45.7%)	7 (53.8%)	/
		AG+GG	61 (63.5%)	18 (54.5%)	19 (54.3%)	6 (4.2%)	0.515
	Recesiva	GG	12 (12.5%)	2 (6.1%)	5 (14.3%)	1 (7.7%)	0.677
AA+AG		84 (87.5%)	31 (93.9%)	30 (85.7%)	12 (92.3%)	/	
<i>BRCA1</i> <i>rs16942</i>	Codominante	AA	34 (35.4%)	16 (48.5%)	17 (48.6%)	7 (53.8%)	
		AG	50 (52.1%)	15 (45.5%)	13 (37.1%)	6 (46.2%)	
		GG	12 (12.5%)	2 (6.1%)	5 (14.3%)	0 (0.0%)	
	Dominante	AA	34 (35.4%)	16 (48.5%)	17 (48.6%)	7 (53.8%)	/
		AG+GG	62 (64.6%)	17 (51.5%)	18 (51.4%)	6 (46.2%)	0.302
	Recesiva	GG	12 (12.5%)	2 (6.1%)	5 (14.3%)	0 (0.0%)	0.378
AA+AG		84 (87.5%)	31 (93.9%)	30 (85.7%)	13 (100.0%)	/	
<i>BRCA1</i> <i>rs799917</i>	Codominante	CC	33 (34.4%)	15 (45.5%)	16 (45.7%)	6 (46.2%)	
		CT	50 (52.1%)	16 (48.5%)	14 (40.0%)	4 (30.8%)	
		TT	13 (13.5%)	2 (6.1%)	5 (14.3%)	3 (23.1%)	
	Dominante	CC	33 (34.4%)	15 (45.5%)	16 (45.7%)	6 (46.2%)	/
		CT+TT	63 (65.6%)	18 (54.5%)	19 (54.3%)	7 (53.8%)	0.503
	Recesiva	TT	13 (13.5%)	2 (6.1%)	5 (14.3%)	3 (23.1%)	0.449
CC+CT		83 (86.5%)	31 (93.9%)	30 (85.7%)	10 (76.9%)	/	
<i>MLH1</i> <i>rs1800734</i>	Codominante	GG	55 (57.3%)	24 (72.7%)	23 (65.7%)	9 (69.2%)	
		GA	35 (36.5%)	7 (21.2%)	10 (28.6%)	4 (30.8%)	
		AA	6 (6.3%)	2 (6.1%)	2 (6.1%)	0 (0.0%)	
	Dominante	GG	55 (57.3%)	24 (72.7%)	23 (65.7%)	9 (69.2%)	/
		GA+AA	41 (42.7%)	9 (27.3%)	12 (34.3%)	4 (31.8%)	0.393
	Recesiva	AA	6 (6.3%)	2 (6.1%)	2 (6.1%)	0 (0.0%)	0.836
GG+GA		90 (93.8%)	97 (92.4%)	31 (93.9%)	13 (100.0%)	/	

Tabla A 5. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en los grupos CMF- y CMF+.

	<i>Genotipo</i>	<i>CMF-</i>	<i>CMF+</i>	<i>OR (IC95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>FGFR2</i> <i>rs2981582</i>	Codominante	CC	36 (28.8%)	25 (23.8%)	1	
		CT	64 (51.2%)	56 (53.3%)	1.260 (0.675-2.351)	
		TT	25 (20.0%)	24 (22.9%)	1.382 (0.648-2.949)	
	Dominante	CC	36 (28.8%)	25 (23.8%)	1	/
		CT+TT	89 (71.2%)	80 (76.2%)	1.294 (0.715-2.342)	0.394
	Recesiva	TT	25 (20.0%)	24 (22.9%)	1.185 (0.630-2.230)	0.598
CT+CC		100 (80.0%)	81 (77.1%)	1	/	
<i>MIR146</i> <i>rs2910164</i>	Codominante	GG	74 (59.2%)	60 (57.1%)	1	
		GC	43 (34.4%)	40 (38.1%)	1.147 (0.663-1.986)	
		CC	8 (6.4%)	5 (4.8%)	0.772 (0.240-2.479)	
	Dominante	GG	74 (59.2%)	60 (57.1%)	1	/
		GC+CC	51 (40.8%)	45 (42.9%)	1.088 (0.643-1.841)	0.753
	Recesiva	CC	8 (6.4%)	5 (4.8%)	0.731 (0.232-2.307)	0.593
GC+GG		117 (93.6%)	100 (95.2%)	1	/	
<i>8q24</i> <i>rs13281615</i>	Codominante	AA	32 (25.6%)	22 (21.0%)	1	
		AG	64 (51.2%)	55 (52.4%)	1.250 (0.652-2.398)	
		GG	29 (23.2%)	28 (26.7%)	1.404 (0.663-2.977)	
	Dominante	AA	32 (25.6%)	22 (21.0%)	1	/
		AG+GG	93 (74.4%)	83 (79.0%)	1.298 (0.700-2.409)	0.407
	Recesiva	GG	29 (23.2%)	28 (26.7%)	1.204 (0.661-2.193)	0.544
AG+AA		96 (76.8%)	77 (73.3%)	1	/	

Tabla A 6. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en los grupos HER2- y HER2+.

	<i>Genotipo</i>	<i>HER2-</i>	<i>HER2+</i>	<i>OR (IC95%)</i>	<i>p-valor</i>	
FGFR2 <i>rs2981582</i>	Codominante	CC	35 (26.5%)	18 (39.1%)	1	0.237
		CT	67 (50.8%)	21 (45.7%)	0.609 (0.288-1.291)	0.196
		TT	30 (22.7%)	7 (15.2%)	0.454 (0.167-1.233)	0.121
	Dominante	CC	35 (26.5%)	18 (39.1%)	1	/
		CT+TT	97 (73.5%)	28 (60.9%)	0.561 (0.277-1.138)	0.109
	Recesiva	TT	30 (22.7%)	7 (15.2%)	0.610 (0.248-1.503)	0.283
CC+CT		102 (77.3%)	39 (84.8%)	1	/	
MIR146 <i>rs2910164</i>	Codominante	GG	78 (59.1%)	27 (58.7%)	1	0.994
		GC	46 (34.8%)	16 (34.8%)	1.005 (0.490-2.060)	0.989
		CC	8 (6.1%)	3 (6.5%)	1.083 (0.268-4.381)	0.911
	Dominante	GG	78 (59.1%)	27 (58.7%)	1	/
		GC+CC	54 (40.9%)	19 (41.3%)	1.016 (0.514-2.010)	0.963
	Recesiva	CC	8 (6.1%)	3 (6.5%)	1.081(0.274-4.262)	0.911
GG+GC		124 (93.9%)	43 (93.5%)	1	/	
8q24 <i>rs13281615</i>	Codominante	AA	29 (22.0%)	10 (21.7%)	1	0.999
		AG	69 (52.3%)	24 (52.2%)	1.009 (0.429-2.374)	0.984
		GG	34 (25.8%)	12 (26.1%)	1.024 (0.386-2.712)	0.963
	Dominante	AA	29 (22.0%)	10 (21.7%)	1	/
		AG+GG	103 (78.0%)	36 (78.3%)	1.014 (0.450-2.285)	0.974
	Recesiva	GG	34 (25.8%)	12 (26.1%)	1.017 (0.473-2.186)	0.965
AA+GA		98 (74.2%)	34 (26.1%)	1	/	

Tabla A 7. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes identificados mediante GWAS en los distintos subtipos tumorales

	<i>Genotipo</i>	<i>Luminal A</i>	<i>Luminal B</i>	<i>Triple negativo</i>	<i>HER2</i>	<i>p-valor</i>	
FGFR2 <i>rs2981582</i>	Codominante	CC	22 (22.9%)	11 (33.3%)	13 (37.1%)	7 (53.8%)	0.193
		CT	51 (53.2%)	15 (45.5%)	15 (42.9%)	6 (46.2%)	
		TT	23 (24.0%)	7 (21.2%)	7 (20.0%)	0 (0.0%)	
	Dominante	CC	22 (22.9%)	11 (33.3%)	13 (37.1%)	7 (53.8%)	/
		CT+TT	74 (77.1%)	22 (66.7%)	22 (62.9%)	6 (46.2%)	0.077
	Recesiva	TT	23 (24.0%)	7 (21.2%)	7 (20.0%)	0 (0.0%)	0.262
CC+CT		73 (76.0%)	7 (21.2%)	7 (20.0%)	13 (100.0%)	/	
MIR146 <i>rs2910164</i>	Codominante	GG	57 (59.4%)	19 (57.6%)	20 (57.1%)	8 (6.5%)	0.864
		GC	35 (36.5%)	12 (36.4%)	11 (31.4%)	4 (30.8%)	
		CC	4 (4.2%)	2 (6.1%)	4 (11.4%)	1 (7.7%)	
	Dominante	GG	57 (59.4%)	19 (57.6%)	20 (57.1%)	8 (6.5%)	/
		GC+CC	39 (40.6%)	14 (42.4%)	15 (42.9%)	5 (38.5%)	0.990
	Recesiva	CC	4 (4.2%)	2 (6.1%)	4 (11.4%)	1 (7.7%)	0.499
GG+GC		92 (95.8%)	31 (93.9%)	31 (88.6%)	12 (92.3%)	/	
8q24 <i>rs13281615</i>	Codominante	AA	21 (21.9%)	8 (24.2%)	8 (22.9%)	2 (15.4%)	0.988
		AG	51 (53.1%)	17 (48.6%)	17 (48.6%)	8 (61.5%)	
		GG	24 (25.0%)	10 (28.6%)	10 (28.6%)	3 (23.1%)	
	Dominante	AA	21 (21.9%)	8 (24.2%)	8 (22.9%)	2 (15.4%)	/
		AG+GG	75 (78.1%)	25 (75.8%)	27 (77.1%)	11 (84.6%)	0.931
	Recesiva	GG	24 (25.0%)	9 (27.3%)	10 (28.6%)	3 (23.1%)	0.968
AA+AG		72 (75.0%)	24 (72.7%)	25 (71.4%)	10 (76.9%)	/	

Anexos

Tabla A 8. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con TP53 en los grupos BRCA- y BRCA+.

	<i>Genotipo</i>	<i>BRCA-</i>	<i>BRCA+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
TP53 <i>rs1042522</i>	Codominante	GG	115 (55.3%)	14 (63.6%)	1	0.099
		GC	84 (40.4%)	5 (22.7%)	0.489 (0.170-1.410)	0.185
		CC	9 (4.3%)	3 (13.6%)	2.738 (0.662-11.323)	0.164
	Dominante	GG	115 (55.3%)	14 (63.6%)	1	/
		GC+CC	93 (44.7%)	8 (36.4%)	0.707 (0.284-1.757)	0.455
	Recesiva	CC	9 (4.3%)	3 (13.6%)	3.491 (0.871-14.000)	0.078
GG+GC		199 (95.7%)	19 (86.4%)	1	/	
MDM2 <i>rs2279744</i>	Codominante	TT	91 (43.8%)	10 (45.5%)	1	0.842
		TG	87 (41.8%)	8 (36.4%)	0.837 (0.316-2.219)	0.720
		GG	30 (14.4%)	4 (18.2%)	1.213 (0.354-4.154)	0.758
	Dominante	TT	91 (43.8%)	10 (45.5%)	1	/
		TG+GG	117 (56.3%)	12 (54.5%)	0.933 (0.386-2.256)	0.878
	Recesiva	GG	30 (14.4%)	4 (18.2%)	1.319 (0.418-4.166)	0.638
		TT+TG	178 (85.6%)	18 (81.8%)	1	/

Tabla A 9. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con TP53 en controles y pacientes BRCA+.

	<i>Genotipo</i>	<i>Controles</i>	<i>BRCA+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
TP53 <i>rs1042522</i>	Codominante	GG	53 (45.7%)	14 (63.6%)	1	0.232
		GC	49 (42.2%)	5 (22.7%)	0.386 (0.130-1.152)	0.088
		CC	14 (12.1%)	3 (13.6%)	0.296 (0.121-0.728)	0.811
	Dominante	GG	53 (45.7%)	14 (63.6%)	1	/
		GC+CC	63 (54.3%)	8 (36.4%)	0.481 (0.187-1.234)	0.128
	Recesiva	CC	14 (12.1%)	3 (13.6%)	1.150 (0.301-4.392)	0.838
GG+GC		102 (87.9%)	19 (86.4%)	1	/	
MDM2 <i>rs2279744</i>	Codominante	TT	40 (34.5%)	10 (45.5%)	1	0.596
		TG	54 (46.6%)	8 (36.4%)	0.593 (0.215-1.636)	0.313
		GG	22 (19.0%)	4 (18.2%)	0.727 (0.204-2.592)	0.623
	Dominante	TT	40 (34.5%)	10 (45.5%)	1	/
		TG+GG	76 (65.5%)	12 (54.5%)	0.632 (0.251-1.589)	0.329
	Recesiva	GG	22 (19.0%)	4 (18.2%)	0.949 (0.292-3.086)	0.931
		TT+TG	94 (81.0%)	18 (81.8%)	1	/

Tabla A 10. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en los genes relacionados con TP53 en los grupos CMF- y CMF+.

	<i>Genotipo</i>	<i>CMF-</i>	<i>CMF+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
TP53 <i>rs1042522</i>	Codominante	GG	66 (52.8%)	63 (60.0%)	1	0.257
		GC	54 (43.2%)	35 (33.3%)	0.679 (0.393-1.174)	0.168
		CC	5 (4.0%)	7 (6.7%)	1.467 (0.442-4.862)	0.531
	Dominante	GG	66 (52.8%)	63 (60.0%)	1	/
		GC+CC	59 (47.2%)	42 (40.0%)	0.746 (0.441-1.261)	0.274
	Recesiva	CC	5 (4.0%)	7 (6.7%)	1.714 (0.528-5.569)	0.370
GG+GC		120 (96.0%)	98 (93.3%)	1	/	
MDM2 <i>rs2279744</i>	Codominante	TT	58 (46.4%)	43 (41.0%)	1	0.842
		TG	47 (37.6%)	48 (45.7%)	1.378 (0.784-2.420)	0.265
		GG	20 (16.0%)	14 (13.3%)	0.944(0.429-2.078)	0.887
	Dominante	TT	58 (46.4%)	43 (41.0%)	1	/
		TG+GG	67 (53.6%)	62 (59.0%)	1.248 (0.739-2.108)	0.407
	Recesiva	GG	20 (16.0%)	14 (13.3%)	0.808 (0.386-1.690)	0.571
		TT+TG	105 (84.0%)	91 (86.7%)	1	/

Tabla A 11. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en los genes relacionados con TP53 en los grupos RH- y RH+.

	<i>Genotipo</i>	<i>RH-</i>	<i>RH+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
TP53 <i>rs1042522</i>	Codominante	GG	33 (62.3%)	72 (51.1%)	1	0.051
		GC	15 (28.3%)	64 (45.4%)	2.956 (0.974-3.92)	0.059
		CC	5 (9.4%)	5 (3.5%)	0.458 (0.124-1.692)	0.242
	Dominante	GG	33 (62.3%)	72 (51.1%)	1	/
		GC+CC	20 (37.7%)	68 (48.9%)	1.581 (0.829-3.017)	0.165
	Recesiva	CC	5 (9.4%)	5 (3.5%)	0.353 (0.098-1.273)	0.111
GG+GC		48 (90.6%)	136 (96.5)	1	/	
MDM2 <i>rs2279744</i>	Codominante	TT	91 (43.8%)	10 (45.5%)	1	0.257
		TG	87 (41.8%)	8 (36.4%)	0.635 (0.321-1.257)	0.192
		GG	30 (14.4%)	4 (18.2%)	1.270 (0.455-3.544)	0.648
	Dominante	TT	91 (43.8%)	10 (45.5%)	1	/
		TG+GG	117 (56.3%)	12 (54.5%)	0.750 (0.393-1.433)	0.384
	Recesiva	GG	30 (14.4%)	4 (18.2%)	1.607 (0.617-4.182)	0.331
		TT+TG	178 (85.6%)	18 (81.8%)	1	/

Tabla A 12. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en los genes relacionados con TP53 en los grupos HER2- y HER2+.

	<i>Genotipo</i>	<i>HER2-</i>	<i>HER2+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
TP53 <i>rs1042522</i>	Codominante	GG	70 (53.0%)	25 (54.3%)	1	0.530
		GC	53 (40.2%)	20 (43.5%)	1.057 (0.531-2.102)	0.875
		CC	9 (6.8%)	1 (2.2%)	0.311 (0.037-2.581)	0.279
	Dominante	GG	70 (53.0%)	25 (54.3%)	1	/
		GC+CC	62 (47.0%)	21 (45.7%)	0.948 (0.484-1.860)	0.877
	Recesiva	CC	9 (6.8%)	1 (2.2%)	0.304 (0.037-2.465)	0.265
GG+GC		123 (93.2%)	45 (97.8%)	1	/	
MDM2 <i>rs2279744</i>	Codominante	TT	59 (44.7%)	17 (37.0%)	1	0.592
		TG	56 (42.4%)	21 (45.7%)	1.301 (0.623-2.719)	0.483
		GG	17 (12.9%)	8 (17.4%)	1.633 (0.602-4.433)	0.336
	Dominante	TT	59 (44.7%)	17 (37.0%)	1	/
		TG+GG	73 (55.3%)	29 (63.0%)	1.379 (0.692-2.749)	0.362
	Recesiva	GG	17 (12.9%)	8 (17.4%)	1.424 (0.569-3.562)	0.450
		TT+TG	115 (87.1%)	38 (82.6%)	1	/

Tabla A 13. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en los genes relacionados con TP53 en los distintos subtipos tumorales.

	<i>Genotipo</i>	<i>Luminal A</i>	<i>Luminal B</i>	<i>Triple negativo</i>	<i>HER2</i>	<i>p-valor</i>	
TP53 <i>rs1042522</i>	Codominante	GG	47 (49.0%)	18 (54.5%)	22 (62.9%)	7 (53.8%)	0.260
		GC	44 (45.8%)	15 (45.5%)	9 (25.7%)	5 (38.5%)	
		CC	5 (5.2%)	0 (0.0%)	4 (11.4%)	1 (7.7%)	
	Dominante	GG	47 (49.0%)	18 (54.5%)	22 (62.9%)	7 (53.8%)	/
		GC+CC	49 (51.0%)	15 (45.5%)	13 (37.1%)	6 (46.2%)	0.566
	Recesiva	CC	5 (5.2%)	0 (0.0%)	4 (11.4%)	1 (7.7%)	0.230
GG+GC		91 (94.8%)	33 (100%)	31 (88.6%)	12 (92.3%)	/	
MDM2 <i>rs2279744</i>	Codominante	TT	44 (45.8%)	13 (39.4%)	15 (42.9%)	4 (30.8%)	0.254
		TG	36 (37.5%)	15 (45.5%)	19 (54.3%)	6 (46.2%)	
	Recesiva	GG	16 (16.7%)	5 (15.2%)	1 (2.9%)	3 (23.1%)	/
		TT	44 (45.8%)	13 (39.4%)	15 (42.9%)	4 (30.8%)	
		TG+GG	52 (54.2%)	20 (60.6%)	20 (57.1%)	9 (69.2%)	
	Dominante	GG	16 (16.7%)	5 (15.2%)	1 (2.9%)	3 (23.1%)	0.167
		TT+TG	80 (83.3%)	28 (84.8%)	34 (97.1%)	10 (76.9%)	/

Tabla A 14. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la actividad de la telomerasa en controles y pacientes.

	<i>Genotipo</i>	<i>Controles</i>	<i>Pacientes</i>	<i>OR (IC95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>TERT</i> <i>rs2735940</i>	Codominante	TT	47 (35.9%)	81 (35.2%)	1	0.940
		TC	62 (47.3%)	107 (46.5%)	1.001 (0.622-1.613)	0.995
		CC	22 (16.4%)	42 (18.3%)	1.108 (0.591-2.077)	0.750
	Dominante	TT	47 (35.9%)	81 (35.2%)	1	/
		TC+CC	84 (64.1%)	149 (64.8%)	1.029 (0.658-1.611)	0.900
	Recesiva	CC	22 (16.6%)	42 (18.3%)	1.107 (0.628-1.952)	0.726
TT+TC		109 (83.2%)	188 (81.7%)	1	/	
AA		85 (64.9%)	145 (63%)	1	0.832	
<i>TERC</i> <i>rs2293607</i>	Codominante	AG	41 (31.3%)	76 (33.9%)	1.115 (0.702-1.772)	0.645
		GG	5 (3.8%)	7 (3.0%)	0.821 (0.253-2.667)	0.742
		AA	85 (64.9%)	145 (63.0%)	1	/
	Dominante	AG+GG	46 (35.1%)	85 (37.0%)	1.083 (0.692-1.695)	0.726
		GG	5 (3.8%)	7 (3.0%)	0.791 (0.246-2.544)	0.694
	Recesiva	AA+AG	126 (96.2%)	223 (97.0%)	1	/

Tabla A 15. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la actividad de la telomerasa en los grupos BRCA- y BRCA+.

	<i>Genotipo</i>	<i>BRCA-</i>	<i>BRCA+</i>	<i>OR (IC95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>TERT</i> <i>rs2735940</i>	Codominante	TT	75 (36.1%)	6 (27.3%)	1	0.683
		TC	95 (45.7%)	12 (54.5%)	1.579 (0.566-4.404)	0.383
		CC	38 (18.3%)	4 (18.2%)	1.316 (0.350-4.945)	0.685
	Dominante	TT	75 (36.1%)	6 (27.3%)	1	/
		TC+CC	133 (63.9%)	16 (72.7%)	1.504 (0.564-4.007)	0.415
	Recesiva	CC	38 (18.3%)	4 (18.2%)	0.994 (0.318-3.106)	0.992
TT+TC		170 (81.7%)	18 (81.8%)	1	/	
AA		130 (62.5%)	15 (68.2%)	1	0.948	
<i>TERC</i> <i>rs2293607</i>	Codominante	AG	71 (34.1%)	7 (31.8%)	0.854 (0.333-2.193)	0.744
		GG	7 (3.4%)	0 (0%)	-	0.999
		AA	130 (62.5%)	15 (68.2%)	1	/
	Dominante	AG+GG	78 (37.5%)	7 (31.8%)	0.778 (0.304-1.991)	0.600
		GG	7 (3.4%)	0 (0%)	-	0.999
	Recesiva	AA+AG	201 (96.6%)	22 (100%)	1	/

Tabla A 16. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la actividad de la telomerasa en los grupos control y BRCA-

	<i>Genotipo</i>	<i>Controles</i>	<i>BRCA-</i>	<i>OR (IC95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>TERT</i> <i>rs2735940</i>	Codominante	TT	47 (35.9%)	75 (36.1%)	1	0.929
		TC	62 (47.3%)	95 (45.7%)	0.960 (0.591-1.560)	0.870
		CC	22 (16.4%)	38 (18.3%)	1.082 (0.571-2.051)	0.808
	Dominante	TT	47 (35.9%)	75 (36.1%)	1	/
		TC+CC	84 (64.1%)	133 (63.9%)	0.992 (0.629-1.565)	0.973
	Recesiva	CC	22 (16.6%)	38 (18.3%)	1.107 (0.622-1.973)	0.729
TT+TC		109 (83.2%)	170 (81.7%)	1	/	
AA		85 (64.9%)	130 (62.5%)	1	0.855	
<i>TERC</i> <i>rs2293607</i>	Codominante	AG	41 (31.3%)	71 (34.1%)	1.132 (0.706-1.815)	0.606
		GG	5 (3.8%)	7 (3.4%)	0.915 (0.281-2.978)	0.883
		AA	85 (64.9%)	130 (62.5%)	1	/
	Dominante	AG+GG	46 (35.1%)	78 (37.5%)	1.109 (0.703-1.748)	0.657
		GG	5 (3.8%)	7 (3.4%)	0.878 (0.273-2.825)	0.827
	Recesiva	AA+AG	126 (96.2%)	201 (96.6%)	1	/

Anexos

Tabla A 17. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la actividad de la telomerasa en los grupos control y BRCA+.

	Genotipo	Controles	BRCA+	OR (IC95%)	p-valor	
<i>TERT</i> <i>rs2735940</i>	Codominante	TT	47 (35.9%)	6 (27.3%)	1	0.733
		TC	62 (47.3%)	12 (54.5%)	1.516 (0.530-4.336)	0.438
		CC	22 (16.4%)	4 (18.2%)	1.424 (0.365-5.564)	0.611
	Dominante	TT	47 (35.9%)	6 (27.3%)	1	/
		TC+CC	84 (64.1%)	16 (72.7%)	1.492 (0.547-4.072)	0.435
	Recesiva	CC	22 (16.6%)	4 (18.2%)	1.101 (0.340-3.570)	0.873
<i>TERC</i> <i>rs2293607</i>	Codominante	AA	85 (64.9%)	15 (68.2%)	1	0.998
		AG	41 (31.3%)	7 (31.8%)	0.967 (0.366-2.556)	0.947
		GG	5 (3.8%)	0 (0%)	-	0.999
	Dominante	AA	85 (64.9%)	15 (68.2%)	1	/
		AG+GG	46 (35.1%)	7 (31.8%)	0.862 (0.328-2.266)	0.764
	Recesiva	GG	5 (3.8%)	0 (0%)	-	0.999
		AA+AG	126 (96.2%)	22 (100%)	1	/

Tabla A 18. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos relacionados con la actividad de la telomerasa en los grupos HER2- y HER2+.

	Genotipo	HER2-	HER2+	OR (IC95%)	p-valor	
<i>TERT</i> <i>rs2735940</i>	Codominante	TT	44 (33.3%)	15 (32.6%)	1	0.804
		TC	65 (49.2%)	21 (45.7%)	0.948 (0.441-2.037)	0.891
		CC	23 (17.4%)	10 (21.7%)	1.275 (0.495-3.284)	0.614
	Dominante	TT	44 (33.3%)	15 (32.6%)	1	/
		TC+CC	88 (66.7%)	31 (67.4%)	1.033 (0.506-2.112)	0.928
	Recesiva	CC	23 (17.4%)	10 (21.7%)	1.316 (0.573-3.027)	0.517
<i>TERC</i> <i>rs2293607</i>	Codominante	AA	85 (64.4%)	25 (54.3%)	1	0.480
		AG	43 (32.6%)	19 (41.3%)	1.502 (0.746-3.026)	0.255
		GG	4 (3.0%)	2 (4.3%)	1.700 (0.294-9.832)	0.553
	Dominante	AA	85 (64.4%)	25 (54.3%)	1	/
		AG+GG	47 (35.6%)	21 (45.7%)	1.519 (0.769-3.001)	0.229
	Recesiva	GG	4 (3.0%)	2 (4.3%)	1.455 (0.257-8.218)	0.671
		AA+AG	128 (97.0%)	44 (95.7%)	1	/

Tabla A 19. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos relacionados con la actividad de la telomerasa en los distintos subtipos tumorales.

	Genotipo	Luminal A	Luminal B	Triple negativo	HER2	p-valor	
<i>TERT</i> <i>rs2735940</i>	Codominante	TT	37 (38.5%)	12 (36.4%)	6 (17.1%)	3 (23.1%)	0.157
		CT	43 (44.8%)	16 (48.5%)	22 (62.9%)	5 (38.5%)	
		CC	16 (16.7%)	5 (15.2%)	7 (20.0%)	5 (38.5%)	
	Dominante	TT	37 (38.5%)	12 (36.4%)	6 (17.1%)	3 (23.1%)	/
		CT+CC	59 (61,5%)	21 (63,6%)	29 (82,9%)	10 (76,1%)	0.108
	Recesiva	CC	16 (16.7%)	5 (15.2%)	7 (20.0%)	5 (38.5%)	0.270
TT+CT		80 (83,3%)	28 (84,8%)	28 (80,0%)	5 (38,5%)	/	
<i>TERC</i> <i>rs2293607</i>	Codominante	AA	61 (63.5%)	19 (57.6%)	23 (65.7%)	6 (46.2%)	0.182
		AG	34 (35.4%)	12 (36.4%)	9 (25.7%)	7 (53.8%)	
		GG	1 (1.0%)	2 (6.1%)	3 (8.6%)	0 (0.0%)	
	Dominante	AA	61 (63.5%)	19 (57.6%)	23 (65.7%)	6 (46.2%)	/
		AG+GG	35 (36,5%)	14 (42,4%)	12 (34,3%)	7 (53,8%)	0.585
	Recesiva	GG	1 (1.0%)	2 (6.1%)	3 (8.6%)	0 (0.0%)	0.129
	AA+AG	95 (99,0%)	31 (93,9%)	32 (91,4%)	13 (100,0%)	/	

Tabla A 20. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular en los grupos BRCA- y BRCA+.

	Genotipo	BRCA-	BRCA+	OR (IC95%)	p-valor
LOXL1 rs2165241	Codominante	CC 51 (24.5%)	5 (22.7%)	1	0.974
		CT 99 (47.6%)	11 (50%)	1.133 (0.374-3.438)	0.825
		TT 58 (27.9%)	6 (27.3%)	1.055 (0.304-3.665)	0.933
	Dominante	CC 51 (24.5%)	5 (22.7%)	1	/
		CT+TT 157 (75.5%)	17 (77.3%)	1.104 (0.388-3.143)	0.852
	Recesiva	TT 58 (27.9%)	6 (27.3%)	0.970 (0.362-2.600)	0.970
	CT+CC 150 (72.1%)	16 (72.7%)	1	/	
LOXL1 rs3825942	Codominante	GG 143 (68.8%)	15 (68.2%)	1	0.968
		GA 59 (28.4%)	7 (31.8%)	1.131 (0.439-2.916)	0.799
		AA 6 (2.9%)	0 (0%)	-	0.999
	Dominante	GG 143 (68.8%)	15 (68.2%)	1	/
		GA+AA 65 (31.3%)	7 (31.8%)	1.027 (0.400-2.638)	0.956
	Recesiva	AA 6 (2.9%)	0 (0%)	-	0.999
	GA+GG 202 (97.1%)	22 (100%)	1	/	

Tabla A 21. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular los grupos control y BRCA+.

	Genotipo	Control	BRCA+	OR (IC95%)	p-valor
LOXL1 rs2165241	Codominante	CC 37 (28.2%)	5 (22.7%)	1	0.655
		CT 69 (52.7%)	11 (50%)	1.180 (0.381-3.652)	0.774
		TT 25 (19.1%)	6 (27.3%)	1.776 (0.489-6.457)	0.383
	Dominante	CC 37 (28.2%)	5 (22.7%)	1	/
		CT+TT 94 (71.8%)	17 (77.3%)	1.212 (0.739-1.987)	0.593
	Recesiva	TT 25 (19.1%)	6 (27.3%)	1.672(0.592-4.718)	0.332
	CC+CT 106 (80.9%)	16 (72.7%)	1	/	
LOXL1 rs3825942	Codominante	GG 88 (67.2%)	15 (68.2%)	1	0.998
		GA 38 (29%)	7 (31.8%)	1.081 (0.408-2.864)	0.876
		AA 5 (3.8%)	0 (0%)	-	0.999
	Dominante	GG 88 (67.2%)	15 (68.2%)	1	/
		GA+AA 43 (32.8%)	7 (31.8%)	0.955 (0.363-2.515)	0.926
	Recesiva	AA 5 (3.8%)	0 (0%)	-	0.999
	GG+GA 126 (96.2%)	22 (100%)	1	/	

Tabla A 22. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular en los grupos RH- y RH+.

	Genotipo	RH-	RH+	OR (IC95%)	p-valor
LOXL1 rs2165241	Codominante	CC 8 (15.1%)	36 (25.5%)	1	0.293
		CT 30 (56.6%)	67 (47.5%)	0.496 (0.206-1.195)	0.118
		TT 15 (28.3%)	38 (27.0%)	0.563 (0.213-1.487)	0.246
	Dominante	CC 8 (15.1%)	36 (25.5%)	1	/
		CT+TT 45 (84.9%)	105 (74.5%)	0.519 (0.223-1.203)	0.126
	Recesiva	TT 15 (28.3%)	38 (27.0%)	0.935 (0.462-1.890)	0.851
	CT+CC 38 (71.7%)	103 (73.0%)	1	/	
LOXL1 rs3825942	Codominante	GG 143 (68.8%)	15 (68.2%)	1	0.998
		GA 59 (28.4%)	7 (31.8%)	0.977 (0.490-1.950)	0.948
		AA 6 (2.9%)	0 (0%)	-	0.999
	Dominante	GG 143 (68.8%)	15 (68.2%)	1	/
		GA+AA 65 (31.3%)	7 (31.8%)	1.049 (0.528-2.083)	0.891
	Recesiva	AA 6 (2.9%)	0 (0%)	-	0.999
	GA+GG 202 (97.1%)	22 (100%)	1	/	

Tabla A 23. Distribución de las frecuencias genóticas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular en los grupos HER2- y HER2+

	<i>Genotipo</i>	<i>HER2-</i>	<i>HER2+</i>	<i>OR (IC95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>LOXL1</i> <i>rs2165241</i>	Codominante	CC	31 (23.5%)	10 (21.7%)	1	0.970
		CT	67 (50.8%)	24 (52.2%)	1.110 (0.474-2.603)	0.809
		TT	35 (25.8%)	12 (26.1%)	1.094 (0.415-2.887)	0.856
	Dominante	CC	31 (23.5%)	10 (21.7%)	1	/
		CT+TT	101 (76.5%)	36 (78.3%)	1.105 (0.493-2.579)	0.809
	Recesiva	TT	34 (25.8%)	12 (26.1%)	1.017 (0.473-2.186)	0.965
CT+CC		98 (74.2%)	34 (73.9%)	1	/	
<i>LOXL1</i> <i>rs3825942</i>	Codominante	GG	90 (68.2%)	31 (67.4%)	1	0.956
		GA	40 (30.3%)	14 (30.4%)	1.016 (0.488-2.115)	0.966
		AA	2 (1.5%)	1 (2.2%)	1.452 (0.127-16.570)	0.764
	Dominante	GG	90 (68.2%)	31 (67.4%)	1	/
		GA+AA	42 (31.8%)	15 (32.6%)	1.037 (0.506-2.124)	0.921
	Recesiva	AA	2 (1.5%)	1 (2.2%)	1.444 (0.128-16.314)	0.766
GA+GG		130 (98.5%)	175 (98.3%)	1	/	

Tabla A 24. Distribución de las frecuencias genóticas de los polimorfismos en genes relacionados con la matriz extracelular en los distintos subtipos tumorales

	<i>Genotipo</i>	<i>Luminal A</i>	<i>Luminal B</i>	<i>Triple negativo</i>	<i>HER2</i>	<i>p-valor</i>	
<i>LOXL1</i> <i>rs2165241</i>	Codominante	CC	26 (27.1%)	7 (21.2%)	5 (14.3%)	3 (23.1%)	0.753
		CT	46 (47.9%)	16 (48.5%)	20 (57.1%)	8 (61.5%)	
		TT	24 (25.0%)	10 (30.3%)	10 (28.6%)	2 (15.4%)	
	Dominante	CC	26 (27.1%)	7 (21.2%)	5 (14.3%)	3 (23.1%)	/
		CT+TT	70 (72.9%)	26 (78.8%)	30 (85.7%)	10 (76.9%)	0.485
	Recesiva	TT	24 (25.0%)	10 (30.3%)	10 (28.6%)	2 (15.4%)	0.741
CT+CC		72 (75.0%)	23 (69.7%)	25 (71.4%)	11 (84.6%)	/	
<i>LOXL1</i> <i>rs3825942</i>	Codominante	GG	66 (68.8%)	22 (66.7%)	23 (65.7%)	9 (69.2%)	0.959
		GA	28 (29.2%)	10 (30.3%)	12 (34.3%)	4 (30.5%)	
		AA	2 (2.1%)	1 (3.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
	Dominante	GG	66 (68.8%)	22 (66.7%)	23 (65.7%)	9 (69.2%)	/
		GA+AA	30 (31.3%)	11 (33.3%)	12 (34.3%)	4 (30.3%)	0.986
	Recesiva	AA	2 (2.1%)	1 (3.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.737
GA+GG		94 (97.9%)	32 (97%)	35 (100%)	13 (100%)	/	

Anexos

Tabla A 25. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en controles y pacientes.

	<i>Genotipo</i>	<i>Controles</i>	<i>Pacientes</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>ATG2B</i> <i>rs3759601</i>	Codominante	CC	56 (42.7%)	110 (47.8%)	1	0.251
		CG	55 (42%)	98 (42.6%)	0.907 (0.572-1.438)	0.679
		GG	20 (15.3%)	22 (9.6%)	0.560 (0.282-1.112)	0.097
	Dominante	CC	56 (42.7%)	110 (47.8%)	1	/
		CG+GG	75 (57.3%)	120 (52.2%)	0.815 (0.529-1.255)	0.352
	Recesiva	GG	20 (15.3)	22 (9.6%)	0.587 (0.397-1.122)	0.107
		CC+CG	111 (84.7%)	208 (90.4%)	1	/
<i>ATG5</i> <i>rs2245214</i>	Codominante	CC	57 (43.5%)	90 (39.1%)	1	0.525
		CG	63 (48.1%)	113 (49.1%)	1.136 (0.722-1.787)	0.581
		GG	11 (8.4%)	27 (11.7%)	1.555 (0.716-3.376)	0.265
	Dominante	CC	57 (43.5%)	90 (39.1%)	1	/
		CG+GG	74 (56.5%)	140 (60.9%)	1.198 (0.775-1.852)	0.415
	Recesiva	GG	11 (8.4%)	27 (11.7%)	1.451 (0.695-3.031)	0.322
		CC+CG	120 (91.6%)	203 (88.3%)	1	/
<i>ATG16L1</i> <i>rs2241880</i>	Codominante	TT	34 (26%)	68 (29.6%)	1	0.171
		TC	64 (48.9%)	123 (53.5%)	0.961 (0.577-1.601)	0.878
		CC	33 (25.2%)	39 (17%)	0.591 (0.318-1.098)	0.096
	Dominante	TT	34 (26.0%)	68 (29.6%)	1	/
		TC+CC	97 (74.0%)	162 (70.4%)	0.835 (0.515-1.53)	0.464
	Recesiva	CC	33 (25.2%)	39 (17.0%)	0.606 (0.359-1.024)	0.061
		TT+TC	98 (74.8%)	191 (83.0%)	1	/
<i>ATG10</i> <i>rs1864183</i>	Codominante	CC	33 (25.2%)	75 (32.6%)	1	0.330
		CT	75 (57.3%)	117 (50.9%)	0.686 (0.416-1.134)	0.142
		TT	23 (17.6%)	38 (16.5%)	0.727 (0.376-1.407)	0.344
	Dominante	CC	33 (25.2%)	75 (32.6%)	1	/
		CT+TT	98 (74.8%)	155 (67.4%)	0.696 (0.430-1.126)	0.140
	Recesiva	TT	23 (17.6%)	38 (16.5%)	0.929 (0.526-1.642)	0.801
		CC+CT	108 (82.4%)	192 (83.5%)	1	/

Tabla A 26. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en controles y pacientes BRCA-.

	<i>Genotipo</i>	<i>Control</i>	<i>BRCA-</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
<i>ATG2B</i> <i>rs3759601</i>	Codominante	CC	56 (42.7%)	98 (47.1%)	1	0.350
		CG	55 (42.0%)	89 (42.8%)	0.925 (0.578-1.479)	0.744
		GG	20 (15.3%)	21 (10.1%)	0.600 (0.299-1.202)	0.150
	Dominante	CC	56 (42.7%)	98 (47.1%)	1	/
		CG+GG	75 (57.3%)	110 (52.9%)	0.838 (0.540-1.302)	0.432
	Recesiva	GG	20 (15.3%)	21 (10.1%)	0.623 (0.323-1.201)	0.158
		CC+CG	111 (84.7%)	187 (89.9%)	1	/
<i>ATG5</i> <i>rs2245214</i>	Codominante	CC	57 (43.5%)	84 (40.4%)	1	0.828
		CG	63 (48.1%)	104 (50%)	1.120 (0.708-1.773)	0.628
		GG	11 (8.4%)	20 (9.6%)	1.234 (0.549-2.771)	0.611
	Dominante	CC	57 (43.5%)	84 (40.4%)	1	/
		CG+GG	74 (56.5%)	124 (59.6%)	1.137 (0.730-1.770)	0.570
	Recesiva	GG	11 (8.4%)	20 (9.6%)	1.161 (0.537-2.508)	0.705
		CC+CG	120 (91.6%)	188 (90.4%)	1	/
<i>ATG16L1</i> <i>rs2241880</i>	Codominante	TT	34 (26.0%)	60 (28.8%)	1	0.217
		TC	64 (48.9%)	112 (53.8%)	0.992 (0.589-1.670)	0.975
		CC	33 (25.2%)	36 (17.3%)	0.618 (0.328-1.164)	0.136
	Dominante	TT	34 (26.0%)	60 (28.8%)	1	/
		TC+CC	97 (74.0%)	148 (71.2%)	0.865 (0.528-1.415)	0.563
	Recesiva	CC	33 (25.2%)	36 (17.3%)	0.622 (0.365-1.060)	0.081
		TT+TC	98 (74.8%)	172 (82.7%)	1	/
<i>ATG10</i> <i>rs1864183</i>	Codominante	CC	33 (25.2%)	68 (32.7%)	1	0.315
		CT	75 (57.3%)	104 (50.0%)	0.673 (0.404-1.122)	0.129
		TT	23 (17.6%)	36 (17.3%)	0.760 (0.389-1.482)	0.142
	Dominante	CC	33 (25.2%)	68 (32.7%)	1	/
		CT+TT	98 (74.8%)	140 (67.3%)	0.693 (0.425-1.131)	0.934
	Recesiva	TT	23 (17.6%)	36 (17.3%)	0.983 (0.553-1.748)	0.953
		CC+CT	108 (82.4%)	172 (82.7%)	1	/

Anexos

Tabla A 27. Distribución de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la ruta de autofagia en los grupos RH- y RH+.

	<i>Genotipo</i>	<i>RH-</i>	<i>RH+</i>	<i>OR (IC 95%)</i>	<i>p-valor</i>	
ATG2B rs3759601	Codominante	CC	24 (45.3%)	68 (48.2%)	1	0.174
		CG	21 (39.6%)	64 (45.4%)	1.076 (0.546-2.119)	0.833
	Dominante	GG	8 (15.1%)	9 (6.4%)	0.397 (0.138-1.146)	0.088
		CC	24 (45.3%)	68 (48.2%)	1	/
	Recesiva	CG+GG	29 (54.7%)	73 (51.8%)	0.888 (0.471-1.674)	0.714
		GG	8 (15.1%)	9 (6.4%)	0.384 (0.140-1.054)	0.063
	CC+CG	45 (84.9%)	132 (93.6%)	1	/	
ATG5 rs2245214	Codominante	CC	21 (39.6%)	53 (37.6%)	1	0.656
		CG	23 (43.4%)	70 (49.6%)	1.206 (0.604-2.406)	0.595
	Dominante	GG	9 (17%)	18 (12.8%)	0.792 (0.308-2.042)	0.630
		CC	21 (39.6%)	53 (37.6%)	1	/
	Recesiva	CG+GG	32 (60.4%)	88 (62.4%)	1.090 (0.570-2.082)	0.795
		GG	9 (17%)	18 (12.8%)	0.715 (0.299-1.710)	0.451
	CC+CG	44 (83.0%)	123 (87.2%)	1	/	
ATG16L1 rs2241880	Codominante	TT	13 (24.5%)	43 (30.5%)	1	0.411
		TC	32 (60.4%)	70 (49.6%)	0.661 (0.313-1.397)	0.279
	Dominante	CC	8 (15.1%)	28 (19.9%)	1.058 (0.389-2.880)	0.096
		TT	13 (24.5%)	43 (30.5%)	1	/
	Recesiva	TC+CC	40 (75.5%)	98 (69.5%)	0.741 (0.360-1.523)	0.415
		CC	8 (15.1%)	28 (19.9%)	1.394 (0.591-3.288)	0.448
	TT+TC	45 (84.9%)	113 (80.1%)	1	/	
ATG10 rs1864183	Codominante	CC	19 (35.8%)	45 (31.9%)	1	0.809
		CT	27 (50.9%)	73 (51.8%)	0.709 (0.570-2.286)	0.709
	Dominante	TT	7 (13.2%)	23 (16.3%)	1.387 (0.510-3.777)	0.522
		CC	19 (35.8%)	45 (31.9%)	1	/
	Recesiva	CT+TT	34 (64.2%)	96 (68.1%)	1.192 (0.614-2.315)	0.604
		TT	7 (13.2%)	23 (16.3%)	1.281 (0.515-3.189)	0.595
	CC+CT	46 (86.8%)	118 (83.7%)	1	/	

Tabla A 28. Tumores afectados con patrón de cromotripsis, grupo al que pertenecen y cromosomas afectados

Grupo	Tumor	Chr 1	Chr 6	Chr 7	Chr 8	Chr 9	Chr 15	Chr 17	Chr 20
BRCA+	31772		X			X		X	
CMF-	31813							X	
	31844						X		
	32106							X	
	34641				X				
CMF+	32104							X	
	32105							X	
	34017			X					X
	34253		X						
	34256	X							

Bibliografía

1. Bray, F., Ren, J.-S., Masuyer, E. & Ferlay, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int. J. Cancer* **132**, 1133–1145 (2013).
2. WHO | Breast cancer: prevention and control. WHO Available at: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. (Accessed: 11th October 2016)
3. Las Cifras del Cáncer en España 2016. (SEOM, 2016)
4. Azim, H. A. & Azim, H. Breast cancer arising at a young age: Do we need to define a cut-off? *The Breast* **22**, 1007–1008 (2013).
5. Breast Cancer in Women Under 40 | Cancer Network. (2009). Available at: <http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/breast-cancer-women-under-40>. (Accessed: 25th January 2017)
6. Anders, C. K., Johnson, R., Litton, J., Phillips, M. & Bleyer, A. Breast Cancer Before Age 40 Years. *Semin. Oncol.* **36**, 237–249 (2009).
7. Assi, H. A. *et al.* Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *J. Thorac. Dis.* **5**, S2–S8 (2013).
8. Global cancer statistics - Jemal - 2011 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.20107/abstract>. (Accessed: 15th October 2016)
9. Pollán, M. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res. Treat.* **123**, 3–6 (2010).
10. Brenner, D. R. *et al.* Breast cancer survival among young women: a review of the role of modifiable lifestyle factors. *Cancer Causes Control* **27**, 459–472 (2016).
11. Bharat, A., Aft, R. L., Gao, F. & Margenthaler, J. A. Patient and tumor characteristics associated with increased mortality in young women (≤ 40 years) with breast cancer. *J. Surg. Oncol.* **100**, 248–251 (2009).
12. Gnerlich, J. L. *et al.* Elevated Breast Cancer Mortality in Young Women (<40 Years) Compared with Older Women Is Attributed to Poorer Survival in Early Stage Disease. *J. Am. Coll. Surg.* **208**, 341–347 (2009).
13. Anders, C. K. *et al.* Young Age at Diagnosis Correlates With Worse Prognosis and Defines a Subset of Breast Cancers With Shared Patterns of Gene Expression. *J. Clin. Oncol.* **26**, 3324–3330 (2008).
14. Danforth Jr, D. N. Disparities in breast cancer outcomes between Caucasian and African American women: a model for describing the relationship of biological and nonbiological factors. *Breast Cancer Res.* **15**, 208 (2013).
15. DeSantis, C. E. *et al.* Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 31–42 (2016).
16. Lalloo, F. & Evans, D. G. Familial Breast Cancer. *Clin. Genet.* **82**, 105–114 (2012).
17. Turnbull, C. & Hodgson, S. Genetic predisposition to cancer. *Clin. Med.* **5**, 491–498 (2005).
18. Llort, G. *et al.* SEOM clinical guidelines in Hereditary Breast and ovarian cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **17**, 956–961 (2015).
19. Dumitrescu, R. G. & Cotarla, I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 208–221 (2005).
20. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies - The Lancet Oncology. Available at: [http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(12\)70425-4/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(12)70425-4/abstract). (Accessed: 16th October 2016)
21. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group *et al.* Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol.* **14**, 1009–1019 (2013).
22. Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P. & Starostawska, E. Breast cancer risk factors. *Przegląd Menopauzalny Menopause Rev.* **14**, 196–202 (2015).
23. Bassuk, S. S. & Manson, J. E. Oral Contraceptives and Menopausal Hormone Therapy: Relative and Attributable Risks of Cardiovascular Disease, Cancer, and Other Health Outcomes. *Ann. Epidemiol.* **25**, 193–200 (2015).
24. Al-Sader, H., Abdul-Jabar, H., Allawi, Z. & Haba, Y. Alcohol and Breast Cancer: The Mechanisms Explained. *J. Clin. Med. Res.* **1**, 125–131 (2009).

25. Chen, W. Y., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A. & Willett, W. C. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *Jama* **306**, 1884–1890 (2011).
26. Matthews, S. B. & Thompson, H. J. The Obesity-Breast Cancer Conundrum: An Analysis of the Issues. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 989 (2016).
27. Miki, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66–71 (1994).
28. Smith, S. A. *et al.* Localisation of the breast-ovarian cancer susceptibility gene (BRCA1) on 17q12–21 to an interval of \leq 1cM. *Genes. Chromosomes Cancer* **10**, 71–76 (1994).
29. Wooster, R. *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12–13. *Science* **265**, 2088–2090 (1994).
30. Chen, S. & Parmigiani, G. Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 Penetrance. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25**, 1329–1333 (2007).
31. Lee, H.-B. & Han, W. Unique Features of Young Age Breast Cancer and Its Management. *J. Breast Cancer* **17**, 301–307 (2014).
32. Medicine, C. C. J. of. Managing patients at genetic risk of breast cancer : Cleveland Clinic Journal of Medicine. Available at: http://www.ccm.org/past-issues/past-issue-single-view/managing-patients-at-genetic-risk-of-breast-cancer/51c47b1416177250760ee05baa6036f5.html?tx_ttnews%5BViewItem%5D=1. (Accessed: 6th December 2016)
33. Dossus, L. & Benusiglio, P. R. Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Res. BCR* **17**, (2015).
34. Melhem-Bertrandt, A. *et al.* Young Onset HER2 Positive Breast Cancer is Associated with Germline TP53 Mutations. *Cancer* **118**, 908–913 (2012).
35. Oldenburg, R. A., Meijers-Heijboer, H., Cornelisse, C. J. & Devilee, P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **63**, 125–149 (2007).
36. Tsou, H. C. *et al.* The role of MMAC1 mutations in early-onset breast cancer: causative in association with Cowden syndrome and excluded in BRCA1-negative cases. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 1036–1043 (1997).
37. Pradella, L. M. *et al.* A novel deleterious PTEN mutation in a patient with early-onset bilateral breast cancer. *BMC Cancer* **14**, 70 (2014).
38. Fitzgerald, R. C. *et al.* Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J. Med. Genet.* **47**, 436–444 (2010).
39. Tomas, C. Update on imaging of Peutz-Jeghers syndrome. *World J. Gastroenterol.* **20**, 10864 (2014).
40. King-Spohn, K. & Pilarski, R. Beyond BRCA1 and BRCA2. *Curr. Probl. Cancer* **38**, 235–248 (2014).
41. Sapkota, Y. Germline DNA Variations in Breast Cancer Predisposition and Prognosis: A Systematic Review of the Literature. *Cytogenet. Genome Res.* **144**, 77–91 (2014).
42. Hoeijmakers, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366–374 (2001).
43. Lee, J., Ledermann, J. A. & Kohn, E. C. PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Ann. Oncol.* **25**, 32–40 (2014).
44. Conde, J. *et al.* Association of common variants in mismatch repair genes and breast cancer susceptibility: a multigene study. *BMC Cancer* **9**, 344 (2009).
45. Sehl, M. E. *et al.* Associations between Single Nucleotide Polymorphisms in Double-Stranded DNA Repair Pathway Genes and Familial Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 2192–2203 (2009).
46. Kumar, A., Purohit, S. & Sharma, N. K. Aberrant DNA Double-strand Break Repair Threads in Breast Carcinoma: Orchestrating Genomic Insult Survival. *J. Cancer Prev.* **21**, 227–234 (2016).
47. Cornejo-Moreno, B. A., Uribe-Escamilla, D. & Salamanca-Gómez, F. Breast cancer genes: looking for BRCA's lost brother. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* **16**, 787–792 (2014).
48. Venkitaraman, A. R. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**, 171–182 (2002).
49. Paul, A. & Paul, S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **19**, 605–618 (2014).
50. Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 68–78 (2011).

51. Fradet-Turcotte, A., Sitz, J., Grapton, D. & Orthwein, A. BRCA2 functions: from DNA repair to replication fork stabilization. *Endocr. Relat. Cancer* **23**, T1–T17 (2016).
52. Shrivastav, M., De Haro, L. P. & Nickoloff, J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* **18**, 134–147 (2008).
53. Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. & Zhao, X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5795–5818 (2012).
54. Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W. & Jasin, M. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2 and associated proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
55. Sung, P. & Klein, H. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 739–750 (2006).
56. Gudmundsdottir, K. & Ashworth, A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* **25**, 5864–5874 (2006).
57. Walsh, C. S. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *Gynecol. Oncol.* **137**, 343–350 (2015).
58. Oktay, K., Turan, V., Titus, S., Stobezki, R. & Liu, L. BRCA Mutations, DNA Repair Deficiency, and Ovarian Aging. *Biol. Reprod.* **93**, (2015).
59. Cox, D. G. *et al.* Common variants of the BRCA1 wild-type allele modify the risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 4732–4747 (2011).
60. Dunning, A. M. *et al.* Common BRCA1 Variants and Susceptibility to Breast and Ovarian Cancer in the General Population. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 285–289 (1997).
61. Durocher, F. *et al.* Comparison of BRCA1 Polymorphisms, Rare Sequence Variants and/or Missense Mutations in Unaffected and Breast/Ovarian Cancer Populations. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 835–842 (1996).
62. Janezic, S. A. *et al.* Germline BRCA1 Alterations in a Population-Based Series of Ovarian Cancer Cases. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 889–897 (1999).
63. Tommasi, S. *et al.* Molecular and in silico analysis of BRCA1 and BRCA2 variants. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **644**, 64–70 (2008).
64. Lee, E. *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 Res.* **10**, R19 (2008).
65. Wójcicka, A. *et al.* Variants in the ATM-CHEK2-BRCA1 Axis Determine Genetic Predisposition and Clinical Presentation of Papillary Thyroid Carcinoma. *Genes. Chromosomes Cancer* **53**, 516–523 (2014).
66. Ricks-Santi, L. J. *et al.* BRCA1 polymorphisms and breast cancer epidemiology in the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) study. *Genet. Epidemiol.* **37**, 504–511 (2013).
67. Cox, D. G., Kraft, P., Hankinson, S. E. & Hunter, D. J. Haplotype analysis of common variants in the BRCA1 gene and risk of sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **7**, R171 (2004).
68. Qin, T. *et al.* Association between BRCA1 rs799917 polymorphism and breast cancer risk: A meta-analysis of 19,878 subjects. *Biomed. Pharmacother.* **68**, 905–910 (2014).
69. Wang, K., Xu, L., Pan, L., Xu, K. & Li, G. The functional BRCA1 rs799917 genetic polymorphism is associated with gastric cancer risk in a Chinese Han population. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **36**, 393–397 (2015).
70. Zhang, X. *et al.* A functional BRCA1 coding sequence genetic variant contributes to risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* **34**, 2309–2313 (2013).
71. Silva, F. C. C. da, Valentin, M. D., Ferreira, F. de O., Carraro, D. M. & Rossi, B. M. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. *Sao Paulo Med. J.* **127**, 46–51 (2009).
72. Peltomäki, P. Update on Lynch syndrome genomics. *Fam. Cancer* **15**, 385–393 (2016).
73. Modrich, P. & Lahue, R. Mismatch Repair in Replication Fidelity, Genetic Recombination, and Cancer Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 101–133 (1996).
74. Jiricny, J. MutL α : At the Cutting Edge of Mismatch Repair. *Cell* **126**, 239–241 (2006).
75. Fukui, K. DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria. *J. Nucleic Acids* **2010**, e260512 (2010).
76. Kadyrov, F. A., Dzantiev, L., Constantin, N. & Modrich, P. Endonucleolytic Function of MutL α in Human Mismatch Repair. *Cell* **126**, 297–308 (2006).
77. Muro, Y., Sugiura, K., Mimori, T. & Akiyama, M. DNA mismatch repair enzymes: Genetic defects and autoimmunity. *Clin. Chim. Acta* **442**, 102–109 (2015).

78. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004763740800064X>. (Accessed: 28th December 2016)
79. Li, G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* **18**, 85–98 (2008).
80. Steinke, V. *et al.* Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)/Lynch Syndrome. *Dtsch. Ärztebl. Int.* **110**, 32–38 (2013).
81. Win, A. K., Lindor, N. M. & Jenkins, M. A. Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review. *Breast Cancer Res. BCR* **15**, R27 (2013).
82. McCullough, L. E. *et al.* Polymorphisms in DNA Repair Genes, Recreational Physical Activity and Breast Cancer Risk. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **134**, 654–663 (2014).
83. Feng, I. J. & Radivoyevitch, T. SNP-SNP interactions between dNTP supply enzymes and mismatch DNA repair in breast cancer. *Proc. Ohio Collab. Conf. Bioinforma. OCCBIO Ohio Collab. Conf. Bioinforma.* **2009**, 123–128 (2009).
84. Kappil, M., Terry, M. B., Delgado-Cruzata, L., Liao, Y. & Santella, R. M. Mismatch Repair Polymorphisms as Markers of Breast Cancer Prevalence in the Breast Cancer Family Registry. *Anticancer Res.* **36**, 4437–4441 (2016).
85. Ito, E. *et al.* A Core Promoter and a Frequent Single-Nucleotide Polymorphism of the Mismatch Repair Gene MLH1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 488–494 (1999).
86. Arita, M., Zhong, X., Min, Z., Hemmi, H. & Shimatake, H. Multiple sites required for expression in 5'-flanking region of the hMLH1 gene. *Gene* **306**, 57–65 (2003).
87. Mei, M. *et al.* The MLH1 -93 promoter variant influences gene expression. *Cancer Epidemiol.* **34**, 93–95 (2010).
88. Whiffin, N. *et al.* MLH1-93G > A is a risk factor for MSI colorectal cancer. *Carcinogenesis* **32**, 1157–1161 (2011).
89. Shih, C.-M., Chen, C.-Y., Lee, I.-H., Kao, W.-T. & Wang, Y.-C. A polymorphism in the hMLH1 gene (-93G>A) associated with lung cancer susceptibility and prognosis. *Int. J. Mol. Med.* **25**, 165–170 (2010).
90. Niu, L., Li, S., Liang, H. & Li, H. The hMLH1 -93G>A Polymorphism and Risk of Ovarian Cancer in the Chinese Population. *PLoS ONE* **10**, (2015).
91. Zhu, H. *et al.* Polymorphisms in mismatch repair genes are associated with risk and microsatellite instability of gastric cancer, and interact with life exposures. *Gene* **579**, 52–57 (2016).
92. Lin, L.-H. *et al.* The hMLH1 -93G>A Promoter Polymorphism is Associates with Outcomes in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Ann. Surg. Oncol.* **21**, 4270–4277 (2014).
93. Ghoussaini, M. & Pharoah, P. D. Polygenic susceptibility to breast cancer: current state-of-the-art. *Future Oncol. Lond. Engl.* **5**, 689–701 (2009).
94. Fanale, D. *et al.* Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers. *Oncogene* **31**, 2121–2128 (2012).
95. Helsten, T., Schwaederle, M. & Kurzrock, R. Fibroblast growth factor receptor signaling in hereditary and neoplastic disease: biologic and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev.* **34**, 479–496 (2015).
96. Moffa, A. B. & Ethier, S. P. Differential signal transduction of alternatively spliced FGFR2 variants expressed in human mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* **210**, 720–731 (2007).
97. Garcia-Closas, M. & Chanock, S. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor (ER) status. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **14**, 8000–8009 (2008).
98. Hunter, D. J. *et al.* A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat. Genet.* **39**, 870–874 (2007).
99. Easton, D. F. *et al.* Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447**, 1087–1093 (2007).
100. Antoniou, A. C. *et al.* Common Breast Cancer-Predisposition Alleles Are Associated with Breast Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 937–948 (2008).
101. Zhang, Y. *et al.* Association between FGFR2 (rs2981582, rs2420946 and rs2981578) polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Oncotarget* **5**, (2016).
102. Rebbeck, T. R. *et al.* Hormone-dependent effects of FGFR2 and MAP3K1 in breast cancer susceptibility in a population-based sample of post-menopausal African-American and European-American women. *Carcinogenesis* **30**, 269–274 (2009).

103. Broeks, A. *et al.* Low penetrance breast cancer susceptibility loci are associated with specific breast tumor subtypes: findings from the Breast Cancer Association Consortium. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3289–3303 (2011).
104. Fernandes, G. C., Michelli, R. A. D., Scapulatempo-Neto, C. & Palmero, E. I. Association of polymorphisms with a family history of cancer and the presence of germline mutations in the BRCA1/BRCA2 genes. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **14**, (2016).
105. Liang, H. *et al.* Heterogeneity of Breast Cancer Associations with Common Genetic Variants in FGFR2 according to the Intrinsic Subtypes in Southern Han Chinese Women. *BioMed Res. Int.* **2015**, (2015).
106. Garcia-Closas, M. *et al.* Heterogeneity of Breast Cancer Associations with Five Susceptibility Loci by Clinical and Pathological Characteristics. *PLoS Genet.* **4**, (2008).
107. O'Brien, K. M. *et al.* Breast cancer subtypes and previously established genetic risk factors: A Bayesian approach. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **23**, 84–97 (2014).
108. Andersen, S. W. *et al.* Breast cancer susceptibility loci in association with age at menarche, age at natural menopause and the reproductive lifespan. *Cancer Epidemiol.* **38**, 62–65 (2014).
109. Fu, F. *et al.* Polymorphisms in second intron of the FGFR2 gene are associated with the risk of early-onset breast cancer in Chinese Han women. *Tohoku J. Exp. Med.* **226**, 221–229 (2012).
110. Liu, C.-L. *et al.* Case-Control Study on the Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Gene Polymorphisms Associated with Breast Cancer in Chinese Han Women. *J. Breast Cancer* **16**, 366–371 (2013).
111. Zhang, K., Zhang, Y., Liu, C., Xiong, Y. & Zhang, J. MicroRNAs in the diagnosis and prognosis of breast cancer and their therapeutic potential (Review). *Int. J. Oncol.* **45**, 950–958 (2014).
112. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950312/>. (Accessed: 10th January 2017)
113. Song, F.-J. & Chen, K.-X. Single-nucleotide polymorphisms among microRNA: big effects on cancer. *Chin. J. Cancer* **30**, 381–391 (2011).
114. Shen, J. *et al.* A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* **29**, 1963–1966 (2008).
115. Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3377076/>. (Accessed: 10th January 2017)
116. Xie, W.-Q., Tan, S.-Y. & Wang, X.-F. MiR-146a rs2910164 polymorphism increases risk of gastric cancer: A meta-analysis. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 15440 (2014).
117. Jazdzewski, K. *et al.* Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7269 (2008).
118. Chen, J., Cao, X. & Zhang, H. MiR-146a rs2910164 polymorphism is associated with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 15852 (2015).
119. Zhou, B. *et al.* Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs and risk of cervical squamous cell carcinoma. *Mol. Carcinog.* **50**, 499–505 (2011).
120. Chae, Y. S. *et al.* A miR-146a Polymorphism (rs2910164) Predicts Risk of and Survival from Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* **33**, 3233–3239 (2013).
121. 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* **31**, 2124–2126 (2010).
122. Dai, Z.-J. *et al.* Five common functional polymorphisms in microRNAs (rs2910164, rs2292832, rs11614913, rs3746444, rs895819) and the susceptibility to breast cancer: evidence from 8361 cancer cases and 8504 controls. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 1455–1463 (2015).
123. Chen, Q.-H., Wang, Q.-B. & Zhang, B. Ethnicity modifies the association between functional microRNA polymorphisms and breast cancer risk: a HuGE meta-analysis. *Tumor Biol.* **35**, 529–543 (2014).
124. Garcia, A. I. *et al.* The rs2910164:G>C SNP in the MIR146A gene is not associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Hum. Mutat.* **32**, 1004–1007 (2011).
125. Zhang, H. *et al.* Association between three functional microRNA polymorphisms (miR-499 rs3746444, miR-196a rs11614913 and miR-146a rs2910164) and breast cancer risk: a meta-analysis. *Oncotarget* **5**, (2016).

126. Upadhyaya, A. *et al.* Association of the microRNA-Single Nucleotide Polymorphism rs2910164 in miR146a with sporadic breast cancer susceptibility: A case control study. *Gene* **576**, 256–260 (2016).
127. Ling, H. *et al.* Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics. *Oncogene* **34**, 5003–5011 (2015).
128. Grisanzio, C. & Freedman, M. L. Chromosome 8q24–Associated Cancers and MYC. *Genes Cancer* **1**, 555–559 (2010).
129. Huppi, K., Pitt, J. J., Wahlberg, B. M. & Caplen, N. J. The 8q24 Gene Desert: An Oasis of Non-Coding Transcriptional Activity. *Front. Genet.* **3**, (2012).
130. Goode, E. L. *et al.* A Genome-Wide Association Study Identifies Susceptibility Loci for Ovarian Cancer at 2q31 and 8q24. *Nat. Genet.* **42**, 874–879 (2010).
131. Wang, M. *et al.* Cumulative effect of genome-wide association study-identified genetic variants for bladder cancer. *Int. J. Cancer* **135**, 2653–2660 (2014).
132. Zhang, Z. *et al.* Frequent Mutation of rs13281615 and Its Association with PVT1 Expression and Cell Proliferation in Breast Cancer. *J. Genet. Genomics* **41**, 187–195 (2014).
133. Zhang, Y. *et al.* Association between 8q24 (rs13281615 and rs6983267) polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 117,355 subjects. *Oncotarget* **7**, 68002–68011 (2016).
134. Campa, D. *et al.* Interactions Between Genetic Variants and Breast Cancer Risk Factors in the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 1252–1263 (2011).
135. Reeves, G. K. *et al.* Incidence of Breast Cancer and Its Subtypes in Relation to Individual and Multiple Low-Penetrance Genetic Susceptibility Loci. *JAMA* **304**, 426–434 (2010).
136. Mulligan, A. M. *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 Res. BCR* **13**, R110 (2011).
137. Antoniou, A. C. *et al.* Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Res.* **70**, 9742–9754 (2010).
138. Keller, B. M. *et al.* Associations between breast density and a panel of single nucleotide polymorphisms linked to breast cancer risk: a cohort study with digital mammography. *BMC Cancer* **15**, (2015).
139. Bertucci, F. *et al.* 8q24 Cancer Risk Allele Associated with Major Metastatic Risk in Inflammatory Breast Cancer. *PLoS ONE* **7**, (2012).
140. Kim, M. P., Zhang, Y. & Lozano, G. Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Front. Oncol.* **5**, (2015).
141. Fuster, J. J., Sanz-González, S. M., Moll, U. M. & Andrés, V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol. Med.* **13**, 192–199 (2007).
142. Vousden, K. H. & Prives, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**, 413–431 (2009).
143. Herrero, A. B., Rojas, E. A., Misiewicz-Krzeminska, I., Krzeminski, P. & Gutiérrez, N. C. Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
144. Hainaut, P. & Pfeifer, G. P. Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026179 (2016).
145. Matlashewski, G. J. *et al.* Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 961–963 (1987).
146. Siddique, M. & Sabapathy, K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene* **25**, 3489–3500 (2006).
147. Dumont, P., Leu, J. I.-J., Della Pietra, A. C., George, D. L. & Murphy, M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* **33**, 357–365 (2003).
148. Gonçalves, M. L. *et al.* Association of the TP53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *SpringerPlus* **3**, (2014).
149. Huang, X.-E. *et al.* Association of p53 codon Arg72Pro and p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 genetic polymorphisms with the risk of Japanese breast cancer. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* **10**, 307–311 (2003).

150. Proestling, K. *et al.* The Pro Allele of the p53 Codon 72 Polymorphism Is Associated with Decreased Intratumoral Expression of BAX and p21, and Increased Breast Cancer Risk. *PLoS ONE* **7**, (2012).
151. Zhang, Z. *et al.* P53 codon 72 polymorphism contributes to breast cancer risk: a meta-analysis based on 39 case-control studies. *Breast Cancer Res. Treat.* **120**, 509–517 (2010).
152. Buyru, N., Tigli, H. & Dalay, N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol. Rep.* **10**, 711–714 (2003).
153. Dahabreh, I. J. *et al.* Genotype Misclassification in Genetic Association Studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) Polymorphism: A Systematic Review of Studies of Breast, Lung, Colorectal, Ovarian, and Endometrial Cancer. *Am. J. Epidemiol.* **177**, 1317–1325 (2013).
154. HOU, J., JIANG, Y., TANG, W. & JIA, S. p53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk: A meta-analysis. *Exp. Ther. Med.* **5**, 1397–1402 (2013).
155. Consortium, T. B. C. A. Commonly Studied Single-Nucleotide Polymorphisms and Breast Cancer: Results From the Breast Cancer Association Consortium. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 1382–1396 (2006).
156. Schmidt, M. K. *et al.* Do MDM2 SNP309 and TP53 R72P Interact in Breast Cancer Susceptibility? A Large Pooled Series from the Breast Cancer Association Consortium. *Cancer Res.* **67**, 9584–9590 (2007).
157. Cheng, H. *et al.* Individual and combined effects of MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro on breast cancer risk: an updated meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 9265–9274 (2012).
158. Tommiska, J. *et al.* Breast Cancer Patients with p53 Pro72 Homozygous Genotype Have a Poorer Survival. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5098–5103 (2005).
159. Sinilnikova, O. M. *et al.* The TP53 Arg72Pro and MDM2 309G>T polymorphisms are not associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br. J. Cancer* **101**, 1456–1460 (2009).
160. Osorio, A. *et al.* An evaluation of the polymorphisms Ins16bp and Arg72Pro in p53 as breast cancer risk modifiers in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br. J. Cancer* **99**, 974–977 (2008).
161. Vecchi, G. D. *et al.* The p53 Arg72Pro and Ins16bp polymorphisms and their haplotypes are not associated with breast cancer risk in BRCA-mutation negative familial cases. *Cancer Detect. Prev.* **32**, 140–143 (2008).
162. Toyama, T. *et al.* Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **9**, R34 (2007).
163. Chang-Claude, J. *et al.* Genetic polymorphisms in DNA repair and damage response genes and late normal tissue complications of radiotherapy for breast cancer. *Br. J. Cancer* **100**, 1680–1686 (2009).
164. Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. & Levine, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237–1245 (1992).
165. Wasylshen, A. R. & Lozano, G. Attenuating the p53 Pathway in Human Cancers: Many Means to the Same End. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026211 (2016).
166. Brady, C. A. & Attardi, L. D. p53 at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 2527–2532 (2010).
167. Brown, C. J., Lain, S., Verma, C. S., Fersht, A. R. & Lane, D. P. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 862–873 (2009).
168. Elizabeth Rayburn, R. Z. MDM2 and Human Malignancies: Expression, Clinical Pathology, Prognostic Markers, and Implications for Chemotherapy. <http://www.eurekaselect.com> Available at: <http://www.eurekaselect.com/60801/article>. (Accessed: 14th January 2017)
169. Pietsch, E. C., Humbey, O. & Murphy, M. E. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene* **25**, 1602–1611 (2006).
170. Ruijs, M. W. G. *et al.* The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 110–114 (2006).
171. Bond, G. L. *et al.* A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans. *Cell* **119**, 591–602 (2004).
172. Knappskog, S. & Lønning, P. E. MDM2 promoter SNP285 and SNP309; phylogeny and impact on cancer risk. *Oncotarget* **2**, 251–258 (2011).
173. Gansmo, L. B. *et al.* Influence of MDM2 SNP309 and SNP285 status on the risk of cancer in the breast, prostate, lung and colon. *Int. J. Cancer* **137**, 96–103 (2015).
174. Zhao, E., Cui, D., Yuan, L. & Lu, W. MDM2 SNP309 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 3471–3477 (2012).

175. Leu, J.-D. *et al.* Involvement of p53 R72P polymorphism in the association of MDM2-SNP309 with breast cancer. *Oncol. Rep.* **25**, 1755–1763 (2011).
176. Sun, Y.-F., Leu, J.-D., Chen, S.-M., Lin, I.-F. & Lee, Y.-J. Results based on 124 cases of breast cancer and 97 controls from Taiwan suggest that the single nucleotide polymorphism (SNP309) in the MDM2 gene promoter is associated with earlier onset and increased risk of breast cancer. *BMC Cancer* **9**, 13 (2009).
177. Samuel, N. *et al.* Assessment of TP53 Polymorphisms and MDM2 SNP309 in Pre-Menopausal Breast Cancer Risk. *Hum. Mutat.* (2016). doi:10.1002/humu.23154
178. Nechushtan, H. *et al.* Effects of the single nucleotide polymorphism at MDM2 309 on breast cancer patients with/without BRCA1/2 mutations. *BMC Cancer* **9**, 60 (2009).
179. Chrisanthar, R. *et al.* Predictive and Prognostic Impact of TP53 Mutations and MDM2 Promoter Genotype in Primary Breast Cancer Patients Treated with Epirubicin or Paclitaxel. *PLoS ONE* **6**, (2011).
180. Boersma, B. J. *et al.* Association of Breast Cancer Outcome With Status of p53 and MDM2 SNP309. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 911–919 (2006).
181. Broek, A. J. van den *et al.* Association of the germline TP53 R72P and MDM2 SNP309 variants with breast cancer survival in specific breast tumor subgroups. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**, 599–608 (2011).
182. Lång, A., Palmebäck Wegman, P. & Wingren, S. The significance of MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro in young women with breast cancer. *Oncol. Rep.* **22**, 575–579 (2009).
183. Cox, D. G. *et al.* The p53 Arg72Pro and MDM2 -309 polymorphisms and risk of breast cancer in the nurses' health studies. *Cancer Causes Control* **18**, 621–625 (2007).
184. Blasco, M. A. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 611–622 (2005).
185. Mirabello, L. *et al.* The association of telomere length and genetic variation in telomere biology genes. *Hum. Mutat.* **31**, 1050–1058 (2010).
186. Aubert, G. & Lansdorp, P. M. Telomeres and Aging. *Physiol. Rev.* **88**, 557–579 (2008).
187. Lin, J. *et al.* Analyses and comparisons of telomerase activity and telomere length in human T and B cells: Insights for epidemiology of telomere maintenance. *J. Immunol. Methods* **352**, 71–80 (2010).
188. Wojtyła, A., Gladych, M. & Rubis, B. Human telomerase activity regulation. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 3339–3349 (2011).
189. Ma, H. *et al.* Shortened Telomere Length Is Associated with Increased Risk of Cancer: A Meta-Analysis. *PLOS ONE* **6**, e20466 (2011).
190. Artandi, S. E. & DePinho, R. A. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 9–18 (2010).
191. Herbert, B.-S., Wright, W. E. & Shay, J. W. Telomerase and breast cancer. *Breast Cancer Res.* **3**, 146–149 (2001).
192. Mocellin, S. *et al.* Telomerase Reverse Transcriptase Locus Polymorphisms and Cancer Risk: A Field Synopsis and Meta-Analysis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 840–854 (2012).
193. Rubis, B. *et al.* Telomerase downregulation induces proapoptotic genes expression and initializes breast cancer cells apoptosis followed by DNA fragmentation in a cell type dependent manner. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 4995–5004 (2013).
194. Pellatt, A. J. *et al.* Telomere length, telomere-related genes, and breast cancer risk: The breast cancer health disparities study. *Genes. Chromosomes Cancer* **52**, 595–609 (2013).
195. Bojesen, S. E. *et al.* Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer. *Nat. Genet.* **45**, 371–384e2 (2013).
196. Shen, J. *et al.* Genetic polymorphisms in telomere pathway genes, telomere length, and breast cancer survival. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 393–400 (2012).
197. Li, Z.-Y., Dong, Y.-L., Feng, Y., Zhang, Z. & Cao, X.-Z. Polymorphisms in the telomerase reverse transcriptase promoter are associated with risk of breast cancer: A meta-analysis. *J. Cancer Res. Ther.* **12**, 1040–1044 (2016).
198. Savage, S. A. *et al.* Genetic variation in five genes important in telomere biology and risk for breast cancer. *Br. J. Cancer* **97**, 832–836 (2007).
199. Yang, H. *et al.* Telomere Reverse Transcriptase (TERT) rs2735940 Increases Cancer Risk. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **21**, 612–616 (2015).

200. Njajou, O. T. *et al.* A Common Variant in the Telomerase RNA Component Is Associated with Short Telomere Length. *PLoS ONE* **5**, (2010).
201. Jones, A. M. *et al.* TERC polymorphisms are associated both with susceptibility to colorectal cancer and with longer telomeres. *Gut* **61**, 248–254 (2012).
202. Barker, H. E., Cox, T. R. & Erler, J. T. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 540–552 (2012).
203. Wu, G. *et al.* LOXL1 and LOXL4 Are Epigenetically Silenced and Can Inhibit Ras/Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway in Human Bladder Cancer. *Cancer Res.* **67**, 4123–4129 (2007).
204. Wuest, M. *et al.* Targeting lysyl oxidase for molecular imaging in breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* **17**, (2015).
205. Erler, J. T. *et al.* Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* **440**, 1222–1226 (2006).
206. Semenza, G. L. Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Trends Mol. Med.* **18**, 534–543 (2012).
207. Oskarsson, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *The Breast* **22, Supplement 2**, S66–S72 (2013).
208. Zanon-Moreno, V. *et al.* Genetic polymorphism related to exfoliative glaucoma is also associated with primary open-angle glaucoma risk. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **43**, 26–30 (2015).
209. Anastasopoulos, E. *et al.* Association of LOXL1 Polymorphisms With Pseudoexfoliation, Glaucoma, Intraocular Pressure, and Systemic Diseases in a Greek Population. The Thessaloniki Eye Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 4238–4243 (2014).
210. Sharma, S. *et al.* Biological effect of LOXL1 coding variants associated with pseudoexfoliation syndrome. *Exp. Eye Res.* **146**, 212–223 (2016).
211. Wang, L., Yu, Y., Fu, S., Zhao, W. & Liu, P. LOXL1 Gene Polymorphism With Exfoliation Syndrome/Exfoliation Glaucoma: A Meta-Analysis. *J. Glaucoma* **25**, 62–94 (2016).
212. Álvarez, L. *et al.* LOXL1 gene variants and their association with pseudoexfoliation glaucoma (XFG) in Spanish patients. *BMC Med. Genet.* **16**, (2015).
213. Abramsson, A. *et al.* No Association of LOXL1 Gene Polymorphisms with Alzheimer’s Disease. *NeuroMolecular Med.* **13**, 160–166 (2011).
214. Sharma, S. *et al.* Biological effect of LOXL1 coding variants associated with pseudoexfoliation syndrome. *Exp. Eye Res.* **146**, 212–223 (2016).
215. Albertson, D. G. & Pinkel, D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum. Mol. Genet.* **12**, R145–R152 (2003).
216. Albertson, D. G., Collins, C., McCormick, F. & Gray, J. W. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat. Genet.* **34**, 369–376 (2003).
217. Wang, Z. C. *et al.* Loss of Heterozygosity and Its Correlation with Expression Profiles in Subclasses of Invasive Breast Cancers. *Cancer Res.* **64**, 64–71 (2004).
218. Pinkel, D. & Albertson, D. G. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat. Genet.* **37**, S11–S17 (2005).
219. Oros, K. K. *et al.* Analysis of genomic abnormalities in tumors: a review of available methods for Illumina two-color SNP genotyping and evaluation of performance. *Cancer Genet.* **206**, 103–115 (2013).
220. Shen, Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *J. Mol. Cell Biol.* **3**, 1–3 (2011).
221. Bonnet, F. *et al.* An array CGH based genomic instability index (G2I) is predictive of clinical outcome in breast cancer and reveals a subset of tumors without lymph node involvement but with poor prognosis. *BMC Med. Genomics* **5**, 54 (2012).
222. Fridlyand, J. *et al.* Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* **6**, 96 (2006).
223. Birkbak, N. J. *et al.* Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA damaging agents. *Cancer Discov.* **2**, 366–375 (2012).
224. Hicks, J. *et al.* Novel patterns of genome rearrangement and their association with survival in breast cancer. *Genome Res.* **16**, 1465–1479 (2006).
225. Stephens, P. J. *et al.* Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* **144**, 27–40 (2011).

226. Forment, J. V., Kaidi, A. & Jackson, S. P. Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 663–670 (2012).
227. Rode, A., Maass, K. K., Willmund, K. V., Lichter, P. & Ernst, A. Chromothripsis in cancer cells: An update. *Int. J. Cancer* **138**, 2322–2333 (2016).
228. Wyatt, A. W. & Collins, C. C. In Brief: Chromothripsis and cancer. *J. Pathol.* **231**, 1–3 (2013).
229. Garraway, L. A. & Lander, E. S. Lessons from the Cancer Genome. *Cell* **153**, 17–37 (2013).
230. Korbel, J. O. & Campbell, P. J. Criteria for Inference of Chromothripsis in Cancer Genomes. *Cell* **152**, 1226–1236 (2013).
231. Cai, H. *et al.* Chromothripsis-like patterns are recurring but heterogeneously distributed features in a survey of 22,347 cancer genome screens. *BMC Genomics* **15**, 82 (2014).
232. Przybytkowski, E. *et al.* Chromosome-breakage genomic instability and chromothripsis in breast cancer. *BMC Genomics* **15**, (2014).
233. Chen, H. *et al.* Genome-wide copy number aberrations and HER2 and FGFR1 alterations in primary breast cancer by molecular inversion probe microarray. *Oncotarget* **8**, 10845–10857 (2017).
234. Yang, J. *et al.* CTLPScanner: a web server for chromothripsis-like pattern detection. *Nucleic Acids Res.* **44**, W252–W258 (2016).
235. Beroukhi, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899–905 (2010).
236. Nadal, R. *et al.* Combined analysis of copy number alterations by single-nucleotide polymorphism array and MYC status in non-metastatic breast cancer patients: comparison according to the circulating tumor cell status. *Tumor Biol.* **36**, 711–718 (2015).
237. Alvarez, C. *et al.* Different Array CGH profiles within hereditary breast cancer tumors associated to BRCA1 expression and overall survival. *BMC Cancer* **16**, (2016).
238. Lee, H. J. *et al.* Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer. *Br. J. Cancer* **112**, 103–111 (2015).
239. Jönsson, G. *et al.* Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics. *Breast Cancer Res.* **12**, R42 (2010).
240. Melchor, L. *et al.* Distinct genomic aberration patterns are found in familial breast cancer associated with different immunohistochemical subtypes. *Oncogene* **27**, 3165–3175 (2007).
241. Melchor, L. *et al.* Comprehensive characterization of the DNA amplification at 13q34 in human breast cancer reveals TFDP1 and CUL4A as likely candidate target genes. *Breast Cancer Res. BCR* **11**, R86 (2009).
242. Wessels, L. F. A. *et al.* Molecular Classification of Breast Carcinomas by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Res.* **62**, 7110–7117 (2002).
243. Gronwald, J. *et al.* Comparison of genomic abnormalities between BRCA1 and sporadic breast cancers studied by comparative genomic hybridization. *Int. J. Cancer* **114**, 230–236 (2005).
244. Maguire, P. *et al.* CGH analysis of familial non-BRCA1/BRCA2 breast tumors and mutation screening of a candidate locus on chromosome 17q11.2-12. *Int. J. Mol. Med.* **16**, 135–141 (2005).
245. Weber-Mangal, S. *et al.* Breast cancer in young women (≤ 35 years): Genomic aberrations detected by comparative genomic hybridization. *Int. J. Cancer* **107**, 583–592 (2003).
246. Ching, H. C., Naidu, R., Seong, M. K., Har, Y. C. & Taib, N. A. M. Integrated analysis of copy number and loss of heterozygosity in primary breast carcinomas using high-density SNP array. *Int. J. Oncol.* **39**, 621–633 (2011).
247. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* **221**, 3–12 (2010).
248. Gu, Y. *et al.* Autophagy-related prognostic signature for breast cancer. *Mol. Carcinog.* **55**, 292–299 (2016).
249. Rosenfeldt, M. T. & Ryan, K. M. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* **32**, 955–963 (2011).
250. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).
251. Pyo, J. O., Nah, J. & Jung, Y. K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp. Mol. Med.* **44**, 73–80 (2012).
252. Chen, Y. & Klionsky, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* **124**, 161–170 (2011).

253. Hale, A. N., Ledbetter, D. J., Gawriluk, T. R. & Rucker, III, E. B. Autophagy. *Autophagy* **9**, 951–972 (2013).
254. Munson, M. J. & Ganley, I. G. MTOR, PIK3C3, and autophagy: Signaling the beginning from the end. *Autophagy* **11**, 2375–2376 (2015).
255. Lai, K., Killingsworth, M. C. & Lee, C. S. Gene of the month: PIK3CA. *J. Clin. Pathol.* **68**, 253–257 (2015).
256. Vicencio, J. M. *et al.* The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ.* **16**, 1006–1017 (2009).
257. Mizushima, N., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* **27**, 421–429 (2002).
258. Zhou, Y., Rucker, E. B. & Zhou, B. P. Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **48**, 60–74 (2016).
259. Chen, S. *et al.* The Residual Tumor Autophagy Marker LC3B Serves as a Prognostic Marker in Local Advanced Breast Cancer after Neoadjuvant Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **19**, 6853–6862 (2013).
260. Tanaka, Y. *et al.* Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **406**, 902–906 (2000).
261. Jäger, S. *et al.* Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* **117**, 4837–4848 (2004).
262. Bento, C. F. *et al.* Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu. Rev. Biochem.* (2016). doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014556
263. Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G. & Gao, F.-B. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol. CB* **17**, 1561–1567 (2007).
264. Liu, J. & Debnath, J. The Evolving, Multifaceted Roles of Autophagy in Cancer. *Adv. Cancer Res.* **130**, 1–53 (2016).
265. Cheng, Y., Ren, X., Hait, W. N. & Yang, J.-M. Therapeutic Targeting of Autophagy in Disease: Biology and Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **65**, 1162–1197 (2013).
266. Decuypere, J.-P., Parys, J. B. & Bultynck, G. Regulation of the autophagic bcl-2/beclin 1 interaction. *Cells* **1**, 284–312 (2012).
267. Proikas-Cezanne, T. & Codogno, P. Beclin 1 or not Beclin 1... *Autophagy* **7**, 671–672 (2011).
268. Won, K. Y., Kim, G. Y., Kim, Y. W., Song, J. Y. & Lim, S.-J. Clinicopathologic correlation of beclin-1 and bcl-2 expression in human breast cancer. *Hum. Pathol.* **41**, 107–112 (2010).
269. Qu, X. *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* **112**, 1809–1820 (2003).
270. Laddha, S. V., Ganesan, S., Chan, C. S. & White, E. Mutational Landscape of the Essential Autophagy Gene BECN1 in Human Cancers. *Mol. Cancer Res. MCR* **12**, 485–490 (2014).
271. Debnath, J. The Multifaceted Roles of Autophagy In Tumors--Implications For Breast Cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **16**, 173–187 (2011).
272. Breast Cancer Metastasis Suppressor 1 Up-regulates miR-146, Which Suppresses Breast Cancer Metastasis | Cancer Research. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/4/1279>. (Accessed: 9th January 2017)
273. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 107–132 (2011).
274. Velikkakath, A. K. G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N. & Mizushima, N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* **23**, 896–909 (2012).
275. Buffen, K. *et al.* Autophagy Controls BCG-Induced Trained Immunity and the Response to Intravesical BCG Therapy for Bladder Cancer. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
276. Usategui-Martín, R. *et al.* Polymorphisms in autophagy genes are associated with paget disease of bone. *PLoS One* **10**, e0128984 (2015).
277. Songane, M. *et al.* Polymorphisms in autophagy genes and susceptibility to tuberculosis. *PLoS One* **7**, e41618 (2012).
278. Plantinga, T. S. *et al.* Role of genetic variants of autophagy genes in susceptibility for non-medullary thyroid cancer and patients outcome. *PLoS One* **9**, e94086 (2014).
279. Bhattacharya, A. & Eissa, N. T. Autophagy and autoimmunity crosstalks. *Front. Immunol.* **4**, 88 (2013).

280. White, K. A. M. *et al.* Variants in autophagy-related genes and clinical characteristics in melanoma: a population-based study. *Cancer Med.* **5**, 3336–3345 (2016).
281. Mizushima, N. *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395–398 (1998).
282. Qin, Z. *et al.* Potentially functional polymorphisms in ATG10 are associated with risk of breast cancer in a Chinese population. *Gene* **527**, 491–495 (2013).
283. Salem, M., Nielsen, O. H., Nys, K., Yazdanyar, S. & Seidelin, J. B. Impact of T300A Variant of ATG16L1 on Antibacterial Response, Risk of Culture Positive Infections, and Clinical Course of Crohn's Disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **6**, e122 (2015).
284. Murthy, A. *et al.* A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* **506**, 456–462 (2014).
285. Salem, M., Ammitzboell, M., Nys, K., Seidelin, J. B. & Nielsen, O. H. ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy* **11**, 585–594 (2015).
286. Burada, F. *et al.* ATG16L1 T300A Polymorphism is Correlated with Gastric Cancer Susceptibility. *Pathol. Oncol. Res. POR* **22**, 317–322 (2016).
287. Li, Q. *et al.* The Thr300Ala variant of ATG16L1 is associated with decreased risk of brain metastasis in patients with non-small cell lung cancer. *Autophagy* **0**, 1–11 (2017).
288. Grimm, W. A. *et al.* The Thr300Ala variant in ATG16L1 is associated with improved survival in human colorectal cancer and enhanced production of type I interferon. *Gut* **65**, 456–464 (2016).
289. Nagelkerke, A., Bussink, J., Geurts-Moespot, A., Sweep, F. C. G. J. & Span, P. N. Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part II: pharmacological modulation of treatment-induced autophagy. *Semin. Cancer Biol.* **31**, 99–105 (2015).
290. Sui, X. *et al.* Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* **4**, e838 (2013).
291. Antitumor and antimetastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332210001174>. (Accessed: 27th January 2017)
292. Maycotte, P. & Thorburn, A. Targeting autophagy in breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 224–240 (2014).
293. Carey, L. A. *et al.* Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* **295**, 2492–2502 (2006).
294. Yost, S. E. *et al.* Identification of high-confidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens. *Nucleic Acids Res.* **40**, e107–e107 (2012).
295. Kumar, D., Panigrahi, M. K., Suryavanshi, M., Mehta, A. & Saikia, K. K. Quantification of DNA Extracted from Formalin Fixed Paraffin-Embedded Tissue Comparison of Three Techniques: Effect on PCR Efficiency. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **10**, BC01-BC03 (2016).
296. Ganguly, A. An update on conformation sensitive gel electrophoresis. *Hum. Mutat.* **19**, 334–342 (2002).
297. Tuefferd, M. *et al.* Genome-wide copy number alterations detection in fresh frozen and matched FFPE samples using SNP 6.0 arrays. *Genes. Chromosomes Cancer* **47**, 957–964 (2008).
298. Nilsen, G. *et al.* Copynumber: Efficient algorithms for single- and multi-track copy number segmentation. *BMC Genomics* **13**, 591 (2012).
299. Mermel, C. H. *et al.* GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol.* **12**, R41 (2011).
300. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
301. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
302. Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R. & Moreno, V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* **22**, 1928–1929 (2006).
303. Vincent-Salomon, A. *et al.* Genomic Instability: A Stronger Prognostic Marker Than Proliferation for Early Stage Luminal Breast Carcinomas. *PLoS ONE* **8**, (2013).
304. Vollan, H. K. M. *et al.* A tumor DNA complex aberration index is an independent predictor of survival in breast and ovarian cancer. *Mol. Oncol.* **9**, 115–127 (2015).

305. Hamilton, R. Original Research: Being Young, Female, and Brca Positive. *Ajn Am. J. Nurs.* **112**, 26–31 (2012).
306. Rosenberg, S. M. *et al.* BRCA1 and BRCA2 Mutation Testing in Young Women With Breast Cancer. *JAMA Oncol.* **2**, 730–736 (2016).
307. Smith, T. R. *et al.* Genetic polymorphisms of multiple DNA repair pathways impact age at diagnosis and TP53 mutations in breast cancer. *Carcinogenesis* **32**, 1354–1360 (2011).
308. Nicoloso, M. S. *et al.* SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS INSIDE microRNA TARGET SITES INFLUENCE TUMOR SUSCEPTIBILITY. *Cancer Res.* **70**, 2789–2798 (2010).
309. Martínez-Urueña, N. *et al.* Incidence of –93 MLH1 promoter polymorphism in familial and sporadic colorectal cancer. *Colorectal Dis.* **15**, e118–e123 (2013).
310. Campbell, T. M. *et al.* FGFR2 risk SNPs confer breast cancer risk by augmenting oestrogen responsiveness. *Carcinogenesis* **37**, 741–750 (2016).
311. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. Available at: <http://carcin.oxfordjournals.org/content/29/10/1963.long>. (Accessed: 10th January 2017)
312. Ethnicity modifies the association between functional microRNA polymorphisms and breast cancer risk: a HuGE meta-analysis | SpringerLink. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13277-013-1074-7>. (Accessed: 10th January 2017)
313. Association of the microRNA-Single Nucleotide Polymorphism rs2910164 in miR146a with sporadic breast cancer susceptibility: A case control study. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111915012275>. (Accessed: 11th January 2017)
314. Francisco, G., Menezes, P. R., Eluf-Neto, J. & Chammas, R. Arg72Pro TP53 polymorphism and cancer susceptibility: A comprehensive meta-analysis of 302 case-control studies. *Int. J. Cancer* **129**, 920–930 (2011).
315. Matsubara, Y. *et al.* Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 128–131 (2006).
316. O’Sullivan, R. J. & Karlseder, J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 171–181 (2010).
317. Artandi, S. E. & DePinho, R. A. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 39–46 (2000).
318. Daniel, M., Peek, G. W. & Tollefsbol, T. O. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* **498**, 135–146 (2012).
319. Haiman, C. A. *et al.* A common variant at the TERT-CLPTM1L locus is associated with estrogen receptor–negative breast cancer. *Nat. Genet.* **43**, 1210–1214 (2011).
320. Stevens, K. N., Vachon, C. M. & Couch, F. J. Genetic Susceptibility to Triple Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* **73**, 2025–2030 (2013).
321. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
322. Sørlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8418–8423 (2003).
323. Ho, C. C., Mun, K. S. & Naidu, R. SNP array technology: an array of hope in breast cancer research. *Malays. J. Pathol.* **35**, 33–43 (2013).
324. Dang, T. P. Notch, Apoptosis and Cancer. in *Notch Signaling in Embryology and Cancer* (eds. Reichrath, J. & Reichrath, S.) 199–209 (Springer US, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-0899-4_15
325. Lobry, C., Oh, P. & Aifantis, I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it’s NOTCH what you think. *J. Exp. Med.* **208**, 1931–1935 (2011).
326. Xu, J. *et al.* Prognostic values of Notch receptors in breast cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **37**, 1871–1877 (2016).
327. Zarubin, T., Jing, Q., New, L. & Han, J. Identification of eight genes that are potentially involved in tamoxifen sensitivity in breast cancer cells. *Cell Res.* **15**, 439–446 (2005).
328. Veeraraghavan, J., Ma, J., Hu, Y. & Wang, X.-S. Recurrent and pathological gene fusions in breast cancer: current advances in genomic discovery and clinical implications. *Breast Cancer Res. Treat.* **158**, 219–232 (2016).
329. Espinoza, I. & Miele, L. Notch Inhibitors for Cancer Treatment. *Pharmacol. Ther.* **139**, 95–110 (2013).

330. Quinlan, K. G. R., Verger, A., Yaswen, P. & Crossley, M. Amplification of zinc finger gene 217 (ZNF217) and cancer: When good fingers go bad. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1775**, 333–340 (2007).
331. Krig, S. R. *et al.* ZNF217, a candidate breast cancer oncogene amplified at 20q13, regulates expression of the ErbB3 receptor tyrosine kinase in breast cancer cells. *Oncogene* **29**, 5500–5510 (2010).
332. Cohen, P. A., Donini, C. F., Nguyen, N. T., Lincet, H. & Vendrell, J. A. The dark side of ZNF217, a key regulator of tumorigenesis with powerful biomarker value. *Oncotarget* **6**, 41566–41581 (2015).
333. Bellanger, A. *et al.* The critical role of the ZNF217 oncogene in promoting breast cancer metastasis to the bone. *J. Pathol.* **242**, 73–89 (2017).
334. Zhang, M.-Z. *et al.* TGIF Governs a Feed-Forward Network That Empowers Wnt Signaling to Drive Mammary Tumorigenesis. *Cancer Cell* **27**, 547–560 (2015).
335. Razzaque, M. S. & Atfi, A. TGIF function in oncogenic Wnt signaling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1865**, 101–104 (2016).
336. Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192–1205 (2012).
337. Zhang, J., Zhang, F. & Niu, R. Functions of Shp2 in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 2075–2083 (2015).
338. Pierga, J.-Y. *et al.* Microarray-based comparative genomic hybridisation of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 341–351 (2007).
339. Johannsdottir, H. K. *et al.* Deletions on Chromosome 4 in Sporadic and BRCA Mutated Tumors and Association with Pathological Variables. *Anticancer Res.* **24**, 2681–2688 (2004).
340. Al-Reefy, S., Osman, H., Jiang, W. & Mokbel, K. Evidence for a pro-apoptotic function of RACK1 in human breast cancer. *Oncogene* **29**, 5651–5651 (2010).
341. Gorlov, I. P. *et al.* Seizure 6-Like (SEZ6L) Gene and Risk for Lung Cancer. *Cancer Res.* **67**, 8406–8411 (2007).
342. Boulding, T. *et al.* Differential Roles for DUSP Family Members in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell Regulation in Breast Cancer. *PLoS ONE* **11**, (2016).
343. Lukusa, T. & Fryns, J. P. Human chromosome fragility. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 3–16 (2008).
344. Miller, B. J., Wang, D., Krahe, R. & Wright, F. A. Pooled Analysis of Loss of Heterozygosity in Breast Cancer: a Genome Scan Provides Comparative Evidence for Multiple Tumor Suppressors and Identifies Novel Candidate Regions. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 748–767 (2003).
345. Melchor, L. *et al.* Estrogen Receptor Status Could Modulate the Genomic Pattern in Familial and Sporadic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 7305–7313 (2007).
346. Turner, N. *et al.* Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene* **29**, 2013–2023 (2010).
347. Arsuaga, J., Borrman, T., Cavalcante, R., Gonzalez, G. & Park, C. Identification of Copy Number Aberrations in Breast Cancer Subtypes Using Persistence Topology. *Microarrays* **4**, 339–369 (2015).
348. Inwald, E. C. *et al.* Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 539–552 (2013).
349. Ormenisan, C. *et al.* The potential of ki67 and p53 assessment in development of individualized targeted therapy in breast cancer patients. *Pathologica* **107**, 177–180 (2015).
350. Rashid-Kolvear, F., Pintilie, M. & Done, S. J. Telomere Length on Chromosome 17q Shortens More than Global Telomere Length in the Development of Breast Cancer. *Neoplasia N. Y. N* **9**, 265–270 (2007).
351. Skuja, E. *et al.* Chromothripsis and progression-free survival in metastatic colorectal cancer. *Mol. Clin. Oncol.* **6**, 182–186 (2017).
352. McDermott, D. H. *et al.* Chromothriptic Cure of WHIM Syndrome. *Cell* **160**, 686–699 (2015).
353. Parhizgar, A. R. & Tahghighi, A. Introducing New Antimalarial Analogues of Chloroquine and Amodiaquine: A Narrative Review. *Iran. J. Med. Sci.* **42**, 115–128 (2017).
354. Zhang, Y., Liao, Z., Zhang, L. & Xiao, H. The utility of chloroquine in cancer therapy. *Curr. Med. Res. Opin.* **31**, 1009–1013 (2015).
355. Pascolo, S. Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. *Eur. J. Pharmacol.* **771**, 139–144 (2016).
356. Towers, C. G. & Thorburn, A. Therapeutic Targeting of Autophagy. *EBioMedicine* **14**, 15–23 (2016).

357. Jiang, P. *et al.* Cell growth inhibition, G2/M cell cycle arrest, and apoptosis induced by chloroquine in human breast cancer cell line Bcap-37. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **22**, 431–440 (2008).
358. HU, T. *et al.* Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.* **35**, 43–49 (2016).
359. Lefort, S. *et al.* Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy* **10**, 2122–2142 (2015).
360. Dong, M. *et al.* Low expression of Beclin 1 and elevated expression of HIF-1 α refine distant metastasis risk and predict poor prognosis of ER-positive, HER2-negative breast cancer. *Med. Oncol.* **30**, 355 (2013).
361. Jung, G. *et al.* Autophagic Markers BECLIN 1 and LC3 are Associated with Prognosis of Multiple Myeloma. *Acta Haematol.* **134**, 17–24 (2015).
362. Wang, J. *et al.* Aberrant Expression of Beclin-1 and LC3 Correlates with Poor Prognosis of Human Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE* **8**, e69038 (2013).
363. Lee, Y. J. & Jang, B. K. The Role of Autophagy in Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 26629–26643 (2015).
364. KATAGIRI, H. *et al.* Loss of autophagy-related protein Beclin 1 may define poor prognosis in ovarian clear cell carcinomas. *Int. J. Oncol.* **47**, 2037–2044 (2015).
365. Komatsu, M. & Ichimura, Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1374–1378 (2010).
366. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor - Katsuragi - 2015 - The FEBS Journal - Wiley Online Library. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.13540/full>. (Accessed: 1st June 2017)
367. Liu, D. *et al.* Autophagy regulates the survival of cells with chromosomal instability. *Oncotarget* **7**, 63913–63923 (2016).
368. Vessoni, A. T., Filippi-Chiela, E. C., Menck, C. F. & Lenz, G. Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ.* **20**, 1444–1454 (2013).
369. Maycotte, P. *et al.* Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy* **8**, 200–212 (2012).
370. Tang, M. K. S. *et al.* BRCA1 deficiency induces protective autophagy to mitigate stress and provides a mechanism for BRCA1 haploinsufficiency in tumorigenesis. *Cancer Lett.* **346**, 139–147 (2014).