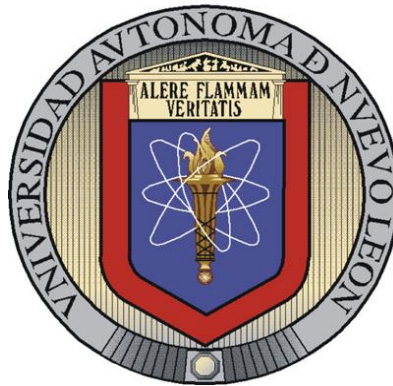


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS

IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES DE LÍNEA GERMINAL EN GENES

ASOCIADOS AL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

Por

QFB Erick Pereira Zavala

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Enero, 2014

Identificación de mutaciones de línea germinal en genes asociados al cáncer de mama hereditario.

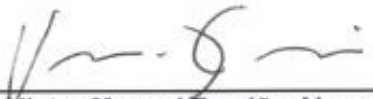
Aprobación de Tesis:



Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña
Director de Tesis



Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez
Co-Directora de Tesis



Dr. C. Víctor Manuel Treviño Alvarado
Miembro de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

Dónde se realizó el trabajo

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Biotecnología Médica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León así como en el Beckman Research Institute of City of Hope, Duarte, California, EUA.

Agradecimientos

A Dios por permitirme alcanzar este logro.

A mis padres por todo el apoyo brindado durante la maestría.

Al CONACYT por la beca otorgada.

Al Dr. Hugo Barrera por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por su insistencia en llevar al límite el esfuerzo para ser siempre mejor en todo.

A la Dra. Lourdes Garza por su apoyo, amistad y la confianza para realizar el trabajo.

A Mariel Oyervides y Daniela Monsiváis, fue un gusto haber trabajado con ustedes.

Un especial agradecimiento al Dr. Jeffrey N. Weitzel por aceptarme en su laboratorio en City of Hope.

A Josef Herzog que fue mi tutor y a Danielle Castillo que me apoyó en el laboratorio.

A Daniel Sumarriva por estar al pendiente de mí en todo momento durante la estancia en City of Hope.

A las pacientes que desinteresadamente aportaron muestras para esta investigación.

A todas aquellas personas que contribuyeron de alguna u otra forma a la realización de este estudio.

Colaboraciones

El trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Jeffrey N. Weitzel y su equipo de trabajo del Clinical Cancer Genetics, Department of Population Sciences, Beckman Research Institute, Comprehensive Cancer Center of City of Hope, Duarte, California, EUA en City of Hope, Duarte, California, EUA.

Tabla de contenido

Lista de figuras.....	VI
Lista de cuadros.....	VII
Abreviaturas.....	VIII
Resumen.....	IX
CAPITULO I.....	1
Introducción.....	1
1.1 Epidemiología del cáncer de mama.....	1
1.2 Factores de riesgo.....	2
1.3 Tipos de cáncer de mama.....	4
1.3.1 Principales genes de susceptibilidad al CMH: <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	5
1.3.2 Funciones de los genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	6
1.3.3 Análisis molecular.....	8
1.3.4 Penetrancia.....	11
1.3.5 Otros genes de susceptibilidad.....	13
1.4 Prevención.....	16
1.5 El proceso del asesoramiento genético en cáncer.....	16
1.6 Estudios genéticos.....	18
1.7 Estudios en población Hispana y en México.....	21
1.7.1 Hispanel.....	24
CAPITULO II.....	27
2. Objetivos.....	27
2.1 Objetivo General.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
CAPITULO III.....	28
3. Materiales y métodos.....	28
3.1 Sujetos de estudio.....	28
3.2 Extracción de ADN.....	28
3.2.1 Cuantificación y determinación de la calidad del ADN.....	29

3.3 Detección de mutaciones	29
3.3.1 Detección de la mutación <i>BRCA1</i> ex9-12del	29
3.3.2 Genotipificación con HISPANEL	30
3.4 Validación por secuenciación Sanger	34
CAPÍTULO IV	36
4. Resultados	36
4.1 Sujetos de Estudio	36
4.2 Extracción de ADN	38
4.2.1 Cuantificación y determinación de la calidad del ADN	39
4.3 Detección de mutaciones	42
4.3.1 Detección de la mutación <i>BRCA1</i> ex9-12del	43
4.3.2 Genotipificación con HISPANEL	44
4.4 Validación por secuenciación Sanger	44
CAPÍTULO V	46
5. Discusión	46
CAPÍTULO VI	51
6. Conclusiones	51
Referencias	52

Figura 1. Incidencia de tumor maligno de mama en mujeres de 20 años y más, por entidad federativa en 2011.	3
Figura 2. Estructura de BRCA1 y BRCA2, y las regiones de interacción con otras proteínas.....	6
Figura 3. Principales interacciones de las proteínas BRCA1 y BRCA2 en la reparación del ADN y tumorigénesis.....	11
Figura 4. Gel de Agarosa al 0.8% para evaluar la integridad de las muestras de ADN.....	39
Figura 5. Detección de la mutación <i>BRCA1</i> ex9-12del por PCR punto final.....	44

Lista de cuadros

Cuadro 1. Otros genes asociados al cáncer de mama hereditario.....	15
Cuadro 2. Diferencia en masa entre los terminadores iPLEX (masa en Daltons)	25
Cuadro 3. Lista de las 114 mutaciones que componen el HISPANEL	34
Cuadro 4. Características de las pacientes.....	37
Cuadro 5. Análisis descriptivo.....	38
Cuadro 6. Concentraciones de ADN en un volumen de 50 μ L y relaciones de absorbancia para la evaluación de la calidad	42
Cuadro 7. Mutaciones detectadas.....	43

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
µg	Microgramos
ng	Nanogramos
µL	Microlitros
Abs	Absorbancia
260/280	Relación de absorbancia 260 nanómetros entre 280 nanómetros
<i>BRCA1</i>	Gen de susceptibilidad al cáncer de mama 1
<i>BRCA2</i>	Gen de susceptibilidad al cáncer de mama 2

Identificación de mutaciones de línea germinal en genes asociados al cáncer de mama hereditario

Resumen

Introducción. La detección de mutaciones de línea germinal en los genes *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes con cáncer de mama e historial familiar de la enfermedad, es de gran importancia para un diagnóstico y tratamientos más oportunos. En 2012 Villarreal-Garza y col. diseñaron un panel para rastrear mutaciones frecuentes en población hispana (HISPANEL) y se realizó el tamizaje en 97 pacientes con cáncer de mama y antecedentes familiares, provenientes de la Ciudad de México. Reportaron una frecuencia de mutaciones del 11%, correspondiendo un tercio de ellas a la delección de los exones 9 al 12 en el gen *BRCA1*, reportada anteriormente como mutación fundadora para población mexicana. Para aplicar el panel al diagnóstico oportuno en la región NE de México es necesario conocer la frecuencia de mutaciones que abarca dicho panel en las mujeres afectadas.

Material y métodos. Con el ADN recuperado de sangre periférica de 81 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y antecedentes familiares de ésta enfermedad así como también de 13 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama antes de los 35 años sin antecedentes familiares, oriundos del NE de México, se probó el HISPANEL para rastrear 114 mutaciones. La detección de variaciones nucleotídicas se realizó en una plataforma de espectrometría de masas (Sequenom), así como mediante un ensayo de PCR con 3 primers que alinean en los puntos de ruptura del ADN para detectar el rearrreglo genómico que consta de la referida delección de los exones 9 al 12 (abarca 15.4 kpb) del gen *BRCA1*.

Resultados. 9 (11.1%) pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama presentaron mutaciones, padeciendo el 88.8% de ellas de sobrepeso y obesidad. De las pacientes que resultaron positivas en el rastreo de las mutaciones, 8 (88.8%) presentaron mutación en el gen *BRCA1* y una (11.1%) en el gen *BRCA2*. La delección multicitada en el gen *BRCA1* fue encontrada en una (11.1%) paciente, asimismo las mutaciones *BRCA1* 185delAG, *BRCA1* 943ins10, *BRCA1* 330A>G (R71G) y *BRCA2* 3492insT fueron detectadas cada una en una paciente, mientras que la mutación *BRCA1* 2552delC se presentó en 4 (44.4%) sujetos. 6 (75%) de las mutaciones encontradas en *BRCA1* involucran al exón 11, mientras que la única mutación detectada en *BRCA2* se encuentra en el exón 11. A excepción de la delección de los exones 9 al 12 en el que se pierde el dominio de unión al ADN, todas las mutaciones detectadas originan una proteína truncada. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al asociar la presencia de las mutaciones con la condición triple negativo de los tumores ($p=0.002$), así como con la edad de inicio de la enfermedad ($p<0.0001$), confirmando que presentar la mutación origina un tipo de enfermedad más agresivo y de inicio más temprano.

Conclusiones. Los resultados concuerdan con otros estudios en que el gen *BRCA1* se encuentra mutado con mayor frecuencia respecto al gen *BRCA2*. Ninguna paciente sin historial familiar de cáncer de mama tenía la condición de triple negativo ni se encontraron mutaciones en ellas. El rastreo de mutaciones debe ser considerado fundamental en personas con historial familiar de cáncer de mama, particularmente en aquellas con tumores triples negativos y de aparición temprana, además se probó por primera vez la utilidad del HISPANEL para ensayos en población del NE de México, sugiriendo que la detección de mutaciones en el exón 11 de ambos genes puede ser un primer enfoque para apoyar el diagnóstico temprano.

CAPÍTULO I

1. Introducción

1.1 Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es actualmente la segunda neoplasia maligna con mayor incidencia en mujeres a nivel mundial particularmente en los países en vías de desarrollo, donde la mayoría de los casos son diagnosticados en estadios tardíos de la enfermedad y por consecuencia las tasas de mortalidad son mayores respecto a los países desarrollados[1,2,3,4]. El CM abarca el 25% de todos los cánceres que afectan a las mujeres. En el 2012 se registraron 1.677 millones de nuevos casos y 522 mil muertes a causa del CM en el planeta y según la OMS a partir del 2020 se registrarán cada año 20 millones de casos nuevos de CM en el mundo. A pesar de que del 65% al 70% de los cánceres de mama afectan a mujeres de 50 años o más, miles de mujeres cada vez aun más jóvenes son diagnosticadas cada año con alguna patología mamaria maligna[5,6,7].

En Europa las tasas de mortalidad por CM han disminuido alrededor del 19% desde finales de los años ochenta[8,9,10]. Globalmente, la mayoría de los descensos en cuanto a la mortalidad han ocurrido en países occidentales con elevada participación en programas nacionales de cribado del CM iniciados a

principios de la década de los 90. Estos han adoptado y facilitado de forma rápida el acceso a nuevos tratamientos, y además han reestructurado sus servicios médicos en unidades multidisciplinarias que atienden un elevado volumen de casos[11].

La Secretaría de Salud (SS) de México reportó en 2011 una incidencia promedio nacional de 23.70 por cada 100, 000 mujeres de 20 años y más, con una tasa de mortalidad de 14.05 por cada 100,000 observándose que las entidades federativas con mayor desarrollo económico registran mayores tasas de incidencia[12] (Figura 1).

1.2 Factores de riesgo

Dentro de los factores de riesgo que predisponen a padecer CM se enlistan las siguientes características[13,14,15,16,17,18]:

a) Factores de riesgo reproductivos

- Primera menstruación a edad muy temprana (<11 años).
- Menopausia tardía (>50 años).
- Tener un hijo a edad avanzada (>30 años).
- Nuliparidad.
- No haber amamantado.
- Uso prolongado de la terapia de reemplazo hormonal.

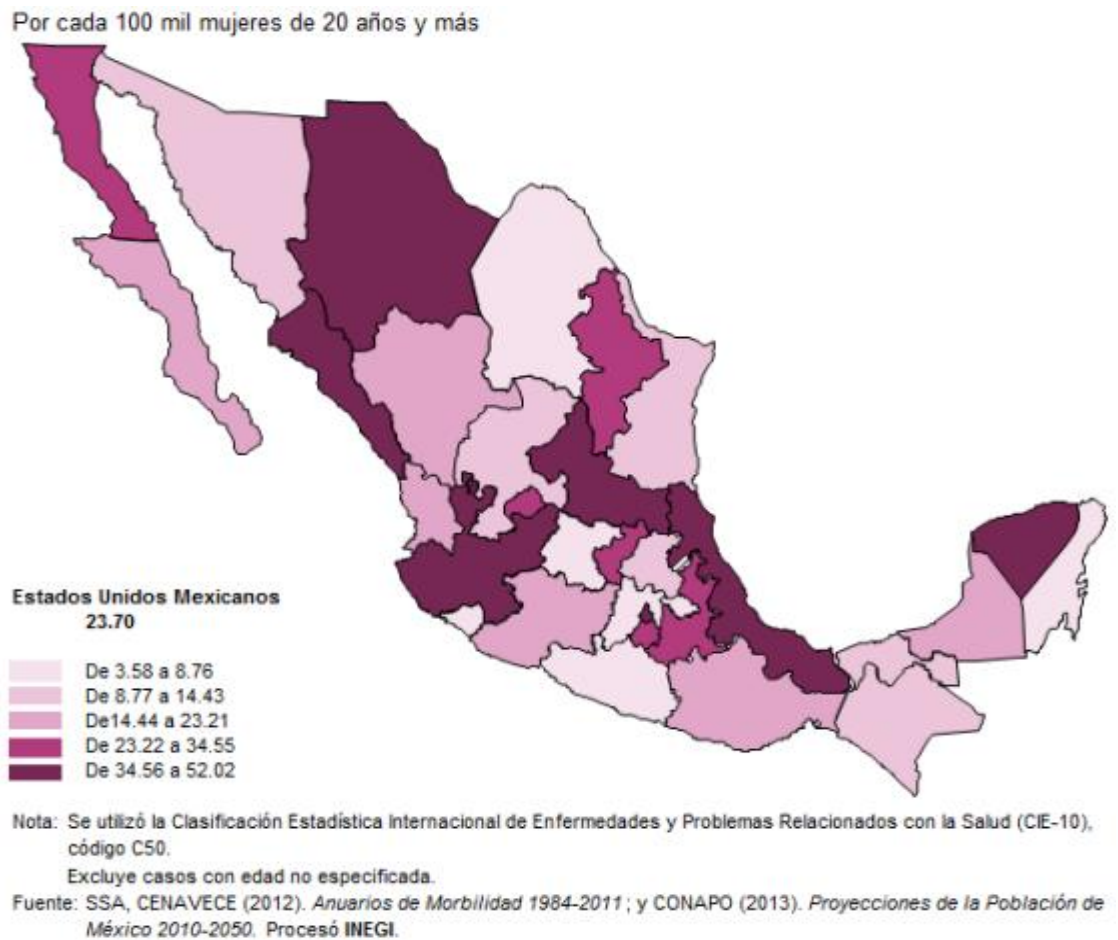


Figura 1. Incidencia de tumor maligno de mama en mujeres de 20 años y más, por entidad federativa en 2011.

b) Otros factores de riesgo

- Envejecimiento.
- Tener antecedentes familiares de CM o de otras enfermedades no cancerosas
- Haber recibido algún tipo de radioterapia en el pecho o en la

mama.

- Densidad de la mama determinada por mamografía (más grande de lo normal).
- Sobrepeso y obesidad.
- Consumo de bebidas alcoholicas.
- No hacer ejercicio regularmente.

1.3 Tipos de cáncer de mama

De acuerdo a las características de su presentación se puede clasificar en tres grandes grupos[19,20]: El CM Esporádico (CME), el cual abarca el mayor porcentaje de los casos reportados (50-65%) presentes en casos únicos dentro de una familia. El CM Familiar (CMF) es aquel que se presenta con una probabilidad y frecuencia (10-30%) mayores que el CME donde los factores ambientales y genéticos juegan un papel importante; y por último, el CM hereditario (CMH) que con una frecuencia del 5 al 10% es aquel en el que el componente genético es el más importante y relacionado principalmente con mutaciones en los genes de susceptibilidad *BRCA1* (Breast Cancer Susceptibility Gene 1) y *BRCA2* (Breast Cancer Susceptibility Gene 2). Afecta a un número mayor de individuos dentro de una familia presentándose en la mayoría a una edad temprana (< 40 años)[21].

1.3.1 Principales genes de susceptibilidad al CMH: *BRCA1* y *BRCA2*

El análisis de ligamiento de familias con múltiples casos de CM y Cáncer de Ovario (CO) permitió identificar en 1990 la primera región cromosómica (17q21) candidata a contener un gen de alto riesgo en CMH. En 1994, mediante clonación posicional se identificó el gen causal, denominado *BRCA1*. De manera similar en 1995 se identificó *BRCA2*[22,23]. La identificación de los genes *BRCA1* y *BRCA2* supuso un gran avance en el manejo de las familias con CMH, ya que ofreció la posibilidad de realizar un test genético mediante el cual se podía identificar a los individuos de alto riesgo en las familias, recibir consejo genético y realizar medidas preventivas y de seguimiento adecuadas.

Ambos genes presentan gran tamaño en cuanto a su secuencia codificante: *BRCA1* con 5,592 nucleótidos repartidos en sus 24 exones se extiende a lo largo de 100 kb de ADN genómico y se traduce a una proteína de 1,863 aminoácidos, *BRCA2*, aún mayor, posee 11,385 nucleótidos, distribuidos a lo largo de 70 kb de ADN genómico, compuesto de 27 exones y traducido a una proteína de 3,418 aminoácidos[24].

Las proteínas *BRCA1* y *BRCA2* muestran escasa similitud entre sí, presentando una estructura compleja. *BRCA1* contiene en su extremo amino-terminal un dominio (RING) de unión a zinc altamente conservado, mediante el que interacciona con proteínas como *BARD1* adquiriendo

capacidad de ubiquitinación. La región central de BRCA1 presenta un sitio de fosforilación por CHEK2. Su extremo carboxílico terminal posee dominios que interaccionan con PALB2 y ATM, destacando las dos copias en tándem del dominio BRCT (BRCA1 C-terminal) con capacidad de unión a BRIP1, entre otras proteínas. De la estructura de BRCA2 destaca el extremo N-terminal de unión a PALB2, ocho dominios centrales BRC de unión a RAD51 y una región de unión al ADN [25](Figura 2).

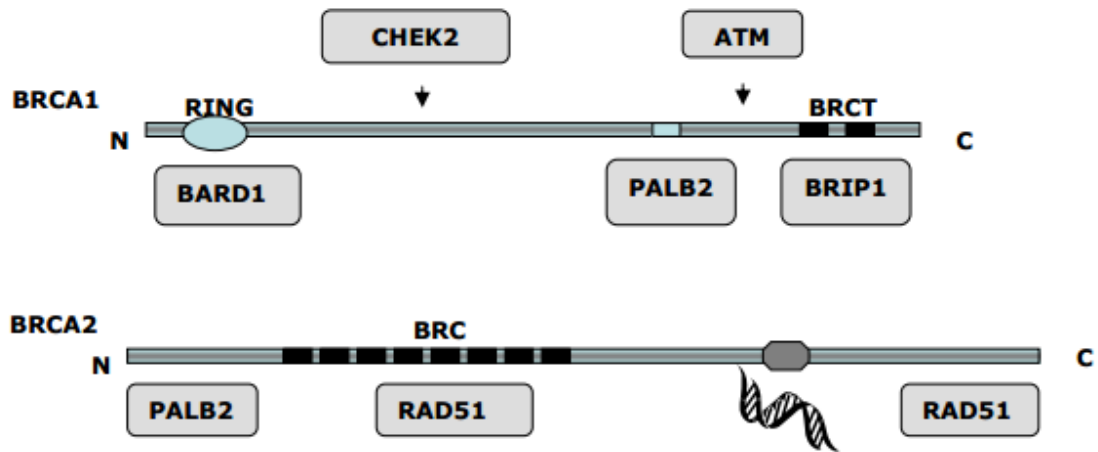


Figura 2. Estructura de BRCA1 y BRCA2, y las regiones de interacción con otras proteínas.

1.3.2 Funciones de los genes *BRCA1* y *BRCA2*

BRCA1 y *BRCA2*, como la mayoría de los genes implicados en síndromes de cáncer hereditario, pertenecen al grupo de los genes supresores de tumores, cuya función clave es el mantenimiento de la integridad genómica.

El proceso principal en el que están implicadas ambas proteínas es en la reparación de roturas de ADN de doble cadena mediante recombinación homóloga (RH), el mecanismo más importante para proteger la integridad del genoma en células proliferantes. La RH precisa que el daño en la doble cadena del ADN sea reconocido por las cinasas ATM y ATR, la mediación en las señales se realice por CHEK2 y BRCA1, y la reparación la completen los efectores BRCA2 y RAD51. Existen además proteínas facilitadores de la RH, entre las que destacan BRIP1 y PALB2, que interaccionan con BRCA1 y BRCA2, respectivamente[26,27].

Mientras que la función de BRCA2 parece principalmente limitada a su papel en la RH. El papel de BRCA1 es más complejo dado que interactúa con múltiples proteínas participando en más procesos además de la reparación del ADN por RH. Tales procesos abarcan: señalización del ciclo celular, control de la transcripción, remodelación de la cromatina y ubiquitinación de proteínas (Figura 3). Otra función de BRCA1 a destacar es la originada por la interacción de sus dominios BRCT con la enzima Acetil-CoA Carboxilasa- α (ACCA), manteniendo ésta en estado inactivo. La ACCA es una enzima clave en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga al catalizar la carboxilación de Acetil-CoA a Malonil-CoA, indispensable en la lipogénesis endógena. Se ha hipotetizado que la función supresora de tumores de BRCA1 también pudiese residir en su interacción con ACCA, dado que al mantenerse esta enzima en su forma inactiva, se imita un estado de baja energía celular, que se sabe bloquea

el anabolismo de las células tumorales y suprime el fenotipo maligno. Estudios epidemiológicos apoyarían la importancia del metabolismo lipídico al haber asociado el ejercicio físico y la ausencia de la obesidad (dieta de baja energía y elevado gasto energético) en la adolescencia con retraso significativo en la aparición de CM en cohortes de mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA1*[28].

1.3.3 Análisis molecular

El análisis molecular de los genes *BRCA1* y *BRCA2* es de gran laboriosidad debido a su tamaño y a la enorme variedad de mutaciones y SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), distribuidas a lo largo de todo el gen. Se han registrado alrededor de 4,000 cambios en la secuencias de ADN de *BRCA1* y *BRCA2*[29,30,31,32,33,34] (mutaciones deletéreas, polimorfismos, variantes de significado incierto, etc.), recogidas en la bases de datos Breast Cancer Information Core (BIC) (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>).

Estudios epidemiológicos realizados en población anglosajona con CM no seleccionada por la historia familiar, estiman que globalmente la prevalencia de mutaciones deletéreas en *BRCA1* y *BRCA2* en afectados está en el rango de 2 a 3%, mientras que en la población general sin CM, la prevalencia de portadores es inferior al 0,7% para cada uno de los genes. Sólo del 16 al 20% del aumento de riesgo de CM se debe a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*[35,36,37]. Globalmente, todos estos resultados nos indican la

importancia de la historia familiar a la hora de determinar la probabilidad de que esté presente una mutación en *BRCA1* y *BRCA2*. Otro factor a tener en cuenta es que en ciertas poblaciones unas pocas mutaciones se presentan con frecuencias inusualmente altas. Los análisis de haplotipos han demostrado que en poblaciones pequeñas con cierto grado de endogamia existen mutaciones fundadoras que provienen de un único ancestro portador. Tras generaciones sucesivas, estas mutaciones aumentan su presencia en la población, pasando a ser cambios altamente recurrentes o incluso característicos de un grupo étnico particular y/o área geográfica más o menos definidas. Aunque las mutaciones fundadoras más intensamente estudiadas en el mundo son propias de la población judía Ashkenazi[38,39,40] (185delAG y 5382insC en *BRCA1* y 6174delT en *BRCA2*), presentes en más del 2% de los individuos de esta etnia, este tipo de mutaciones también han sido identificadas en muchas poblaciones. En los individuos de origen europeo destaca la importancia del efecto fundador en *BRCA1* y *BRCA2* en poblaciones escandinavas, holandesa, polaca, franco-canadiense (Quebec) e italiana (Calabria y Cerdeña), pero en casi todas las poblaciones del mundo podemos encontrar mutaciones fundadoras. En México la primera mutación fundadora reportada fue el rearrreglo genómico que consta de la delección de 15.4 kb correspondientes a los exones 9 al 12 en *BRCA1*[41]. La presencia de mutaciones fundadoras facilita el estudio de ambos genes en línea germinal al permitir realizar el tamizaje mutacional mediante métodos de análisis más rápidos y económicos; estudiar más

individuos con criterios menos astringentes en una población, además de estimar de forma más precisa el riesgo de cáncer asociado[42].

El estudio de las vías donde actúan *BRCA1* y *BRCA2* ha dado como resultado el uso de nuevas estrategias terapéuticas para tratar el CM, una de las cuales es la mastectomía profiláctica en portadoras de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, la cual disminuye considerablemente el riesgo de padecer CM[43,44]. Además de la cirugía, se han desarrollado alternativas como el uso de los inhibidores de la Poli-(ADP ribosa) Polimerasa (PARP), enzima que participa en la reparación de rupturas de cadena sencilla del ADN mediante escisión de bases. Cuando hay una disminución en la función de PARP se incrementan las lesiones al ADN que son reparadas mediante RH. Ya que *BRCA1* y *BRCA2* participan en la RH, aquellas células que son deficientes en *BRCA1* y *BRCA2* y que son de rápida proliferación, disminuyen significativamente su viabilidad al inhibir la función de PARP, y en combinación con quimioterapia poseen una alta tasa de efectividad de eliminación de células malignas[45,46].

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en su reporte del año 2013 menciona la importancia sensibilizar a la población acerca de la importancia de identificar mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, ya que el retraso en el diagnóstico de estos pacientes es común y el pronóstico de sobrevida en pacientes diagnosticados en etapas tardías es bajo[12].

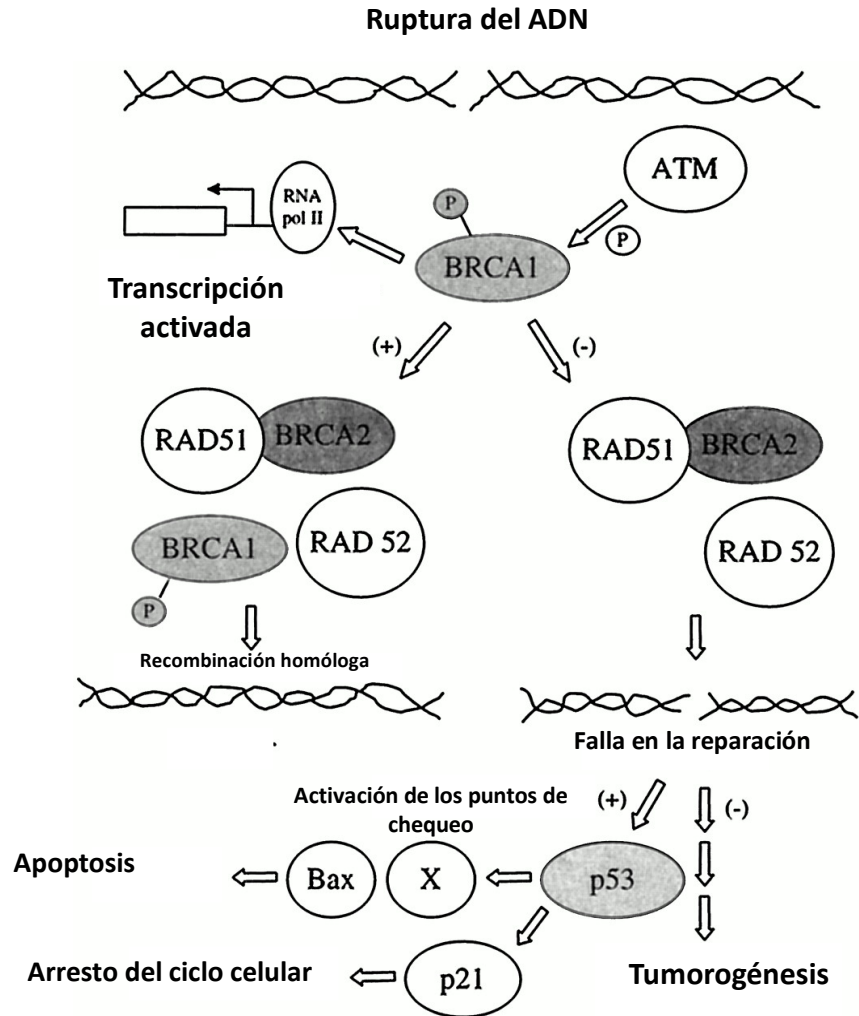


Figura 3. Principales interacciones de las proteínas BRCA1 y BRCA2 en la reparación del ADN y tumorogénesis.

1.3.4 Penetrancia

Las mutaciones de línea germinal en *BRCA1* o *BRCA2* confieren alto riesgo para el desarrollo de CMH y tumores como CO, páncreas, próstata entre otros. Poder conocer con la mayor exactitud posible la penetrancia de mutaciones en ambos genes que predisponen al cáncer, es de vital importancia

a la hora de tomar decisiones clínicas sobre medidas de diagnóstico temprano y reductoras de riesgo[36,47,48].

La penetrancia puede ser variable entre las mujeres portadoras de la misma mutación en *BRCA1* y *BRCA2* dentro de una familia, lo que sugiere que el riesgo de padecer cáncer puede estar influenciado tanto por genes modificadores, como por cofactores ambientales y hormonales[49]. En relación con estos últimos factores, un reciente estudio multicéntrico español confirma que la paridad puede ser un factor protector en portadoras de mutación. En la actualidad, existen dos consorcios internacionales, el IBCCS (International BRCA1/2 Carrier Cohort Study) y el CIMBA (Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2) creados para la identificación de factores exógenos como la influencia del uso de anticonceptivos orales en portadoras[50] y genes modificadores del riesgo, respectivamente. El primer resultado, y de los más relevantes publicados por CIMBA, es la confirmación de que un polimorfismo en el gen *RAD51* (c.135G>C) incrementa el riesgo de desarrollar CM en portadoras de mutaciones en *BRCA2*, especialmente cuando aparece en homocigosis[51] (HR: 3,18, 95% IC, p = 0,0007). Actualmente, el consorcio CIMBA centra sus esfuerzos en estudiar si los loci de susceptibilidad al cáncer de mama de elevada frecuencia y bajo riesgo identificados a través de GWAS (Genome-Wide Association Study) modifican el riesgo de cáncer en portadoras *BRCA1* y *BRCA2*.

En relación con las mujeres afectadas por cáncer de mama portadoras de mutación en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, el riesgo de CM contralateral es significativamente mayor (4 veces más) en comparación con la población general[52].

Las mujeres portadoras supervivientes a CM tienen elevado riesgo de presentar CO, con un riesgo a 10 años del diagnóstico del CM del 12,7% y 6,8% para *BRCA1* y *BRCA2*, respectivamente[53]. Una cuarta parte de las mujeres portadoras de mutación en *BRCA1* y *BRCA2* con CM estadio I fallecen por CO. Un meta-análisis reciente demostró que la salpingo-ooforectomía bilateral profiláctica en mujeres *BRCA1* y *BRCA2* positivas reduce el riesgo de CO y trompa de falopio cerca del 80%, pero se debe tener en cuenta que existe un riesgo de presentar carcinoma peritoneal primario de hasta el 4,3% hasta veinte años después de la intervención ovárica reductora de riesgo[54,55].

La presencia de cáncer de páncreas a edades jóvenes en una familia con antecedentes de CM y/o CO puede ser un factor predictivo de la presencia de mutación, especialmente en *BRCA2*.

1.3.5 Otros genes de susceptibilidad

En una parte de los casos de CMH no se detectan mutaciones en los genes de susceptibilidad *BRCA1* y *BRCA2*, lo que ha llevado a la búsqueda de

nuevos loci que estén asociados a la enfermedad. Diversas vías de señalización y reparación del ADN han sido estudiadas con el fin de identificar mutaciones relevantes[20,56,57,58].

TP53 codifica para una proteína supresora de tumores, que contiene tres dominios: oligomerización, de unión al ADN y de activación transcripcional. *TP53* participa en la respuesta de estrés celular regulando la expresión de ciertos genes que participan en el arresto celular, apoptosis, senescencia, reparación del ADN y cambios en el metabolismo. Las mutaciones en el gen de *TP53* han sido asociadas con una mayor agresividad del CM y un pronóstico desfavorable[59].

El gen *CHEK2* actúa en respuesta al daño del ADN, así como en interrupciones de la replicación, es un regulador del ciclo celular, considerado como un supresor de tumores. Cuando la proteína codificada por *CHEK2* es activada, interactúa con *P53* estabilizándola, además de fosforilar a la proteína *BRCA1* provocando su activación y reparando los daños al ADN. Se ha reportado una frecuencia de mutaciones en el gen *CHEK2* de hasta 4.3% en casos de CMH[60].

PTEN es otro gen que se ha visto involucrado en el desarrollo de CMH cuando su secuencia está alterada. Este gen codifica una fosfatasa que fosforila principalmente sustratos fosfoinosítidos.

Además de los mencionados existen otros genes que han sido asociados al CMH aunque con frecuencia de mutaciones bajas (Cuadro 1).

Gen	Frecuencia de mutaciones* (%)	Referencia
<i>BRIP1</i>	2	[61]
<i>BARD1</i>	1	[62,63]
<i>CHEK2</i>	2.0-4.3	[56,64,65,66,67]
<i>MRE11A</i>	1	[68]
<i>NBN</i>	2.2	[69]
<i>RAD50</i>	1	[60]
<i>RAD51C</i>	2.3	[70,71]
<i>PALB2</i>	0.4-3.4	[72,73]
<i>TP53</i>	2-20	[74,75,76,77]
<i>PTEN</i>	10-22	[78,79]
<i>STK11</i>	1.1	[65]
<i>CDH1</i>	4-8	[60,80,81]
<i>ATM</i>	2-12	[82,83,84]
<i>MSH6</i>	2.3	[73]

Cuadro 1. Otros genes asociados al cáncer de mama hereditario

*Respecto al total de mutaciones encontradas en el estudio

1.4 Prevención

Existen diversos enfoques para ayudar a prevenir el CM, como:

- Modificar el estilo de vida: Una dieta más saludable, hacer ejercicio, limitar el consumo de alcohol, etc.
- Conocer los antecedentes de enfermedades en la familia
- Realizarse con regularidad pruebas de detección temprana: Autoexploración, mamografía, examen clínico de mamas, análisis genéticos, etc.

Se ha reportado que la sensibilidad de la mamografía varía de 62 al 94%; además la autoexploración y el examen clínico de mamas no han demostrado disminuir el riesgo de padecer CM. Más, cuando se conocen bien los antecedentes de CM en la familia, es de gran utilidad un análisis genético, el cual puede determinar el riesgo de CMH con mejor precisión[6,85,86].

1.5 El proceso del asesoramiento genético en cáncer

El descubrimiento de los genes *BRCA1* y *BRCA2* supuso un gran avance en el manejo de las familias afectadas con CMH, ya que permitió ofrecer consejo genético y valorar la realización de un test genético que permitiese identificar a los individuos portadores en familias de alto riesgo, estableciendo medidas preventivas, de seguimiento y reductoras de riesgo adecuadas.

La Sociedad Nacional de Asesores Genéticos (NSGC, por sus siglas en inglés) en Estados Unidos de América define el consejo genético como “*el proceso de asesoramiento que permite a los individuos entender y adaptarse a las implicaciones médicas, psicológicas y familiares de los aspectos genéticos de una enfermedad*”. Este proceso integra los siguientes elementos[87]:

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

El proceso de asesoramiento genético en cáncer se divide en varias etapas[87]:

- Sospecha clínica de un síndrome de cáncer hereditario: elaboración del árbol genealógico detallado incluyendo al menos tres generaciones consecutivas; motivos por los que el paciente acude a la visita y evaluación de las razones que tiene para solicitar las pruebas; valoración de la percepción del riesgo de cáncer; educación sanitaria sobre prevención primaria; adopción de hábitos de vida saludables y promoción de la salud.

- Valoración de la indicación del estudio genético: determinar si existe la sospecha clínica de un síndrome determinado del cual se conocen los genes asociados y cuyo resultado puede interpretarse a nivel clínico.
- Información sobre las implicaciones médicas personales y familiares de la identificación de una susceptibilidad genética.
- Asesoramiento sobre los beneficios y limitaciones de cada tipo de estudio genético: implicaciones sobre la toma de decisiones médica de detección precoz, prevención y tratamiento, así como las limitaciones relacionadas con la sensibilidad limitada de algunas técnicas diagnósticas o la posibilidad de identificar variantes de significado incierto.
- Realización del estudio genético, previo consentimiento informado en los casos en que se considere indicado.
- Interpretación e información del resultado del estudio genético cuando se haya realizado.
- Plan de seguimiento médico en función del resultado del estudio genético o de la historia personal y familiar si no se consideró oportuno realizar el test.

1.6 Estudios genéticos

Se puede definir al estudio genético de predisposición al cáncer como el análisis que nos informa si un individuo ha heredado una alteración genética

que aumente el riesgo para ciertos tipos de cánceres. Los resultados del test genético tienen repercusiones tanto en el individuo como en sus familiares.

Según la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO, por sus siglas en inglés), el estudio genético sólo debería ofrecerse cuando:

1. El individuo tenga altas probabilidades de ser portador de alguna mutación.
2. Se pueda garantizar con fiabilidad la interpretación del resultado.
3. Los resultados puedan ayudar al diagnóstico y manejo médico del paciente o sus familiares con riesgo hereditario al cáncer.
4. Las pruebas genéticas se realicen en el marco de asesoramiento genético.

Previo a realizar cualquier estudio genético, los individuos en riesgo deben estar informados de las opciones para la prevención, diagnóstico precoz y tratamiento. Se recomienda iniciar el estudio genético en una familia a partir de la persona que tenga más posibilidades de ser portadora de la mutación. Si se identifica la mutación en el caso índice, podrá ampliarse el estudio a otros familiares a riesgo de ser portadores.

El estudio genético puede tener los siguientes resultados o interpretaciones:

- Resultado no concluyente o de significado incierto: es un resultado negativo en ausencia de una mutación conocida en la familia o un

resultado del cual se desconoce su significado patológico. Las interpretaciones de este resultado pueden ser varias: la alteración genética reside en un gen desconocido o las técnicas empleadas no han sido suficientemente sensibles y no han detectado la mutación en los genes estudiados.

- Resultado verdadero positivo: en la primera persona estudiada en la familia si se identifica una mutación en alguno de los genes estudiados, el resultado es informativo y se interpreta como la existencia de predisposición a padecer un tipo determinado de CMH. Es una oportunidad para que esta persona pueda informar a otros familiares interesados en clarificar su riesgo.
- Resultado verdadero negativo: existe una mutación identificada en la familia, pero el individuo testado no es portador de dicha mutación. Por lo tanto, no tiene riesgo de padecer CMH y su riesgo es similar al de la población general.

Aunque se ha hipotetizado que la realización de estudios genéticos podría tener un profundo impacto emocional provocando síntomas ansiosos y/o depresivos en relación con el temor a padecer cáncer, y/o sentimientos de culpabilidad por la posibilidad de transmitir la mutación a la descendencia, se ha demostrado la eficacia del consejo genético a la hora de disminuir la ansiedad y mejorar la percepción del riesgo en mujeres con historia de CMH. En la clínica habitual tampoco parece existir morbilidad psicológica significativa atribuible a la realización de estudios genéticos a corto y largo plazo[88].

1.7 Estudios en población Hispana y en México

La falta de investigaciones de la prevalencia de mutaciones de BRCA en Hispanas ha limitado el estudio sobre factores genéticos y ambientales asociados a esta población, así como la implementación de medidas preventivas. Resulta muy relevante, pero aún poco explicado, la alta prevalencia del CM no sensible a hormonas (triple negativo) en Hispanas y la edad temprana de diagnóstico del CM en México. Estos resultados epidemiológicos sobre el CM en México se pudiesen explicar mediante la identificación de situaciones particulares de alto riesgo como la proporción de pacientes portadoras de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*. Desafortunadamente, el acceso al análisis de mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* y al asesoramiento del riesgo de cáncer, que son medidas consideradas como estándares de atención en la mayoría de los países desarrollados, no se encuentran disponibles en la mayor parte de México.

En un estudio reciente publicado en 746 Hispanas con historia personal/familiar de CM y/o CO residentes en EUA desarrollado por el Dr. Jeffrey N. Weitzel y su equipo en el Beckman Research Institute, Comprehensive Cancer Center de City of Hope, Duarte, California, EUA, se documentaron 189 mutaciones deletéreas en *BRCA1* y *BRCA2* del total de los casos (25%), (124 *BRCA1*, 65 *BRCA2*). Se identificaron 9 mutaciones recurrentes que comprendieron el 53% del total de éstas[41].

Basándose en la información de genotipificación sobre Hispanas residentes en EUA en los estudios previos publicados por Weitzel et al., así como en información de ascendencia Hispana de la base de datos BIC, el Dr. Weitzel y su equipo desarrollaron un panel para detectar 114 mutaciones con significancia clínica en *BRCA1* y *BRCA2* (HISPANEL) que incluye inserciones/deleciones y mutaciones puntuales que se han encontrado como recurrentes en estas poblaciones para utilizarse en la plataforma MassArray de Sequenom®. Adicional a este panel, se incluyó en el test genético la mutación que se origina por la deleción de los exones 9 al 12 en *BRCA1* (*BRCA1*del ex9-12) que en estudios previos fue reportada como la primera mutación fundadora de la población Mexicana, probablemente originada en el estado de Puebla[89,90].

Mediante el HISPANEL se han analizado más de 1,500 muestras a la fecha. La información preliminar indica que la sensibilidad del panel es de aproximadamente 80%, comparado con la secuenciación completa de los genes BRCA. La precisión del estudio se respalda en el hecho que el 100% de las mutaciones han sido confirmadas mediante secuenciación comercial (Myriad Genetics Laboratory, Salt Lake, City, UT). Esta información preliminar sobre el uso del panel de mutaciones de BRCA en Hispanas sugiere que mediante el empleo de esta prueba se ha logrado la detección de mutaciones recurrentes de BRCA. El procedimiento de tamizaje (con un costo estimado de \$50 USD por prueba del estudio del panel) ha demostrado ser factible y económico en

una clínica de genética y cáncer de referencia en EUA que atiende a población Hispana con acceso limitado a atención médica.

En México se desconoce si existen en alguna proporción, mutaciones representativas de la población, ya que hasta el momento se han realizado pocos estudios. En el año 2002 Ruiz-Flores y cols., realizaron un estudio en 51 pacientes mexicanas con CM de inicio temprano (menores a 35 años) y fue reportada una frecuencia de mutaciones con significancia clínica de 6.25% en *BRCA1* y 2.08% en *BRCA2*. En el año 2005 Calderón-Garcidueñas y cols., estudiaron a 22 pacientes con CM de inicio temprano (menores a 35 años) que fueron diagnosticadas consecutivamente en un período de un año en un hospital público del norte del país; reportaron una frecuencia mutacional de 4.5% para cada uno de los genes (*BRCA1* y *BRCA2*) y del 18% para variantes de significado clínico incierto[91]. En el año 2009, Vidal y cols., estudiaron a 40 pacientes, 29 de ellos con síndrome de CM-CO hereditarios y 11 con CM de inicio temprano (< 40 años); la frecuencia de mutaciones patogénicas que reportaron fue del 5.4%[92]. En ambos reportes se ha resaltado la importancia de conocer la prevalencia de CM y CO atribuibles a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* en la población mexicana. Recientemente, el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) realizó un estudio en colaboración con el Dr. Weitzel donde se incluyeron 189 pacientes con cáncer (92 casos con CO y 97 con CM), encontrando una prevalencia de 14% de mutaciones en ambos genes (17% en aquellas con CO y 11% con cáncer de mama).

Resulta primordial comprobar la utilidad clínica de este panel de mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* Hispano en pacientes mexicanas con alto riesgo de ser portadores del síndrome de CM-CO hereditarios.

La importancia de determinar el estatus de una paciente respecto a una mutación germinal de predisposición a cáncer radica en la posibilidad de calcular el riesgo de segundas neoplasias, estudiar a los familiares e intervenir mediante medidas de prevención, detección temprana e incluso tratamiento tanto en el paciente como en los familiares que presenten la predisposición.

1.7.1 Hispanel

Diversas técnicas han sido utilizadas para la identificación de mutaciones, entre las que se puede mencionar: PCR-SCCP (PCR-polimorfismos conformacionales de cadena sencilla), DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) para análisis de heterodúplex, Secuenciación por química de Sanger y recientemente la secuenciación masiva. La secuenciación por química de Sanger es el estándar de oro en la identificación de mutaciones, pero presenta la desventaja de un costo elevado al analizar genes grandes. La secuenciación masiva representa una gran ventaja cuando se requiere analizar muchas muestras así como muchos genes, sin embargo es demasiado costosa. La creciente necesidad de identificar los casos con mayor riesgo de padecer CM llevó al grupo de colaboradores del Dr.

Jeffrey N. Weitzel a buscar alternativas para realizar el tamizaje de mutaciones a un menor costo.

El HISPANEL está basado en la tecnología iPLEX de SEQUENOM® que utiliza terminadores (nucleótidos) con masa modificada (Cuadro 2) para facilitar la detección mediante diferencias en la masa-carga a través de un sistema de espectrometría de masa, lo que permite además realizar múltiples ensayos simultáneamente.

Terminador	A	C	G	T
A	0	-24	16	55.9
C	21	0	40	79.9
G	-16	-40	0	39.9
T	-55.9	-79.9	-39.9	0

Cuadro 2. Diferencia en masa entre los terminadores iPLEX (masa en Daltons)

El ensayo comienza con una amplificación por PCR múltiple de diferentes regiones (114 regiones) que componen el HISPANEL y que posteriormente son purificadas por un tratamiento con fosfatasa alcalina de camarón (SAP) para la eliminación de los nucleótidos no incorporados puesto que en la segunda reacción de PCR pueden interferir y modificar la masa del producto que será detectado. Una vez concluida la reacción con SAP se

procede a realizar una segunda PCR llamada “extensión”, donde en los reactivos de la reacción van añadidos los terminadores. Al momento de llevarse a cabo la PCR sólo un nucleótido será incorporado a la reacción debido a la carencia del hidroxilo en la posición 3' por lo que al final la reacción el producto será el primer (de masa conocida) más un nucleótido y con ayuda del software TyperAnalyzer® es asignado el genotipo de acuerdo a la masa detectada (ver Cuadro 2).

CAPITULO II

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Obtener la frecuencia de las principales mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* descritos en la población hispana y determinar la utilidad del HISPANEL en pacientes con CM de alto riesgo del Noreste de México.

2.2 Objetivos Específicos

1. Integrar un grupo de estudio con pacientes con historial familiar de CM del Noreste de México e información demográfica, clínica y epidemiológica, para examinar sus factores de riesgo
2. Tamizar en el grupo de estudio las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* por medio de la tecnología MassArray, utilizando el HISPANEL.
3. Determinar la posible asociación entre las mutaciones detectadas y las características clínicas y epidemiológicas de las pacientes afectadas.

CAPÍTULO III

3. Materiales y métodos

3.1 Sujetos de estudio

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética y Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” (con número de registro BI10-002). Se invitó a participar en el estudio a mujeres del noreste de México con diagnóstico confirmado de CM que acudieran a la consulta de oncología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, así como al Hospital de Especialidades No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y que tuvieran al menos un pariente en primer o segundo grado afectado con CM. Para cada paciente se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica en tubos vacutainer con EDTA, previa firma del consentimiento informado. Las características demográficas, clínicas y epidemiológicas se ingresaron a una base de datos confidencial.

3.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el buffer de lisis TSNT (1% Tritón, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA), seguido de una doble extracción con fenol-SEVAG (cloroformo:alcohol

isoamílico 24:1 v/v). El ADN fue resuspendido en buffer TE 1X (10 mM Tris pH 8.0 y 1 mM EDTA) y almacenado a 4°C hasta su uso.

3.2.1 Cuantificación y determinación de la calidad del ADN

Se realizó la cuantificación del ADN por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm usando el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). El ADN fue considerado como de buena calidad cuando los valores de la relación de absorbancia 260/280 estuvieron dentro del rango 1.8 a 2.0 y las de la relación 260/230 fueran > 2.0. Se verificó la integridad del ADN en una alícuota de este, mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con solución de bromuro de etidio a 0.5 mg/mL esperando ver una masa de ADN de alto peso molecular y sin que de esta se desprendiera señal a manera de barrido hacia el fondo del gel que evidenciara degradación.

3.3 Detección de mutaciones

Para evaluar la utilidad, en población mexicana, de las mutaciones frecuentemente reportadas en hispanos, se realizó el tamizaje de las 114 mutaciones que corresponden al HISPANEL, más la mutación fundadora reportada en mexicanos *BRCA1* ex9-12del en dos ensayos por separado.

3.3.1 Detección de la mutación *BRCA1* ex9-12del

Para detectar la delección de 15.4 kb en el gen *BRCA1*, se realizó un ensayo con tres primers [564 (+) GGAAGCCTTTTAAGAAGAGC, 567 (-) CCCAGTTTGAATTCTGAGC y 570 (-) CTCCTGTTGTTTATTGGTCC]. Los primers 564 (+) y 567 (-) amplifican una región de 1146 pb en el alelo tipo silvestre y los primers 564 (+) y 570 (-) amplifican una región de 745 pb en el alelo mutado. La reacción consistió de 17.9 µL de agua, 2.5 µL de buffer 10X, 0.5 µL de dNTP Mix a 10 mM cada uno, 1 µL de MgCl₂ a 25 mM, 0.5 µL del primer 564 (+) a 20 µM, 0.5 µL del primer 570 (-) a 20 µM, 1 µL del primer 567 (-) a 20 µM, 0.125 µL de Taq DNA Polimerasa de Qiagen a 5 U/µL y 1 del templado a 50 ng/µL, con el siguiente programa: 94°C/5min de desnaturalización inicial, seguido por 28 ciclos de desnaturalización a 94°C/30s, alineamiento a 60°C/30s, extensión a 72°C/1min y una extensión final a 72°C/7min.

3.3.2 Genotipificación con HISPANEL

3.3.2.1 Amplificación de los loci

Primeramente se realizó la amplificación de los loci donde se han reportado las 114 mutaciones (Cuadro 3). En una placa de 96 pozos (Fisher Scientific) se añadieron 20 ng de ADN de cada paciente más los siguientes reactivos: 2.98 µL de agua (desionizada grado HPLC), 0.8 µL de buffer 10X (MgCl₂ a 15 mM), 0.8 µL de MgCl₂ a 25 mM, 0.4 µL de dNTP Mix a 10 mM cada uno, 0.8 µL de Mix de primers (1 µM cada uno) y 0.22 µL de HotStart Taq

Plus de Qiagen a 5 U/ μ L, con las siguientes condiciones: 94°C/5min desnaturalización inicial seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94°C/20s, alineamiento a 56°C/30s, extensión a 72°C/1min y una extensión final a 72°C/3min.

Nota: La reacción de amplificación se realizó con cinco mixes por separado para cubrir las 114 regiones.

3.3.2.2 Tratamiento con SAP

Al finalizar la amplificación de los loci se hizo un tratamiento con SAP añadiendo a cada pozo los siguientes reactivos: 1.91 μ L de agua (desionizada grado HPLC), 0.213 μ L de buffer SAP 10X y 0.375 μ L de enzima SAP a 1.7 U/ μ L. Se incubó a una temperatura de 37°C/40min seguido por una inactivación de la enzima a 85°C/15min.

3.3.2.3 Reacción de extensión (iPLEX)

Para la reacción de extensión, a cada pocillo se añadieron 0.7 μ L de agua (desionizada grado HPLC), 0.225 μ L de buffer iPLEX plus 10x, 0.225 μ L de Mix de terminación iPLEX, 1.058 μ L de Mix de primers y 0.046 μ L de enzima iPLEX. Las siguientes condiciones se aplicaron a la reacción: desnaturalización inicial a 95°C/30s, seguidos por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C/5s, alineamiento y extensión (52°C/5s y 80°C/5s, respectivamente) x 5 veces y una

extensión final a 72°C/3min. Se añadieron 40 µL de agua ultra pura (Invitrogen) al producto y se limpió con la resina SpectroCLEAN (Sequenom) durante media hora. Se acondicionó el chip 384-sample SpectroCHIP (Sequenom) con el nanodispensador y posteriormente se introdujo el chip en el espectrómetro de masas para la genotipificación (Cuadro 3).

Nota: La reacción de extensión se realizó con 5cinco mixes por separado.

BRCA1 (Nomenclatura BIC)	Exón	rs	BRCA2 (Nomenclatura BIC)	Exón	rs
185delAG	2	80357713	802delAT	7	80359533
300T/G (C61G)	5	28897672	886delGT	8	80359604
4153delA	11	80357711	957del4	9	90359645
5382insC	20	80357906	1538del4	10	80359280
330A/G(R71G)	5	80357382	2452C/T (Q742X)	11	80358494
666+1G/T (IVS8+1G/T)	8	80358030	3036del4	11	NA
943ins10	11	NA	3417del4	11	80359374
1135insA	11	80357569	3492insT	11	80359380
2079A/T (K654X)	11	80357355	3710insGA	11	NA
2415delAG	11	80357780	4150G/T (E1308X)	11	80358638
2552delC	11	80357524	5423delT	11	NA
2800delAA	11	80357971	6027del4	11	80359538
2983A/C (S955X)	11	80357295	6174delT	11	80359550
3450del4	11	80357903	6503delTT	11	11571658
3717C/T (Q1200X)	11	62625307	7640del10	14	80359649
4184del4	11	80357508	7986G/A (W2586X)	16	80359003
4458C/T (Q1447X)	13	80357067	8550insT	18	80359706
5154del5	17	80357623	9254del5	23	80359741
5242C/A (A1708E)	18	28897696	9610C/T (R3128X)	25	80359212

5272-1G/A (IVS18-1G/A)	19	80358137	373G/T (E49X)	3	80358435
331+1G/A (IVS5+1G/A)	5	80358042	999del5	9	80358675
589delCT	8	80357887	5164del4	11	80359473
1205del56	11	80359875	5301insA	11	80359480
1793delA	11	80357600	6006delTG	11	80359536
2525del4	11	80357674	7261C/T (Q2345X)	12	NA
2576delC	11	80357669	9538delAA	25	80359756
2731C/G	11	NA	9927del4	27	80359775
2925del4	11	80357832	2663insA	11	NA
3148delCT	11	80357510	3394C/T (Q1056X)	11	79728106
3767insA	11	80357902	5377delG	11	NA
3936C/T (Q1273X)	11	80357208	5844delAGTAA	11	80359525
4446C/T (R1443X)	13	41293455	6252insC	11	NA
4671C/T (Q1518X)	15	80356881	7784insC	15	80359660
5083del19	16	80359876	7907delTT	16	80359673
5396+1G/A (IVS20+1G/A)	20	80358150	9345G/A (P3039P)	23	28897756
5420T/A (C1767X)	21	NA	295+2T/C (IVS2+2T/C)	2	81002885
208T/A (L30X)	2	NA	1825delA	10	80359292
2080delA	11	80357522	2604C/A (Y792X)	11	80358503
2156delGinsCC	11	NA	3034delAAAC	11	80359351
2428C/A (S770X)	11	80357063	4265delCT	11	80359421
2859del11	11	NA	6076delGTTA	11	80359543
3124delA	11	80357846	6265A/T (K2013X)	11	80358840
3596delAAAG	11	80357781	6633delCTTAA	11	80359585
3878delTA	11	80357520	6884C/G (S2219X)	11	80358893
4134G/T (E1339X)	11	80357021	9463delG	24	NA
5105+6T/C (IVS6+6T/C)	6		1384delG	10	NA
5370C/T (R1751X)	20	80357123	2041insA	10	80359308
5443T/G (M1775R)	21	41293463	4167C/Pu (Y1313X)	11	80358641

5482G/A (G1788D)	22	80357069	4232insA	11	NA
189insTGTC	2	80357536	4673del5	11	NA
917delTT	11	80357724	4859delA	11	80359461
2448delT	11	80357725	5025delT	11	80359465
2883delACAG	11	80357822	5117C/G (S1630X)	11	80358711
3118delA	11	80357991	7990delATAinsTT	16	NA
3587delT	11	NA	8605G/A (G2793R)	19	80359082
3837C/T (Q1240X)	11	80356903			
4476+1G/A (IVS13+1G/A)	13	80358027			
5454delC	22	80357590			
5472C/T (Q1785X)	22	80356969			

Cuadro 3. Lista de las 114 mutaciones que componen el HISPANEL

NA: No existe rs reportado

3.4 Validación por secuenciación Sanger

Se validó por secuenciación con la técnica de Sanger la mutación que se presentó con mayor frecuencia. Se amplificó la región donde se detectó la mutación con el HISPANEL (ver 4.2). 3 μ L de ADN Genómico a 200 ng/ μ L, 1 μ L del primer BRCA1-11F4 (5'-TGG CAC TCA GGA AAG TAT CTC G-3') 10 μ M, 1 μ L del primer BRCA1-11R1 (5'-GAT GAC GTC CTA GCT GCT TGA A-3') 10 μ M, 12.5 μ L de GoTaq® colorless master mix 2X (Promega) y 7.5 μ L de Agua libre de nucleasas (Promega), con el siguiente programa en el termociclador: Desnaturalización inicial a 95°C/5min seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C/35s, alineamiento a 60°C/1min, extensión a 72°C/90s y posteriormente una extensión final a 72°C/10 min.

Después de la amplificación se hizo un tratamiento añadiendo 4 μ L de ExoSap-IT (Affymetrix) a 10 μ L de producto amplificado y se puso en el termociclador (Veriti® Termociclador 96 pozos) a una temperatura de trabajo 37°C/30min, seguido por una inactivación de la enzima a 80°C/15min. Se hicieron dos reacciones de secuenciación en paralelo para cada primer con los siguientes reactivos: 5 μ L de producto tratado con ExoSap-IT, 2 μ L de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) 1 μ L de Primer 5 μ M, 2 μ L de Agua libre de nucleasas (Promega), con el siguiente programa de temperaturas: 96°C/1min seguido de 25 ciclos de 96°C/10s, 50°C/5s, 60°C/4min. Terminado el programa se mantuvo el producto a 4°C hasta su purificación.

La purificación se llevó a cabo mediante una precipitación con etanol. A cada reacción se añadió 2.5 μ L de EDTA 125 mM y 25 μ L de Etanol 100%, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente 15min en oscuridad y posteriormente se centrifugó por 30 min a 3000 g. Luego se hizo una centrifugación con la placa invertida por 10 s a 185 g, se añadieron 30 μ L de etanol al 70%, se mezcló y se centrifugó 15 min a 1650 g. De nueva cuenta se invirtió la placa y se centrifugó durante 1 min a 185g. El contenido se resuspendió en buffer de inyección y se procedió a inyectarlo en el Analizador Genético 3130 ABI PRISM®. Los resultados fueron analizados con el programa Sequence Scanner V1.0.

CAPÍTULO IV

4. Resultados

4.1 Sujetos de Estudio

94 mujeres con diagnóstico de CM aceptaron participar en el estudio, de las cuales se obtuvieron muestras de sangre, así como las características clínicas, demográficas y epidemiológicas (Cuadro 4).

Características demográficas	
Origen	%
Nuevo León	52.7
Coahuila	31.2
Zacatecas	4.3
Veracruz	3.2
Jalisco	2.2
Tamaulipas	2.2
D.F.	1.1
Características clínicas	
Tipo Histológico	
NA	12.8
Adenocarcinoma Ductal Infiltrante	67
Adenocarcinoma Lobulillar infiltrante	7.4
Adenocarcinoma Mucinoso infiltrante	2.1
Adenoma Ductal poco diferenciado	2.1
Adenocarcinoma Insitu diferenciado	1.1
Adenocarcinoma Canalicular infiltrante	3.2
Adenocarcinoma Coloide	1.1
Estadio Clínico	

NA	26
I	5.6
IIA	15
IIB	15
IIIA	14
IIIB	15
IIIC	2.2
IV	9
Grado de Obesidad	
Normal	23.6
Sobrepeso y Obesidad	76.4
Lado del cáncer	
Derecho	46.2
Izquierdo	44.1
Bilateral	9.7
Características epidemiológicas	
Uso de Anticonceptivos orales	
No	67
Si	33
Reemplazo Hormonal	
No	95
Si	4
Lactancia	
No	25.3
Si	74.7
Consumo de alcohol	
No	83
Si	17
Consumo de tabaco	
No	80.9
Si	19.1
HF de CO	
No	98
Si	2

Cuadro 4. Características de las pacientes

Las principales características epidemiológicas que aumentan el riesgo en mujeres se detallan en el Cuadro 4, en el Cuadro 5 se presenta el resultado

del análisis de descriptivo de edad, peso, índice de masa corporal (IMC), edad de menarquía y menopausia.

	Edad (años)	Peso (kg)	IMC (kg/m2)	Edad de Menarquia (años)	Edad de Menopausia (años)
Media	49	71	29.5	12	44
Desv. Est.	13.4	138	6.2	1.54	5.8
Valor mín.	20	38	16.2	9	31
Valor máx.	85	103	58.4	16	56

Cuadro 5. Análisis descriptivo

4.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN dio como resultado un rendimiento de 60 a 120 µg de ADN por mililitro de sangre utilizado, con concentraciones de ADN de 150 a 300 ng/µL que fueron almacenados en tubos eppendorf de 1.5 mL a 4°C hasta su uso.

4.2.1 Cuantificación y determinación de la calidad del ADN

Se realizaron geles de agarosa al 0.8% (Figuras 3, 4 y 5) para evaluar la integridad del ADN, comparado con un marcador de peso molecular de 1 kb, así como con ADN extraído de bloques de parafina que es conocido que se posee una degradación considerable (Figura 4). Se realizó una dilución de todas las muestras a una concentración entre 10 y 20 ng/ μ L para los estudios posteriores. Los resultados de la cuantificación y calidad del ADN se detallan en la Cuadro 4.

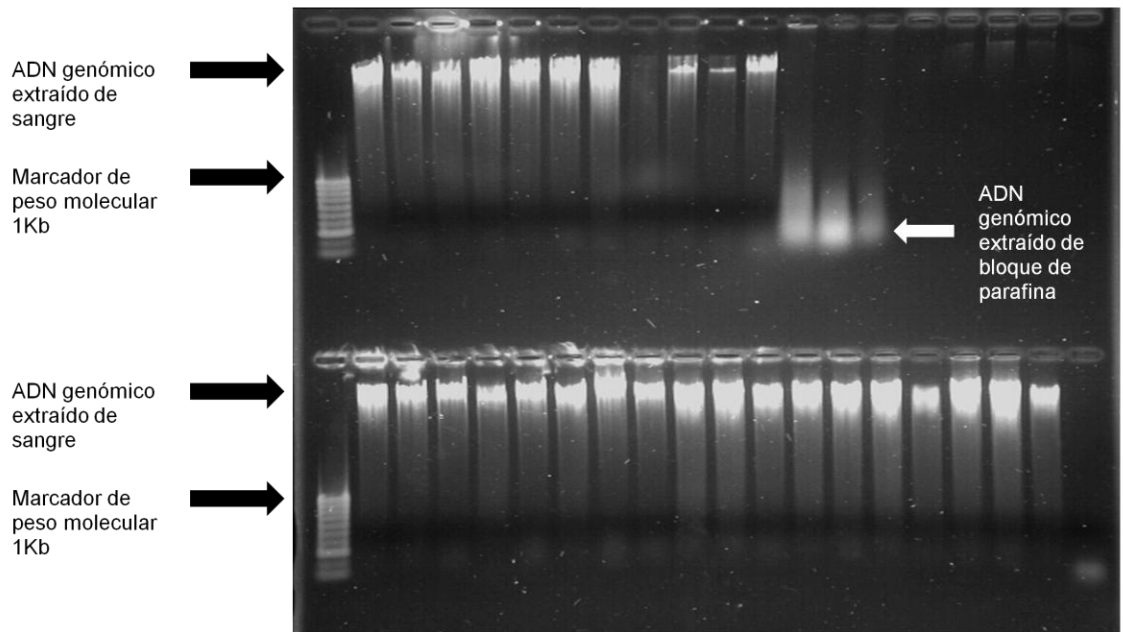


Figura 4. Gel de Agarosa al 0.8% para evaluar la integridad de las muestras de ADN. Se utilizaron 1 μ g de ADN en cada pocillo.

Número	Muestra	Concentración (ng/μL)	Absorbancia (260 nm)	Absorbancia (280 nm)	260/280	260/230
1	13	22.5	0.45	0.217	2.08	1.12
2	20	46.3	0.927	0.514	1.8	1.2
3	34	19.7	0.395	0.223	1.77	1.35
4	44	18.9	0.377	0.217	1.74	1.49
5	48	14.8	0.297	0.165	1.8	1.84
6	65	19.7	0.394	0.218	1.8	1.61
7	80	16.7	0.334	0.184	1.82	2.03
8	81	53.9	1.077	0.62	1.74	0.65
9	98	7.8	0.155	0.073	2.14	0.95
10	101	13.5	0.269	0.129	2.09	2.67
11	115	12.6	0.252	0.141	1.78	2.58
12	126	48.	9.712	5.241	1.85	2.13
13	127	23	0.46	0.262	1.76	1.8
14	133	14.8	0.297	0.201	1.48	1.49
15	136	15.1	0.302	0.171	1.77	1.43
16	148	40.6	0.813	0.359	2.26	0.06
17	150	12	0.241	0.131	1.84	0.31
18	157	12.2	0.244	0.126	1.94	2.23
19	158	26.2	0.524	0.336	1.56	0.97
20	163	16	0.321	0.182	1.76	2.06
21	165	13.7	0.275	0.152	1.81	1.97
22	166	14.6	0.292	0.177	1.65	0.56
23	139	19	0.381	0.199	1.92	2.08
24	178	10.7	0.213	0.114	1.87	1.93
25	183	22.4	0.447	0.228	1.96	1.76
26	176	15.7	0.313	0.195	1.61	1.46
27	198	12.5	0.251	0.12	2.09	1.25
28	206	14.8	0.296	0.273	1.08	0.77
29	210	11.3	0.227	0.097	2.34	2.82
30	211	54.3	1.087	0.595	1.83	1.79
31	220	14.9	0.299	0.042	7.04	0.05
32	225	16.2	0.324	0.172	1.88	1.99
33	236	9.1	0.181	0.115	1.58	0.19
34	239	14.5	0.29	0.171	1.69	1.11
35	242	29.1	0.582	0.324	1.79	0.42
36	251	13.7	0.274	0.163	1.67	2.31
37	254	15.2	0.303	0.196	1.55	0.91
38	256	1.9	0.038	0.026	1.44	0.92
39	267	12.5	0.25	0.121	2.06	1.47
40	275	14.1	0.282	0.127	2.23	1.52
41	279	50	1	0.5	2	0.76

42	289	20.7	0.414	0.222	1.86	1.37
43	292	34.8	0.695	0.363	1.91	2
44	317	14	0.281	0.187	1.5	1.16
45	319	6.5	0.13	0.072	1.81	6.6
46	324	16.2	0.325	0.181	1.8	1.49
47	327	13.2	0.264	0.13	2.03	3.08
48	332	12.9	0.258	0.139	1.86	1.54
49	342	5.9	0.117	0.06	1.95	2.6
50	353	9.9	0.198	0.112	1.77	1.93
51	355	8.5	0.17	0.097	1.75	1.69
52	356	9.4	0.188	0.085	2.22	1.92
53	359	9.1	0.182	0.096	1.9	1.89
54	361	7.3	0.146	0.083	1.77	2.18
55	362	8.8	0.176	0.092	1.92	2.81
56	369	11	0.22	0.139	1.58	1.14
57	378	7	0.14	0.07	1.98	1.29
58	379	15	0.299	0.16	1.87	1.92
59	386	14.4	0.289	0.161	1.79	1.4
60	389	10.3	0.207	0.108	1.92	2.05
61	393	15.2	0.303	0.178	1.7	2.34
62	395	17	0.34	0.182	1.87	1.21
63	396	13.9	0.278	0.163	1.7	1.52
64	397	12.3	0.246	0.149	1.65	2.48
65	410	11.1	0.223	0.13	1.71	2.45
66	411	12	0.24	0.132	1.82	2.35
67	415	9.8	0.196	0.113	1.73	2.13
68	417	1.6	0.033	0.026	1.24	0.4
69	419	5.4	0.108	0.06	1.8	0.56
70	426	11.7	0.234	0.128	1.83	2.23
71	428	11.4	0.228	0.149	1.53	1.61
72	429	14.6	0.293	0.182	1.61	1.82
73	435	9.3	0.185	0.108	1.72	3.43
74	437	13.4	0.267	0.159	1.68	2.57
75	438	10.4	0.208	0.123	1.69	2.05
76	439	13.1	0.262	0.169	1.55	2.16
77	446	8	0.16	0.048	3.31	0.46
78	448	8.9	0.178	0.113	1.58	0.94
79	449	8.9	0.178	0.136	1.31	0.65
80	450	18.1	0.362	0.25	1.44	1.14
81	461	14.7	0.293	0.197	1.49	1.68
82	462	14.7	0.294	0.191	1.53	1.8
83	469	17.5	0.349	0.182	1.92	1.61
84	471	16.8	0.335	0.206	1.63	1.69

85	476	15	0.3	0.162	1.85	1.48
86	480	12.1	0.242	0.165	1.46	0.96
87	488	20.1	0.403	0.25	1.61	1.56
88	491	15.7	0.315	0.231	1.36	1.38
89	494	16.8	0.336	0.242	1.39	1.38
90	495	14.9	0.297	0.185	1.6	1.93
91	499	13.4	0.268	0.161	1.67	1.6
92	508	11	0.221	0.118	1.88	3.23
93	509	10.1	0.201	0.099	2.03	2.57
94	510	10.9	0.218	0.113	1.93	2.42

Cuadro 6. Concentraciones de ADN en un volumen de 50 μ L y relaciones de absorbancia para la evaluación de la calidad.

4.3 Detección de mutaciones

De las 94 pacientes analizadas, el 9.57% (9/94) fueron positivas para mutaciones. Ocho de ellas albergan mutaciones en el gen *BRCA1* y una en *BRCA2* (Cuadro 5).

Mutaciones detectadas por MassArray										
Mutación (BIC)	Exón	Gen	Efecto en la proteína	Tipo histológico	ER	PR	Her2	Edad	IMC	Origen
185delAG	2	BRCA1	Pt (AA39)	AM	NEG	NEG	NEG	28	Ob1	S.L.P.
330A>G	5	BRCA1	R71G, Pt (AA64)	ADI	NEG	NEG	NEG	38	Ob2	N.L.
2552delC	11	BRCA1	Pt (AA814)	ADI	NEG	NEG	NEG	40	N	Coah.
2552delC	11	BRCA1	Pt (AA814)	ADI	NEG	NEG	NEG	70	Sp	Coah.
2552delC	11	BRCA1	Pt (AA814)	ADI	NEG	NEG	NEG	28	Sp	N.L.
2552delC	11	BRCA1	Pt (AA814)	ADI	SD	SD	SD	33	Sp	N.L.
943ins10	11	BRCA1	Pt (AA275)	ADI	NEG	NEG	NEG	31	Sp	N.L.

3492insT	11	BRCA2	Pt (AA1098)	ADI	NEG	NEG	POS	37	Sp	Coah.
Mutación detectada por PCR convencional										
Mutación	Exón	Gen	Efecto en la proteína	Tipo histológico	ER	PR	Her2	Edad	IMC	Origen
ex9-12del	9-12	BRCA1	Sin unión al ADN	ADI	NEG	NEG	NEG	33	Sp	N.L.

Cuadro 7. Mutaciones detectadas. Pt: Proteína truncada, AA: Posición del aminoácido, ADI: Adenocarcinoma ductal infiltrante, AM: Adenocarcinoma metastásico, N: Normal, Sp: Sobrepeso (IMC >25), Ob1: Obesidad grado 1 (IMC >30), Ob2: Obesidad grado 2 (IMC >35). NL: Nuevo León. Coah.: Coahuila. SD: Sin datos. ER: Receptor de estrógenos. PR: Receptor de progesterona. Her2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

4.3.1 Detección de la mutación *BRCA1* ex9-12del

Una paciente (1/94) fue positiva para la delección de los exones 9 al 12 en *BRCA1* (Figura 5) que representa el 11.1% de todas las mutaciones detectadas. Las características principales de la paciente se muestran en la Cuadro 5.

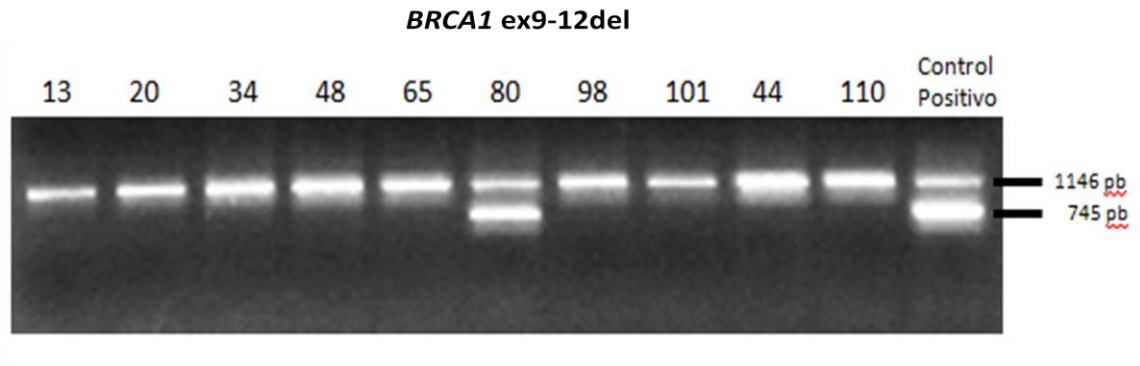


Figura 5. Detección de la mutación *BRCA1* ex9-12del por PCR punto final.

4.3.2 Genotipificación con HISPANEL

Todas las muestras analizadas pasaron el control de calidad y se reportaron 8 mutaciones (siete en *BRCA1* y una en *BRCA2*, ver Cuadro 5). Todas las pacientes con mutaciones fueron del tipo heterocigotas.

4.4 Validación por secuenciación Sanger

La mutación *BRCA1* 2552delC que se detectó en el 50% de las pacientes con mutación en el gen *BRCA1* fue validada por secuenciación Sanger en tres muestras de pacientes que contenían suficiente ADN para la prueba (Figura 5). La mutación se origina por la delección de una Citosina en la posición 2552 de la secuencia codificante, por lo que el marco de lectura se corre y en esa misma posición al ser heterocigota se observan dos nucleótidos (Citosina y Adenina) ya que el siguiente nucleótido es Adenina. Esta mutación

origina un codón de paro en la posición aminoacídica 814 de la proteína BRCA1.

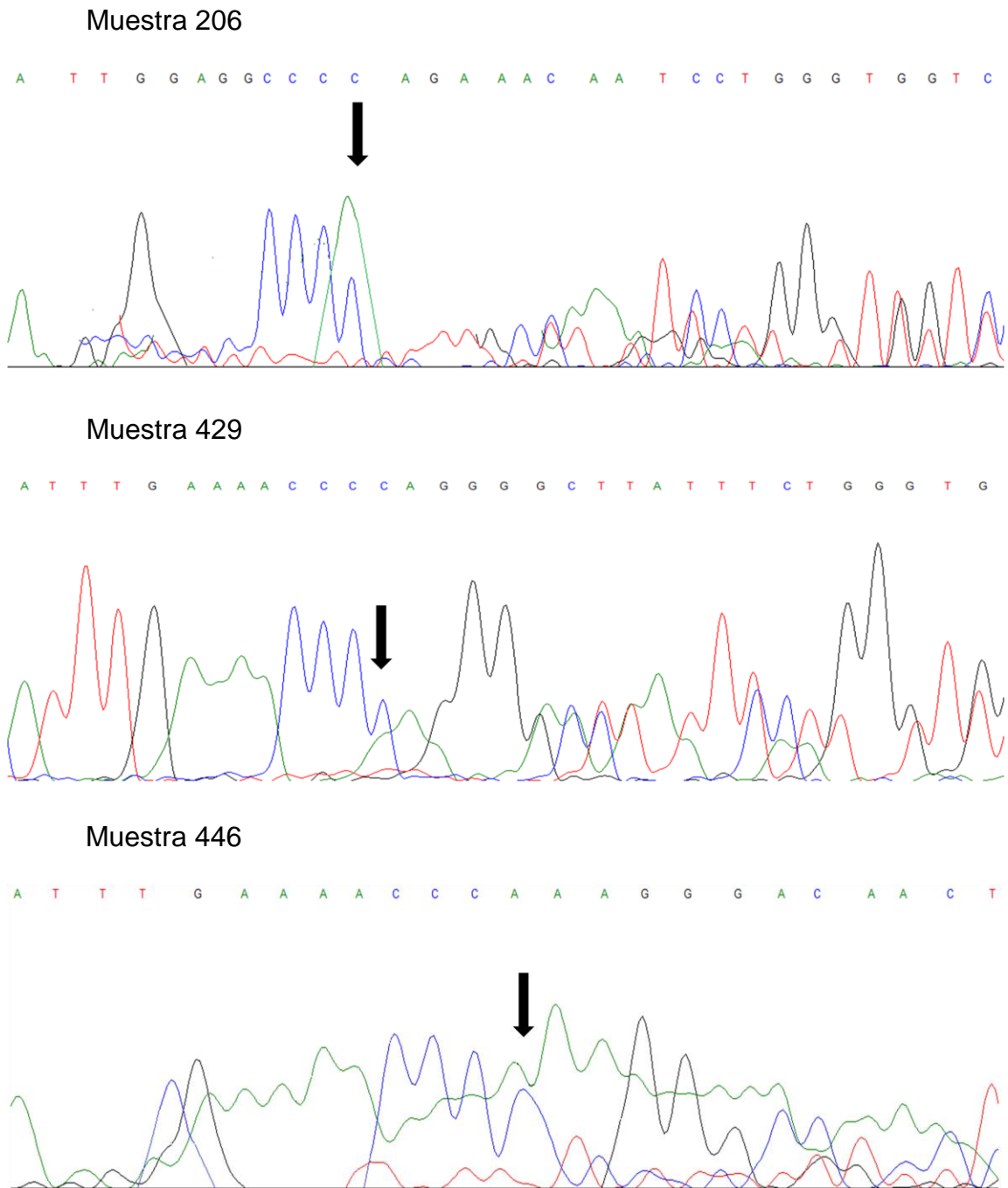


Figura 6. Validación de la mutación *BRCA1* 2552delC

CAPÍTULO V

5. Discusión

El estudio de los factores de riesgo es importante en la población, ya que se puede identificar a las mujeres sensibles de padecer CM. De las características que se recopilaron de las pacientes, la presencia de mutaciones está asociado a la condición triple negativo del tumor ($p=0.002$), el cual se caracteriza principalmente por su agresividad y a la dificultad de tratamiento, puesto que no tiene un blanco específico; así como a la presentación temprana de la enfermedad (< 40 años, $p<0.0001$) y esto es de gran importancia, ya que tiene implicaciones en la detección temprana del CMH, así como en la toma de decisiones al momento de ordenar en qué pacientes es recomendable realizar un test genético[93,94,95].

La detección temprana del CMH a través de métodos moleculares es un tema relativamente nuevo en México, ya que se han llevado a cabo pocos estudios sobre los genes causantes de esta enfermedad. En este estudio, el 9.57% de las pacientes analizadas fueron positivas para mutaciones en *BRCA1* (8.5%) y *BRCA2* (1.07%) que son los principales genes de predisposición al CMH; análisis realizado con un panel de mutaciones (HISPANEL) que se presume pueda abarcar al menos el 80% de todas las mutaciones en hispanos.

A la fecha, únicamente se ha publicado un estudio en México de secuenciación completa de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que incluyó a 39 pacientes con historial familiar de CM, en el cual se reportó una frecuencia de mutaciones de 5% para cada uno de los genes, además de reportar un 10% de variantes con significado clínico incierto pero clasificadas como posiblemente patológicas por el programa Polyphen V2[96]. Estas variantes deben ser analizadas en las familias donde se identificó las portadoras para evaluar su patogenicidad.

Comparando el estudio de secuenciación completa con el presente trabajo se puede afirmar que el HISPANEL es de gran utilidad en la población Mexicana, ya que también se ha utilizado el HISPANEL en el centro del país para determinar su funcionalidad. Esto se debe a que la mayoría de los pacientes hispanos analizados en California por medio del HISPANEL son mexicanos y/o de ascendencia mexicana (79%)[41]. Aunque todavía faltan los estudios que comprueben la sensibilidad (secuenciación completa de ambos genes en pacientes negativos en el estudio de HISPANEL) en ambos caso (Centro y Norte), la referencia del estudio de secuenciación completa y la validación de la mutación más frecuente supone la efectividad del método como un primer recurso para el tamizaje de mutaciones.

Es interesante que todas las mutaciones detectadas por el HISPANEL en este estudio generen una proteína trunca en el dominio que corresponde al exón 11 o antes de él, lo que resalta la importancia de este exón. La mutación

de sentido erróneo, R71G, que provoca el cambio del nucleótido citosina por guanina en la posición 330 de la secuencia codificante, está en el sitio de corte y empalme, por lo que se genera un ARN mensajero distinto, con un codón de paro prematuro y se ha comprobado que este efecto predomina sobre el cambio de arginina por glicina en la posición aminoacídica 71[97]. Además la mutación detectada en *BRCA2* también se encuentra en el exón 11.

La delección de los exones 9 al 12 en *BRCA1* no genera una proteína truncada, sin embargo involucra la delección completa del dominio BRCT con el cual la proteína *BRCA1* ejerce su función primordial[41].

Los primeros judíos llegaron a México con Hernán Cortés y desde entonces ha habido una serie de migraciones de éstos a México; la propia ciudad de Monterrey fue fundada por judíos. No es de extrañarse encontrar en mexicanos alguna de las mutaciones fundadoras inherente a los judíos. Tal es el caso de la mutación que se detectó en una paciente originaria de San Luis Potosí; *BRCA1* 185delAG, una de las tres mutaciones fundadoras de los Judíos Askenazi que causa la terminación de la proteína *BRCA1* en la posición aminoacídica 39. Diversos estudios han determinado que esta mutación tiene una alta penetrancia que pudo comprobarse en este trabajo ya que la paciente refirió tener al menos cinco parientes afectados con CM[98,99,100,101].

Similar al caso de la mutación *BRCA1* 185delAG, *BRCA1* 330^a>G es una mutación fundadora de la población española, originada en Galicia. Esta

mutación como ya se mencionó tiene dos efectos, el principal es la traducción del mensajero a una proteína trunca en la posición aminoacídica 64 y el segundo un cambio de arginina por glicina, probablemente por estos dos efectos que provoca es que esta mutación se ha reportado como de baja penetrancia[102,103].

La mutación *BRCA1* 2552delC fue reportada común en hispanos que residen en el sur de California, sin embargo todas las mutaciones se encontraron en pacientes mexicanos y/o con ascendencia mexicana. La frecuencia de esta mutación en el trabajo que se realizó en el centro del país fue del 18%. En este estudio, esta mutación representó el 50% de las mutaciones detectadas el gen *BRCA1*, lo que sugiere que pueda ser considerada como una mutación fundadora de la población mexicana, además de la delección de los exones 9 al 12[41]. Un estudio con un número mayor de muestras podría confirmar esta hipótesis. También existen reportes de que esta mutación ha sido detectada en coreanos y es interesante que desde 1905 se hayan documentado migraciones de coreanos a México[104]. Un análisis de ancestría en las pacientes podría determinar el origen de la mutación.

Los resultados de estudios en hispanos muestran que la mutación *BRCA1* 943ins10 es recurrente. Esta mutación tiene su origen en el oeste de África con un promedio de aparición de la enfermedad de 64 años a diferencia de este estudio donde a la paciente se le diagnosticó el CM a los 31 años[105].

La única mutación detectada en el gen *BRCA2* confirma las investigaciones previas que reportan una frecuencia de mutaciones en el gen *BRCA1* superior respecto a las del gen *BRCA2* en pacientes con CM. *BRCA2* 3492insT origina una proteína trunca en el dominio principal de función de *BRCA2* y ha sido reportada en diferentes poblaciones (españoles, estadounidenses, latinos/caribeños)[106].

Todas las pacientes fueron heterocigotas para las mutaciones que se detectaron, siendo una confirmación de los estudios donde se menciona que las mutaciones deletéreas que se presentan en homocigosis son incompatibles con la vida[107]. Esta evidencia representa una oportunidad de estudio en las parejas del sexo masculino de las pacientes para determinar el riesgo de abortos en portadores de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*.

Recopilar la información relevante de frecuencias en los genes de mediana y baja penetrancia que han sido reportados frecuentemente en hispanos para añadirla al HISPANEL, puede incrementar su sensibilidad en los casos de CMH.

CAPÍTULO VI

6. Conclusiones

El abordaje mediante el HISPANEL, del rastreo de mutaciones de línea germinal en genes asociados al CMH, en pacientes del noreste de México, permitió detectar estas en el 9.57% de las pacientes del grupo estudiado.

Este porcentaje de positividad para mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en pacientes con CM, cae dentro del rango esperado, lo que demuestra la utilidad del HISPANEL en el Noreste de México.

Con los resultados obtenidos del rastreo de las mutaciones, se está ahora en la posibilidad de ofrecer el asesoramiento genético a los familiares que tan desinteresada y altruistamente apoyaron este trabajo de investigación.

Referencias

1. Januszewski A, Tanna N, Stebbing J (2014) Ethnic variation in breast cancer incidence and outcomes-the debate continues. *Br J Cancer* 110: 4-6.
2. Antoine C, Ameye L, Paesmans M, Rozenberg S (2013) Systematic review about breast cancer incidence in relation to hormone replacement therapy use. *Climacteric*.
3. Autier P, Boniol M (2013) Effect of screening mammography on breast cancer incidence. *N Engl J Med* 368: 677.
4. Berman AT, Thukral AD, Hwang WT, Solin LJ, Vapiwala N (2013) Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment. *Clin Breast Cancer* 13: 88-94.
5. Cramer DW, Finn OJ (2013) Incidence rate of breast cancer in young women. *JAMA* 309: 2434-2435.
6. Fisher KJ, Lee JH, Ferrante JM, McCarthy EP, Gonzalez EC, et al. (2013) The effects of primary care on breast cancer mortality and incidence among Medicare beneficiaries. *Cancer* 119: 2964-2972.
7. Foca F, Mancini S, Bucchi L, Puliti D, Zappa M, et al. (2013) Decreasing incidence of late-stage breast cancer after the introduction of organized mammography screening in Italy. *Cancer* 119: 2022-2028.
8. Leclere B, Molinie F, Tretarre B, Stracci F, Daubisse-Marliac L, et al. (2013) Trends in incidence of breast cancer among women under 40 in seven European countries: a GRELL cooperative study. *Cancer Epidemiol* 37: 544-549.
9. Schwartz AM, Henson DE, Patel A (2013) Re: Age-specific incidence of breast cancer subtypes: understanding the Black-White crossover. *J Natl Cancer Inst* 105: 368-370.
10. Antoine C, Ameye L, Paesmans M, Rozenberg S (2012) Update of the evolution of breast cancer incidence in relation to hormone replacement therapy use in Belgium. *Maturitas* 72: 317-323.
11. Njor S, Nystrom L, Moss S, Paci E, Broeders M, et al. (2012) Breast cancer mortality in mammographic screening in Europe: a review of incidence-based mortality studies. *J Med Screen* 19 Suppl 1: 33-41.
12. INEGI (2012) Estadísticas a propósito del día internacional de la mujer.
13. Wernli KJ, O'Meara ES, Kerlikowske K, Miglioretti DL, Muller CY, et al. (2014) Investigation of mammographic breast density as a risk factor for ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 106: djt341.
14. Roman L, Meghea C, Ford S, Penner L, Hamade H, et al. (2014) Individual, provider, and system risk factors for breast and cervical cancer screening among underserved black, latina, and arab women. *J Womens Health (Larchmt)* 23: 57-64.
15. Lee H, Li JY, Fan JH, Li J, Huang R, et al. (2014) Risk factors for breast cancer among chinese women: a 10-year nationwide multicenter cross-sectional study. *J Epidemiol* 24: 67-76.
16. O'Brien KM, Cole SR, Engel LS, Bensen JT, Poole C, et al. (2014) Breast cancer subtypes and previously established genetic risk factors: a bayesian approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23: 84-97.
17. Qin Y, Zhou Y, Zhang X, Wei X, He J (2014) Sleep duration and breast cancer risk: A meta-analysis of observational studies. *Int J Cancer* 134: 1166-1173.

18. Grimaldi-Bensouda L, Cameron D, Marty M, Barnett AH, Penault-Llorca F, et al. (2014) Risk of breast cancer by individual insulin use: an international multicenter study. *Diabetes Care* 37: 134-143.
19. Bielinska B, Gaj P, Kluska A, Nowakowska D, Balabas A, et al. (2013) Association of the BRCA1 promoter polymorphism rs11655505 with the risk of familial breast and/or ovarian cancer. *Fam Cancer* 12: 691-698.
20. Blanco A, de la Hoya M, Osorio A, Diez O, Miramar MD, et al. (2013) Analysis of PALB2 gene in BRCA1/BRCA2 negative Spanish hereditary breast/ovarian cancer families with pancreatic cancer cases. *PLoS One* 8: e67538.
21. Narod SA, Rodriguez AA (2011) [Genetic predisposition for breast cancer: BRCA1 and BRCA2 genes]. *Salud Publica Mex* 53: 420-429.
22. Filippini SE, Vega A (2013) Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Front Biosci (Landmark Ed)* 18: 1358-1372.
23. Lianos GD, Zoras O, Roukos DH (2013) Beyond BRCA1/2: polygenic, 'polyfunctional' molecular circuitry model to predict breast cancer risk. *Biomark Med* 7: 675-678.
24. Chan M, Ji SM, Yeo ZX, Gan L, Yap E, et al. (2012) Development of a next-generation sequencing method for BRCA mutation screening: a comparison between a high-throughput and a benchtop platform. *J Mol Diagn* 14: 602-612.
25. Carraro DM, Koike Figueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepschi AC, et al. (2013) Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. *PLoS One* 8: e57581.
26. Bakker JL, Thirthagiri E, van Mil SE, Adank MA, Ikeda H, et al. (2014) A Novel Splice Site Mutation in the Non-coding Region of BRCA2: Implications for Fanconi Anemia and Familial Breast Cancer Diagnostics. *Hum Mutat*.
27. Dacheux E, Vincent A, Nazaret N, Combet C, Wierinckx A, et al. (2013) BRCA1-Dependent Translational Regulation in Breast Cancer Cells. *PLoS One* 8: e67313.
28. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Mayas D, Garcia-Santos E, Gomez-Serrano M, et al. (2012) Breast cancer 1 (BrCa1) may be behind decreased lipogenesis in adipose tissue from obese subjects. *PLoS One* 7: e33233.
29. Bensam M, Hafez E, Awad D, El-Saadani M, Balbaa M (2013) Detection of New Point Mutations of BRCA1 and BRCA2 in Breast Cancer Patients. *Biochem Genet*.
30. Berzina D, Nakazawa-Miklasevica M, Zestkova J, Aksenoka K, Irmejs A, et al. (2013) BRCA1/2 mutation screening in high-risk breast/ovarian cancer families and sporadic cancer patient surveilling for hidden high-risk families. *BMC Med Genet* 14: 61.
31. Campos B, Balmana J, Gardenyes J, Valenzuela I, Abad O, et al. (2013) Germline mutations in NF1 and BRCA1 in a family with neurofibromatosis type 1 and early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 139: 597-602.
32. Dobricic J, Brankovic-Magic M, Filipovic S, Radulovic S (2010) Novel BRCA1/2 mutations in Serbian breast and breast-ovarian cancer patients with hereditary predisposition. *Cancer Genet Cytogenet* 202: 27-32.
33. Hansen TV, Jonson L, Albrechtsen A, Steffensen AY, Bergsten E, et al. (2010) Identification of a novel BRCA1 nucleotide 4803delCC/c.4684delCC mutation and a nucleotide 249T>A/c.130T>A (p.Cys44Ser) mutation in two Greenlandic Inuit families: implications for genetic screening of Greenlandic Inuit families with high risk for breast and/or ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* 124: 259-264.
34. Glover JN (2006) Insights into the molecular basis of human hereditary breast cancer from studies of the BRCA1 BRCT domain. *Fam Cancer* 5: 89-93.

35. Brohet RM, Velthuizen ME, Hogervorst FB, Meijers-Heijboer HE, Seynaeve C, et al. (2013) Breast and ovarian cancer risks in a large series of clinically ascertained families with a high proportion of BRCA1 and BRCA2 Dutch founder mutations. *J Med Genet*.
36. Hashemian AH, Hajizadeh E, Kazemnejad A, Atri M, Mehdipour P (2009) Penetrance of BRCA1/BRCA2 specific gene mutations in Iranian women with breast cancer. *Saudi Med J* 30: 41-44.
37. Imyanitov EN (2009) Breast cancer therapy for BRCA1 carriers: moving towards platinum standard? *Hered Cancer Clin Pract* 7: 8.
38. Blay P, Santamaria I, Pitiot AS, Luque M, Alvarado MG, et al. (2013) Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer families from Asturias (Northern Spain). *BMC Cancer* 13: 243.
39. Tkatch R, Schwartz K, Shore RD, Penner LA, Simon MS, et al. (2013) Breast Cancer Incidence Rates Among Orthodox Jewish Women. *J Immigr Minor Health*.
40. Finkelman BS, Rubinstein WS, Friedman S, Friebel TM, Dubitsky S, et al. (2012) Breast and ovarian cancer risk and risk reduction in Jewish BRCA1/2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 30: 1321-1328.
41. Weitzel JN, Clague J, Martir-Negron A, Ogaz R, Herzog J, et al. (2013) Prevalence and type of BRCA mutations in Hispanics undergoing genetic cancer risk assessment in the southwestern United States: a report from the Clinical Cancer Genetics Community Research Network. *J Clin Oncol* 31: 210-216.
42. van der Merwe NC, Hamel N, Schneider SR, Apffelstaedt JP, Wijnen JT, et al. (2012) A founder BRCA2 mutation in non-Afrikaner breast cancer patients of the Western Cape of South Africa. *Clin Genet* 81: 179-184.
43. Garcia-Etienne CA, Barile M, Gentilini OD, Botteri E, Rotmensz N, et al. (2009) Breast-conserving surgery in BRCA1/2 mutation carriers: are we approaching an answer? *Ann Surg Oncol* 16: 3380-3387.
44. Maarse W, Jonasse Y, Ausems MG, Schipper ME, van Hillegersberg R (2009) First case of invasive breast cancer following prophylactic bilateral skin sparing mastectomy in a BRCA1 mutation carrier. *Eur J Surg Oncol* 35: 1016-1018.
45. Annunziata CM, Bates SE (2010) PARP inhibitors in BRCA1/BRCA2 germline mutation carriers with ovarian and breast cancer. *F1000 Biol Rep* 2.
46. Isakoff SJ (2010) PARP inhibition outside of BRCA mutation carriers. *Clin Adv Hematol Oncol* 8: 757-758.
47. Papi L, Putignano AL, Congregati C, Zanna I, Sera F, et al. (2009) Founder mutations account for the majority of BRCA1-attributable hereditary breast/ovarian cancer cases in a population from Tuscany, Central Italy. *Breast Cancer Res Treat* 117: 497-504.
48. Evans DG, Shenton A, Woodward E, Lalloo F, Howell A, et al. (2008) Penetrance estimates for BRCA1 and BRCA2 based on genetic testing in a Clinical Cancer Genetics service setting: risks of breast/ovarian cancer quoted should reflect the cancer burden in the family. *BMC Cancer* 8: 155.
49. Walker LC, Waddell N, Ten Haaf A, Grimmond S, Spurdle AB (2008) Use of expression data and the CGEMS genome-wide breast cancer association study to identify genes that may modify risk in BRCA1/2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 112: 229-236.
50. Brohet RM, Goldgar DE, Easton DF, Antoniou AC, Andrieu N, et al. (2007) Oral contraceptives and breast cancer risk in the international BRCA1/2 carrier cohort study: a report from EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and the IBCCS Collaborating Group. *J Clin Oncol* 25: 3831-3836.

51. Antoniou AC, Sinilnikova OM, Simard J, Leone M, Dumont M, et al. (2007) RAD51 135G-->C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. *Am J Hum Genet* 81: 1186-1200.
52. Evans DG, Ingham SL, Baildam A, Ross GL, Lalloo F, et al. (2013) Contralateral mastectomy improves survival in women with BRCA1/2-associated breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 140: 135-142.
53. Chapman JS, Powell CB, McLennan J, Crawford B, Mak J, et al. (2011) Surveillance of survivors: follow-up after risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA 1/2 mutation carriers. *Gynecol Oncol* 122: 339-343.
54. Collins IM, Milne RL, Weideman PC, McLachlan SA, Friedlander ML, et al. (2013) Preventing breast and ovarian cancers in high-risk BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Med J Aust* 199: 680-683.
55. Powell CB, Chen LM, McLennan J, Crawford B, Zaloudek C, et al. (2011) Risk-reducing salpingo-oophorectomy (RRSO) in BRCA mutation carriers: experience with a consecutive series of 111 patients using a standardized surgical-pathological protocol. *Int J Gynecol Cancer* 21: 846-851.
56. Huijts PE, Hollestelle A, Balliu B, Houwing-Duistermaat JJ, Meijers CM, et al. (2014) CHEK2*1100delC homozygosity in the Netherlands-prevalence and risk of breast and lung cancer. *Eur J Hum Genet* 22: 46-51.
57. de Garibay GR, Diaz A, Gavina B, Romero A, Garre P, et al. (2013) Low prevalence of SLX4 loss-of-function mutations in non-BRCA1/2 breast and/or ovarian cancer families. *Eur J Hum Genet* 21: 883-886.
58. Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, Peterlongo P, Dominguez O, et al. (2013) Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. *PLoS One* 8: e55681.
59. Kumar P, Mukherjee M, Johnson JP, Patel M, Huey B, et al. (2012) Cooperativity of Rb, Brca1, and p53 in malignant breast cancer evolution. *PLoS Genet* 8: e1003027.
60. Kuusisto KM, Bebel A, Vihinen M, Schleutker J, Sallinen SL (2011) Screening for BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD50, and CDH1 mutations in high-risk Finnish BRCA1/2-founder mutation-negative breast and/or ovarian cancer individuals. *Breast Cancer Res* 13: R20.
61. Pabalan N, Jarjanazi H, Ozcelik H (2013) Association between BRIP1 (BACH1) polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 137: 553-558.
62. Brodie KM, Mok MT, Henderson BR (2012) Characterization of BARD1 targeting and dynamics at the centrosome: the role of CRM1, BRCA1 and the Q564H mutation. *Cell Signal* 24: 451-459.
63. Sabatier R, Adelaide J, Finetti P, Ferrari A, Huiart L, et al. (2010) BARD1 homozygous deletion, a possible alternative to BRCA1 mutation in basal breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 49: 1143-1151.
64. Fachal L, Santamarina M, Blanco A, Carracedo A, Vega A (2013) CHEK2 c.1100delC mutation among non-BRCA1/2 Spanish hereditary breast cancer families. *Clin Transl Oncol* 15: 164-165.
65. Guenard F, Pedneault CS, Ouellette G, Labrie Y, Simard J, et al. (2010) Evaluation of the contribution of the three breast cancer susceptibility genes CHEK2, STK11, and PALB2 in non-BRCA1/2 French Canadian families with high risk of breast cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 14: 515-526.

66. Cybulski C, Gorski B, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, et al. (2009) Effect of CHEK2 missense variant I157T on the risk of breast cancer in carriers of other CHEK2 or BRCA1 mutations. *J Med Genet* 46: 132-135.
67. Skasko E, Kluska A, Niwinska A, Kwiatkowska E, Balabas A, et al. (2009) Age at onset of bilateral breast cancer, the presence of hereditary BRCA1, BRCA2, CHEK2 gene mutations and positive family history of cancer. *Onkologie* 32: 182-188.
68. Loizidou MA, Cariolou MA, Neuhausen SL, Newbold RF, Bashiardes E, et al. (2010) Genetic variation in genes interacting with BRCA1/2 and risk of breast cancer in the Cypriot population. *Breast Cancer Res Treat* 121: 147-156.
69. Desjardins S, Beauparlant JC, Labrie Y, Ouellette G, Durocher F (2009) Variations in the NBN/NBS1 gene and the risk of breast cancer in non-BRCA1/2 French Canadian families with high risk of breast cancer. *BMC Cancer* 9: 181.
70. Johnson J, Healey S, Khanna KK, Chenevix-Trench G (2011) Mutation analysis of RAD51L1 (RAD51B/REC2) in multiple-case, non-BRCA1/2 breast cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 129: 255-263.
71. Rodriguez-Lopez R, Osorio A, Ribas G, Pollan M, Sanchez-Pulido L, et al. (2004) The variant E233G of the RAD51D gene could be a low-penetrance allele in high-risk breast cancer families without BRCA1/2 mutations. *Int J Cancer* 110: 845-849.
72. Cao AY, Huang J, Hu Z, Li WF, Ma ZL, et al. (2009) The prevalence of PALB2 germline mutations in BRCA1/BRCA2 negative Chinese women with early onset breast cancer or affected relatives. *Breast Cancer Res Treat* 114: 457-462.
73. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, et al. (2011) Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 18032-18037.
74. Lee DS, Yoon SY, Looi LM, Kang P, Kang IN, et al. (2012) Comparable frequency of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutations in a multi-ethnic Asian cohort suggests TP53 screening should be offered together with BRCA1/2 screening to early-onset breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 14: R66.
75. Holstege H, Joosse SA, van Oostrom CT, Nederlof PM, de Vries A, et al. (2009) High incidence of protein-truncating TP53 mutations in BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res* 69: 3625-3633.
76. Manie E, Vincent-Salomon A, Lehmann-Che J, Pierron G, Turpin E, et al. (2009) High frequency of TP53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors. *Cancer Res* 69: 663-671.
77. Arcand SL, Maugard CM, Ghadirian P, Robidoux A, Perret C, et al. (2008) Germline TP53 mutations in BRCA1 and BRCA2 mutation-negative French Canadian breast cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 108: 399-408.
78. Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Nishimura Y, Matsuda S (2011) Alternative splicings on p53, BRCA1 and PTEN genes involved in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 413: 395-399.
79. Guenard F, Labrie Y, Ouellette G, Beauparlant CJ, Bessette P, et al. (2007) Germline mutations in the breast cancer susceptibility gene PTEN are rare in high-risk non-BRCA1/2 French Canadian breast cancer families. *Fam Cancer* 6: 483-490.
80. Tipirisetti NR, Govatati S, Kandukuri LR, Cingeetham A, Singh L, et al. (2013) Association of E-cadherin single-nucleotide polymorphisms with the increased risk of breast cancer: a study in South Indian women. *Genet Test Mol Biomarkers* 17: 494-500.

81. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C (2001) Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 121: 1348-1353.
82. Grana B, Fachal L, Darder E, Balmana J, Ramon YCT, et al. (2011) Germline ATM mutational analysis in BRCA1/BRCA2 negative hereditary breast cancer families by MALDI-TOF mass spectrometry. *Breast Cancer Res Treat* 128: 573-579.
83. Brunet J, Gutierrez-Enriquez S, Torres A, Berez V, Sanjose S, et al. (2008) ATM germline mutations in Spanish early-onset breast cancer patients negative for BRCA1/BRCA2 mutations. *Clin Genet* 73: 465-473.
84. Baynes C, Healey CS, Pooley KA, Scollen S, Luben RN, et al. (2007) Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 9: R27.
85. Ceber E, Mermer G, Okcin F, Sari D, Demireloz M, et al. (2013) Breast cancer risk and early diagnosis applications in Turkish women aged 50 and over. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 5877-5882.
86. Shaukat U, Ismail M, Mehmood N (2013) Epidemiology, major risk factors and genetic predisposition for breast cancer in the pakistani population. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 5625-5629.
87. Berliner JL, Fay AM, Cummings SA, Burnett B, Tillmanns T (2013) NSGC practice guideline: risk assessment and genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer. *J Genet Couns* 22: 155-163.
88. Peshkin BN, DeMarco TA, Garber JE, Valdimarsdottir HB, Patenaude AF, et al. (2009) Brief assessment of parents' attitudes toward testing minor children for hereditary breast/ovarian cancer genes: development and validation of the Pediatric BRCA1/2 Testing Attitudes Scale (P-TAS). *J Pediatr Psychol* 34: 627-638.
89. Weitzel JN, Lagos VI, Herzog JS, Judkins T, Hendrickson B, et al. (2007) Evidence for common ancestral origin of a recurring BRCA1 genomic rearrangement identified in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 1615-1620.
90. Torres D, Rashid MU, Seidel-Renkert A, Weitzel JN, Briceno I, et al. (2009) Absence of the BRCA1 del (exons 9-12) mutation in breast/ovarian cancer families outside of Mexican Hispanics. *Breast Cancer Res Treat* 117: 679-681.
91. Calderon-Garciduenas AL, Ruiz-Flores P, Cerda-Flores RM, Barrera-Saldana HA (2005) Clinical follow up of mexican women with early onset of breast cancer and mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Salud Publica Mex* 47: 110-115.
92. Vidal-Millan S, Taja-Chayeb L, Gutierrez-Hernandez O, Ramirez Ugalde MT, Robles-Vidal C, et al. (2009) Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Mexican breast cancer patients. *Eur J Gynaecol Oncol* 30: 527-530.
93. Winchester E, Hodgson SV (2006) Psychosocial and ethical issues relating to genetic testing for BRCA1 and BRCA2 breast cancer susceptibility genes. *Womens Health (Lond Engl)* 2: 357-373.
94. Weitzel JN, Blazer KR, Macdonald DJ, Culver JO, Offit K (2011) Genetics, genomics, and cancer risk assessment: State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine. *CA Cancer J Clin*.
95. Vos J, Oosterwijk JC, Gomez-Garcia E, Menko FH, Collee MJ, et al. (2012) Exploring the short-term impact of DNA-testing in breast cancer patients: the counselees' perception matters, but the actual BRCA1/2 result does not. *Patient Educ Couns* 86: 239-251.

96. Vaca-Paniagua F, Alvarez-Gomez RM, Fragoso-Ontiveros V, Vidal-Millan S, Herrera LA, et al. (2012) Full-exon pyrosequencing screening of BRCA germline mutations in Mexican women with inherited breast and ovarian cancer. *PLoS One* 7: e37432.
97. Vega A, Campos B, Bressac-De-Paillerets B, Bond PM, Janin N, et al. (2001) The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum Mutat* 17: 520-521.
98. Shiri-Sverdlov R, Oefner P, Green L, Baruch RG, Wagner T, et al. (2000) Mutational analyses of BRCA1 and BRCA2 in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jewish women with familial breast and ovarian cancer. *Hum Mutat* 16: 491-501.
99. Sanabria MC, Munioz G, Vargas CI (2009) [Mutations in the BRCA1 gene (185delAG and 5382insC) are not present in any of the 30 breast cancer patients analyzed from eastern Colombia]. *Biomedica* 29: 61-72.
100. Kadalmani K, Deepa S, Bagavathi S, Anishetty S, Thangaraj K, et al. (2007) Independent origin of 185delAG BRCA1 mutation in an Indian family. *Neoplasma* 54: 51-56.
101. Jara L, Ampuero S, Seccia L, Bustamante M, Blanco R, et al. (2002) [Frequency of the 185delAG mutation in the BRCA1 gene in Chilean healthy women with family history of breast cancer]. *Rev Med Chil* 130: 1113-1123.
102. Diez O, Osorio A, Duran M, Martinez-Ferrandis JI, de la Hoya M, et al. (2003) Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat* 22: 301-312.
103. Milne RL, Osorio A, Cajal TR, Vega A, Llorca G, et al. (2008) The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. *Clin Cancer Res* 14: 2861-2869.
104. Ginsburg OM, Dinh NV, To TV, Quang LH, Linh ND, et al. (2011) Family history, BRCA mutations and breast cancer in Vietnamese women. *Clin Genet* 80: 89-92.
105. Vogel KJ, Atchley DP, Erlichman J, Broglio KR, Ready KJ, et al. (2007) BRCA1 and BRCA2 genetic testing in Hispanic patients: mutation prevalence and evaluation of the BRCAPRO risk assessment model. *J Clin Oncol* 25: 4635-4641.
106. Campos B, Diez O, Domenech M, Baena M, Pericay C, et al. (2001) BRCA2 mutation analysis of 87 Spanish breast/ovarian cancer families. *Ann Oncol* 12: 1699-1703.
107. Lecarpentier J, Nogues C, Mouret-Fourme E, Gauthier-Villars M, Lasset C, et al. (2012) Variation in breast cancer risk associated with factors related to pregnancies according to truncating mutation location, in the French National BRCA1 and BRCA2 mutations carrier cohort (GENEPSO). *Breast Cancer Res* 14: R99.