



APLICACIÓ DE TÈCNiques ÒMIQUES PER A LA MILLORA DEL DIAGNÒSTIC EN LA SÍNDROME DE CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI.

Marta Rodríguez Balada

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

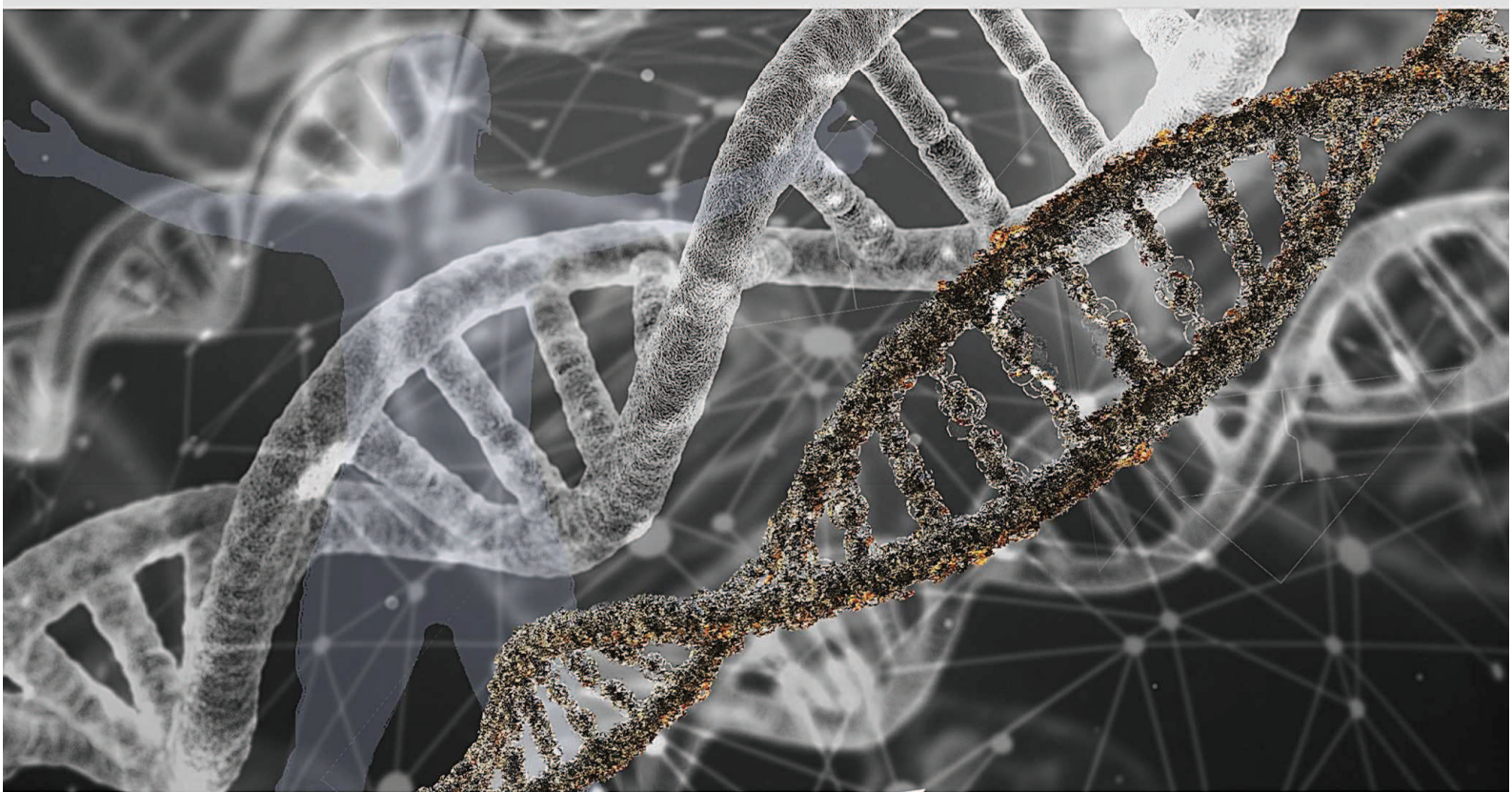
WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Aplicació de tècniques òmiques per a la millora del diagnòstic en la síndrome de càncer de mama i ovari hereditari

Marta Rodríguez Balada



TESI DOCTORAL
2020

Marta Rodríguez Balada

Aplicació de tècniques òmiques per a la millora del diagnòstic en la síndrome de càncer de mama i ovari hereditari.

TESI DOCTORAL

Dirigida per la Dra. Lourdes Martorell i pel Dr. Josep Gumà

Departament de Medicina i Cirurgia



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

Reus, 2020

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

APLICACIÓ DE TÈCNiques ÒMIQUES PER A LA MILLORA DEL DIAGNÒSTIC EN LA SÍNDROME DE CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI.

Marta Rodríguez Balada

Disseny de la portada,

Antonio Rodríguez Vico i Irene Balada Asensio

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

APLICACIÓ DE TÈCNiques ÒMIQUES PER A LA MILLORA DEL DIAGNÒSTIC EN LA SÍNDROME DE CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI.

Marta Rodríguez Balada

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

APLICACIÓ DE TÈCNiques ÒMIQUES PER A LA MILLORA DEL DIAGNÒSTIC EN LA SÍNDROME DE CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI.

Marta Rodríguez Balada



UNIVERSITAT ROVIRA i VIRGILI

Departament de Medicina i Cirurgia

C/Sant Llorenç, 21

43201 Reus

Tel. 977 75 93 45

FEM CONSTAR que aquest treball, titulat “**Aplicació de tècniques òmiques per a la millora del diagnòstic en la síndrome de càncer de mama i ovari hereditari**”, que presenta la Marta Rodríguez Balada per a l’obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d’aquesta universitat.

Reus, agost del 2020

Els directors de la tesi doctoral

Dra. Lourdes Martorell Bonet

Dr. Josep Gumà Padró

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

APLICACIÓ DE TÈCNiques ÒMIQUES PER A LA MILLORA DEL DIAGNÒSTIC EN LA SÍNDROME DE CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI.

Marta Rodríguez Balada

No té gens d'importància com de poc a poc vagis, sempre que no t'aturis.

Confuci

Si no escales la muntanya mai podràs gaudir del paisatge.

Pablo Neruda

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

APLICACIÓ DE TÈCNiques ÒMIQUES PER A LA MILLORA DEL DIAGNÒSTIC EN LA SÍNDROME DE CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI.

Marta Rodríguez Balada

Agraïments

Tot i que ha estat un procés llarg, crec que finalment puc dir que estic contenta d'haver fet la tesi que em venia de gust fer, per a millorar el meu dia a dia i per aprendre de diferents àmbits que fins ara no havia pogut explorar. I tot va començar un dia entrant al despatx de la Dra. Martorell i, per tant, no estaria escrivint aquestes línies si no m'hagués donat l'oportunitat d'iniciar-me en aquest món i d'endinsar-me en l'univers genètic. Així que gràcies Lourdes per tot el que m'has aportat i per haver-me acompanyat en aquest camí.

Moltíssimes gràcies al Dr. Borràs i al Dr. Gumà per empènyer-me en fer la tesi. I mil gràcies Pep, per les voltes i voltes que li hem anat donant a la tesi, i les hores que li has dedicat, sempre respectant el meu treball.

No em deixaré a la Bàrbara, que en aquesta tesi hi ha la suor, inspiració, riures i rabietes de totes dues. I a la Mireia, la Sara, la Cinta, la Montse i la Mònica, que vau suar tinta amb els resultats dels panells...

A la Nerea, l'Helena i la Lorena, que sembla que els nostres camins sempre van en paral·lel i molt sovint es creuen.

A la meva amiga Sara, per a l'empenta final que m'has fet... "has sido un soplo de aire fresco".

La Mònica, la Sandra, l'Anna, l'Estrella i la Cristina, que sembla que aquesta tesi és ja de totes... i les ganes que tenim totes de que s'acabi...

A tots els coautors de les publicacions i especialment al Xavier Correig, que vas creure en una inspiració que per alguns no semblava que hagués d'anar a cap lloc...

A la Cristina, que té més fe en mi que jo mateixa...

I a tota, TOTA la meva família, que aquesta tesi és com un membre més i que tots tenim ganes ja de conèixer: Als meus pares, que sempre esteu. Per tot. I que sense el vostre recolzament, empena i força, avui no estaríem aquí. I a tu, Elena, que sempre tens raó (i no ho diré mai més) i que si no fos pels teus consells, tampoc estaria aquí. A les tietes, que no pregunten, quan saben que és millor no preguntar. I per últim, però perquè sou molt importants, als meus homes, Jordi i Joan, que em mireu com si el que faig fos el més important del món i no em deixeu defallir...us estimo.

En resum....MIL GRÀCIES!

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

APLICACIÓ DE TÈCNiques ÒMIQUES PER A LA MILLORA DEL DIAGNÒSTIC EN LA SÍNDROME DE CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI.

Marta Rodríguez Balada

Índex

RESUM	13
ABREVIATURES	17
I. INTRODUCCIÓ	19
1. Bases genètiques del Càncer Hereditari	21
1.1. VIES DE REPARACIÓ DE L'ADN	24
1.2. VIES D'INACTIVACIÓ GÈNICA	29
1.2.1. Alteracions Genètiques o Mutacions	30
1.2.2. Pèrdua d'heterozigositat (<i>Loss of heterozygosity</i> - LOH).....	32
1.2.3. Hipermetilació del promotor.....	33
2. Càncer de mama i ovari hereditari (CMOH)	35
2.1. ETIOLOGIA DEL CMOH	38
2.1.1. <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	38
2.1.2. Altres Gens i Síndromes Relacionades	42
2.1.2.1. <i>ATM</i>	42
2.1.2.2. <i>BARD1</i>	44
2.1.2.3. <i>BRIP1</i>	44
2.1.2.4. <i>CDH1</i>	45
2.1.2.5. <i>CHEK2</i>	45
2.1.2.6. <i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i> (gens MMR).....	45
2.1.2.7. <i>TP53</i>	46
2.1.2.8. <i>PALB2</i>	46
2.1.2.9. <i>PTEN</i>	47
2.1.2.10. <i>RAD51C</i> i <i>RAD51D</i>	47
2.1.2.11. <i>STK11</i>	47
2.1.2.12. COMPLEX MRN	48
2.1.3. Sistemes de classificació de les variants genètiques en CMOH.....	48
2.1.3.1. Classificació de les variants dels gens <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i>	48
a) Evidències directes	49
b) Evidències indirectes	51
c) Model probabilístic multifactorial	54
2.1.3.2. Classificació de les variants en altres gens de càncer hereditari	55
2.2. Expressió fenotípica del CMOH.....	59
2.2.1. Càncer de Mama	60
2.2.2. Càncer d'Ovari	63
2.2.3. BRCAness.....	64
3. Assessorament genètic en CMOH	66
3.1. El procés de l'assessorament genètic	66
3.2. Resultats de l'estudi genètic	68
3.3. Aspectes legals del consell genètic	70
II. HIPÒTESI I OBJECTIUS	71

III. RESULTATS	77
1. In silico, in Vitro and case-control analyses as an effective combination for analyzing BRCA1 and BRCA2 unclassified variants in a population-based sample.....	79
2. Germline promoter hypermethylation in <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> genes is not present in hereditary breast cancer patients.....	89
3. Identification of germline pathogenic variants in DNA damage repair genes by a next-generation sequencing multigene panel in BRCAX patients.....	97
4. Metabolomics reveals novel blood plasma biomarkers associated to the BRCA1-mutated phenotype of human breast cancer.....	109
IV. DISCUSSIÓ	123
V. CONCLUSIONS	141
VI. BIBLIOGRAFIA	147
GLOSSARI	167

Resum

Tot i que el càncer hereditari representa un proporció molt baixa de la totalitat de casos de càncer diagnosticats, aquesta és prou significativa. Aproximadament entre un 5-10% dels tumors són conseqüència d'alteracions genètiques heretades dels progenitors i/o que es poden transmetre a la descendència. Per tant, les persones afectades poden beneficiar-se de l'assessorament genètic que les ajudarà a prendre decisions mèdiques informades basades en l'avaluació del risc individual.

En l'estudi molecular del càncer hereditari, l'objectiu és identificar l'alteració genètica responsable de la predisposició a desenvolupar la malaltia en un individu. Amb aquest objectiu, cal trobar estratègies per a la detecció de les variants genètiques implicades en el seu desenvolupament.

De tots els individus amb una clara història personal i/o familiar de càncer hereditari, només s'aconsegueix trobar l'alteració genètica hereditària responsable en el 15% dels casos. A vegades es detecten variants genètiques amb un significat biològic i clínic desconegut. Per aquest motiu aquestes es coneixen com a variants de significat incert (VUS, de l'anglès, *Variant of Uncertain Significance*). Poder conèixer quin és l'efecte d'aquestes VUS i poder classificar-les segons la seva rellevància clínica és, per tant, molt important. Per aquest motiu s'han creat consorcis internacionals, com el consorci *Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles* (ENIGMA), que basa els seus projectes i col·laboracions en classificar aquestes variants.

En els estudis moleculars del càncer de mama i ovari hereditari (CMOH), no es disposa de cap tècnica de laboratori senzilla per al cribratge dels pacients candidats a realitzar un estudi genètic. Una estratègia per a obtenir aquesta eina

de cribratge és l'ús de la metabolòmica, que permet establir perfils característics en diferents patologies segons la presència de certs metabòlits.

D'altra banda, l'estudi dels gens *BRCA1* i *BRCA2* no només es limita a la línia germinal. S'ha descrit que quan els tumors són portadors de variants patogèniques en els gens *BRCA1* i *BRCA2*, presenten un dèficit en un sistema de reparació de l'ADN: el sistema de recombinació homòloga. Aquest comportament del tumor es coneix com a fenotip *BRCAness*. S'ha observat que alguns tumors, tot i no presentar alteracions genètiques amb un efecte deleteri en aquests gens, també són tumors *BRCAness*. Per això actualment existeixen línies d'investigació basades en la identificació dels mecanismes que donen lloc a aquest fenotip *BRCAness*. Hi ha diferents estratègies per a poder aclarir aquest fet, com ara buscar alteracions genètiques en altres gens, o buscar altres mecanismes d'inactivació com poden ser mecanismes epigenètics.

En l'àmbit de l'oncologia clínica, algunes alteracions genètiques, tant en tumor com en línia germinal, poden ser utilitzades com a factors predictius de resposta als diferents tractaments antineoplàstics. En el camp que ens ocupa, la mutació en els gens *BRCA1* i *BRCA2* es relaciona amb la resposta als tractaments amb inhibidors de PARP (*Poly ADP-Ribose Polymerase*) en el càncer d'ovari. Per tant, la seva identificació té un valor important en la selecció del tractament en la pràctica mèdica habitual.

Aquesta tesi doctoral pretén avançar en el diagnòstic del CMOH mitjançant quatre estudis. En un primer treball l'objectiu és determinar amb més exactitud la possible patogenicitat d'un conjunt de VUS. Per això s'ha realitzat un estudi cas-control poblacional, amb l'objectiu de conèixer la freqüència d'algunes variants identificades freqüentment en la cohort estudiada, i també mitjançant la combinació d'eines bioinformàtiques amb l'anàlisi de l'ARN missatger, per a detectar alteracions en el procés d'empalmament. En un segon estudi la finalitat

és esbrinar si el mecanisme d'hipermetilació del promotor dels gens *BRCA1* i *BRCA2* és un mecanisme heretable i responsable de la síndrome de CMOH. En un tercer estudi l'objectiu és identificar altres gens que puguin ser els causants del càncer hereditari en famílies no portadores de variants patogèniques ens els gens *BRCA1* i *BRCA2*, mitjançant la tècnica de la seqüenciació massiva. I finalment en un quart estudi es pretén determinar si els pacients amb una mutació en *BRCA1* o *BRCA2* presenten un perfil metabolòmic en plasma diferent als pacients sense mutació en aquests gens.

Mitjançant l'estudi cas-control s'ha pogut classificar com a variants no patogèniques tres de les variants analitzades (c.4068G>A, c.8851G>A i c.7008-62A>G del gen *BRCA2*). A més a més, s'ha pogut confirmar una concordança total de la predicció de les eines *in silico* i de l'efecte de quatre variants en l'alteració que pateixen en el procés d'empalmament. Per altra banda, mitjançant un segon estudi, s'ha descartat la hipermetilació del promotor dels gens *BRCA1* i *BRCA2* com a procés d'inactivació hereditària d'aquests gens. En tercer lloc, s'ha obtingut una millora en el rendiment diagnòstic mitjançant l'estudi d'un panell de gens relacionat amb les vies de reparació de l'ADN, reduint un 8% els estudis no informatius, principalment per la identificació de variants patogèniques en el gen *PALB2*. Finalment, en un quart estudi, s'ha identificat un perfil metabolòmic que permet distingir un fenotip *BRCA-like*, és a dir, un comportament tumoral de dèficit de la via de reparació de l'ADN on hi intervenen *BRCA1* i *BRCA2*, tot i no presentar mutacions en aquests gens.

Abreviatures

ACMG	de l'anglès <i>American College of Medical Genetics</i>
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ssDNA	ADN de cadena simple. De l'anglès <i>single-stranded DeoxyriboNucleic Acid</i>
cDNA	ADN complementari (ADNc). De l'anglès <i>complementay Deoxyribonucleic Acid</i>
AMP	de l'anglès <i>Association for Molecular Pathology</i>
ARN	Àcid ribonucleic
mRNA	ARN missatger. De l'anglès <i>messenger RiboNucleic Acid</i>
BER	Reparació per escissió de bases. De l'anglès <i>Base Excision Repair</i>
CMOH	Càncer de mama i ovari hereditari
DNMT	Metiltransferasa d'ADN. De l'anglès <i>DNA methyltransferase</i>
DSB	Trencament de doble cadena. De l'anglès <i>Double Strand Break</i>
EGFR	Factor de creixement epidèrmic humà. De l'anglès <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> .
ENIGMA	De l'anglès <i>Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles</i>
HER2	<i>Huma Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> . També conegut com HER2/neu o ERBB2
HR	Recombinació Homòloga. De l'anglès <i>Homologous Recombination</i>
IOCS	Institut d'Oncologia de la Catalunya Sud
LOD	Logaritme de les probabilitats. De l'anglès: <i>Logarithm of the odds</i>
LOH	Pèrdua d'heterozigositat. De l'anglès <i>Loss of Heterozigosity</i>
MLPA	De l'anglès <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MMR	Reparació de bases desaparellades. De l'anglès <i>MisMatch Repair</i>

MS	Espectrometria de masses. De l'anglès <i>Mass Spectrometry</i>
MSI	Inestabilitat de microsatèl·lits. De l'anglès <i>MicroSatellite Instability</i>
NCCN	De l'anglès <i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NER	Reparació de nucleòtids per escissió. De l'anglès <i>Nucleotide Excision Repair</i>
NGS	De l'anglès <i>Next Generation Sequencing</i>
NHEJ	Unió d'extrems no homòlegs. De l'anglès <i>Non-Homologous End Joining</i>
OMIM	De l'anglès <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PARP	De l'anglès <i>Poli-ADP-Ribose Polymerase</i>
RE	Receptors d'estrògens
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
RP	Receptors de progesterona
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SNP	De l'anglès <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
UKCFSG	De l'anglès <i>UK Cancer Family Study Group</i>
VUS	Variant de significat incert o variant de significat biològic desconegut. De l'anglès <i>Variant of uncertain significance</i>

I. INTRODUCCIÓ

1. Bases genètiques del Càncer Hereditari

Durant el segle XX, molts autors van recollir evidències d'agregacions familiars de càncer de mama (Jacobsen, Oluf and Fraser, 1946; Henry T Lynch, 1967; Macklin, 1959). L'any 1966, Henry Lynch va descriure dues famílies amb un espectre similar de càncers, caracteritzades per la presència de múltiples generacions de càncer colorectal. Va proposar que l'herència era l'etiologia més probable del càncer en aquestes famílies (H T Lynch et al., 1966). A finals dels anys 80, Mary-Claire King va estudiar l'agregació de càncer de mama precoç (Newman et al., 1988). Amb tot això es va demostrar la naturalesa hereditària d'algunes agregacions familiars de càncer, principalment les que afectaven a mama i còlon. Mitjançant anàlisi de lligament i clonació es va poder determinar l'existència dels gens relacionats amb aquesta predisposició al càncer (Hall et al., 1990; Wooster et al., 1995).

Per tant, tot i que la major part dels càncers són d'origen esporàdic o no hereditaris (és a dir, són deguts a alteracions genètiques i/o epigenètiques a nivell del teixit d'un òrgan específic), sabem que aproximadament un 5-10% es consideren d'origen hereditari (Figura 1). Es coneixen com a síndromes hereditàries o germinals degut a que són causades per una alteració genètica provinent d'una de les cèl·lules germinals que posteriorment donarà lloc al zigot. Aquesta alteració genètica heretada pot estar present en gens d'elevat risc, en gens de risc moderat o en gens de baix risc (Figura 2).

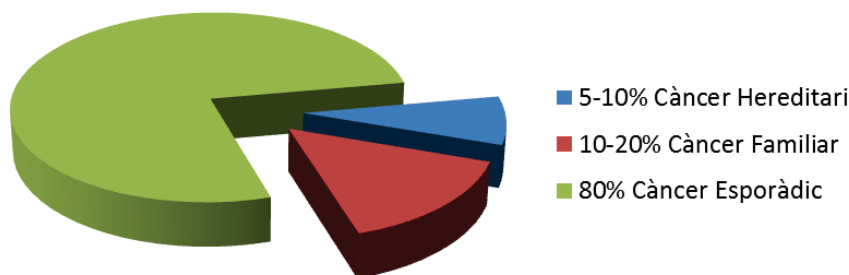


Figura 1. Els tipus de càncer més comuns són majoritàriament esporàdics. Entre un 5-10% són heretats i es produeixen per la presència de variants patogèniques germinals. Entre un 10-20% de tots els càncer diagnosticats són considerats "familiar" i produïts segurament per una interacció de gens de baixa penetrància i/o la interacció gen-ambient .

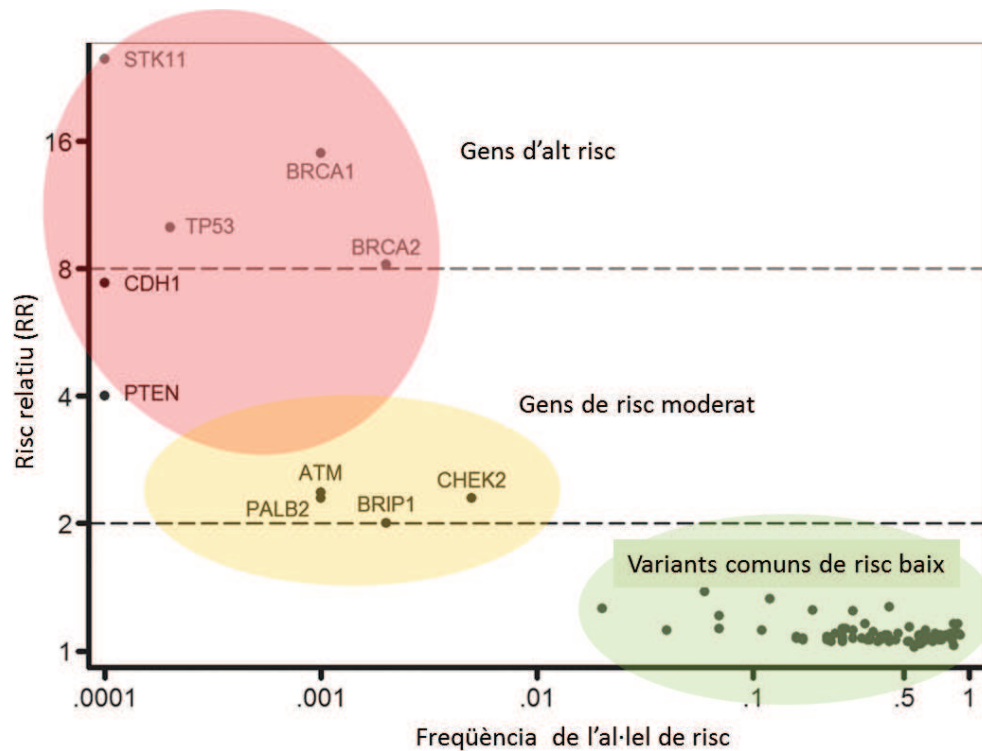


Figura 2. Relació entre el risc relatiu (RR) per a CMOH i la freqüència de l'al·lel de risc que conté variants genètiques en els gens de susceptibilitat per CMOH. Figura adaptada de Ghossaini et al., 2013.

Les principals síndromes de càncer hereditari que s'estudien són majoritàriament malalties monogèniques (causades per un únic gen), amb una herència autosòmica dominant i que comporten un risc important en la susceptibilitat al càncer hereditari (gens d'alt o moderat risc).

Fins al dia d'avui, s'han descrit al voltant de 200 gens responsables de síndromes hereditàries en càncer (Nagy et al., 2004). Aquests gens acostumen a estar implicats en el control del cycle cel·lular o en mecanismes de reparació de l'ADN donant lloc a un espectre tumoral característic. A més a més, cada gen i cada síndrome presenten una penetrància i expressivitat o heterogeneïtat clínica característica, que s'ha de tenir en compte per a dur a terme el procés d'assessorament genètic adequat. La identificació d'una mutació en una família,

permet millorar el diagnòstic precoç la qual cosa comporta una reducció de la mortalitat associada als tumors característics de la síndrome. Cal destacar que en alguns casos el coneixement de la mutació responsable pot ser útil per a la planificació de certs tractaments oncològics.

1.1. VIES DE REPARACIÓ DE L'ADN

El manteniment de la integritat i fidelitat del genoma és essencial pel bon funcionament i supervivència dels organismes (Lindahl, 1993). Ens referim a la integritat del genoma com el manteniment de tots els elements genètics, inclosos l'ADN, l'ARN i els elements epigenètics cel·lulars. La fidelitat del genoma implica una transmissió del material genètic correcta després de la duplicació cel·lular. El genoma està sotmès contínuament a canvis i necessita mecanismes per a la seva reparació per a disminuir el nombre d'alteracions que es transmeten. És per això que és important l'existència d'un bon sistema de replicació de l'ADN i de sistemes de reparació de l'ADN que puguin rectificar els danys que presenta (Figura 3). Amb aquest objectiu, les cèl·lules eucariotes han desenvolupat una sèrie de respostes cel·lulars per eliminar o corregir una lesió o error en l'ADN, o per a l'activació del procés de mort cel·lular programada, quan aquests errors no s'han pogut corregir. Aquestes respostes inclouen: 1) eliminació del dany de l'ADN i restauració de la continuïtat de la doble hèlix; 2) activació dels punts de control dels danys de l'ADN que aturen el cicle cel·lular per a poder reparar l'error abans de continuar la divisió cel·lular; 3) inducció de la transcripció de gens involucrats en la reparació de la lesió; i 4) apoptosi, per eliminar aquelles cèl·lules amb una lesió severa i/o irreversible (Zhou & Elledge, 2000). Defectes en qualsevol d'aquestes vies poden causar inestabilitat genòmica.

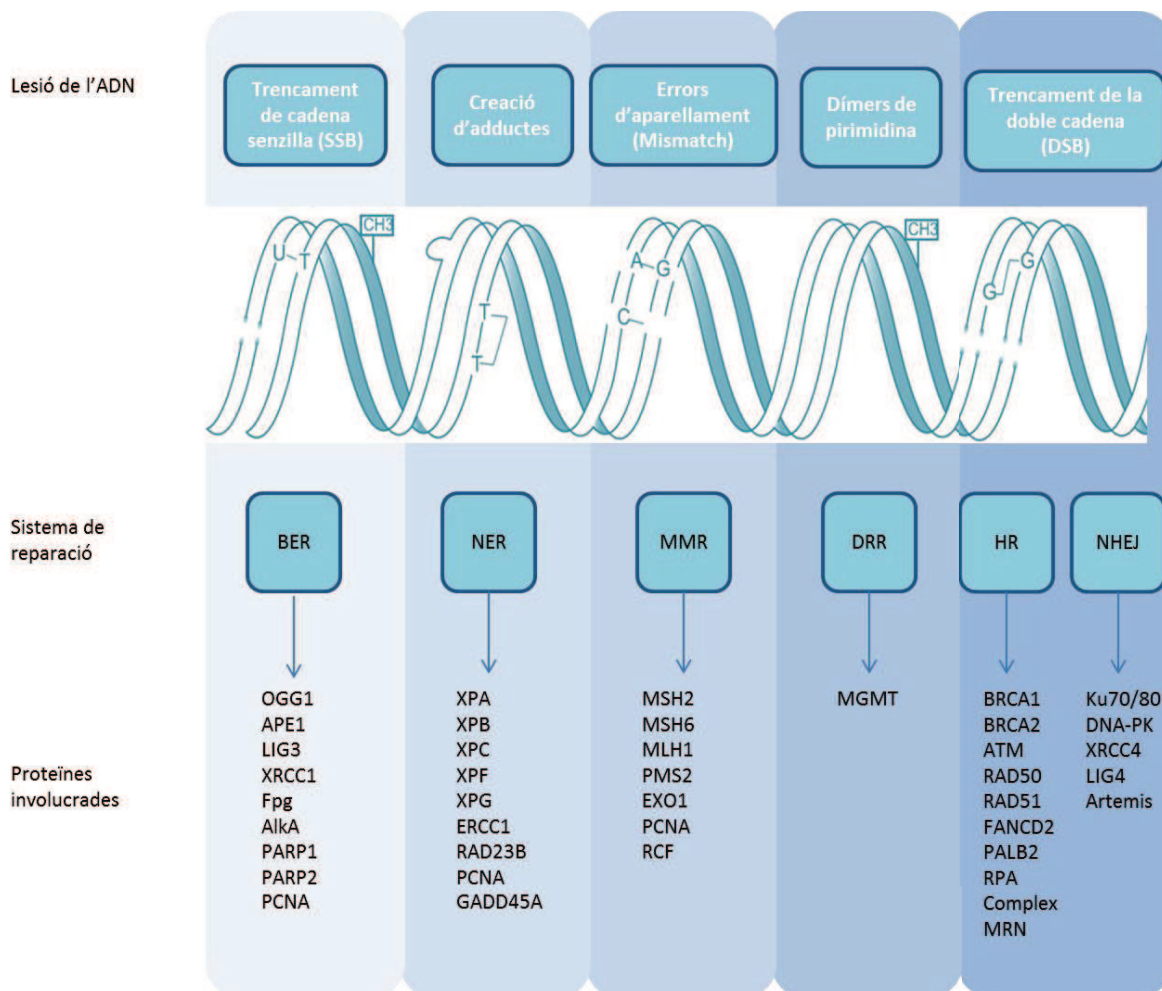


Figura 3. Vies de reparació de l'ADN i proteïnes involucrades. Depenent de la lesió que pateix l'ADN, s'aplica un sistema de reparació en el qual hi ha diferents proteïnes involucrades. Si el sistema de reparació no funciona correctament, això dóna lloc a una inestabilitat genòmica que contribueix a l'aparició del càncer.

Tots els agents carcinògens, produeixen canvis en l'ADN degut a lesions directes sobre ell o per alteracions en la maquinària de reparació. Existeixen diferents mecanismes de lesió de l'ADN i per això també hi ha diferents vies de reparació:

Reparació directa (DR – Direct Repair). El mecanisme principal de reparació directa en humans és l'eliminació dels grup O⁶-metil de la O⁶-metilguanina de l'ADN, mitjançant la O⁶-metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT). La formació d'O⁶-metilguanina en l'ADN és produïda per agents alquilants mitjançant l'addició de

grups metil (i en alguns casos grups etil) a les macromolècules com l'ADN (Margison & Koref, 2002). El mecanisme d'acció dels agents quimioteràpics de la família dels alquilants, estan basats en l'addició de grups alquil a l'ADN comportant una distorsió de la doble cadena i en conseqüència, finalment la mort cel·lular (Gerson, 2002).

Reparació per escissió de bases (BER – Base Excision Repair). S'encarrega de la correcció de danys resultants de l'oxidació, metilació, desaminació o pèrdua espontània d'una base nitrogenada. Comença mitjançant l'acció d'una ADN-glicosilasa, amb la qual s'elimina la base nitrogenada danyada. El resultat és la creació d'un lloc apirimidínic o apurínic (AP). Mitjançant una polimerasa d'ADN i una ADN-ligasa, la cadena d'ADN queda reparada.

Reparació de nucleòtids per escissió (NER – Nucleotide excision repair). Aquesta via és la més flexible ja que actua sobre diferents tipus de danys de l'ADN. Actua sobre els dímers de pirimidina, els adductes químics, enllaços creuats de l'ADN i altres formes de dany oxidatiu de l'ADN. Tots aquests danys tenen en comú una distorsió de l'hèlix de la doble cadena de l'ADN i la modificació de la química d'aquesta (Hess et al., 1997). Degut a la gran varietat de lesions que pot corregir, aquest sistema no pot reconèixer grups químics específics que caracteritzin la lesió però reconeix les conformacions resultants de la lesió de l'esquelet fosfodièster. La NER requereix la implicació de més de 30 proteïnes involucrades en el reconeixement del dany, l'obertura de la doble hèlix, l'escissió de la lesió i la posterior reparació. Entre aquestes proteïnes, trobem 6 factors de reparació (RPA, XPA, XPC, TFIIH, XPG, XPF-ERCC1). En humans, defectes en la reparació per escissió causen una síndrome de foto-sensibilitat anomenada *Xeroderma Pigmentosum* (XP), que es caracteritza per una elevada incidència en càncer de pell induïda per la llum.

Reparació de bases no aparellades (MMR – *Mismatch repair*). Durant la replicació de l'ADN, es poden produir substitucions errònies dels nucleòtids. Aquestes substitucions són més freqüents en zones de repeticions de mononucleòtids o de dinucleòtids degut al lliscament de l'ADN-polimerasa. El sistema de reparació MMR juga un paper essencial en la reparació d'aquests errors. El sistema MMR "escaneja" l'ADN per a trobar bases no aparellades o zones amb insercions o delecions, d'una grandària màxima de 10 nucleòtids. Les proteïnes que formen part d'aquest sistema són MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 i PMS2, mitjançant el reconeixement de l'error i l'escissió del mateix. Finalment, polimerases, endonucleases i altres proteïnes completen el procés de reparació. Quan la MMR no funciona correctament, s'observa un fenotip cel·lular anomenat "fenotip mutador", caracteritzat per una freqüència elevada de mutacions espontànies i una inestabilitat de microsatèl·lits (MSI). Les mutacions en els gens involucrats en aquesta via de reparació donen lloc a una predisposició al carcinoma colorectal hereditari no lligat a la poliposi (Peltomäki, 2001). Avui en dia, la determinació de l'alteració en aquesta via de reparació s'utilitza com a factor de resposta a certs tractaments antineoplàstics com la immunoteràpia.

Reparació de trencaments de doble cadena (*DSB repair - Double-Strand Breaks*). Els trencaments de doble cadena es produeixen durant la replicació com a conseqüència del col·lapse de la forca de replicació, per la presència d'espècies reactives de l'oxigen. Aquesta via s'encarrega de reparar lesions que, a diferència de la resta de mecanismes, inclouen les dues cadenes de l'ADN i per tant no permet l'ús de l'altra cadena com a motlle durant el procés de reparació. Hi ha dos tipus de reparació per als trencaments de doble cadena: 1) **La recombinació homòloga (HR)** i 2) **la unió terminal no homòloga (NHEJ)**

1) Recombinació Homòloga (HR – Homologous Recombination). Aquest sistema de reparació utilitza la seqüència homòloga de la cromàtide germana com a motlle per a restaurar fidelment la informació original. La major part de la reparació basada en HR es fa a les fases S o G2 del cicle cel·lular, ja que és el moment de més proximitat entre les cromàtides. El complex nucleasa multi-proteic RAD50/MRE11/NBS1 elimina nucleòtids de la doble cadena, generant un ADN monocatenari (*ssDNA*). El complex proteic format per RAD51, XRCC2, XRCC3, BRCA1 i BRCA2 s'uneix a l'ADN formant un filament de nucleoproteïnes que cerca i envaeix la cadena homòloga. Un cop identificat l'ADN homòleg, una ADN-polimerasa allarga l'extrem 3' de la cadena invasora i posteriorment la ADN-Ligasa I la uneix produint una estructura d'ADN heterodúplex coneguda com l'estructura de Holliday. Aquesta unió de Holliday finalment es talla, generant-se dues molècules d'ADN separades i finalitzant el procés de reparació adequadament.

2) Unió Terminal No Homòloga (NHEJ – Nonhomologous End Joining). En contraposició a la HR, la NHEJ no requereix una cadena motlle homòloga per a la reparació del DSB i acostuma a donar lloc a la correcció de la ruptura d'una manera propensa a la introducció d'errors. El més important en aquesta via NHEJ és l'activitat quinasa de la proteïna heterodimèrica Ku70/Ku80. L'heterodímer Ku, regulat per proteïnes quinasa-dependents (PKcs), reconeix el lloc de tall i s'hi uneix, per a protegir l'ADN de les exonucleases i mantenir la doble cadena unida. A partir d'aquí la proteïna endo/exonucleasa Artemis, ADN polimerases i ADN-lligases s'encarreguen d'unir els trencaments de les cadenes. El processament final dels trencaments de la doble cadena el realitza el complex MRE11-Rad50-NBS1 que té activitat endonucleasa, exonucleasa i helicasa. Tot i que aquesta via és molt eficient per a la reparació d'aquest tipus d'error, pot donar lloc a reordenaments cromosòmics.

El primer pas en la resposta a les lesions de l'ADN inclou el reconeixement d'aquests danys seguit d'una activació dels punts de control del cicle cel·lular. Si aquest reconeixement no és adequat, la subsegüent reparació del dany tampoc ho serà, produint-se una inestabilitat genètica. Principalment, hi ha tres punts de control del dany de l'ADN: El G1/S que impedeix l'inici de la replicació, intraS que evita la progressió de la duplicació i G2/M que impedeix l'inici de la mitosi. El reconeixement dels DSB és imprescindible en la via de reparació de l'ADN. Dues proteïnes importants que desenvolupen aquesta funció són les proteïnes codificades pels gens *ATM* i *TP53*. En el cas d'*ATM*, després de detectar una lesió, s'encarrega de fosforilar tota una sèrie de substrats, tots ells involucrats en la senyalització de la lesió. La proteïna p53 és coneguda com el guardià del genoma degut a la seva intervenció en la detenció del cicle cel·lular o en l'apoptosi en cas necessari, amb l'objectiu d'evitar la propagació de les cèl·lules que han acumulat lesions en l'ADN.

En resum, molts dels gens descrits en les síndromes de càncer hereditari són gens supressors de tumors que formen part de diferents vies de reparació de l'ADN (Goyal et al., 2016). La funció principal d'aquests gens en les síndromes de càncer hereditari és la inhibició de la proliferació cel·lular i la preservació del genoma. És per això que quan hi ha una inactivació d'un d'aquests gens el resultat és la carcinogènesi.

1.2. VIES D'INACTIVACIÓ GÈNICA

L'any 1971 Knudson, basant-se en l'estudi del Retinoblastoma, va postular la hipòtesi de doble impacte o de "Two-Hits" (Knudson, 1971). Amb aquesta hipòtesi va establir que la majoria de gens requereixen dues mutacions, una en cada al·lel,

per causar un canvi fenotípic. Així doncs, per al desenvolupament d'un càncer hereditari, s'han de produir dos esdeveniments en la cèl·lula que iniciarà el tumor: el primer és una alteració genètica heretada en un dels dos al·lels d'aquest gen i el segon és una alteració adquirida en l'altre al·lel que silenciï o inactivi completament el gen (Berger et al., 2011). Actualment, aquesta hipòtesi serveix com a base per entendre com les mutacions en els gens supressors de tumors donen lloc al desenvolupament del càncer (Figura 4).

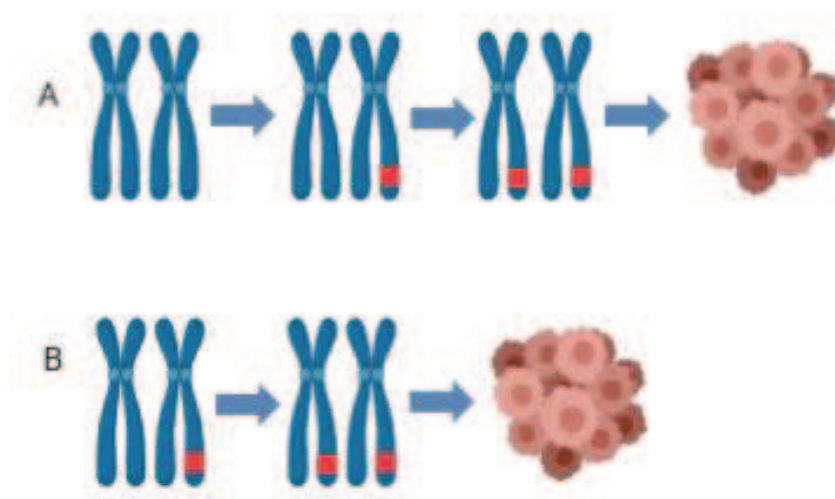


Figura 4. Hipòtesi del doble impacte de Knudson. Segons aquesta hipòtesi, per a què es produeixi una progressió tumoral, els dos al·lels del gen supressor de tumors han d'estar alterats. En càncer esporàdic (A) calen dos esdeveniments, però en el cas del càncer hereditari (B), la primera alteració s'hereta, i per tant, una sola còpia alterada del gen augmenta la predisposició de la malaltia. La inactivació de l'altre al·lel, degut a una mutació, a una modificació post-transcripcional, o bé a la pèrdua de l'altre al·lel, completa el segon pas per l'aparició de la malaltia.

1.2.1. Alteracions Genètiques o Mutacions

El genoma humà és molt homogeni, amb un 99.9% de similitud entre individus. Les diferències entre individus són degudes a canvis genètics, principalment canvis en la seqüència de l'ADN anomenats **polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNPs - Single**

Nucleotide Polymorphisms), que són canvis que estan presents en més de l'1% dels individus. De totes maneres, s'ha descrit que no es pot afirmar que aquests polimorfismes no confereixin un augment en el risc de desenvolupar una malaltia, sobretot en l'etiopatogènia de les malalties complexes, com s'ha pogut descriure en el cas del càncer de mama (Escala-Garcia et al., 2019; Han et al., 2004; H. Zhang et al., 2020).

Una de les vies d'inactivació més freqüents és la presència d'alteracions en la seqüència de l'ADN que donen lloc a una proteïna no funcional. Els danys que pot patir l'ADN són molt diversos i poden ser produïts per factors endògens o exògens. En els organismes multicel·lulars, aquelles mutacions o alteracions que es produeixen en les cèl·lules germinals, és a dir en aquelles cèl·lules que formaran els gàmetes, s'anomenen **mutacions germinals**. Aquelles alteracions que es produeixen en la resta de cèl·lules s'anomenen **mutacions somàtiques**. La importància de les mutacions germinals rau en què aquestes poden ser heretades de pares a fills. Els canvis en l'ADN no sempre corresponen a mutacions amb un efecte deleteri per a la cèl·lula o l'organisme, i fins i tot en alguns casos pot donar lloc a un avantatge evolutiu.

Les alteracions genètiques es poden classificar de diferents maneres, segons la grandària d'aquestes (**macromutacions** o **micromutacions**), segons l'alteració que produeixen en la cadena de nucleòtids (**puntuals**, **insercions**, **delecions**, **duplicacions**, **inversions**), segons la font del mutagen (**espontània** o **induída**) o basat en l'origen (**germinals** o **somàtiques**). També classifiquem les alteracions genètiques segons els seu efecte en la proteïna: **mutació amb error de sentit** o **missense** quan es produeix un canvi d'aminoàcid, **mutació sense sentit** o **nonsense** quan es crea un codó stop, **mutació del patró de lectura** o **frameshift** quan es produeix un corriment en la pauta de lectura, **mutació que conserva el patró de lectura** o **in-frame** quan s'eliminen o insereixen un o més triplets, **mutació**

silenciosa o *silent* quan no es produeix cap canvi en la cadena d'aminoàcids. O bé segons l'efecte en la funcionalitat de la mateixa: ***loss-of-function*** quan hi ha pèrdua de funció de la proteïna, **hipomòrfica o *hypomorphic*** quan hi ha una reducció en la funció normal de la proteïna, **hipermòrfica o *hypermorphic*** quan es produeix un increment en la funció normal de la proteïna i **guany de funció o *gain-of-function*** quan s'adquireix una nova funció molecular o un nou patró d'expressió gènica.

1.2.2. Pèrdua d'heterozigositat (*Loss of heterozygosity - LOH*)

En la LOH es produeix una pèrdua al·lèlica d'un gen. És a dir, una cèl·lula heterozigota, amb una mutació en un al·lel, pateix una alteració en la còpia que encara és funcional del gen supressor de tumors, esdevenint homozigota pel gen mutat. Les mutacions que inactiven els gens supressors de tumors, acostumen a ser mutacions puntuals o petites delecions que alteren la funció de la proteïna que codifica el gen alterat o bé delecions cromosòmiques que eliminen un al·lel.

Aquest és un mecanisme molt important en la inactivació dels gens supressors de tumors, com s'explica en la hipòtesi dels "*Two-Hits*" de Knudson, per la inactivació dels gens supressors tumorals. La LOH s'ha associat a la pèrdua de l'al·lel no mutat en individus amb una síndrome de predisposició al càncer (portadores d'una mutació germinal) en gens com el *RB1* en el retinoblastoma o *BRCA1* en el càncer de mama i ovari, i fins i tot com a un esdeveniment complementari a una mutació somàtica com per exemple en el gen *TP53* (Cavenee et al., 1983; Merajver et al., 1995).

1.2.3. Hipermetilació del promotor

La metilació és un fenomen fisiològic molt important en la regulació gènica, sobretot durant l'embriogènesi, i és imprescindible per a mantenir el silenciament genètic per tal de regular la expressió dels gens i assegurar un desenvolupament normal de l'organisme. En mamífers, la metilació de l'ADN es refereix a la inserció d'un grup metil (CH₃) en la posició 5' de la dioxicitosina per a formar la 5-metilcitosina. Aquesta es troba en els dinucleòtids citosina-guanina, que no estan distribuïts d'una manera uniforme en el genoma humà. Tot i que en la major part del genoma es troben aproximadament una vegada cada 80 dinucleòtids, hi ha regions de 200 parells de bases amb una freqüència 5 vegades superior, anomenades illes CpG (Ma & Adjei, 2009). Les illes CpG dels gens responsables del manteniment cel·lular (*caretakers*), localitzades entre la regió central del promotor i el lloc d'inici de la transcripció, normalment no estan metilades. La seva metilació produeix una repressió de l'expressió.

La metilació està involucrada en processos com: la regulació transcripcional, el manteniment de l'estabilitat cromosòmica, la modulació de l'estructura de la cromatina i la inactivació d'un dels cromosomes X. Però s'ha observat que en molts tipus de càncer es presenten patrons aberrants de metilació (hipermetilació i hipometilació), que principalment donen lloc a una inactivació de gens supressors de tumors i a la inestabilitat del genoma (Herman & Baylin, 2003). En el cas del càncer, s'ha demostrat que hi ha una hipermetilació restringida a certes regions del genoma, principalment somàtica, i per altra banda existeix una hipometilació generalitzada del genoma en presència d'una activitat augmentada de l'enzim de desmetilació (DNMT) (Figura 5).

La hipermetilació del promotor de gens supressors de tumors com *p6/CDKN2*, *Rb*, *p21*, *BRCA1*, gens de reparació de l'ADN com *MLH1* i altres, provoca la seva

repressió en el teixit tumoral (Yuan et al., 2001). En general, la hipermetilació està involucrada en el silenciament de gens i provoca la repressió transcripcional degut a un canvi estructural de la cromatina, que fa que els factors de transcripció no hi puguin accedir. Així, els gens supressors de tumors queden inactivats.

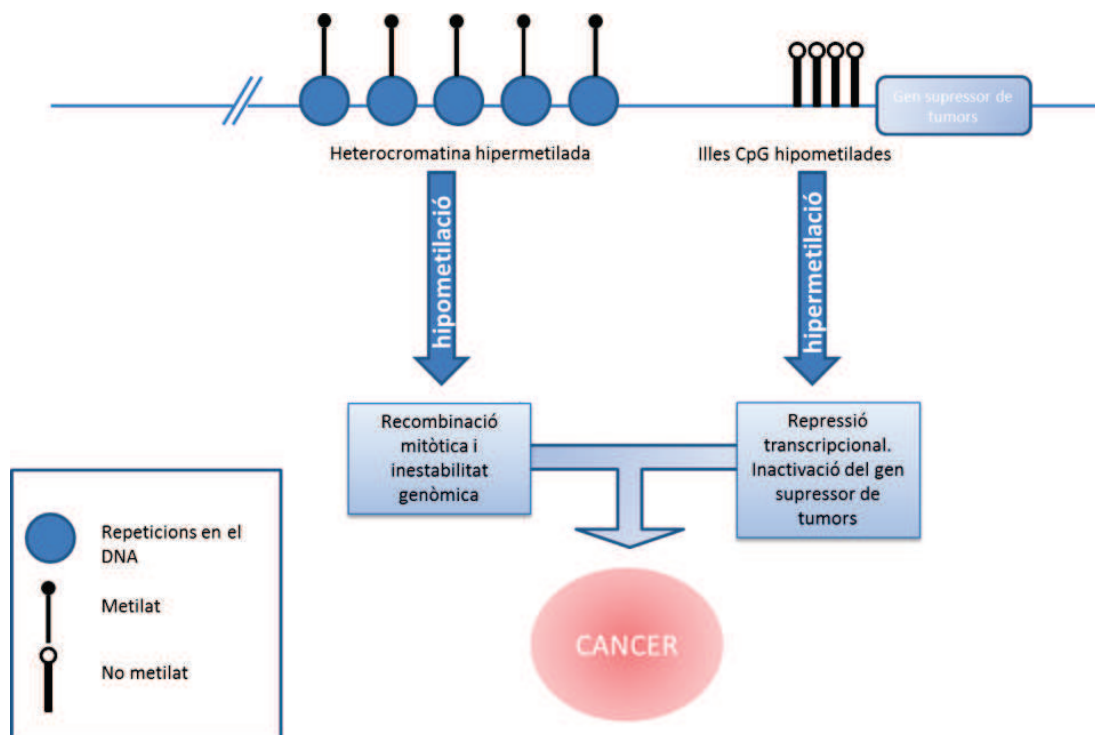


Figura 5. Metilació de l'ADN. En el càncer, el genoma es troba majoritàriament hipometilat i els gens supressors de tumors es troben hipermetilats. Quan les illes CpG de la regió promotora d'un gen s'hipermetilen, es produeix una repressió transcripcional i inactivació d'aquest. Per altra banda, hi ha una hipometilació de la regió repetitiva de l'heterocromatina, que contribueix a la inestabilitat genòmica, una característica de les cèl·lules tumorals, mitjançant un increment en els processos de recombinació mitòtica. Aquests canvis en la metilació són processos de les primeres fases de la progressió tumoral. Figura modificada de (Robertson, 2005).

En el cas dels gens involucrats en les síndromes de càncer hereditari, s'ha descrit que es poden silenciar mitjançant una hipermetilació del promotor, principalment en el tumor (Esteller et al., 2001). Per altra banda, en el cas del càncer colorectal esporàdic, s'ha observat que els gens *MLH1*, *APC* i *LKB1* poden patir una inactivació transcripcional degut a una hipermetilació del promotor (Grønbaek et al., 2007; Kane et al., 1997).

2. Càncer de mama i ovari hereditari (CMOH)

El càncer de mama és el tipus de càncer més freqüent en dones a la població espanyola (el segon més freqüent a l'estat espanyol), amb 32.536 nous diagnòstics de càncer de mama l'any 2019 segons la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) i és la primera causa de mort per càncer, juntament amb el càncer colorectal (Bray et al., 2018). Es coneix que del total de casos de càncer de mama, aproximadament el 80-85% són d'origen esporàdic, és a dir, no hereditaris. La seva etiologia pot ser deguda a diferents factors com poden ser l'exposició a estrògens endògens, l'ús de tractaments hormonals substitutius, l'edat, i l'exposició a radiacions ionitzants, entre d'altres. Entre un 15-20% dels casos de càncer de mama, es consideren casos d'agregació familiar. D'aquests, entre el 5 i el 10% dels casos es consideren clarament hereditaris (Nagy et al., 2004), és a dir, que presenten variants patogèniques en gens involucrats en les vies de reparació de l'ADN, en la regulació del creixement cel·lular o del control del cicle cel·lular en la línia germinal.

El càncer d'ovari és el responsable aproximadament del 3% de tots els càncers en dones i és el causant del major nombre de morts per càncer ginecològic (Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, 2012). D'aquestes dades se'n deriva la importància de poder fer una detecció precoç en el càncer d'ovari. S'han estudiat els possibles factors de risc per a aquest tipus de càncer (nul·liparitat, menopausa tardana...), però tot i això s'ha observat que el factor més important és la història familiar. Aproximadament un 20% dels casos de càncer són deguts a la síndrome de CMOH i a la síndrome de Lynch (T Pal et al., 2012; Tuya Pal et al., 2005; Walsh et al., 2011).

La síndrome de CMOH és una de les síndromes de càncer hereditari més ben caracteritzades i més freqüents (Q. Wang, 2016). Aquesta síndrome està associada principalment a alteracions germinals en els gens *BRCA1* i *BRCA2* tot i que s'han descrit altres alteracions en gens d'alt o moderat risc implicats en càncer de mama i/o càncer d'ovari (*ATM*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *TP53*, *STK11*).

La primera descripció del càncer de mama hereditari la va realitzar el francès Paul Broca en el seu llibre "*Traité des tumeurs*" l'any 1866, en el que va descriure la família de la seva dona, malalta amb càncer de mama, i un total de quatre generacions successives en la seva família de dones amb càncer de mama (Figura 6). En aquest tractat descriu la possible heretabilitat de la malaltia, passant de generació en generació (Broca, 1866).

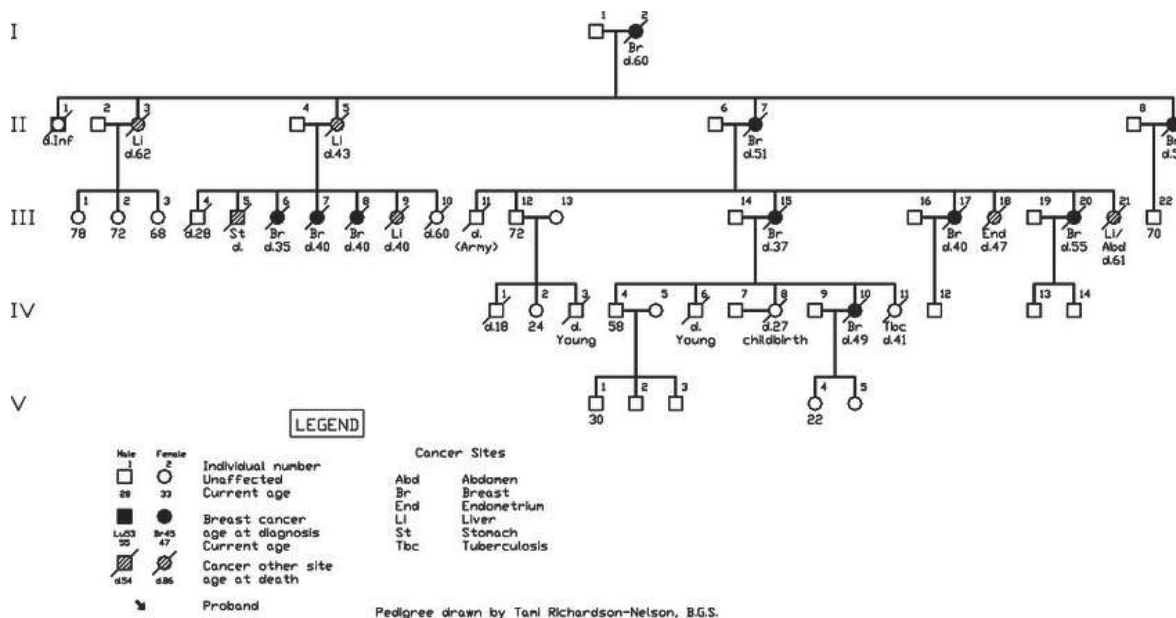


Figura 6. Arbre genealògic estudiat per Paul Broca on s'identificava per primera vegada la possible heretabilitat del càncer de mama (Henry T Lynch et al., 2008).

Tot i que el càncer és una malaltia d'origen multifactorial, en el càncer de mama els principals factors de risc per al desenvolupament de la malaltia són la història familiar i l'edat (Claus et al., 1998). A vegades, aquesta agregació familiar també pot ser deguda a l'exposició a factors ambientals que s'hagin produït en comú en una mateixa família.

Per a la identificació de famílies amb aquesta síndrome, diferents grups com la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), la *UK Cancer Family Study Group* (UKCFSG) (Eccles et al., 2000) o la Sección de Càncer Hereditario de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (González-Santiago et al., 2019), han establert una sèrie de criteris clínics de sospita de CMOH (Taula 1).

<p>Independentment de la història familiar:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diagnòstic de càncer de mama i ovari sincrònic o metacrònic • Diagnòstic de càncer de mama \leq 40 anys • Càncer de mama bilateral (el primer diagnosticat \leq 50 anys) • Diagnòstic de càncer de mama i ovari en el mateix individu • Càncer de mama triple negatiu \leq 60 anys • Càncer d'ovari epitelial d'alt grau, no mucinos (o de trompa de fal·lopi o càncer primari peritoneal) • Avantpassats amb mutacions fundadores • Detecció de mutació somàtica en BRCA en qualsevol tipus tumoral amb una freqüència al·lèlica $>$ 30% • Càncer de mama metastàtic HER2-negatiu per a considerar aquests pacients per a una possible teràpia amb agents inhibidors de la PARP.
<p>Dos o més familiars de primer grau amb alguna combinació de les següents característiques d'alt risc:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Càncer de mama bilateral i un altre càncer de mama $<$ 60 anys • Càncer de mama $<$ 50 anys i càncer de pròstata o càncer de pàncrees $<$ 60 anys • Càncer de mama en home • Càncer de mama i càncer d'ovari • 2 casos de càncer de mama diagnosticats $<$ 50 anys
<p>Tres o més familiars amb càncer de mama (almenys un pre-menopàusic) i/o càncer d'ovari i/o càncer de pàncrees o càncer de pròstata amb un <i>Gleason</i> \geq7.</p>

Taula 1. Criteris de selecció per a la realització d'estudis genètics amb pacients amb sospita de la síndrome de CMOH, publicats per la secció de càncer hereditari de la SEOM.

Tot i això, aquests criteris són força dinàmics i es van ampliant i modificant a mida que es tenen més dades. Així per exemple, a nivell de Catalunya s'està treballant en un consens en el que es proposa modificar alguns d'aquests criteris, sobretot pel que fa a les edats de diagnòstic, més en concordança amb els criteris establerts a altres països d'Europa.

S'han descrit diferents síndromes de càncer hereditari en les quals el càncer de mama és una manifestació clínica, com per exemple en la síndrome de càncer colorectal no lligada a poliposi (Roberts et al., 2018).

2.1. ETIOLOGIA DEL CMOH

2.1.1. *BRCA1* i *BRCA2*

L'any 1994 l'investigador Miki i els seus col·laboradors van clonar el gen *Breast cancer 1 gene (BRCA1)*; OMIM 113705; Genbank U14680) (Miki et al., 1994), prèviament descrit mitjançant estudis de lligament com a gen de susceptibilitat al CMOH per Hall *et al.* (Hall et al., 1990). Posteriorment, Wooster *et al.* van identificar i clonar el gen *Breast cancer 2 gene (BRCA2)*; OMIM 600185; Genbank U43746) (Wooster et al., 1995) com a gen de susceptibilitat al càncer de mama hereditari.

Els gens *BRCA1* i *BRCA2* es consideren gens d'alta susceptibilitat i principals causants de la síndrome de CMOH que es caracteritza per l'aparició d'aquestes neoplàsies a edats joves i a l'agregació familiar de les mateixes, amb una herència autosòmica dominant. En aproximadament el 16% dels casos de CMOH es poden identificar variants patogèniques en els gens *BRCA1* i *BRCA2*. Tot i els intents dels investigadors de poder trobar un gen *BRCA3* que pugui explicar els casos restants,

s'ha apostat per l'anàlisi d'altres gens de moderat o baix risc així com d'altres gens relacionats amb altres síndromes, en les quals també s'ha descrit el càncer de mama o d'ovari com a neoplàsia característica. En el nostre entorn, el risc acumulat als 70 anys en càncer de mama és del 52% per *BRCA1* i del 47% per *BRCA2*. Pel càncer d'ovari, el risc estimat és del 22% per *BRCA1* i del 18% per *BRCA2* (Milne et al., 2008; Gabai-Kapara et al., 2014; Kuchenbaecker et al., 2017; Zhang & Long, 2015a).

Aquests gens tenen estructures complexes i codifiquen proteïnes molt llargues conegudes com proteïnes vetlladores (*caretakers*, per la seva funció de manteniment de la integritat genòmica), o proteïnes supressores de tumors per la seva funció reguladora negativa del creixement tumoral. S'han descrit centenars de variants genètiques en la seva seqüència de les quals més del 70% corresponen a petites insercions o delecions, mentre que la resta són mutacions amb error de sentit (*missense*, que produeixen un canvi d'aminoàcid), alteracions del procés d'empalmament (*splicing*) o grans reordenaments.

El gen *BRCA1* està localitzat al braç llarg del cromosoma 17 (17q21). Està format per 5592 nucleòtids distribuïts en 24 exons, dels quals només se'n tradueixen 22 (tots excepte l'1 i el 4). L'ARNm resultant de la transcripció es tradueix en una proteïna nuclear supressora de tumors de 1863 aminoàcids, present en l'epiteli normal d'ovari i de mama. Aquesta proteïna té diferents funcions com la detecció i senyalització de danys en l'ADN, la regulació de la transcripció, la reparació de l'ADN acoblada a la transcripció i l'activitat ubiquitina lligasa. Consta de 4 dominis funcionals principals: RING, NLS, COILED-COIL i BRCT (Figura 7a i 7b). L'exó 11 codifica més del 60% de la proteïna i conté dues senyals de localització nuclear (NLS). El domini RING, que es troba a l'extrem N-terminal, consta de 109 aminoàcids molt conservats i ric en cisteïnes. Mitjançant aquest domini forma un heterodímer amb la proteïna BARD1, adquireix propietats d'ubiquitina lligasa i

afavoreix la degradació d'altres proteïnes. El domini d'hèlix superenrotllada (*coiled-coil*) s'uneix a la proteïna PALB2, la qual s'uneix a l'extrem N-terminal de BRCA2. Aquest complex proteic afavoreix la unió de RAD51 a l'ADN durant la reparació per recombinació homòloga. Els dominis BRCT ubicats a l'extrem C-terminal poden unir-se a serines fosforilades i a altres proteïnes com Abraxas (FAM175) i BRIP1, involucrades en la reparació de l'ADN i en punts de control del cicle cel·lular. A més, les seqüències BRCT poden activar la transcripció d'alguns gens. En general, la proteïna BRCA1 interactua amb moltes altres proteïnes de gens supressors de tumors, oncogens, activadors i repressors de la transcripció, reguladors del cicle cel·lular i detecció i reparació de lesions de l'ADN, ubiquïtinació de proteïnes, remodelació de la cromatina, replicació de l'ADN, regulació del centrosoma i apoptosi entre d'altres, amb la finalitat de mantenir l'estabilitat genòmica.

El gen *BRCA2* està localitzat al braç llarg del cromosoma 13 (13q12) i conté 11385 nucleòtids repartits en 27 exons dels quals el primer no es tradueix. De la traducció es forma una proteïna de 3418 aminoàcids. La proteïna BRCA2 també s'associa a la reparació de l'ADN a través del mecanisme de recombinació homòloga i localització de RAD51, activitat transcripcional, activitat acetiladora d'histones i regulació dels centrosomes (Figura 7c i 7d). L'extrem N-terminal s'uneix a PALB2. L'exó 11 conté 8 repeticions BRC molt conservades que s'uneixen a RAD51 i ajuden a regular la formació de filaments helicoïdals sobre l'ADN monocatenari, per a què puguin tenir lloc les reaccions d'aparellament de les cadenes homòlogues de l'ADN per a la seva reparació. L'extrem C-terminal és la regió més conservada de la proteïna, la qual és una regió d'unió a l'ADN que promou la recombinació homòloga. En l'extrem C-terminal també hi ha dues senyals de localització nuclear. En general, BRCA2 sembla tenir menys funcions que BRCA1, tot i que BRCA2 participa en la reparació de l'ADN i en la progressió del cicle cel·lular.

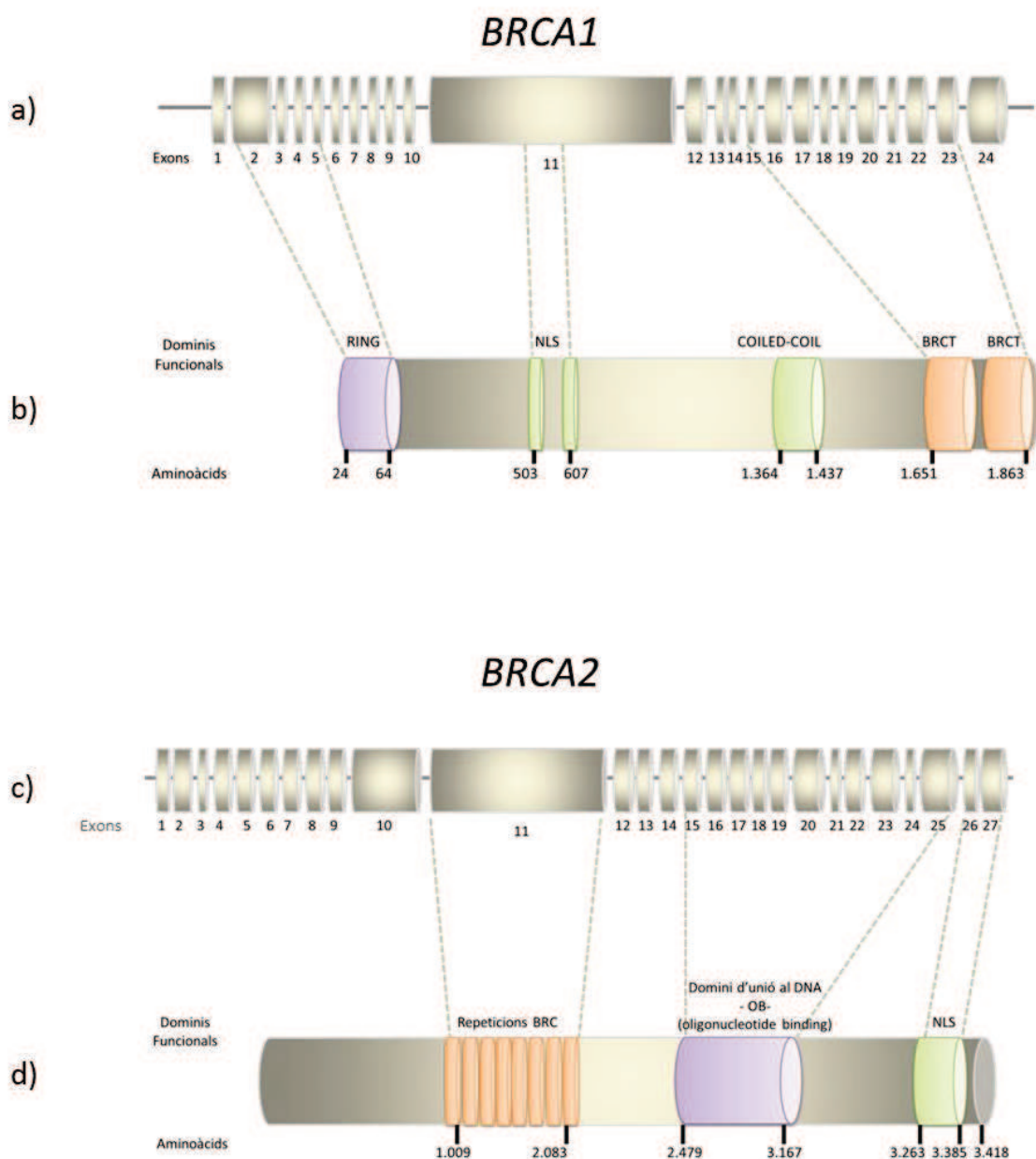


Figura 7. Estructura dels gens *BRCA1* i *BRCA2* i de les proteïnes *BRCA1* i *BRCA2*. a) El gen supressor de tumors *BRCA1* està format per 24 exons. Aquest es tradueix en una fosfoproteïna nuclear que està inclòs en molts processos cel·lulars com la recombinació homòloga i la reparació de l'ADN. b) Aquesta proteïna conté el domini dits de Zinc (*Ring Finger domain*), que és un domini responsable de la interacció entre proteïnes per l'activitat ubiquitina lligasa, dos NLS (Senyal de Localització Nuclear), una regió d'hèlix superenrotllada i dos dominis BRCT (*BRCA1 C terminal*) que tenen un paper molt important en la supressió de tumors mediat per *BRCA1*. c) El gen *BRCA2* està constituït per 27 exons i codifica per una proteïna involucrada en la reparació del dany cromosòmic i amb un paper molt important en la reparació d'errors de doble cadena. d) La proteïna *BRCA2* presenta un domini format per 8 repeticions BRC (amb activitat acetiltransferasa de les histones), un motiu OB d'unió a ADN de cadena senzilla i una regió NLS de senyalització de localització nuclear.

2.1.2. Altres Gens i Síndromes Relacionades

Tot i que els principals gens associats a la síndrome de CMOH són els gens *BRCA1* i *BRCA2*, es coneixen altres gens associats a altres síndromes, que dintre del seu espectre de manifestacions clíniques inclouen un increment en el risc a desenvolupar càncer de mama o càncer d'ovari.

Hi ha un ampli ventall de síndromes que inclouen una probabilitat moderada o elevada d'aparició del càncer de mama o el càncer d'ovari com a possibles neoplàsies, tot i que el gens responsables no siguin *BRCA1* o *BRCA2*. A més a més, alguns gens de moderada o baixa penetrància, s'han començat a incloure en aquests estudis per la seva relació funcional amb els gens *BRCA1* i *BRCA2*. Entre aquests trobem el gens *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *TP53*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* i el complex MRN (Taula 2).

2.1.2.1. *ATM*

El gen *Ataxia-Telangiectasia mutated gene (ATM)*, ubicat en el cromosoma 11q22.3, codifica una proteïna quinasa que participa en la reparació de l'ADN i intervé en la regulació de les proteïnes *BRCA1* i *CHEK2*. Alteracions bial·lèliques en aquest gen, estan relacionades amb una malaltia d'herència autosòmica recessiva anomenada atàxia telangièctasi (OMIM 208900), causant d'un ampli espectre de manifestacions clíniques. Alteracions monoal·lèliques en aquest gen, no comporten un fenotip d'atàxia però confereixen un augment del risc de desenvolupar càncer de mama entre dues i cinc vegades. Aquest gen està considerat com un gen de moderada penetrància.

SÍNDROME	GEN	HERÈNCIA	CÀNCER ASSOCIAT	RISC
Càncer de mama i/o ovari hereditari (CMOH)	<i>BRCA1</i>	Autosòmic dominant	Mama, ovari, Pròstata, trompa de fal·lopi, estómac, pàncreas i melanoma	40-80%
	<i>BRCA2</i>			20-85%
Síndrome de Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	Autosòmic dominant	Mama, cervell, sarcomes i leucèmies	56-90%
Síndrome de Lynch (càncer colorectal hereditari no lligat a poliposi)	<i>MLH1</i>	Autosòmic dominant	Endometri, colorectal, ovari, estómac, pàncrees, cervell	40-70%
	<i>MSH2</i>			
	<i>MSH6</i>			
	<i>PMS2</i>			
Poliposi adenomatosa familiar	<i>APC</i>	Autosòmic dominant	Colorectal, còlon, gàstric, pàncrees i adenomes	100%
Poliposi adenomatosa familiar atenuada	<i>MUTYH</i>	Autosòmic recessiu		70%
Síndrome de Cowden	<i>PTEN</i>	Autosòmic dominant	Mama, tiroides i endometri	25-50%
Síndrome de càncer gàstric difús hereditari	<i>CDH1</i>	Autosòmic dominant	Gàstric, mama	60%
Anèmia de Fanconi	<i>BRIP1</i>	Autosòmic recessiu	Mama*, leucèmia	?
	<i>PALB2</i>			
	<i>BRCA2</i>			
Síndrome de Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>	Autosòmic dominant	Còlon, intestí prim, estómac, mama, pàncrees	32-54%
Síndrome de trencament de Nijmegen	<i>NBN</i>	Autosòmic recessiu	Limfoma, mama*, colorectal	?
CHEK2	<i>CHEK2</i>	Autosòmic dominant	Mama, colorectal, ovari, bufeta	25-37%
Ataxia telangièctasi	<i>ATM</i>	Autosòmic recessiu	Limfomes, leucèmies, mama*	15-20%
PALB2	<i>PALB2</i>	Autosòmic dominant	Mama, pàncreas, ovari, mama en homes	20-40%
Risc moderat de càncer de mama i/o ovari	<i>BARD1</i> <i>BRIP1</i> <i>MRE11A</i> <i>NBN</i> <i>RAD50</i> <i>RAD51C</i> <i>RAD51D</i>		Càncer de mama i càncer d'ovari	variable

Taula 2. Síndromes associades a la presència de càncer d'origen hereditari. Adaptat de Apostolou & Fostira, 2013a.
 *També associat a risc moderat de càncer de mama en heterozigosi.

2.1.2.2. *BARD1*

El gen *BRCA1-associated ring domain 1 (BARD1)* està ubicat en la posició 2q34-q35 i codifica per una proteïna anomenada *BRCA1-associated RING domain protein-1 (BARD1)* descrita com a una proteïna que interacciona amb BRCA1 (Wu et al., 1996). Ambdues proteïnes presenten una homologia estructural i comparteixen els dominis N-terminal (*RING finger*) i C-Terminal (BRCT). La interacció entre aquestes dues proteïnes, promou les funcions de supressors de tumors mitjançant la DSB i l'inici de l'apoptosi. Tot i que aquest gen no ha estat àmpliament estudiat en relació a les síndromes de càncer hereditari, degut a aquesta interacció amb BRCA1, Ratajska *et al.* van fer un estudi de 109 pacients del nord de Polònia, no portadors de mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* (Ratajska et al., 2012). Van identificar tres variants sospitoses de ser patogèniques (c.1690C>T, p.Gln564X; c.1315-2A>G; c.1977A>G). Aquest estudi suggeria la possibilitat que variants patogèniques en aquest gen fossin responsables d'una part dels casos de càncer de mama i/o ovari familiars. Tot i que aquesta relació a dia d'avui no està ben establerta, diferents grups han intentat establir la freqüència d'aquestes variants observant que fins a un 1% dels individus sospitosos d'una síndrome de CMOH poden ser portadors d'una variant patogènica en aquest gen (Weber-Lassalle et al., 2019).

2.1.2.3. *BRIP1*

El gen *BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1 (BRIP1)* també conegut com *FANCI*, està ubicat en el cromosoma 17q22-q24. Les mutacions en 12 gens involucrats en els mecanismes de reparació de l'ADN per recombinació homòloga, inclosos *BRIP1*, *PALB2* i *BRCA1*, s'han associat a una malaltia recessiva i rara anomenada Anèmia de Fanconi (OMIM 227650). A més a més, en el gen *BRIP1* s'han descrit mutacions germinals que confereixen un risc moderat per càncer d'ovari, especialment pel subtipus epitelial serós d'alt grau. En canvi, l'impacte de

mutacions en *BRIP1* en càncer de mama segueix controvertit ja que diferents autors han descrit freqüències molt diferents (Weber-Lassalle et al., 2018).

2.1.2.4. *CDH1*

Conegut com E-Cadherina o *Cadherin 1 (CDH1)*, es localitza en el cromosoma 16q22.1 i codifica per una glicoproteïna responsable de l'adhesió cel·lular depenent de calci, la qual juga un paper molt important en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula. La síndrome de càncer familiar gàstric difús (OMIM 137215), és deguda a alteracions en aquest gen i les dones afectades per aquesta síndrome tenen un augment en la predisposició al càncer de mama lobel·lar. Pacients amb aquesta síndrome tenen un risc al llarg de la vida de desenvolupar càncer de mama aproximadament del 50%.

2.1.2.5. *CHEK2*

El gen *Checkpoint kinase 2 (CHEK2)* localitzat en el cromosoma 22q12.1, és el precursor del la proteïna CHK2 la qual actua com a supressor de tumors. Aquesta proteïna actua interactuant amb la proteïna p53 quan l'ADN està danyat, induint l'apoptosi. Aquest procés impedeix la divisió de les cèl·lules amb ADN danyat, la qual cosa evita la formació de tumors. L'alteració patogènica més freqüent descrita en aquest gen és la deleció c.1100del, p.Thr367fs, molt freqüent en països de l'Europa de l'est, i s'ha descrit que duplica el risc de càncer de mama en dones. Aquest gen es considera un gen de baixa penetrància pel càncer de mama i no s'han obtingut resultats concloents sobre la seva incidència en el càncer d'ovari (Baysal et al., 2004; Krylova et al., 2007).

2.1.2.6. *MLH1, MSH2, MSH6, PMS2* (gens MMR)

Mutacions en els gens *MutL homolog 1 (MLH1)* (3p21.3), *MutS homolog 2 (MSH2)* (2p21), *MutS homolog 6 (MSH6)* (2p16) i *PMS1 homolog 2 (PMS2)* (7p22.2) estan associades a la síndrome de Lynch, també coneguda com a càncer colorectal

hereditari no lligat a poliposi (OMIM 120435), que representa un 10-15% dels càncers d'ovari hereditaris. Aquestes proteïnes formen el complex proteic MMR (*Mismatch Repair*) involucrat en la via de reparació de l'ADN. Quan el sistema de reparació MMR falla, es produeix una acumulació de seqüències repetides (coneguda com a inestabilitat de microsatèl·lits).

2.1.2.7. *TP53*

El gen *Tumor protein p53 gene (TP53)* és un gen supressor de tumors localitzat en el cromosoma 17p13.1 que codifica una fosfoproteïna nuclear (p53). Aquest gen actua com a factor de transcripció i està involucrat en el control de la progressió del cicle cel·lular, la reparació del dany en l'ADN, en l'estabilitat genòmica i en l'apoptosi. Per tot això és conegut com "el guardià del genoma". El gen *TP53* es troba mutat en la síndrome de Li-Fraumeni (OMIM: 151623), una síndrome d'herència autosòmica dominant que predispone al càncer de mama i a altres tipus de tumors com sarcomes, tumors cerebrals, leucèmies i tumors de glàndula suprarenal. La majoria de les alteracions que es detecten són canvis puntuals. El risc al llarg de la vida de patir un càncer de mama associat a aquesta síndrome en persones portadores d'una mutació patogènica és del 50%.

2.1.2.8. *PALB2*

El gen *Partner and localizer of BRCA2 (PALB2)*, ubicat en el cromosoma 16p12.1, codifica per una proteïna coneguda com *BRCA2-interacting protein*. Inicialment, aquest gen estava relacionat amb el càncer de pàncrees hereditari, però s'ha observat que hi ha un risc incrementat de càncer de mama, pàncrees i fins i tot ovari. S'han identificat mutacions en aquest gen en un 1-4% de famílies no portadores de mutacions en els gens *BRCA*. Degut a controvèrsies en els resultats obtinguts en els diferents estudis, encara no està ben establert si el risc de càncer d'ovari realment es veu incrementat (Kotsopoulos et al., 2017; Rodríguez-Balada et al., 2020).

2.1.2.9. *PTEN*

El gen *Phosphatase and tensin homolog (PTEN)* és un gen supressor de tumors localitzat en el cromosoma 10q23.3, que codifica per la proteïna fosfatidilinositol fosfatasa i participa activament en la regulació cel·lular. Alteracions en aquest gen poden donar lloc a la síndrome de Cowden (OMIM: 158350), una síndrome poc freqüent caracteritzada per múltiples creixements no cancerosos de tipus tumoral anomenats hamartomes i un major risc de desenvolupar certs tipus de càncers. La presència d'una alteració en aquest gen, augmenta la predisposició al càncer de mama en un 50% al llarg de la vida així com altres manifestacions clíniques oncològiques com són el càncer de tiroides, d'endometri, colorectal, renal i melanoma i hamartomes. Alteracions en aquest gen també poden donar lloc a una síndrome associada coneguda com Bannayan-Riley-Ruvalcaba (OMIM: 158350).

2.1.2.10. *RAD51C* i *RAD51D*

El gen *RAD51 paralog C (RAD51C)* està relacionat amb l'Anèmia de Fanconi (Vaz et al., 2010) i s'ha descrit en pacients amb càncer de mama i ovari en una cohort de 1100 pacients (Meindl et al., 2010). L'any 2011 gràcies a Loveday *et al.* es va demostrar que la presència de mutacions en heterozigosi en el gen *RAD51 paralog D (RAD51D)* s'associava a un increment de fins a 6 vegades en el risc de càncer d'ovari tot i que el risc de càncer de mama era molt menor (Loveday et al., 2011).

2.1.2.11. *STK11*

El gen *Serine/Threonine protein kinase 11 (STK11)*, ubicat en el cromosoma 19p13.3, codifica una proteïna serina/treonina quinasa. Aquest gen es troba alterat en la síndrome de Peutz-Jeghers (OMIM: 175200), caracteritzada per pigmentació peri-oral i poliposis hamartomatosa. Pacients amb aquesta síndrome tenen un risc de càncer de mama del 15% als 50 anys, el qual augmenta amb l'edat fins a un 57% als 70 anys. Aquesta síndrome també es caracteritza per la presència

de poliposi, pigmentació mucocutània i un risc elevat de càncer a edats joves. També pot donar lloc a càncer de pàncrees, pulmó, testicle i cèrvix, entre d'altres.

2.1.2.12. COMPLEX MRN

El complex MRN està format per les proteïnes Mre11, Nbs1 i Rad50. Aquest representa un component imprescindible en el procés de reparació de l'ADN. En diferents estudis realitzats, s'han observat algunes mutacions en aquests gens potencialment sospitoses d'estar relacionades amb la susceptibilitat del càncer de mama i ovari (Heikkinen et al., 2003; Hsu et al., 2007).

2.1.3. Sistemes de classificació de les variants genètiques en CMOH

2.1.3.1. Classificació de les variants dels gens *BRCA1* i *BRCA2*

A grans trets, les alteracions genètiques es poden classificar com patogèniques, benignes i de significat clínic incert, tenint en compte el seu grau de risc de desenvolupar càncer. En la base de dades *Breast Cancer Information Core Database* (BIC, <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>, setembre del 2019), s'han reportat 1780 i 2000 variants diferents en els gens *BRCA1* i *BRCA2* respectivament. Aproximadament el 50% d'aquestes variants només s'han descrit en una sola família. Les mutacions en aquests gens es distribueixen uniformement al llarg de la zona codificant d'aquests. El principal tipus de mutacions són petites insercions o delecions (d'un o més nucleòtids) o bé substitucions que donen lloc a una proteïna no funcional. També es poden observar mutacions que afecten al lloc d'empalmament i produeixen grans reordenaments (que representen entre un 1-5% de les mutacions truncants (Thompson & Easton, 2004; Thomassen et al., 2006). Les mutacions de canvi d'aminoàcid o silencioses), les intròniques i les

variants que conserven la pauta de lectura també s'identifiquen freqüentment però la seva interpretació clínica presenta una major dificultat. D'entre totes les variants dipositades en les bases de dades, al voltant de 1800 identificades en aquests gens es consideren VUS, és a dir, que no es coneix la seva rellevància clínica. L'any 2009, es va crear el consorci ENIGMA (*Evidence-based network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles*) (Spurdle et al., 2012) amb l'objectiu d'avaluar la significació clínica de les VUS recollint les dades clíniques, genètiques i histopatològiques de laboratoris d'arreu del món.

Per a la classificació de les variants, principalment s'utilitzen anàlisis integratives, models de predicció multifactorials, que tenen en compte diverses tipus d'evidències que es poden diferenciar en directes o indirectes. Les directes són aquelles que mesuren una associació entre la variant i la malaltia. Les indirectes es basen en les prediccions o observacions fetes respecte a la funcionalitat del gen.

a) Evidències directes

Anàlisi de la cosegregació

S'observa la segregació de la VUS amb la malaltia. És una eina molt potent per a la classificació, per la qual cosa s'ha desenvolupat eines per a quantificar-ho. Per a dur a terme aquesta anàlisi, s'estudien familiars del proband, persones afectes i sanes, i s'observa si la variant està present en individus amb la malaltia o s'hereta independentment. Per a poder fer aquesta quantificació, hi ha diferents mètodes que assumeixen uns valor de penetrància i freqüència per a la variant. S'obté una probabilitat (LOD score) (Mohammadi et al., 2009; Rañola et al., 2018; Rosenthal et al., 2017). Si aquest valor és superior a 3, demostra una forta evidència de cosegregació. S'ha de tenir en compte que, tot i que és una mesura força fiable, té certes limitacions. Una limitació és el nombre d'individus analitzats, que es pot resoldre analitzant més famílies amb la mateixa variant. Una altra limitació és

l'existència de fenocòpies. Ens referim a fenocòpia com aquells individus que presenten un fenotip que mimetitza el fenotip dels individus amb una variant patogènica, tot i no ser portador de la mateixa. A més, també cal tenir en compte que no es pot descartar que es produeixi la transmissió de dues variants en desequilibri de lligament, i per tant que es consideri causant de la síndrome aquella que no ho és.

Estudis cas-control

Aquest mètode està basat en la comparació de la freqüència de la variant en estudi en una sèrie de casos i controls. Aquest mètode és difícil que pugui establir el paper patogènic d'una variant, però és molt útil per a poder descartar la patogenicitat. Es considera que una variant amb una freqüència superior a l'1% en controls (per tant, considerat un polimorfisme) és molt poc probable que representi una variant patogènica de penetrància elevada. Aquests estudis poden donar una estimació directa del risc de càncer associat d'una variant al·lèlica específica, però requereixen un nombre d'individus elevat. Per tant és força difícil utilitzar-ho en la classificació de VUS que són poc habituals en la població general.

Història personal i familiar

Aquesta evidència es basa en la premissa que les variants patogèniques són més freqüents en famílies amb major incidència de casos de càncer relacionats amb la síndrome. La informació que es recull en aquests casos són edat al diagnòstic, tipus de càncer i dades anatomopatològiques (Broca, 1866; Spearman et al., 2008).

Coocurrència

La coocurrència en un mateix individu d'una VUS i una variant patogènica en un mateix gen, ja pot ser molt indicatiu de la no patogenicitat de la VUS, en absència d'un fenotip concret. Aquesta afirmació ve deguda a que en la síndrome de CMOH,

generalment la inactivació de les dues còpies del gen responsable de la malaltia, causa letalitat embrionària (Hakem et al., 1996). Basant-se en això, s'assumeix que no poden existir individus portadors de mutacions bial·lèliques en aquests gens. Tot i això, s'han descrit humans portadors de mutacions bial·lèliques que presenten nombroses anomalies congènites i manifestacions clíniques característiques de la síndrome d'anèmia de Fanconi (Keupp et al., 2019; Sawyer et al., 2015). Per tant, si un individu no presenta un fenotip extrem de la síndrome, la presència d'una variant patogènica en un al·lel i d'una variant de significat incert en l'altra al·lel (en *trans*), dóna lloc a una forta evidència contra la patogenicitat de la variant no classificada.

b) Evidències indirectes

Anàlisi del transcrit (ARNm)

Segons el dogma central de la biologia cel·lular, és imprescindible un processament correcte dels introns per a la síntesi d'una proteïna. S'han descrit centenars de variants genètiques que produeixen alteracions en el procés d'empalmament que són causants de malalties d'origen hereditari. L'empalmament és un procés pel qual s'eliminen els introns d'un transcrit primari i posteriorment es connecten els exons per a produir un ARN madur. Aquest procés està conduït pel complex proteic de tall i unió i induït per senyals provinents de l'ARN missatger (ARNm). Els principals senyals en l'ARNm són: el lloc 5' (donador), el lloc 3' (acceptor) i el lloc de ramificació. Aquests senyals presenten un grau de conservació moderat, és a dir, poden patir certes modificacions sense veure's afectada la seva funció. Tot i això, els primers i últims 2 nucleòtids de l'intró sí que són posicions completament conservades (llocs canònics o consens de l'*empalmament*). A més a més, al llarg de l'ARNm hi ha senyals reguladores

d'aquest procés que permeten els processos d'empalmament alternatiu (potenciadors i inhibidors).

Diferents estudis han demostrat que les anàlisis *in vitro* de l'ARNm poden identificar correctament variants que afecten al procés de tall i unió (Bonnet et al., 2008; X. Chen et al., 2006; Claes et al., 2003). Això es pot verificar mitjançant l'anàlisi de l'ARNm amb una o dues metodologies força estandarditzades com són la seqüenciació del ARNm i l'anàlisi dels fragments generats a partir de l'ARNm. Tot que algunes VUS poden alterar el nivell d'expressió, en alguns casos l'al·lel mutat conserva la capacitat de transcripció. Aquests estudis presenten certes dificultats: la disponibilitat d'una mostra d'ARN, la inexistència de guies clares de classificació dels resultats obtinguts i la possibilitat de detectar alteracions en l'empalmament que no siguin patogèniques.

Estudis funcionals

S'han establert diferents assajos *in vitro* per a estudiar els efectes de les variants en la funcionalitat del gen. S'ha de tenir en compte que els resultats que s'obtenen no són del tot informatius degut a que els gens que s'estudien presenten més d'una funció.

En el cas del gen *BRCA1* els estudis funcionals validats són el test d'activació de la transcripció i el test d'activitat ubiquitina lligasa. En el cas de *BRCA2* els assajos validats són l'anàlisi de la reparació mitjançant la recombinació homòloga i l'amplificació del centrosoma. Aquests estudis es centren en les funcions principals d'aquestes proteïnes i dels seus dominis funcionals. Aquests assajos no s'apliquen a la rutina diagnòstica degut a què els resultats obtinguts no acostumen a ser concloents per a la classificació de la variant. Freqüentment s'identifica només una pèrdua parcial de la funcionalitat, la qual cosa no es pot traduir en nivells de risc. Quan l'estudi no detecta una pèrdua de funció, el resultat tampoc és concloent ja

que pot ser degut a que l'assaig seleccionat no fos l'idoni per a la variant a estudiar (Guidugli et al., 2014; Millot et al., 2012).

Anàlisi in silico

Els estudis computacionals són una aproximació molt utilitzada per a la classificació de les VUS. La majoria de les eines *in silico* s'utilitzen per a esbrinar l'efecte de les variants sobre el procés d'empalmament de l'ARNm. La sensibilitat i especificitat d'aquestes eines depèn molt de la regió on es trobi la VUS. Així mentre que una variant que comporta la producció d'un codó de parada prematur, es pot assumir que serà patogènica, aquelles delecions o insercions que no alteren un domini funcional important, s'han de considerar de significat incert.

Per altra banda, les variants que comporten un canvi d'aminoàcid i que es consideren patogèniques, majoritàriament estan ubicades en regions funcionalment importants del gen, és a dir, en dominis funcionals importants. En el cas de *TP53* i *BRCA2*, aquests canvis es localitzen principalment en els dominis d'unió a ADN; en *MLH1* es concentren en el domini ATPasa; en *BRCA1* s'ubiquen en els dominis RING (extrem, N-terminal) i BRCT (extrem C-terminal de la proteïna). Per això, les eines de predicció *in silico* que s'utilitzen en l'estudi de les variants que donen lloc a un canvi d'aminoàcid, es basen principalment en la conservació dels aminoàcids de les proteïnes com SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) o en l'alineament múltiple de seqüències de proteïnes com Align-GVGD (http://agvgd.hci.utah.edu/agvgd_input.php), i en l'efecte del canvi en l'estructura de la proteïna com PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). De totes maneres, aquestes prediccions no són prou robustes com per classificar per sí mateixes les variants amb error de sentit i necessiten en tot cas la confirmació mitjançant estudis funcionals.

c) Model probabilístic multifactorial

Aquest model arrenca d'una probabilitat *a priori*, derivada d'un model basat en la conservació de les seqüències (Align-GVGD) sobre la qual s'integren evidències de l'associació entre la VUS i la malaltia, per a donar lloc a una probabilitat *a posteriori* (Easton et al., 2007). En el cas de *BRCA1* i *BRCA2*, les evidències que s'utilitzen habitualment per obtenir la probabilitat *a posteriori* són: l'anàlisi de cosegregació, la coocurrència, la història familiar i personal i les dades anatomopatològiques del tumor (Lindor et al., 2012). En alguns models alternatius, s'han integrat els resultats de l'anàlisi d'empalmament o d'estudis funcionals (Spearman et al., 2008). Degut a la dificultat en l'aplicació del model multifactorial, aquest no s'aplica en les variants que produeixen un corriment en la pauta de lectura, que produeixen un codó de parada prematur o bé que alteren el procés d'empalmament per estar localitzades en lloc canònics, ja que habitualment es classifiquen directament com a patogèniques. Quan el codó de parada prematur es produeix en l'últim exó del gen, s'ha de tenir precaució en la classificació aquesta variant perquè pot ser que aquest canvi no alteri la funcionalitat de la proteïna. A més, les variants localitzades en les posicions canòniques i que només produeixen una inserció o deleció d'un o més triplets, no es poden classificar directament com a patogèniques perquè aquesta petita alteració pot no afectar a la funció.

Amb la probabilitat final obtinguda del model multifactorial, les variants es poden classificar en 5 classes (Taula 3) tal com indica el consorci ENIGMA. Aquesta classificació és una adaptació a partir de la classificació establerta per l'Agència Internacional per a la Investigació del Càncer (IARC). El consorci ENIGMA a més ha establert unes recomanacions pel que fa al seguiment i al maneig dels pacients segons la classificació d'aquestes variants (Eccles et al., 2015; Plon et al., 2008).

Classe	Definició quantitativa (P)	Definició qualitativa	S'ha d'informar de la variant?	Realitzar estudi directe als familiars?	Seguiment
Classe 1	<0.001	No patogènica	No	No	Estudi genètic no rellevant. Mesures de seguiment basades en la història personal i/o familiar i en altres factors de risc
Classe 2	0.001-0.049	Probablement no patogènica	Sense recomanació específica	Només recomanable per recerca	Estudi genètic no rellevant. Mesures de seguiment basades en la història personal i/o familiar i en altres factors de risc
Classe 3	0.05-0.949	Significat clínic desconegut	Sí	Només recomanable per recerca	Estudi genètic no rellevant. Mesures de seguiment basades en la història personal i/o familiar i en altres factors de risc
Classe 4	0.95-0.99	Probablement patogènica	Sí	Sí i també recomanable per recerca	Mesures de seguiment i/o profilàctiques corresponents a individus d'alt risc
Classe 5	>0.99	Patogènica	Sí	Sí	Mesures de seguiment i/o profilàctiques corresponents a individus d'alt risc

Taula 3. Classificació clínica de variants genètiques i la seva translació a la clínica (Taula adaptada de Eccles et al., 2015)

2.1.3.2. Classificació de les variants en altres gens de càncer hereditari

Per alguns gens en concret, com ara els gens *BRCA1* i *BRCA2* i els gens relacionats amb la síndrome de Lynch, existeixen unes guies de classificació de les variants que s'identifiquen durant la seva anàlisi. Per a la resta dels gens estudiats en malalties d'herència mendeliana, fins l'any 2015 no es van establir unes guies o

recomanacions que permetessin la classificació d'aquestes variants (Richards et al., 2015). Aquestes recomanacions són un consens realitzat per la *American College of Medical Genetics and Genomics* juntament amb la *Association for Molecular Pathology* (ACMG-AMP), en el qual es va crear una nomenclatura i un sistema de classificació estandarditzada i normalitzada per a evitar inconsistències en les classificacions dels diferents laboratoris. En el cas de que la variant no compleixi els criteris per a la classificació d'aquesta, ha de continuar sent considerada variant de significat incert (Taula 4, Taula 5 i Taula 6).

Evidència de patogenicitat	Categoria	
Molt forta (<i>Very Strong</i>)	PVS1	Variant sense sentit o de corriment de la pauta de lectura, en regió canònica ± 1 o 1, en codó d'iniciació, o deleció d'1 o més exons, en gens on la pèrdua de funcionalitat és un mecanisme conegut de la malaltia. Advertències: <ul style="list-style-type: none"> - Precaució amb la interpretació de variants en l'extrem 3' - Precaució amb les variants que alteren el procés d'empalmament que només anul·len pocs nucleòtids i no comporten un codó stop. - Precaució amb els gens amb múltiples transcrits
Forta (<i>Strong</i>)	PS1	Variants que comporten un canvi d'aminoàcid ja descrit com a patogènic, amb un canvi de base nucleotídica diferent
	PS2	Variant <i>de novo</i> en un pacient amb la malaltia i sense història familiar (amb maternitat i paternitat confirmades)
	PS3	Estudis funcionals <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> que corroboren l'efecte deleteri en el gen o en el producte del gen.
	PS4	La prevalença de la variant en individus afectes està incrementat en comparació amb la prevalença en controls
Moderada (<i>moderate</i>)	PM1	Localitzada en una regió <i>hot-spot</i> i/o en un domini funcionalment important sense una variació benigna
	PM2	Absent en controls en les bases de <i>dades Exome Sequencing Project, 1000 Genomes project</i> o <i>Exome Aggregation Consortium</i> . Precaució amb les insercions i delecions ja que en els estudis poblacionals no estan ben establertes.
	PM3	Per a malalties recessives, variant detectada en <i>trans</i> amb una variant patogènica. Aquest paràmetre requereix l'estudi en els pares per a determinar la fase en la que es troba la variant (<i>cis</i> o <i>trans</i>)
	PM4	La llargada de la proteïna canvia com a resultat d'una deleció o inserció que no altera la pauta de lectura en una regió no repetitiva o per variants que anul·len el codó stop.
	PM5	Un canvi d'aminoàcid no descrit anteriorment, en un residu on un canvi d'aminoàcid diferent s'ha descrit com a patogènic.
	PM6	Variant que s'assumeix que és <i>de novo</i> , però sense la confirmació de maternitat ni paternitat.
Evidències que recolzen (<i>Supporting</i>)	PP1	Cosegregació amb la malaltia en molts familiars en un gen que es coneix que es el causant de la malaltia
	PP2	Variant de canvi d'aminoàcid en un gen que té un índex de variants <i>amb error de sentit</i> benignes molt baix i en el qual aquestes variants són un mecanisme conegut de ser causant de la malaltia
	PP3	Diferents eines de predicció <i>in silico</i> recolzen l'efecte deleteri del gen.
	PP4	El fenotip del pacient o de la història familiar es molt específic d'una malaltia amb una etiologia genètica única
	PP5	Fonts molt fiables han classificat aquesta variant com a patogènica, però no es pot corroborar amb una avaluació independent.

Taula 4. Criteris per a la classificació de variants patogèniques publicades per l'*American College of medical genetics* i l'*Association for Molecular Pathology*. Taula Adaptada de (Richards et al., 2015)

Evidència d'impacte benigne	Categoria	
Independents (Stand-Alone)	BA1	La freqüència al·lèlica és >5% en les bases de dades <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1000 Genomes Project</i> o <i>Exome Aggregation Consortium</i> .
	BS1	La freqüència al·lèlica és superior a l'esperada en aquesta malaltia.
Força (Strong)	BS2	Variant observada en adults sans per a malalties recessives (homozigosi), dominant (heterozigots) o associades al cromosoma X (hemizigòtic) en les que s'espera una penetrància complerta en edats joves.
	BS3	Estudis funcionals <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> mostres que no hi ha un efecte deleteri en la funció de la proteïna o en el procés d'empalmament.
	BS4	Manca de segregació en membres afectes de la família - Cal tenir en compte que la presència de fenocòpies de fenotips comuns (càncer, epilèpsia...) poden mostrar una manca de segregació.
	BP1	Variant de canvi d'aminoàcid en un gen on principalment les variants truncants són les causants de la malaltia.
Evidències que recolzen (Supporting)	BP2	Variant identificada en <i>trans</i> amb una variant patogènica en una malaltia de penetrància complerta o identificada en <i>cis</i> amb una variant patogènica en qualsevol patró d'herència.
	BP3	Delecions i/o insercions que preserven la pauta de lectura en regions repetitives sense una funció coneguda.
	BP4	Diferents eines de predicció bioinformàtiques suggereixen que no hi ha un impacte en el gen.
	BP5	La variant s'ha identificat en un cas amb una base molecular alternativa per la malaltia.
	BP6	Fonts fiables han reportat la variant com a benigna, però no hi ha evidències pel laboratori per a confirmar-ho.
	BP7	Un canvi sinònim pel qual els algoritmes de predicció de d'empalmament prediuen que no hi haurà un impacte en les seqüències consens i no es crearan nou llocs d'empalmament. A més a més, es tracta d'una posició poc conservada.

Taula 5. Criteris per a la classificació de variants benignes publicades per a *American College of Medical Genetics* i *Association for Molecular Pathology*. Taula Adaptada de (Richards et al., 2015)

BENIGNA	1.1. 1 BA1 1.2. ≥ 2 BS (BS1-BS4)
PROBABLEMENT BENIGNA	2.1. 1 BS (BS1-BS4) + 1 BP (BP1-BP7) O 2.2. ≥ 2 BP (BP1-BP7)
SIGNIFICAT INCERT	3.1. Quan no compleix cap dels criteris de les altres 4 categories
PROBABLEMENT PATOGENÈICA	4.1. 1 PVS1 + 1 PM (PM1-PM6) O 4.2. 1 PS (PS1-PS4) + 1-2 PM (PM1-PM6) O 4.3. 1 PS (PS1-PS4) + ≥ 2 PP (PP1-PP5) O 4.4. ≥ 3 PM (PM1-PM6) O 4.5. 2 PM (PM1-PM6) + ≥ 2 PP (PP1-PP5) O 4.6. 1 PM (PM1-PM6) + ≥ 4 PP (PP1-PP5)
PATOGENÈICA	5.1. 1 PVS1 + a) ≥ 1 PS (PS1-PS4) O b) ≥ 2 PM (PM1-PM6) O c) 1 PM (PM1-PM6) + 1 PP (PP1-PP5) O d) ≥ 2 PP (PP1-PP5) O 5.2. ≥ 2 PS (PS1-PS4) O 5.3. 1 PS (PS1-PS4) + a) ≥ 3 PM (PM1-PM6) O b) ≥ 2 PM (PM1-PM6) + ≥ 2 PP (PP1-PP5) O c) 1 PM (PM1-PM6) + ≥ 4 PP (PP1-PP5)

Taula 6. Regles per a la combinació dels criteris per a poder classificar les variants. Adaptada de (Richards et al., 2015)

2.2. Expressió fenotípica del CMOH

Les característiques histològiques del càncer de mama associat a alteracions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* varien respecte les característiques histopatològiques del càncer de mama esporàdic així com també passa en el cas del càncer d'ovari.

2.2.1. Càncer de Mama

El càncer de mama és una malaltia heterogènia. És per això que s'han anat incorporant tècniques i tecnologies per a la seva classificació. Actualment, s'utilitza la classificació histològica clàssica en combinació amb la classificació molecular per a poder caracteritzar el tumor, conèixer el pronòstic i poder realitzar un tractament més personalitzat i individualitzat.

La classificació histològica clàssica es basa en la morfologia cel·lular (Nielsen et al., 2004). A partir d'aquesta morfologia, els tumors es poden classificar principalment com a tumors formats per cèl·lules d'origen ductal (**adenocarcinomes ductals**) o d'origen lobel·lar (**carcinomes lobel·lars**). L'adenocarcinoma ductal és el tipus histològic més freqüent (70-80%). Per altra banda, el carcinoma lobel·lar infiltrant (10-15%) té més probabilitat de presentar bilateralitat que el ductal infiltrant (Figura 8).

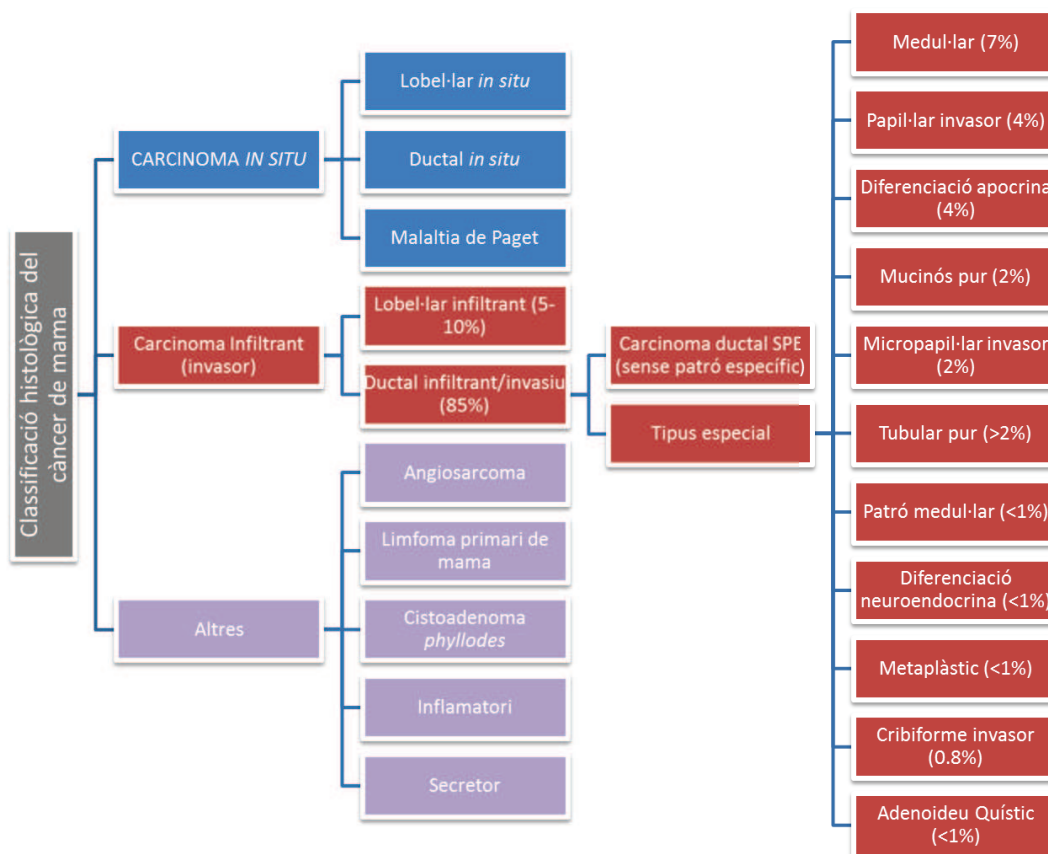


Figura 8. Classificació histològica dels subtipus de càncer de mama. Aquest esquema categoritza l’heterogeneïtat que presenta el càncer de mama, basant-se en elements histològics i patrons de creixement cel·lular.

Els diferents subtipus moleculars reflecteixen la diversitat biològica del càncer de mama. Si integrem totes les dades mutacionals que permeten definir un tumor, s’acaben definint quatre entitats mutacionals o quatre subtipus intrínsecs principals en el càncer de mama, com ja va definir Perou *et al.* (Perou et al., 2000), que realment reflecteixen la transformació de cada una de les diferents poblacions cel·lulars normals. La classificació molecular es basa en l’anàlisi immunohistoquímic, en el número de còpies dels gens del *RE*, *RP* i *HER2*, l’índex de proliferació i el *Ki67* o en plataformes d’expressió multigèniques que poden mesurar desenes o milers de transcrits gènics simultàniament i que es relacionen amb el pronòstic o amb el risc de metastasi. A partir de l’anàlisi molecular, s’han

definit nous subtipus moleculars associats a la distinció de les cèl·lules d'origen. Segons aquestes observacions, el càncer de mama es pot classificar en 1) Luminal A; 2) Luminal B; 3) Tumors de tipus mama normal; 4) Amb amplificació de Her2; 5) Basal; 6) *Claudin-Low* (Taula 7).

TIPUS	FREQÜÈNCIA	CORRESPONDÈNCIA AMB LA CLASSIFICACIÓ HISTOLÒGICA	CARACTERÍSTIQUES MOLECULARS
<i>Claudin-Low</i>	12-14%	Metaplàstic Medul·lar	RE-, RP-, HER2-, CD44/24+
Tipus basal	15-20%	Adenoideu quístic Medul·lar Metaplàstic Secretor	RE-, RP-, HER2-, CK5/6/14+ o EGFR+
Her2+	10-15%	Apocrí Lobular Micropapil·lar Lobular pleomòrfic	RE-, RP-, HER2+
<i>Tumor de tipus mama normal (Normal-like)</i>		Metaplàstic Medul·lar	RE-, RP-, HER2-, CK 5/6-, CK14-, p63- i/o EGFR-
Luminal A	40%	Tubular Ductal infiltrant SPE de baix grau Lobel·lar infiltrant Apocrí DI osteoclàstic Lobel·lar infiltrant Micropapil·lar Mucinós Neuroendocrí Lobel·lar pleomòrfic	RE+, RP+/-, HER2-
Luminal B	20%	Ductal Infiltrant SPE, Micropapil·lar, Apocrí, DI osteoclàstic, Lobel·lar infiltrant Micropapil·lar Mucinós Neuroendocrí Lobel·lar pleomòrfic	RE+, RP +/-, HER2+

Taula 7. Classificació molecular del càncer de mama, basada en els tipus histològics que es representen mitjançant Immunohistoquímica.

+: presència; -: absència; RE: receptor d'estrògens; PR: receptor de progesterona; Ck: citoqueratina; EGFR: receptor del factor de creixement epidèrmic; HER2: receptor 2 del factor de creixement epidèrmic humà

Els tumors amb mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* presenten característiques diferencials respecte els que no presenten mutacions en aquests gens. Els tumors de mama que presenten mutació en *BRCA1*, moltes vegades no presenten expressió de receptors d'estrògens i de progesterona (RE i RP), ni ampliació del gen *HER2*. Aquests tumors també presenten freqüentment mutacions en el gen *TP53*. La classificació molecular dels tumors amb mutacions en el gen *BRCA1* mitjançant els perfils d'expressió gènica, demostra freqüentment un fenotip del tipus basal. Els tumors de mama associats a mutacions de *BRCA2* acostumen a presentar receptors d'estrògens (RE) i normalment s'observen a una edat més avançada que els associats a *BRCA1*. L'any 2014 es van descriure diferències biològiques entre els subtipus triple negatiu i el triple negatiu que presentava mutació en *BRCA1*. La diferència principal es basa en un major número de mutacions (sobretot en *TP53*), degut a que són tumors més inestables (Prat et al., 2014).

2.2.2. Càncer d'Ovari

Els tumors d'ovari es poden classificar segons les cèl·lules d'origen en tres categories principals: tumors epitelials, tumors de cèl·lules germinals i tumors de l'estroma dels cordons sexuals primitius (Taula 8). Els tumors epitelials són els tumors malignes d'ovari més freqüents i són el tipus predominant en el context del càncer hereditari (Bewtra et al., 1992). Aquests tipus de tumors, tradicionalment s'han classificat histològicament segons l'aparença cel·lular en serós, mucinós, endometriode, de cèl·lules clares i de Brenner. El carcinoma serós d'alt grau és el més associat al càncer d'ovari hereditari, sense trobar-se diferències en la morfologia i el grau (Lakhani et al., 2004; Rubin et al., 1996; Shaw et al., 2002).

	Freqüència	Proporció de tumors malignes	Tipus
Cèl·lules de l'epiteli superficial	65-70%	90%	Serós (60-80%) Mucinos (25%) Endometrioide (20%) Cèl·lules clares (5%) Tumor de Brenner (<1%) Cistoadenofibroma
Cèl·lules germinals	15-20%	3-5%	Teratoma Disgerminoma
Cordons sexuals	5-10%	2-3%	Fibroma Tumor de cèl·lules de Sertoli-Leydig Tumor de cèl·lules de la granulosa
Metàstasi a ovari	5%	5%	

Taula 8. Classificació histològica del càncer d'ovari segons la OMS.

2.2.3. BRCAness

El concepte *BRCAness* descriu un conjunt de característiques moleculars que presenten els tumors amb pèrdua de funcionalitat de BRCA1 o BRCA2. Aquest fenotip és la manifestació d'un defecte en la funcionalitat del sistema de recombinació homòloga, que pot ser degut a variants patogèniques en els gens *BRCA1* i *BRCA2*, o per la presència d'alteracions genètiques o altres processos de silenciament, en altres gens associats a la HR a nivell somàtic o germinal (Taula 9) (Lord & Ashworth, 2016). Recentment, Domagala *et al.* han descrit un comportament similar dels tumors triple-negatius no portadors de mutació, amb aquells portadors de mutació en els gens *BRCA1* i *BRCA2*, sent plausible doncs la hipòtesi que aquests tumors puguin ser diana dels agents inhibidors de PARP (Domagala et al., 2017).

GEN	Tipus Tumorals amb alteracions somàtiques (mutacions, delecions i hipermetilació del promotor)	Tipus tumorals i síndromes amb mutacions germinals
ATM	Leucèmia, Mama, glioblastoma, carcinoma de cèl·lules renals clares, adenocarcinoma de pulmó, sarcoma, pròstata, gàstric, bufeta, colorectal, uterí i pancreàtic.	Leucèmia, limfoma, medul·loblastoma, glioma, atàxia telangièctasi
ATR	Mama, colorectal, cap i coll, gàstric, úter	Orofaringe, telangièctasi cutània familiar i càncer familiar
BAP1	Carcinoma renal de cèl·lules clares, colangiosarcoma, fetge i melanoma uveal	Mesotelioma, melanoma uveal
BLM		Síndrome de Bloom
BRCA1	Mama, ovari, pulmó, pròstata, pròstata metastàtic resistent a la castració, adenocarcinoma ductal pancreàtic	Càncer de mama, càncer d'ovari, adenocarcinoma ductal pancreàtic
BRCA2	Mama, Ovari, adenocarcinoma ductal pancreàtic, pròstata, pròstata metastàtic resistent a la castració, gàstric, bufeta, pulmó, limfoma, sarcoma	Mama, ovari, leucèmia, adenocarcinoma ductal pancreàtic
BRIP1	Ovari	
CDK12	Ovari?, càncer de pròstata metastàtic resistent a la castració, gàstric	
CHEK1	adenocarcinoma ductal pancreàtic, sarcoma	
CHEK2	Úter, ovari	Mama
FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF	Ovari, Pulmó (<i>FANCA</i>) Carcinoma renal de cèl·lules clares (<i>FANCD2</i>)	Leucèmia mieloide aguda, leucèmia, anèmia de Fanconi
MRE11A	Càncer colorectal	
NBN (NBS1)	Gàstric, úter	
PALB2	Gàstric, Ovari	Tumor de Wilms, medul·loblastoma, leucèmia mieloide aguda, Anèmia de Fanconi, Mama, adenocarcinoma ductal pancreàtic, ovari
RAD51B, RAD51C, RAD51D	Ovari	Mama, Ovari
WRN	Ovari, càncer de pròstata metastàtic resistent a la castració, pulmó, úter	Síndrome de Werner

Taula 9. Alteracions associades al càncer en gens *BRCAness*. Adaptada de (Lord & Ashworth, 2016). Recentment s'han descrit mutacions somàtiques en tumors relacionats amb la recombinació homòloga, i per tant candidats a presentar *BRCAness*, tot i que calen factors addicionals per a que es produeixi aquest dèficit.

3. Assessorament genètic en CMOH

El descobriment de la implicació dels gens de susceptibilitat *BRCA1* i *BRCA2* en el CMOH va canviar el maneig dels pacients diagnosticats de síndrome de CMOH i de les seves famílies, ja que va permetre oferir unes recomanacions, un assessorament dirigit i fins i tot un estudi genètic per a la identificació dels portadors i no portadors d'una determinada mutació en una família. Això desencadenava la possibilitat d'establir unes mesures preventives, de seguiment i reductores de risc adequades.

3.1. El procés de l'assessorament genètic

L'assessorament genètic és un procés que no implica la realització d'un estudi genètic. Tal i com es defineix a la Llei d'Investigació Biomèdica de l'any 2007 (BOE, 2007), el consell genètic és el "*procediment destinat a informar una persona sobre les possibles conseqüències per a ella o la seva descendència dels resultats d'una anàlisi o cribratge genètics i els seus avantatges i riscos i, si s'escau, per assessorar-la en relació amb les possibles alternatives derivades de l'anàlisi. Té lloc tant abans com després d'una prova o cribratges genètics, i fins i tot en absència d'aquests*".

En aquest procés s'inclou la interpretació de la història individual i familiar, educació sobre els aspectes més complexos com són l'estudi genètic, l'herència i la prevenció i una fase d'assessorament per a facilitar la presa de decisions. Cal tenir en compte que aquest procés presenta un conjunt d'implicacions clíniques, ètiques i psicològiques, i també econòmiques i que per tant es valorarà la recomanació de fer un estudi genètic en cada cas particular. En les primeres fases del procés d'assessorament genètic, és imprescindible ubicar al pacient i a la seva família en un dels possibles escenaris pel que fa al risc:

- a) Risc poblacional o baix risc.** Amb un risc equivalent al de la població general i que no implica canvis pel que fa a les recomanacions i estratègies de cribratge de la població general.
- b) Risc Intermedi o moderat.** Representa un increment del risc respecte a la població general. Una de les estratègies que es duen a terme és avançar uns anys les mesures de cribratge respecte a la població general. En aquest grup, en alguns casos és recomanable realitzar estudis genètics.
- c) Alt risc.** Representa un risc molt incrementat respecte a la població general. Gairebé en tots els casos es recomana la realització d'un estudi genètic i també mesures de reducció de risc específiques, encara que no s'hagi identificat una mutació.

En el cas de l'estudi dels gens relacionats amb la síndrome de CMOH, només es recomanarà l'estudi genètic en aquells casos que compleixin els criteris establerts per les societats científiques (González-Santiago et al., 2019) o que tinguin una probabilitat alta de patir la síndrome de CMOH. Aquesta probabilitat es pot calcular mitjançant diferents eines obtenint una probabilitat pre-test en base a criteris clínics del pacient i de la família. D'aquests models n'hi ha de diferents tipus tot i que el més estandarditzat és el model BOADICEA (*Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm*), que consisteix en un algoritme computacional que permet calcular el risc de càncer de mama i ovari basat en la història familiar del pacient. També s'utilitza per a calcular la probabilitat de ser portadors de mutacions en els gens *BRCA1* i *BRCA2* (Antoniou et al., 2004; Antoniou et al., 2008; Lee et al., 2019).

L'individu amb una major probabilitat de ser portador d'una mutació dintre d'una família, és preferiblement un individu afecte de la malaltia i de menor edat al

diagnòstic (M. E. Robson et al., 2015). L'individu seleccionat per a la realització de l'estudi molecular se'l coneix com a **proband** o cas índex.

En el context del procés d'assessorament genètic, és preceptiu el que es coneix com a consentiment informat. El consentiment informat és la conformitat lliure, voluntària i conscient d'un pacient, manifestada en ple ús de les seves facultats i després de rebre la informació adequada, perquè tingui lloc una actuació que afecta la seva salut. Els drets a la informació i la regulació del procés de consentiment informat tenen referència a la Llei general de sanitat. Aquest procés queda recollit en un document en el qual es descriu l'objectiu, els possibles resultats i les implicacions de l'estudi. A partir de la signatura del document de consentiment informat, és quan es pot dur a terme l'estudi genètic.

3.2. Resultats de l'estudi genètic

L'anàlisi molecular dels gens que s'analitzen en el context del CMOH ha d'incloure la cerca de mutacions puntuals, insercions i delecions i grans reordenaments i l'anàlisi de seqüències intròniques adjacents a la regió codificant. Hi ha dos tipus d'estudis genètics que es poden realitzar: l'estudi genètic complert i l'estudi directe o de portadors.

L'estudi genètic complert és l'estudi genètic inicial de l'individu proband. El cas índex habitualment presenta un diagnòstic de càncer hereditari i en l'entorn de la família no s'ha realitzat cap estudi genètic o no es disposa del resultat. En aquest proband es realitza l'anàlisi de les regions codificants i part de les no codificants, de tots els gens relacionats amb la síndrome en estudi.

En l'estudi directe o de portadors s'estudia en la resta de familiars de risc de l'entorn familiar, la presència o absència d'una mutació identificada prèviament en l'individu proband.

Segons l'estudi realitzat a l'individu proband, hi ha diferents tipus de resultats:

- a) **RESULTAT INFORMATIU.** Un resultat es considera informatiu quan s'identifica una variant genètica que pugui explicar la síndrome que s'està estudiant. Aquest resultat proporciona una informació sobre el risc i permet explicar l'agregació familiar del càncer.
- b) **RESULTAT NO INFORMATIU.** Un resultat es considera no informatiu quan no s'ha identificat cap variant genètica que permeti explicar la síndrome. En aquest context s'inclou la identificació de variants de significat incert, de les quals no es coneix el grau d'associació amb la malaltia. En aquest cas, es recomana realitzar estudis complementaris per a poder dilucidar i/o classificar aquesta variant identificada.

Quan s'ha obtingut un resultat positiu en un proband, s'ofereix a la resta dels membres de la família la possibilitat de la realització d'un estudi genètic per a identificar la presència o absència d'aquesta variant en la resta d'individus. En aquests casos es poden obtenir dos resultats:

- a) **RESULTAT NEGATIU.** L'individu no és portador de la variant estudiada. Per tant, el seu risc de desenvolupar la malaltia és similar al risc de la població general (risc poblacional) (Korde et al., 2011).
- b) **RESULTAT POSITIU.** L'individu és portador de la variant genètica identificada en el proband. Això comporta que aquest individu té un risc similar al del proband i superior al risc poblacional.

En alguns casos, es pot donar lloc a un resultat negatiu en un individu afecte, la qual cosa es coneix com a **fenocòpia**, és a dir, aquell individu pateix la malaltia no per ser portador de la mutació familiar si no per altres causes (ambientals, etc).

3.3. Aspectes legals del consell genètic

A nivell estatal, l'any 2007 es va publicar la Llei 14/2007 d'Investigació Biomèdica, la qual regula la realització d'estudis genètics i el tractament de dades genètiques de caràcter personal, la indicació d'estudis genètics, el consentiment informat, el dret a la informació i el dret a no ser informat, l'accés a les dades genètiques pel personal sanitari, el deure de confidencialitat i el dret a la protecció de dades genètiques, conservació de dades, requisits de qualitat i acreditació dels centres d'anàlisis genètiques. En els articles 46 i 47 d'aquesta llei, es tracten les anàlisis genètiques i el tractament de les dades. En l'article 47 concretament, s'especifica la informació que ha de rebre l'individu respecte el tipus d'estudi que es realitzarà i els possibles resultats, així com els seus drets respecte les seves dades. En resum, especifica com s'ha de dur a terme el procés de consentiment informat. Per una altra banda, l'article 55 d'aquesta llei indica que *"Quan es porti a terme una anàlisi genètica amb fins sanitaris és necessari garantir a l'interessat un assessorament genètic apropiat"*. Per tant és imprescindible garantir un procés d'assessorament genètic adequat sempre que es realitzi un estudi genètic. Així doncs, existeix un marc normatiu ben establert que regula el consell genètic.

II. HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi

El resultat de l'anàlisi mutacional dels gens *BRCA1* i *BRCA2* en famílies amb sospita de la síndrome de CMOH és majoritàriament no informatiu. És a dir, només una de cada cinc famílies fenotípicament sospitoses d'una síndrome de CMOH, són portadores d'una alteració patogènica en aquests gens. Per tant, és necessari explorar altres gens i mecanismes que puguin estar implicats en aquesta síndrome.

En aquest context les hipòtesis d'aquesta tesi doctoral són:

1. Les variants de significat biològic incert detectades en els gens *BRCA1* i *BRCA2* es poden classificar segons l'índole de la seva implicació o no en la síndrome de CMOH mitjançant tres aproximacions:
 - a. L'anàlisi *in silico* (predicció mitjançant eines bioinformàtiques)
 - b. L'anàlisi *in vitro* (estudi de l'ARN missatger per comprovar l'efecte de la variant)
 - c. L'estudi cas-control
2. La hipermetilació del promotor dels gens *BRCA1* i *BRCA2* pot ser una de les causes de la inactivació d'aquests gens en la línia germinal.
3. Les tècniques de seqüenciació massiva aplicades en pacients amb sospita de CMOH, ens permetran detectar altres gens responsables de la patologia, més enllà dels coneguts *BRCA1* i *BRCA2*, augmentant així el rendiment diagnòstic.
4. El perfil metabòlic de les cèl·lules de càncer de mama amb mutació en els gens *BRCA1* i/o *BRCA2* és diferent de les cèl·lules de càncer de mama sense mutació en aquests gens. Trobar aquest patró permetrà desenvolupar una eina de cribatge per la identificació de pacients amb una alteració en aquests gens.

Objectius

L'objectiu general d'aquest treball és millorar el rendiment del diagnòstic molecular en el CMOH, en les famílies amb un resultat no informatiu després de l'anàlisi genètica dels gens *BRCA1* i *BRCA2*.

Per a demostrar les hipòtesis plantejades, s'han establert sis objectius principals:

1. Establir la possible patogenicitat de les variants de significat biològic incert identificades durant el procés de detecció de mutacions dels gens *BRCA1* i *BRCA2*, mitjançant la predicció bioinformàtica del procés d'empalmament i l'anàlisi de la seqüència de l'ARN missatger dels portadors.
2. Comprovar la fiabilitat de les eines bioinformàtiques de predicció per a seleccionar els casos per a fer l'estudi de l'ARN missatger.
3. Comparar les freqüències entre casos i controls de les variants identificades en més d'una família de la cohort estudiada.
4. Determinar si la hipermetilació del promotor dels gens *BRCA1* i *BRCA2* en la línia germinal, és el responsable de la síndrome de CMOH en pacients sense mutacions en aquests gens.
5. Identificar altres gens diferents de *BRCA1* i *BRCA2*, responsables de la síndrome de CMOH.
6. Identificar un perfil metabòlic com a biomarcador de la presència de mutacions en *BRCA1* i *BRCA2*.

III. RESULTATS

1. In silico, in Vitro and case-control analyses as an effective combination for analyzing BRCA1 and BRCA2 unclassified variants in a population-based sample.

Marta Rodríguez-Balada, Bàrbara Roig, Lourdes Martorell, Mireia Melé, Mònica Salvat, Elisabet Vilella, Joan Borràs, Josep Gumà.

Revista: *Cancer Genetics* 209 (11) 487-492. 2016

Quartil: Q3 (133/244) *Oncology*; Q2 (78/177) *Genetics and heredity*.

Impact factor (2019): 3.105

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.09.003>

La detecció de variants de significat biològic desconegut dóna lloc a una elevada incertesa en els resultats d'un estudi genètic.

En aquest treball hem volgut caracteritzar algunes de les variants detectades durant l'estudi dels gens *BRCA1* i *BRCA2* en pacients amb sospita de la síndrome de CMOH. A tal efecte, s'han seleccionat les variants susceptibles d'alterar el procés d'empalmament, mitjançant eines bioinformàtiques de predicció. D'aquestes variants, se n'ha seqüenciat l'ARNm per a poder observar si la predicció coincidia amb el resultat obtingut experimentalment. Per altra banda, les variants identificades en més d'una família de les 710 famílies estudiades a la Unitat de Consell genètic en Càncer de l'IOCS (Institut d'Oncologia de la Catalunya Sud) entre els anys 2001 i 2015, es van analitzar mitjançant un estudi cas-control.

Tots les prediccions obtingudes amb les eines bioinformàtiques es van confirmar amb l'anàlisi de l'ARNm per seqüenciació automàtica. De les 33 variants analitzades, 5 d'elles eren candidates a ser patogèniques segons la predicció *in silico* (c.212+1G>A, c.5152+5G>A, c.5278-1G>A en *BRCA1* i c.8168A>G i c.516+2T>A en *BRCA2*) i aquest resultat es va confirmar mitjançant la seqüenciació de l'ARNm. La resta de variants, segons les prediccions bioinformàtiques, no semblaven candidates a alterar el procés d'empalmament la qual cosa es va confirmar també mitjançant la seqüenciació de l'ARNm, és a dir, hi havia un 100% de concordança entre la predicció de les eines bioinformàtiques i la transcripció de l'ARNm observada.

En quant als resultats de l'estudi cas-control, es van seleccionar 10 variants dels gens *BRCA1* i *BRCA2* que es trobaven almenys en dues famílies. Aquestes variants es van analitzar mitjançant un assaig de discriminació al·lèlica en una població control de 793 individus. Les variants c.4068G>A, c.7008-62A>G i c.8851G>A del gen *BRCA2* es van identificar en freqüències de l'1%, 2.1% i 1.3% respectivament.

Es considera que aquelles variants que es troben en més de l'1% de la població són canvis que donen variabilitat a una espècie i, per si soles, no acostumen a augmentar la susceptibilitat a una malaltia. Aquests canvis es coneixen com a **polimorfismes**.

Per tant, mitjançant un anàlisi cas-control, es va poder classificar com a no patogèniques 3 de les variants estudiades. També es va poder determinar la fiabilitat dels resultats de les prediccions *in silico*, confirmant la patogenicitat de 5 variants.



ELSEVIER



CrossMark

Cancer Genetics 209 (2016) 487–492

**Cancer
Genetics**

ORIGINAL ARTICLE

***In silico*, *in vitro* and case-control analyses as an effective combination for analyzing *BRCA1* and *BRCA2* unclassified variants in a population-based sample**

Marta Rodríguez-Balada ^{a,1}, Bàrbara Roig ^{a,1}, Lourdes Martorell ^b, Mireia Melé ^a, Mònica Salvat ^a, Elisabet Vilella ^b, Joan Borràs ^a, Josep Gumà ^{a,*}

^a Cancer Genetic Counseling Unit (Oncology Research Group), Institut d'Oncologia de la Catalunya Sud (IOCS), Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Av. Del Dr. Josep Laporte, Reus, Spain; ^b Hospital Universitari Institut Pere Mata, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, CIBERSAM, C/Sant Llorenç, Reus, Spain

Ascertaining the clinical consequences of *BRCA1* and *BRCA2* variants of uncertain significance (VUS) is currently indispensable for providing effective genetic counseling and preventive actions for families with hereditary breast and ovarian cancer (HBOC). To this end, we conducted a combination of *in silico* prediction and cDNA splicing analyses of 13 *BRCA1* and 10 *BRCA2* VUS identified in our cohort as well as a case-control analysis in a population-based sample of 10 recurrent VUS. We observed consistent results between the *in silico* predictions and sequencing analyses for all analyzed VUS. An abnormal cDNA pattern was observed for variants c.212+1G>A and c.5278-1G>A in *BRCA1* and c.516+2T>A and c.8168A>G in *BRCA2* according to *in silico* splicing prediction. A case-control study of VUS confirmed the polymorphisms of the c.67+62A>G, c.7008-62A>G and c.8851G>A *BRCA2* variants previously published. c.4068G>A in the *BRCA2* gene can also be considered a polymorphism due to its occurrence at a frequency greater than 1% in our population.

Our study shows that employing population-based analysis and a combination of several *in silico* methods yields highly accurate information, resulting in a reliable tool for selecting variants for cDNA sequencing analysis in routine cancer genetic counseling units.

Keywords *BRCA1*, *BRCA2*, variants of unknown significance, cDNA, splicing, cancer genetic counseling

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The presence of a pathogenic mutation in the *BRCA1* or *BRCA2* gene in an individual confers a higher predisposition to developing hereditary breast and/or ovarian cancer (HBOC). Up to 15% of patients have been found to be carriers of variants in these genes that cannot be classified as benign or pathogenic and are defined as variants of uncertain significance (VUS).

BRCA VUS are currently mismanaged, hindering the clinical assessment of carriers, the determination of implications for cancer surveillance for patients and their family, decision making regarding risk-reducing surgeries and neonatal and prenatal testing and interventions [1].

Deleterious effects of VUS can be due to alterations in the coding sequence of the transcript or disruption of gene regulatory regions, such as promoters, untranslated regions, exons or introns, that modify the level of transcript expression [2].

It is widely accepted that one of the pathogenic pathways of unclassified variants is disruption of mRNA splicing of the *BRCA1* and *BRCA2* genes. In fact, it has been estimated that up to 60% of mutations that cause genetic diseases may alter splicing [3]. There are currently several available methods for analyzing the mRNA splicing processes of *BRCA1* and *BRCA2*.

Received June 3, 2016; received in revised form August 12, 2016; accepted September 8, 2016.

* Corresponding author.

E-mail address: jguma@grupsagessa.com

¹ These authors contributed equally.

To standardize these methodologies across laboratories, the ENIGMA Consortium has provided guidelines and recommendations for the standardized clinical classification of *BRCA* gene sequence variation [4].

Several bioinformatic models have been proposed for prediction of the splicing effects of gene variants. The current gold standard method for variant classification is the multifactorial likelihood model that integrates clinical data from tumor pathology, segregation of the VUS with the disease, family history and co-occurrence with a deleterious mutation. This model derives a posterior probability of pathogenicity for each variant that is used as the basis for a 5-tier classification system with associated clinical recommendations [5]. However, there are some bottlenecks in the classification of *BRCA* sequence variants because this method requires large datasets, and tested individuals are not always available in many cancer genetic counseling units. Pathogenic mutations and VUS are often unique or only detected in a single or a few families, and family histories are limited due to reductions of the birth rate during the past 40 years. All of these factors make VUS classification according to current models that include segregation analysis difficult.

Therefore, the aim of the present study was to use the effectiveness of *in silico* splicing prediction tools, in combination with RNA analyses, to classify the VUS identified in our HBOC patients. We combined the two techniques because *in silico* predictors assess the impact of *BRCA* variants on splicing processes.

In addition, we performed a population-based case-control study of 10 recurrent *BRCA* VUS identified in the HBOC patients of our cohort, which were selected because they have been detected at a higher frequency in our population compared with that indicated in databases.

Materials and methods

Patients and control subjects

The 33 *BRCA1* and *BRCA2* VUS were detected in probands from 710 families undergoing genetic testing at the Genetic Counseling Unit of the Southern Catalan Oncology Institute (IOCS) (Table 1). The screening criteria for the *BRCA* genes were set according to Spanish guidelines [6].

The control group was selected from a population-based sample recruited from a geographic region matching that of the patients and consisted of 793 males and females of self-reported European descent, between 18 and 77 years of age, whose parents and grandparents were also born in Spain.

The study was approved by the Ethics Committee of Clinical Research of Sant Joan University Hospital, and written informed consent was obtained from all participants.

DNA extraction and *BRCA1* and *BRCA2* analyses

Blood samples were collected from patients. The genomic DNA coding regions of the *BRCA1* and *BRCA2* genes and approximately 100 intronic base pairs of the intro-nexon boundary were sequenced on an ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, Madrid, Spain), and an analysis of large rearrangements was performed via Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA; MRC-Holland, The Netherlands).

Additional technical details and primers are available from the authors upon request.

RNA isolation, RT-PCR and cDNA sequencing

Following the recommendations of the ENIGMA Consortium [7] and the Clinical Molecular Genetics Society, patient blood samples were collected in PAXGENE tubes. Total RNA was isolated using a PAXGENE Blood RNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and retrotranscribed using SuperScript II RT Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random hexamers. cDNA amplification reactions were performed for the flanking VUS regions using the AmpliTaq Gold Enzyme (Applied Biosystems, Madrid, Spain). The PCR primers used in this study were described previously [8,9]. The PCR products were separated on 1.5–3% agarose gels and visualized via SYBR Safe staining (Life Technologies, Madrid, Spain) with a Chemidoc XRS system (BioRad, Madrid, Spain). The PCR products were purified through ethanol precipitation and analyzed through direct sequencing on an ABI 3500 automated sequencer (Life Technologies, Spain). Finally, cDNA sequence analysis was performed using Sequencher® version 5.4.1 sequence analysis software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

As a positive control, mRNA from three healthy subjects was included in the analysis of each variant.

Variants were selected without taking into account the *in silico* prediction results to determine the agreement between these tools and *in vitro* analyses.

Splicing prediction

The variants are named according to the recommendations of the Human Variation Society (HGVS), and numbering is based on the cDNA sequences of GenBank entries NM_007294.3 (*BRCA1*) and NM_000059.3 (*BRCA2*).

For bioinformatic splice site prediction and *in silico* analysis, we employed the integrative software Alamut visual version 2.7 (Interactive Biosoftware, Rowen, France), which includes several splice site prediction algorithms: Splice Site Finder-Like (SSF); MxEntScan (MES); Gene Splicer (GS); Splice Site Prediction by Neural Network (NNSplice); and Human Splicing Finder (HSF). For DNA exonic variants that could alter putative exonic splicing enhancers, we used ESE Finder and RESCUE-ESE tools. We also employed *in silico* tools based on conservative and evolutionary analyses, including Polyphen, Align GVGD, SIFT and Mutation Taster, to predict the possible impact of the missense variants on the structure and function of the human *BRCA1* and *BRCA2* proteins.

Case-control analysis by quantitative real-time PCR (qPCR)

We selected 10 recurrent DNA variants that were detected in at least two unrelated families out of the 710 high-risk families fulfilling the HBOC criteria for genetic testing (Table 2). Among these variants, 4 could not be analyzed through cDNA sequencing: c.4068G>A and c.4584C>T due to their location in exon 11 of the *BRCA2* gene, c.-86C>T due to its location in the 5'UTR of *BRCA1* gene and the VUS c.8851G>A was

Analysis of BRCA1 and BRCA2 unclassified variants in a population-based sample

489

Table 1 Description of unclassified BRCA variant predictions and results

Nucleotide Variant (HGVS)	N Families	Site	Interpretation Based on Splicing Prediction Tools	Database Classification (ClinVar, BIC, LOVD)	RNA Analysis	Protein Prediction
BRCA1						
c.212+1G>A	2	D	Interruption of intron-exon junction	Pathogenic / VUS	r.135_212del	p.Phe46_Arg71del
c.302-24_302-22del	2	A	No change	NR	r. =	p. =
c.4097-10G>A	1	D/A	No change	Benign / VUS / NR	r. =	p. =
c.4676-113C>G	2	A	Activation of a new cryptic acceptor site	NR	r.4358_4360del	p.Ala1453del
c.4676-105T>C	1	-	No change	NR	r. =	p. =
c.4766G>A	1	D	No change	VUS / Likely Benign	r. =	p. =
c.4974C>T	1	D	No change	NR	r.4674c > u	p. =
c.5074+6C>G	1	D	New donor site	Likely Benign / VUS	r. =	p. =
c.5074+29T>C	1	-	No change	NR	r.5193 + 29u > c	p. =
c.5152+5G>A	1	D	Interruption of intron-exon junction	Likely Pathogenic / VUS	r.5075_5152del	p.Asp1692_Trp1718delinsGly
c.5277+60_5277+61ins9	3	A	No change	VUS	r. =	p. =
c.5278-1G>A	2	A	Interruption of intron-exon junction	Pathogenic / VUS	r.5278_5284del	p.Ile1760Glyfs*3
c.5333-8C>T	1	A	Interruption of intron-exon junction	Likely Benign / VUS	r.5333-8c > u	p. =
BRCA2						
c.67+62T>G	2	A	No change	VUS	r. =	p. =
c.68-7T>A	3	A	Interruption of intron-exon junction	Likely Benign / VUS	r. =	p. =
c.438A>G	1	-	No change	NR	r. =	p. =
c.516+2T>A	1	D	Interruption of intron-exon junction	VUS	r.476_516del	p.Val159Glyfsn*10
c.516+14C>T	4	D	No change	Benign	r.516 + 14c > u	p. =
c.556G>C	1	A	No change	NR	r. =	p. =
c.601C>G	1	A	No change	NR	r. =	p. =
c.680C>T	1	D	No change	VUS	r.680c > u	p. =
c.6928A>C	1	A	No change	NR	r. =	p. =
c.6938-26T>C	1	D/A	No change	NR	r.6938-26u > c	p. =
c.7007+22_7007+23dupCT	1	-	No change	NR	r. =	p. =
c.7008-62A>G	10	D	No change	Benign / VUS	r. =	p. =
c.7795_7797delGAA	1	A	No change	VUS	r. =	p. =
c.8168A>G	1	D	Creation of new donor site	Pathogenic	r.8168_8831del	p.Asp2723Alafs*32
c.8632+2T>G	1	D	Interruption of intron-exon junction	VUS	r. =	p. =
c.8632+18G>A	1	-	No change	VUS	r. =	p. =
c.8850G>T	1	A	No change	Benign / VUS	r.8850g > u	p. =
c.8854A>G	2	-	No change	Likely Benign / VUS	r. =	p. =
c.8953+98T>C	1	D	Interruption of intron-exon junction	Benign / VUS	r. =	p. =
c.9116C>T	3	D	No change	Likely Benign / VUS	r.9116c > u	p. =

Pathogenic mutations are highlighted in bold.

D: donor splice site, A: acceptor splice site, -: no predicted changes in donor or acceptor site.

Table 2 Recurrent *BRCA1* and *BRCA2* variants analyzed in control subjects

Gene	Variant (HGVS)	rs (dbSNP)	BIC	LOVD Prediction	Population Frequency ^a		Patient Frequency		Control Frequency		P ^{**}
					N	%	N	%	N	%	
<i>BRCA1</i>	c.-86C>T	rs143160357	Nr	Nr	6/20450	0.029	2/710	0.3	2/793	0.3	1
	c.302-24_302-22delAAT	rs756577139	Nr	Nr	3/121402	0.025	2/710	0.3	0/793	0	0.223
	c.4676-113C>G	rs187218638	Nr	Nr	1/5008	0.02	2/710	0.3	4/793	0.5	0.6897
<i>BRCA2</i>	c.67+62T>G	rs11571574	VUS, 4 times	Neutral	14/5008	0.28	4/710	0.6	7/793	0.9	0.5542
	c.516+14C>T	rs182828913	Nr	Neutral	3/5008	0.06	4/710	0.6	4/793	0.5	1
	c.4068G>A	rs28897724	VUS, 9 times	VUS	2/5008	0.04	5/710	0.7	8/793	1.0	0.5871
	c.4584C>T	rs80359788	VUS, 2 times	VUS	2/5008	0.04	3/710	0.4	1/793	0.1	0.3492
	c.7008-62A>G	rs76584943	VUS, 5 times	Neutral	19/5008	0.38	10/710	1.4	17/793	2.1	0.3335
	c.8851G>A	rs11571769	Neutral, 43 times	Neutral	50/5008	0.99	3/710	0.4	10/793	1.3	0.09728
	c.8854A>G	rs397508016	Nr	Nr	Nr	0	2/710	0.3	0/793	0	0.223

Abbreviations: HGVS: Human Genome Variation Society; BIC: Breast Cancer Information Core; LOVD: Leiden Open Variation Database; Nr: Not reported.

^a Population frequency derived from the 1000 Genomes database and ENSEMBL.

^{**} P value for Fisher's exact test.

not included because RNA was not available. Specific Custom TaqMan Genotyping assays (Applied Biosystems, Madrid, Spain) were designed for genotyping the 10 variants. Variants were assessed via qPCR using an ABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). SDS version 2.4 software (Applied Biosystems Madrid, Spain) was employed to automatically assign the allele calls. DNA samples presenting the rare-variant alleles were used as positive controls in each of the sample plates. Patients and control subjects were not matched for age or gender.

Statistical analyses

Fisher's exact test was used to test differences in allele frequencies between the HBOC patients and control subjects. Statistical analyses were performed with R (<https://www.r-project.org/>) [10,11].

Results

Comparison of *in silico* predictions and cDNA splicing analysis

Thirteen VUS located in the *BRCA1* gene and twenty located in the *BRCA2* gene were selected to determine the possibility of an aberrant splicing event (Table 1). The majority of the variants have been previously described in the international databases BIC (Breast Cancer Information Core) and LOVD (Leiden Open Variation Database) and are considered VUS.

BRCA1 c.212+1G>A was previously classified as a pathogenic variant in the databases because of its position at a canonical splice site, but its splicing effect according to *in vitro* analysis has not been reported [12]. *BRCA2* c.8168A>G [13] has been previously reported by several authors [12,14] and was classified as a class 5 variant by Lindor et al. cDNA analyses confirmed the splicing effects of both variants (data not shown).

The *in silico* analyses predicted an alteration of splicing due to interruption of the splice site or activation of a

new acceptor site for seven variants (Table 1). For the c.212+1G>A *BRCA1* and the c.5152+5G>A *BRCA1* variants, at least four of the five programs predicted a 100% decrease in the donor site score and interruption of the intron-exon junction. For the c.5278-1G>A *BRCA1* variant, the five tools predicted a 100% decrease in the acceptor site. For c.4676-113C>G in *BRCA1*, the HSF, MES and SSF tools predicted activation of a new cryptic acceptor site. For c.516+2T>A in *BRCA2*, four tools predicted a 100% decrease in the donor site and an interruption of the intron-exon junction (see Supplementary Table S1). Therefore, all variants for which a 100% decrease was predicted by at least four of the *in silico* tools were analyzed through cDNA sequencing, and the prediction was confirmed by the presence of an aberrant transcript.

The *BRCA1* c.5152+5G>A VUS leads to complete skipping of exon 18 (r.5075_5152del), which at the protein level, is predicted to generate an in-frame deletion of 26 amino acids (p.Asp1692_Trp1718delinsGly) located in the BRCT functional domain. According to the ENIGMA consortium guidelines, in-frame deletions that remove amino acids located in important functional domains can be considered clinically relevant. The *BRCA1* c.5278-1G>A and *BRCA2* c.516+2T>A variants lead to deletion of the first seven bases of exon 21 (r.5278_5284del) and skipping of exon 6, respectively, generating an out-of-frame deletion in both cases and creating a premature stop codon (p.Ile1760Glyfs*3 and p.Val159Glyfs*10, respectively).

The remaining VUS included in the study had no apparent effect on mRNA splicing according to SYBR Safe stained agarose gel electrophoresis and sequencing analysis, as predicted by the *in silico* tools (data not shown). The *BRCA2* variant c.516+14C>T was first detected in co-occurrence with a well-established pathogenic mutation. However, this variant has already been classified as benign, and our results support this classification.

In summary, unrelated patients from 57 families were found to be carriers of 33 VUS. Of these VUS, six were associated with an alteration of the normal splicing pattern, resulting in deletion of a part of the gene (*BRCA1*: c.212+1G>A,

c.4676-133C>G, c.5152+5G>A, c.5278-1G>A. *BRCA2*: c.516+2T>A, c.8168A>G).

All of the bioinformatics predictions were confirmed through cDNA splicing analyses.

Case-control analyses of recurrent VUS

Ten recurrent VUS were selected for case-control analyses (Table 2). When these variants were analyzed by cDNA sequencing, none were found to be associated with modifications in splicing events. Four of these variants have not been reported in the BIC or LOVD database; two are considered VUS; and four have been recently classified as neutral by LOVD and/or the ENIGMA consortium.

Three of the variants, all of which were located in the *BRCA2* gene (c.4068G>A, c.7008-62A>G, c.8851G>A), were detected at a polymorphic frequency (>1%) in the control population-based sample (Table 2). Control carriers of these variants have no personal or family history of HBOC or related conditions. Variants c.7008-62A>G and c.8851G>A have been previously predicted as neutral. Furthermore, the c.7008-62A>G variant was detected in the homozygosis state in a control carrier (with no diagnosed Fanconi anemia).

Discussion

The aim of *BRCA1* and *BRCA2* mutational analysis in HBOC syndrome is to offer personalized clinical management for mutation carriers, but the reality is that a high proportion of the mutational results are non-informative due to the presence of VUS. Ascertaining the pathogenicity of VUS would aid in clinical management. mRNA splicing analyses combined with bioinformatic predictions have been proposed as an efficient method for identifying putative pathogenic effects of *BRCA* VUS according to a 5-tier scheme proposed by the IARC. *BRCA1* and *BRCA2* cDNA sequencing is a suitable methodology for studying mRNA splicing. As reported above, the ENIGMA Consortium established general guidelines and recommendations for best practices in mRNA assays that include PCR primer design, PCR conditions and product detection systems as well as other parameters [8]. The present study followed these recommendations for each point of the analysis, except for the characterization of naturally occurring alternative splicing events through semi-quantitative capillary electrophoresis, which was not performed.

The multifactorial model is a widely accepted method for classifying VUS. In addition, there are a wide range of classification algorithms, all of which are based on large datasets or tumor pathology information, which is not always available to genetic counseling units [15–18]. For this reason, it is important for each unit to be able to identify its own strategies for classifying the VUS with maximum accuracy using the available tools and according to published guidelines.

In the present study, we compared *in silico* tools and cDNA sequencing analysis based on RNA splicing results. We also performed cDNA analyses of VUS that were previously classified as pathogenic as an internal positive control for RNA splicing analyses. The results of the present work confirm current bioinformatic algorithms as powerful tools for predicting *BRCA* VUS splicing events. Concordant results of the two

analyses were found for all of the analyzed variants. For all of the VUS predicted to disturb the natural splice site, the cDNA analysis results confirmed that the VUS can be considered pathogenic or likely pathogenic, with the exception of c.4676-113C>G, which resulted in skipping of only three nucleotides.

Conversely, according to the allele-based case-control analysis of the 10 recurrent VUS selected, in concordance with published databases, we considered four of the analyzed variants to be likely not pathogenic, as they were detected at a polymorphic frequency of at least 1% in our population. Following the classification rules [19] and the 5-tier system proposed for the IARC [20], VUS can be considered as class 1 (neutral or with subtle effects [21]) if the variant is reported to occur in a large outbred control reference group at an allele frequency $\geq 1\%$. The control groups used for such analyses are often datasets, such as those of the 1000 Genomes project and the Exome Variant Server. Our analysis was useful for determining the frequency in our control population specific to our demographic region, after the detection of variants at a frequency greater than that published in the databases.

In summary, based on the detection of a frequency higher than 1% in our demographic population, the *BRCA2* VUS c.7008-62A>G and c.8851G>A are likely neutral, and c.4068G>A can likely be considered a non-pathogenic variant. The frequency of the variant c.67+62T>G reported in public databases is 0.35, whereas in our population, we detected this variant at close to the 1% polymorphic frequency (0.9%); that threshold may have been achieved by increasing the sample size of our control subjects. Conversely, there were no significant differences in the presence of these variants between the cases and controls, allowing us to assume that these results add evidence in favor of neutrality.

In conclusion, the predictive ability of the *in silico* tools used in this study is high, and we are confident in using them as a filtering tool to select variants for *in vitro* analyses when a patient's blood sample is not available for RNA analysis, or a patient has a limited family history. Frequency population analysis is a good strategy for discarding VUS as pathogenic founder mutations based on their presence in control subjects with neither personal nor family antecedents of HBOC syndrome. In addition, we can conclude that the combination of these three tools is a good strategy for confirming VUS relevance in our population.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by Lliga contra el Càncer. Comarques de Tarragona i Terres de l'Ebre.

We would like to acknowledge the technicians from the Biobanc-IISPV in Reus (<http://www.iispv.cat>) for sample management. We also thank Helena Torrell and Lorena Garcia of the Genomics facilities of the Centre for Omics Sciences (COS) of the University Rovira i Virgili for their contributions in technical assistance.

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.cancerger.2016.09.003.

References

1. Garcia C, Lyon L, Little RD, et al. Comparison of risk management strategies between women testing positive for a BRCA variant of unknown significance and women with known BRCA deleterious mutations. *Genet Med* 2014;12:896–902. doi:10.1038/gim.2014.48.
2. Blencowe BJ. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 2006;126:37–47. doi:10.1016/j.cell.2006.06.023.
3. López-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, et al. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett* 2005;579:1900–1903. doi:10.1016/j.febslet.2005.02.047.
4. Plon SE, Eccles DM, Easton D, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 2008;29:1282–1291. doi:10.1002/humu.20880.
5. Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, et al. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 2004;75:535–544. doi:10.1086/424388.
6. Graña B, Lastra E, Llorca G, et al. SEOM clinical guidelines for hereditary cancer. *Clin Transl Oncol* 2011;13:580–586. doi:10.1007/s12094-011-0701-2.
7. Whaley PJ, De La Hoya M, Thomassen M, et al. Comparison of mRNA splicing assay protocols across multiple laboratories: recommendations for best practice in standardized clinical testing. *Clin Chem* 2014;60:341–352. doi:10.1373/clinchem.2013.210658.
8. Menéndez M, Castellsagué J, Mirete M, et al. Assessing the RNA effect of 26 DNA variants in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast Cancer Res Treat* 2012;132:979–992. doi:10.1007/s10549-011-1661-5.
9. Bonnet C, Krieger S, Vezain M, et al. Screening BRCA1 and BRCA2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription PCR on patient RNA and an ex vivo assay based on a splicing reporter minigene. *J Med Genet* 2008;45:438–446. doi:10.1136/jmg.2007.056895.
10. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2008. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>.
11. Fay MP. Confidence intervals that match Fisher's exact or Blaker's exact tests. *Biostatistics* 2010;11:373–374. doi:10.1093/biostatistics/kxp050.
12. Sanz DJ, Acedo A, Infante M, et al. A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010;16:1957–1967. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2564.
13. Théry JC, Krieger S, Gaildrat P, et al. Contribution of bioinformatics predictions and functional splicing assays to the interpretation of unclassified variants of the BRCA genes. *Eur J Hum Genet* 2011;9:1052–1058.
14. Walker LC, Whaley PJ, Couch FJ, et al. Detection of splicing aberrations caused by BRCA1 and BRCA2 sequence variants encoding missense substitutions: implications for prediction of pathogenicity. *Hum Mutat* 2010;31:E1484–E1505. doi:10.1002/humu.21267.
15. Lindor NM, Guidugli L, Wang X, et al. A review of a multifactorial probability-based model for classification of BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance (VUS). *Hum Mutat* 2012;33:8–21. doi:10.1002/humu.21627.
16. Spearman AD, Sweet K, Zhou X-P, et al. Clinically applicable models to characterize BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance. *J Clin Oncol* 2008;26:5393–5400. doi:10.1200/JCO.2008.17.8228.
17. Karbassi I, Maston GA, Love A, et al. A standardized DNA variant scoring system for pathogenicity assessments in Mendelian disorders. *Hum Mutat* 2016;37:127–134. doi:10.1002/humu.22918.
18. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405–423. doi:10.1038/gim.2015.30.
19. Spurdle AB, Healey S, Devoreau A, et al. ENIGMA—evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: an international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* 2012;33:2–7. doi:10.1002/humu.21628.
20. Walker LC, Whaley PJ, Houdayer C, et al. Evaluation of a 5-tier scheme proposed for classification of sequence variants using bioinformatic and splicing assay data: inter-reviewer variability and promotion of minimum reporting guidelines. *Hum Mutat* 2013;34:1424–1431. doi:10.1002/humu.22388.
21. Lindor NM, Goldgar DE, Tavtigian SV, et al. BRCA1/2 sequence variants of uncertain significance: a primer for providers to assist in discussions and in medical management. *Oncologist* 2013;18:518–524. doi:10.1634/theoncologist.2012-0452.

Material suplementari

Supplementary Table. In silico predictions of BRCA1 and BRCA2 VUS analyzed in this study.

Nucleotide Variant (HGVS)	HSF			MES			NNS			GS			SSF			Enhancer Site Prediction			Interpretation Ex-Skip
	Site	Variant Score	WT Score	% Variation	Variant Score	WT Score	% Variation	Variant Score	WT Score	% Variation	Variant Score	WT Score	% Variation	Variant Score	WT Score	% Variation	ESEFinder	RECU-ESE	
BRCA1																			
c.212+16>A	D	0	78.1	-100%	0	7.8	-100%	0	0.9	-100%	0	2.8	-100%	0	77.4	-100%	NCh	2 SC	Inconclusive
c.302-24_302-22del	A	65.1	0	-100%							10	8.4	+19%				9 SC, SD	15 SC, 14 SD	NCh
c.4097-10G>A	A	82.9	83	-0.1%	8.7	8.2	+6.6%	0.8	0.9	-4.6%	10.1	10.7	-5.8%	76.24			NCh	NCh	NCh
c.4676-113C>G	A	76.3			3.13												1 SC	NCh	Inconclusive
c.4676-105T>C	D	73.59	68.74	+7.1%							0	1.12					NCh	NCh	NCh
c.4766G>A	D	85.27	84.37	+1.1%	3.37	3.86	-12.6%										2 SC, 1 SDc	NCh	NCh
c.4974C>T	D	77.1	76.86	+0.3%	8.73	7.48	+16.7%				1.04						2 SC, 1 SI, 1 SD, 1	NCh	NCh
c.5074+6C>G	D	70.23	82.4	-14.8%	0	7.96	-100%	0	0.95	-100%	0	2.25	-100%				1 SD	NCh	Inconclusive
c.5074+29T>C	D	91.43	90.83	+0.7%	9.84	8.82	+11.7%	0.97	0.93	+3.6%	4.82	4.46	+8%				2 SC, 1 SDc	NCh	Inconclusive
c.5152+5G>A	D	0	93.6	-100%	0	13.1	-100%	0	1	-100%	0	14.4	-100%				7 SC, 1 SI	NCh	Inconclusive
c.5277+60_5277+61ins9	A	79.85	80.46	-0.8%	9.46	8.67	+9.2%	0.69	0.67	+2.9%	6.85	6.38	+7.3%	74.82	73.01	+2.5	NCh	1 SD	Inconclusive
c.5278-1G>A	A																NCh	NCh	NCh
c.5333-8C>T	A																NCh	NCh	NCh
BRCA2																			
c.67462T>G	A	78.47	80.63	-2.7%	4.64	6.1	-23.9%	0.68	0.94	-27.3%				82.89	87.89	-5.7%	1 SC	NCh	Inconclusive
c.68-7T>A	D	0	86.9	-100%	0	8.9	-100%	0	1	-100%							1 SC, 1 SD	NCh	NCh
c.438A>G	D	67.3	69.3	-2.9%													NCh	5 SC	Inconclusive
c.516+2T>A	D	0	66.5	-100%													1 SC	NCh	Inconclusive
c.516+14C>T	A	0	66.5	-100%													1 SC	NCh	Inconclusive
c.5566>C	A	0	66.5	-100%													2 SC	1 SC	Aberrant ESE
c.601C>G	A	88.04			0.25	2.91	-91.4%	0	0.57		1.47	2.11	-30.3%				2 SC, 1 SI	NCh	NCh
c.680C>T	D	69.9	70	-0.1%	8.3	8.6	-3.5%	0.9	0.9					75.8	75.4	+0.5%	2 SD, 1 SDc	NCh	NCh
c.6928A>C	D	72.35	72.5	-0.2%	0.33	0		0.55	0.57	-0.02%	12.23	11.89	+2.8%				2 SD, 1 SC	1 SC	NCh
c.6938-26T>C	A																1 SI	1 SC	Aberrant ESE
c.7007+22_7007+23dupCT	A																		
c.7008-62A>G	D																		
c.7795_7797delGAA	A	66.5																	
c.8168A>G	D	84.79	0	-100%	8.99	0	-100%	0.92	0					0	77.02		1 SC	NCh	Inconclusive
c.8632+2T>G	D	0	84.5	-100%	0	8.4	-100%	0	0.08					82.8	0		2 SC, 3 SD, 1 SI	1 SD	Inconclusive
c.8632+18G>A	D	0	84.5	-100%	0	8.4	-100%	0	0.08					0	82.2	-100%	NCh	2 SC	Aberrant ESE
c.8850G>T	A	0	67.6	-100%													NCh	NCh	NCh
c.8854A>G	D	81.27	83.44	-2.6%	0	4.24		0	0.49					71.90	77.68	-7.4%	1 SC	1 SD	NCh
c.8953+98T>C	D				2.4	4.3	-44.2%	0	0.6	-100%							2 SC	1 SD	NCh
c.9116C>T	D																NCh	NCh	NCh

HSF, Human Splicing Finder; MES, MaxEntScan; NNS, NnSplice; GS, Gene Splicer; SSF, Splice Site Finder; WT, wild-type; NR, not reported; D, donor site; A, acceptor site; SC, site created; SD, site destroyed; SI, site increased; SDC, site decreased; NCh, No changes.

2. Germline promoter hypermethylation in *BRCA1* and *BRCA2* genes is not present in hereditary breast cancer patients

Marta Rodríguez-Balada, Bàrbara Roig, Mireia Melé, Mònica Salvat, Lourdes Martorell, Joan Borràs, Josep Gumà

Revista: *Clinical and Translational Oncology* 20 (9) 1226-1231. 2018

Quartil: Q3 (157/244) *Oncology*.

Impact factor (2019): 2.737

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1837-0>

La hipermetilació del promotor de gens supressors de tumors, inclosos els gens *BRCA1* i *BRCA2*, és un mecanisme d'inactivació gènica que s'ha descrit principalment en la línia somàtica. En aquest estudi es pretenia esbrinar si la hipermetilació del promotor en els gens *BRCA1* i *BRCA2* podia ser un mecanisme heretable de silenciament gènic.

Es va analitzar una cohort de 99 pacients entre les quals es va incloure: 14 pacients amb una variant patogènica en el gen *BRCA1*, 9 pacients amb una variant patogènica en *BRCA2* (per a descartar la possibilitat de la coocurrència dels dos esdeveniments), 54 pacients no portadores de variant patogènica i portadores de VUS, i 22 pacients no portadores de variants patogèniques ni VUS. A més, es van incloure 5 individus sans com a controls i 1 ADN estàndard metilat com a control positiu de la tècnica. L'anàlisi es va fer mitjançant un kit comercial per a la detecció d'hipermetilació en el promotor dels gens *BRCA1* i *BRCA2*, en 3 illes CpG del promotor del gen *BRCA1* i 4 del promotor de *BRCA2*.

Cap de les pacients portadores de mutació en els gens *BRCA* ni portadores de VUS presentaven hipermetilació del promotor en aquests gens. Una pacient no portadora de VUS ni mutació, presentava una lleugera hipermetilació (6%) en *BRCA2*.

Tot i detectar una lleugera hipermetilació en una pacient, amb els resultats obtinguts es va concloure que la hipermetilació germinal del promotor dels gens *BRCA1* i *BRCA2* no és un esdeveniment freqüent per al silenciament d'aquests. Per tant, tot i que en altres síndromes, com la síndrome de Lynch, s'ha descrit la hipermetilació del promotor del gen *MLH1* en la línia germinal, la hipermetilació del promotor dels gens *BRCA1* i *BRCA2* no és un mecanisme freqüent d'inactivació gènica en la línia germinal.



Germline promoter hypermethylation in *BRCA1* and *BRCA2* genes is not present in hereditary breast cancer patients

M. Rodríguez-Balada¹ · B. Roig¹ · M. Melé¹ · M. Salvat¹ · L. Martorell² · J. Borràs¹ · J. Gumà¹

Received: 28 September 2017 / Accepted: 21 January 2018
© Federación de Sociedades Españolas de Oncología (FESEO) 2018

Abstract

Purpose Germline promoter hypermethylation of *BRCA1* and *BRCA2* genes is an alternative event of gene silencing that has not been widely investigated in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome.

Methods We analyzed germline *BRCA* promoter hypermethylation in HBOC patients with and without *BRCA* mutations and control subjects, using a recently developed *BRCA* methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) assay.

Results Neither the patients tested nor the control subjects showed germline hypermethylation of the *BRCA1* and *BRCA2* promoter regions analyzed.

Conclusions Despite the results achieved at somatic levels by other researchers, these were not confirmed in our study at the germline level. Our results show the need to establish more predictive CpG sites in the *BRCA* promoter regions to optimize the MS-MLPA assay for the detection of germline hypermethylation as an effective pre-screening tool for whole-*BRCA* genetic analysis in HBOC, because we can not rule out the existence of germline promoter hypermethylation in *BRCA*.

Keywords *BRCA1* · *BRCA2* · Breast cancer · Methylation · MS-MLPA · Germline

Introduction

Hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC) is characterized by the presence of a germline mutation in the tumor suppressor genes *BRCA1* or *BRCA2* and is associated with a significantly increased risk for breast and ovarian cancers [1]. Only 5–10% of HBOC patients are carriers of *BRCA1* and *BRCA2* pathogenic mutations, and up to 15% are carriers of alterations in the DNA sequence that have an unknown effect on the function of the gene product; these

alterations are termed “variants of uncertain significance” (VUS). Consequently, alternative mechanisms that can inactivate *BRCA1* or *BRCA2* are of special interest. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes is an alternative gene silencing mechanism involved in disease development. This epigenetic process has been well-described as a somatic event mainly as a second hit, specifically in breast tumors [2]. Sporadic breast tumors in which *BRCA1* is methylated have been reported to be histologically and molecularly similar to *BRCA1*-mutated hereditary breast cancers tumors [2–4]. Methylation events have also been detected at the germline level in some genes [5, 6].

Allelic hypermethylation is functionally equivalent to a mutation in which the loss of activity of the second allele arises from a mutation, a loss of heterozygosity or a second methylation event, which inactivates the gene [5, 6]. It is well-known that the impact and significance of the epigenetic silencing of *BRCA1* is functionally equivalent to a germline *BRCA1* mutation. However, the hypothesis that the inactivation of *BRCA1* by genetic or epigenetic changes are mutually exclusive events is well-supported, which leads us to investigate epigenetic changes as a second hit in *BRCA*-mutated genes [7, 8]. Conflicting results have been obtained

M. Rodríguez-Balada and B. Roig contributed equally to this work.

✉ M. Rodríguez-Balada
mrodriguez@grupsagessa.cat

✉ J. Gumà
jguma@grupsagessa.cat

¹ Institut d’Oncologia de la Catalunya Sud (IOCS), Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Av. Del Dr. Josep Laporte, 43204 Reus, Spain

² Hospital Universitari Institut Pere Mata, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, CIBERSAM, C/Sant Llorenç, Reus, Spain

in this field, however, discrepancies across different studies are principally due to the heterogeneity of the selected CpG sites, the methylation detection systems, the methodologies used and the types of tissues that were analyzed [8–10]. In general, the frequency of DNA methylation patterns around the transcription start site of *BRCA1* gene promoter region is higher in tumor-derived DNA than in blood-derived DNA [8–10]. These differences are more evident in tumors with BRCA-like clinico-pathological features [11, 12].

Methylation analysis based on MS-MLPA technology [13] is nowadays used as a pre-screening method in the selection of patients that are candidates for *MLH1* germline analysis in Lynch Syndrome and if *MLH1* protein expression is absent [14]. Recently, a new methylation-specific assay, the ME053-X1 *BRCA1*-*BRCA2* (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) has been developed, and its effectiveness as a pre-screening tool that is able to distinguish *BRCA1* and *BRCA2*-related breast carcinomas using DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tumors has recently been assessed [15]. The aim of this study was to analyze germline promoter hypermethylation of *BRCA1* and *BRCA2* in blood-derived DNA from HBOC patients with or without *BRCA* mutations and VUS and control subjects using the ME053-X1 *BRCA1*-*BRCA2* MS-MLPA assay. Results of this study will tell us whether this assay can serve as a useful pre-screening tool for *BRCA* genetic analysis that is able to predict which HBOC patients are less likely to harbor germline *BRCA1* or *BRCA2* pathogenic mutations.

Materials and methods

Patient sample selection

This study included 99 HBOC patients who underwent *BRCA* genetic testing at the Cancer Counseling Unit of the Institute of Oncology of South Catalonia (IOCS). The inclusion criteria for the mutational analysis of the *BRCA* genes were established according to the Spanish guidelines [16]. Of these, 14 patients were carriers of a *BRCA1* pathogenic mutation, 9 were carriers of a *BRCA2* pathogenic mutation, 23 were carriers of VUS in the *BRCA1* gene and 31 were carriers of VUS in the *BRCA2* gene. In all, 22 patients were not carriers of *BRCA* mutations. As negative controls, we included 5 healthy control subjects. This study was approved by the Ethics Committee of Clinical Research of Sant Joan University Hospital, and written informed consent was obtained from all participants.

DNA extraction

A 10-mL blood sample was collected from each HBOC patient in an EDTA blood collection tube. Subsequently, DNA was extracted from the samples using the commercial Gentra® PureGene DNA isolation kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Barcelona, Spain).

BRCA promoter hypermethylation MS-MLPA technology

BRCA1 and *BRCA2* promoter hypermethylation was assessed using a new developed SALSA MS-MLPA probe-mix ME053-X1 *BRCA1*-*BRCA2* according to manufacturer's protocol (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) (Fig. 1a). This probe-mix contains three MS-MLPA probes for the *BRCA1* gene and four MS-MLPA probes for the *BRCA2* gene, which detect the methylation status of the promoter regions. The location of the *BRCA1* and *BRCA2* probes was based on the publication by Esteller et al. [2] (Fig. 1b). We used as a positive control, the Universal Methylated Human DNA Standard, a commercially available DNA that is completely methylated at CpG dinucleotides (Ecogen, Barcelona, Spain).

DNA fragments were analyzed using an ABI 3500 Sequencer (Life Technologies, Madrid, Spain). Coffalyser. Net software (<http://support.coffalyser.com/>) was used for methylation data analysis.

Results

We sought to investigate the germline promoter methylation state of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in peripheral blood DNA of 104 individuals, including 99 HBOC patient carriers and non-carriers of *BRCA1* or *BRCA2* pathogenic mutations or VUS. We used a new *BRCA*-specific methylation ME053-X1 *BRCA1*-*BRCA2* MS-MLPA assay. By this technique, we were able to identify mean methylation percentages of 93.6, 44.3 and 24.4% in 1:1, 1:2 and 1:4 dilution of the Universal methylated human DNA standard and the coefficient of variation was 5.5, 11.5 and 16.18%, respectively.

None of the patients who carried a germline *BRCA* pathogenic mutation exhibited promoter hypermethylation of these genes higher than 6% (Fig. 2). In addition, none of the

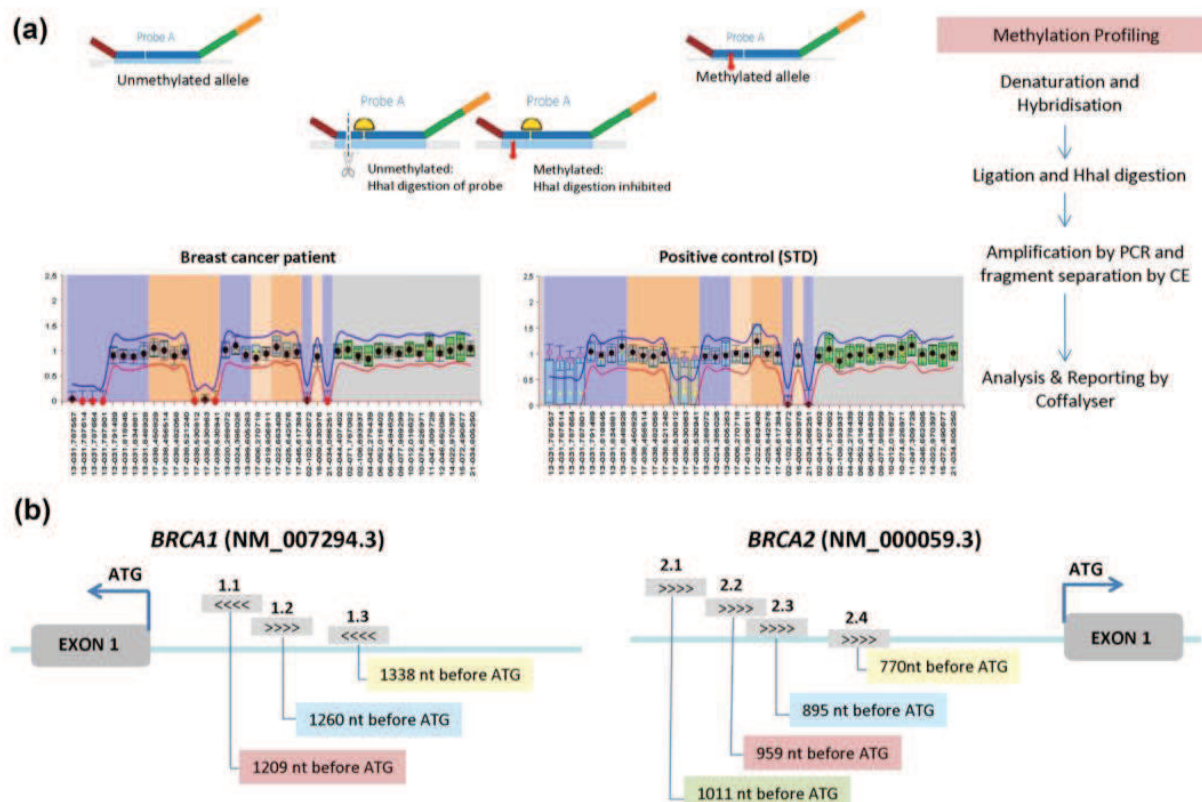


Fig. 1 MS-MLPA protocol and location of probes: **a** procedure to assess methylation profiling of blood DNA from human patients and control samples and **b** location of the *BRCA1* and *BRCA2* promoter probes of the ME053-X1 *BRCA1-*BRCA2** MLPA assay

HBOC patients who carried VUS either on the *BRCA1* or *BRCA2* genes exhibited *BRCA* promoter hypermethylation (Fig. 2).

Notably, our study identified a single HBOC patient, who was a non-carrier of pathogenic mutations or VUS in either of the *BRCA1* and *BRCA2* genes, who showed a 6% methylation in the *BRCA2.2* probe compared with the rest of the patients, who showed 0% methylation in the same probe (Table 1).

Discussion

The goal of the present study was to determine the possibility of using the MS-MLPA ME053-X1 *BRCA1-*BRCA2** assay as a pre-screening tool in the germline mutational analysis of patients in whom HBOC is suspected.

We did not find evidence of a possible contribution of promoter hypermethylation to *BRCA1* and *BRCA2* in the peripheral blood DNA of HBOC patients using the methylation-specific ME053-X1 *BRCA1-*BRCA2** MLPA technology.

None of the patient carriers of *BRCA1* and *BRCA2* mutations showed promoter hypermethylation of these genes and supports the hypothesis that promoter methylation and germline mutations, each of which can silence the *BRCA* genes, are mutually exclusive events [17]. We found one HBOC patient who was not a carrier of pathogenic mutations or VUS in either the *BRCA1* or the *BRCA2* genes who showed a higher percentage of methylation in the *BRCA2.2* probe in the peripheral blood DNA (6%) compared with other patients. This finding needs to be validated in tumor-derived DNA to determine whether the methylation detected can be considered as a true positive epigenetic mutation, to determine the origin of this epigenetic mutation [18] and also to determine if this percentage can be set as the cut-off of promoter hypermethylation of the *BRCA* genes.

The hypothetical germline state of promoter hypermethylation as a mechanism of the transcriptional inactivation of *BRCA1* remains unclear. Chen et al. reported the lack of germline *BRCA1* promoter methylation in 41 HBOC patients who were negative for *BRCA* pathogenic mutations [19]. Snell et al. detected low levels of *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood leukocyte DNA from some cases of

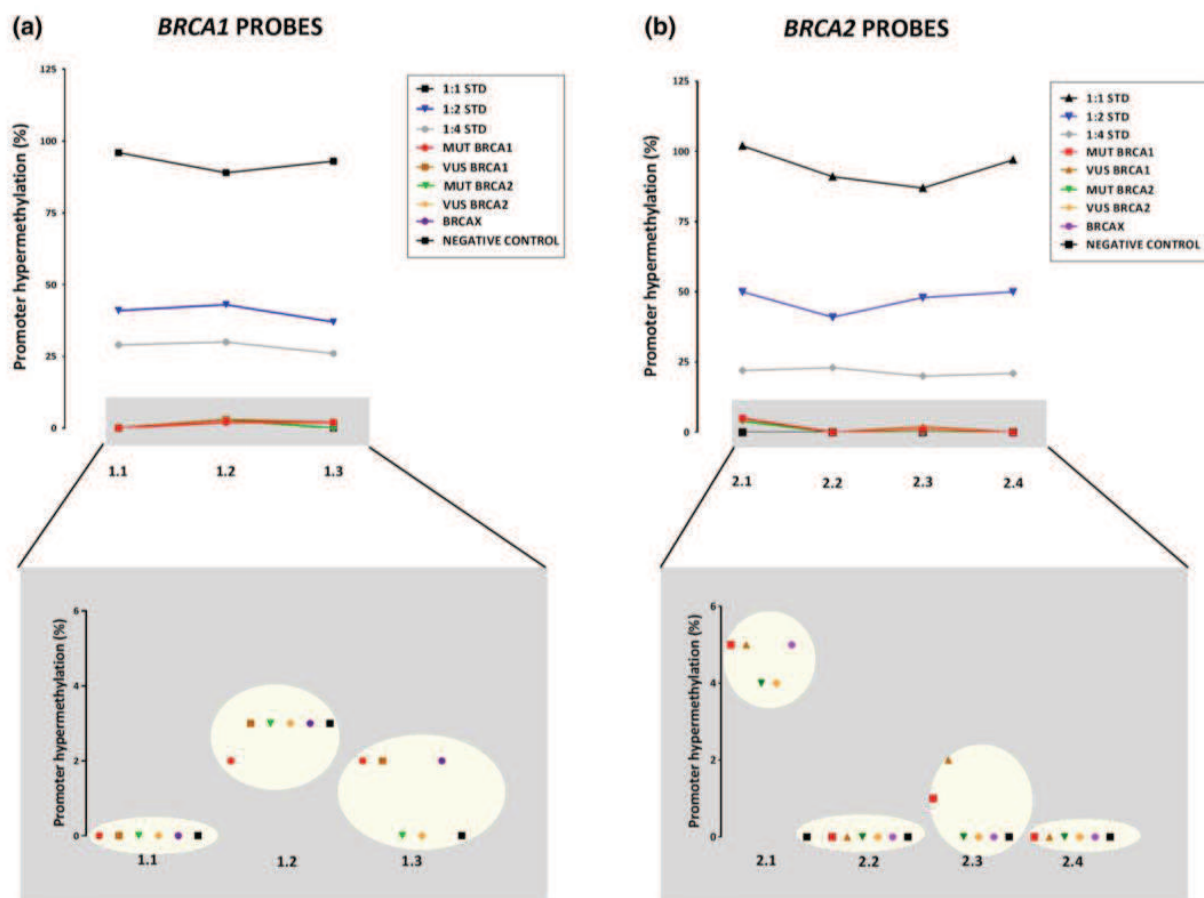


Fig. 2 Median of the hypermethylation percentages for *BRCA1* (a) and *BRCA2* (b) probes in the analyzed samples: Universal Methylated Human DNA standard (STD dilutions 1:1, 1:2 and 1:4; positive control), *BRCA1* and *BRCA2* mutated patients (MUT *BRCA*), *BRCA1*

and *BRCA2* VUS carriers patients (VUS *BRCA*), non-mutated not VUS carrier patients (BRCAX) and healthy subjects (negative control)

familial breast cancer [11]. Recent reports found that *BRCA1* promoter methylation was increased in breast tumors with *BRCA1*-like pathological features [20–22]. Tumor material from the patients included in this study was unavailable, and thus the methylation status of their tumor tissue could not be determined or compared with the methylation levels of their peripheral blood DNA.

Differences in the methylation patterns of breast cancer patients that are related to the detection techniques and the specific targeted CpG sites have been reported. The MS-MLPA assay used in this study was able to identify a mean of 93.6% methylation in the positive control, indicating that the procedure of the technique was successful. Therefore, other targeted CpG sites in these genes might

help predict the HBOC patients who are less likely to harbor germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations [10] and for this reason, we agree with Vos et al. that it is necessary to determine more predictive CpG sites in the *BRCA1* and *BRCA2* genes to improve the diagnostic value of *BRCA* promoter methylation by MS-MLPA technology [15].

Despite the lack of evidence for the possible contribution of germline hypermethylation of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in HBOC syndrome, we cannot discard this process as a pathological event at germline level, and we can't disregard that methylation status might be used as part of a pre-screening analysis for the genetic testing of these genes. Further studies need to be performed to

Clinical and Translational Oncology

Table 1 *BRCA1* and *BRCA2* promoter hypermethylation percentages in HBOC patients and control subjects analyzed by BRCA-specific methylation ME053-X1 BRCA1-BRCA2 MLPA assay

Samples	N	Tumor subtype	<i>BRCA1</i> probes			<i>BRCA2</i> probes			
			1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	2.4
			Md. (range)	Md. (range)	Md. (range)	Md. (range)	Md. (range)	Md. (range)	Md. (range)
Patients									
<i>BRCA1</i> mutated	11	TN	0 (0)	2 (0–3)	2 (0–2)	4 (3–6)	0 (0–2)	1 (0–2)	0 (0)
	3	L	0 (0)	3 (2–3)	2 (2)	5 (4–5)	0 (0–2)	0 (0–2)	0 (0)
<i>BRCA1</i> VUS carriers	8	TN	0 (0)	3 (2–4)	2 (0–2)	5 (5)	0 (0–3)	2 (0–3)	0 (0–2)
	15	L	0 (0–2)	3 (2–5)	2 (0–4)	5 (4–6)	0 (0–3)	0 (0–2)	0 (0–2)
<i>BRCA2</i> mutated	4	TN	0 (0)	0.02 (0–4)	0 (0)	4 (3–5)	0 (0)	0 (0–3)	0 (0)
	5	L	0 (0)	4 (3–4)	0 (0)	5 (3–5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>BRCA2</i> VUS carriers	11	TN	0 (0)	3 (0–4)	0 (0)	4 (3–6)	0 (0)	0 (0–3)	0 (0)
	20	L	0 (0–3)	3 (0–5)	0 (0–4)	4 (2–5)	0 (0)	0 (0–2)	0 (0)
<i>BRCA1/BRCA2</i> not mutated, not VUS carriers	10	TN	0 (0)	3 (2–4)	1 (0–3)	5 (4–5)	0 (0)	1 (0–2)	0 (0)
	12	L	0 (0)	3 (2–5)	2 (0–4)	5 (3–5)	0 (0–6)	0 (0–3)	0 (0)
Healthy controls	5	–	0 (0)	3 (0–3)	0 (0–4)	4 (3–5)	0 (0)	0 (0–2)	0 (0)
Positive control									
Dil. 1:1	–	–	96	89	93	102	91	87	97
Dil. 1:2	–	–	41	43	37	50	41	48	50
Dil. 1:4	–	–	29	30	26	22	23	20	21

N number of subjects, Md. median, TN triple negative, L luminal, VUS variant of uncertain significance, dil. dilution, Positive control universal methylated human DNA standard

determine the efficacy of this tool and to evaluate its inclusion in a clinical setting.

Acknowledgements The genomic analyses were performed at the Centre for Omic Sciences (COS) of the Universitat Rovira i Virgili.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest MS-MLPA reagents were made available by MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands. The ME053-X1 BRCA1-BRCA2 probemix was designed by Lilit Atanesyan. MRC-Holland was not involved in the design or analysis of the experiments or in the writing of the manuscript.

Ethical approval This study was approved by the Ethics Committee of Clinical Research of Sant Joan University Hospital, and written informed consent was obtained from all participants.

References

- Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* 2005;16(3):481–8.
- Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(7):564–9.
- Hedenfalk IA. Gene expression profiling of hereditary and sporadic ovarian cancers reveals unique BRCA1 and BRCA2 signatures. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(13):960–1.
- Alvarez S, Diaz-Uriarte R, Osorio A, Barroso A, Melchor L, Paz MF, et al. A predictor based on the somatic genomic changes of the BRCA1/BRCA2 breast cancer tumours identifies the non-BRCA1/BRCA2 tumors with BRCA1 promoter hypermethylation. *Clin Cancer Res.* 2005;11(3):1146–53.
- Hitchins M, Williams R, Cheong K, Halani N, Lin VA, Packham D, et al. MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2005;129(5):1392–9.
- Hitchins MP, Wong JJ, Shutters G, Suter CM, Martin DI, Hawkins NJ, et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germline epimutation. *N Engl J Med.* 2005;356(7):697–705.
- Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet.* 2001;10(26):3001–7.
- Bosviel R, Garcia S, Lavediaux G, Michard E, Dravers M, Kwiatkowski F, et al. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls. *Cancer Epidemiol.* 2012;36:e177–82.
- Iwamoto T, Yamamoto N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cell is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;129(1):69–77.
- Daniels SL, Burghel GJ, Chambers P, Al-Baba S, Connley DD, Brock IW, et al. Levels of DNA methylation vary at CpG sites across the BRCA1 promoter, and differ according to triple

- negative and “BRCA-like” status, in both blood and tumour DNA. *PLoS One*. 2016;11(7):e0160174.
11. Snell C, Krypuy M, Wong EM, Loughrey MB, Dobrovic A, kConFab Investigators. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Res*. 2008;10(1):R12.
 12. Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA, et al. Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2001;4(1):23–33.
 13. Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(14):e128.
 14. Pérez-Carbonell L, Alenda C, Payá A, Castillejo A, Barberá VM, Guillén C, et al. Methylation analysis of MLH1 improves the selection of patients for genetic testing in Lynch syndrome. *J Mol Diagn*. 2010;12(4):498–504.
 15. Vos S, Moelans CB, van Diest PJ. BRCA promoter methylation in sporadic versus BRCA germline mutation-related breast cancers. *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):64.
 16. Graña B, Lastra E, Llorca G, Brunet J, Isla D. SEOM clinical guidelines for hereditary cancer. *Clin Transl Oncol*. 2011;13(8):580–6.
 17. Lips EH, Mulder L, Oonk A, van der Kolk LE, Hoervorst FB, Imholz AL, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *BJC*. 2013;108(10):2172–7.
 18. Wojdacz T, Thestrup BB, Overgaard J, Hansen LL. Methylation of cancer related genes in tumor and peripheral blood DNA from the same breast cancer patient as two independent events. *Diagn Pathol*. 2011;6:116.
 19. Chen Y, Toland AE, McLennan J, Fridlyand J, Crawford B, Costello JF, et al. Lack of germ-line promoter methylation in BRCA1-negative families with familial breast cancer. *Genet Test*. 2006;10(4):281–4.
 20. Gupta S, Jaworska-Bieniek K, Narod SA, Lubinski J, Wojdacz TK, Jakubowska A. Methylation of the BRCA1 promoter in peripheral blood DNA is associated with triple-negative and medullary breast cancer. *Epidemiology*. 2014;148(3):615–22.
 21. Pang D, Zhao Y, Xue W, Shan M, Chen Y, Zhang Y, et al. Methylation profiles of the BRCA1 promoter in hereditary and sporadic breast cancer among Han Chinese. *Med Oncol*. 2012;29(3):1561–8.
 22. Zhang L, Long X. Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: evidence from 40 studies. *Sci Rep*. 2015;5:17869.

3. Identification of germline pathogenic variants in DNA damage repair genes by a next-generation sequencing multigene panel in BRCA1 patients.

Marta Rodríguez-Balada, Bàrbara Roig, Mireia Melé, Cinta Albacar, Sara Serrano, Mònica Salvat, Montserrat Querol, Joan Borràs, Lourdes Martorell, Josep Gumà

Revista: *Clinical Biochemistry* 76 17-23. 2020

Quartil: Q2 (12/29) *Medical laboratory technology*

Impact factor (2019): 2.573

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.11.014>

S'anomena pacients BRCAx a aquells pacients amb fenotip de CMOH sense mutacions identificades en els gens *BRCA1* o *BRCA2*. Aquests casos representen una proporció molt important del total de casos de càncer hereditari. Per això, la cerca de nous gens d'alta predisposició a aquests càncers no ha parat des del descobriment dels gens *BRCA1* i *BRCA2*. Fins a l'aparició de les tècniques de seqüenciació massiva, l'elevat cost de la seqüenciació automàtica suposava una limitació, donant lloc a que no fos viable l'anàlisi de tots els gens sospitosos. És per això, que amb l'aparició de les noves tecnologies de seqüenciació s'ha trobat la possibilitat de l'anàlisi simultani de grups de gens, demostrant ser una tècnica cost-efectiva. S'ha descrit que aproximadament un 5-10% de dels casos sense variants patogèniques en els gens *BRCA1* i *BRCA2* podien ser portadors de variants causants de la síndrome de CMOH en altres gens d'alt i moderat risc.

Mitjançant l'equipament de seqüenciació massiva o tècnica de seqüenciació de nova generació (NGS, *Next Generation Sequencing*), Ion Torrent™ Personal Genome Machine™ (PGM) System, de la casa Life Technologies es van analitzar 25 gens relacionats amb síndromes de càncer hereditari o relacionats amb vies de reparació de l'ADN, de moderat i alt risc: *APC*, *ATM*, *BARD1*, *BMPR1A*, *BRIP1*, *CDH1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *SMAD4*, *STK11* i *TP53*, en 77 pacients no portadors de variants patogèniques en els gens *BRCA* i fenotípicament sospitosos d'una síndrome de CMOH. L'objectiu principal era poder determinar si en la nostra població era convenient implementar l'anàlisi d'aquests panells de gens, o identificar quins gens incloure per trobar el causant de la síndrome en aquelles famílies, amb la finalitat de poder dur a terme un assessorament genètic més efectiu i dirigit.

Es van identificar variants probablement patogèniques en quatre gens en un 8% dels casos estudiats: 3 en el gen *PALB2* (4%), 1 en el gen *BRIP1* (1.3%), 1 en el gen *BARD1* (1.3%) i 1 en el gen *RAD50* (1.3%), la qual cosa concorda amb els resultats publicats per altres autors. A més a més, es van identificar variants de significat incert en els gens *CDH1*, *TP53*, *CHEK2* i *PMS2*.

Els gens ens els quals es va detectar una variant patogènica són gens accionables, és a dir, són gens ens el que hi ha una evidència clínica per a la seva incorporació en els estudis de càncer hereditari i que per tant hagin de ser considerats en la pràctica assistencial habitual.

Les tècniques basades en NGS permeten una millora en el rendiment diagnòstic en la síndrome de CMOH per a la disminució en el nombre de resultats no informatius.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinbiochem



Identification of germline pathogenic variants in DNA damage repair genes by a next-generation sequencing multigene panel in BRCAx patients



Marta Rodríguez-Balada^{a,b,c,*}, Bàrbara Roig^{a,b,c}, Mireia Melé^{a,b,c}, Cinta Albacar^{a,b,c}, Sara Serrano^{a,b,c}, Mònica Salvat^{a,b,c}, Montserrat Querol^{a,b,c}, Joan Borràs^{a,b,c}, Lourdes Martorell^{b,c,d,e}, Josep Gumà^{a,b,c,*}

^a Institut d'Oncologia de la Catalunya Sud (IOCS), Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Àrea d'Oncologia, Av. Del Dr. Josep Laporte, 43204, Reus, Spain

^b Universitat Rovira i Virgili, Departament de Medicina i Cirurgia, Spain

^c Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, IISPV, Spain

^d Hospital Universitari Institut Pere Mata, Reus, Spain

^e Centro de Investigación Biomédica en Red en Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Hereditary breast and ovarian cancer

BRCA1

BRCA2

Next-generation sequencing

DNA repair

Genetic testing

ABSTRACT

Background: Approximately 5–10% of breast carcinomas have been related to hereditary conditions and are attributable to pathogenic variants in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, which is referred to as hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome. The inclusion of additional genes that can be related to HBOC syndrome is under intense evaluation due to the high proportion of patients with HBOC criteria who do not present pathogenic mutations in *BRCA* genes, named BRCAx, despite having high clinical suspicion of hereditary cancer. The main aim is to identify new potentially pathogenic gene variants that may contribute to HBOC to improve the efficiency of routine diagnostic tests in this hereditary condition.

Methods: A retrospective cohort of 77 HBOC BRCAx patients was analyzed by next-generation sequencing using a targeted multigene panel composed of 25 genes related to hereditary cancer and deficiencies in DNA repair pathways.

Results: We found 9 variants in 7 different genes, which were confirmed by automated sequencing. Six variants were classified as pathogenic or likely pathogenic. Three of them were located in the *PALB2* gene, one in the *BRIP1* gene, one in the *BARD1* gene and 1 in the *RAD50* gene. In addition, three variants of uncertain significance (VUS) were detected in the *TP53*, *CHEK2*, and *CDH1* genes.

Conclusions: We identified that 8% of BRCAx patients were carriers of pathogenic variants in genes other than *BRCA1* and *BRCA2*. Therefore, wide gene panels, including clinically actionable genes, should be routinely used in the screening of HBOC in our population. We observed differences from other studies in the prevalence of mutated genes, most likely due to differences in the selection criteria of the probands and in the population analyzed. The high incidence of deleterious variant detection in *PALB2* supports its significant role in breast cancer susceptibility and reinforces its inclusion in the HBOC genetic diagnostic process.

1. Introduction

Breast cancer is a common disease, affecting over one million women worldwide every year [4]. Though the vast majority of breast cancers are sporadic in nature, approximately 5–10% of them are due to autosomal dominant inheritance of a specific genetic mutation [2]. Hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC) is a well-

known syndrome caused by germline *BRCA1* and *BRCA2* pathogenic mutations. These two genes are the most well-studied and best-known genes implicated in hereditary breast cancer susceptibility. However, mutations in *BRCA1* and *BRCA2* account for no more than 20% of all inherited breast cancers [12,11,14,32]. The remaining 80% are so-called BRCAx patients because they are high-risk breast and/or ovarian cancer patients, negative for *BRCA1* and *BRCA2* mutations. Other

* Corresponding authors.

E-mail addresses: mrodriguez@grupsagessa.cat (M. Rodríguez-Balada), barbara.roig@grupsagessa.cat (B. Roig), mmele@grupsagessa.com (M. Melé), cintarosa.albacar@grupsagessa.com (C. Albacar), sara.serrano@grupsagessa.com (S. Serrano), msalvat@grupsagessa.com (M. Salvat), montserrat.querol@grupsagessa.com (M. Querol), jburras@grupsagessa.com (J. Borràs), lourdes.martorell@urv.cat (L. Martorell), jguma@grupsagessa.com (J. Gumà).

<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.11.014>

Received 1 August 2019; Received in revised form 6 November 2019; Accepted 26 November 2019

Available online 28 November 2019

0009-9120/ © 2019 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

pathogenic variants have also been described in high or moderate breast cancer (BC) susceptibility genes since they are mainly associated with other cancer syndromes: *ATM* (ataxia telangiectasia), *TP53* (Li-Fraumeni syndrome), *PTEN* (Cowden syndrome), *CDH1* (hereditary diffuse gastric cancer), *STK11* (Peutz-Jeghers syndrome), *PALB2* or *CHEK2* (both related to breast cancer) [15,17].

Although the “gold-standard” technique used to detect mutations is automatic sequencing based on Sanger technology, next-generation sequencing (NGS) has been widely introduced not only because of its flexibility and speed but also because it is cost- and time-effective. With the emergence of multigene panel analyses, more genetic counseling units have included this type of genetic study in some specific diseases, such as hereditary cancer or neonatal pathologies [5]. Specifically, in hereditary breast cancer, the most extensive panels used include between 20 and 30 genes linked to this disease. Many of these genes code for proteins involved in the homologous recombination repair (HRR) process and other protein co-factors necessary for the successful repair of DNA [15]. Most of them were selected because both germline and somatic pathogenic variants in *BRCA* genes and in HRR-related genes (*ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK1*, *CHEK2*, *FAM175A*, *MRE11A*, *NBN*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D*) can deregulate HRR pathways. Indeed, some of these DNA repair pathways are currently being targeted by emerging therapies [10,26].

The discovery of new genes involved in the susceptibility to hereditary cancers is constantly under investigation, and a great number of new germline mutations have been identified, which allows for a deeper knowledge of the mechanisms that predispose patients to cancer. Therefore, the detection of germline and somatic pathogenic variants that lead to protein malfunctioning is useful not only for primary and secondary prevention in hereditary cancer but also for the selection of cancer treatment. Thus, the need to identify the contribution of other genes in hereditary breast cancer is crucial. In fact, in cancer care units, genetic studies are well-established diagnostic tools to determine the origin of a cancer aggregation in a family to achieve early detection and to apply the most appropriate preventive measures [3]. Additionally, the importance of identifying alterations in these genes lies in the capacity of the detection of high-risk asymptomatic individuals than can benefit from cancer prevention programs [16]. Likewise, patients carrying tumors with *BRCA1* and *BRCA2* mutations may also benefit from certain targeted antineoplastic therapies [16].

This study analyzed 25 genes involved in other highly prevalent hereditary cancer syndromes in a cohort of breast cancer patients without *BRCA1* and *BRCA2* pathogenic variants. Our aim was to identify new potentially predisposing gene variants in cancer susceptibility genes to improve the efficiency of routine diagnostic tests.

2. Material and methods

2.1. Patients and samples

The selected participants were 77 women who were patients in the Genetic Counseling Unit of the Oncology Institute of South Catalonia (IOCS). These patients fulfill the HBOC criteria to undergo genetic testing of the *BRCA1* and *BRCA2* genes according to the Spanish Society of Medical Oncology guidelines [22]. A 10-mL blood sample was collected from each patient in an EDTA blood collection tube, and DNA was extracted using the commercial Gentra® PureGene DNA Isolation Kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Barcelona, Spain). The *BRCA1* and *BRCA2* genes were analyzed by sequencing and multiple-ligation-dependent probe amplification (MLPA), and none of the detected variants were classified as pathogenic variants according to the ENIGMA Consortium classification criteria (version 2.5.1 29 June 2017) and the 5-tiered classification system proposed by Plon et al. [25]. The median age of cancer onset was 47 years (range 29–72 years). Personal and family clinical data of the patients were collected, as well as the histology, hormonal receptor status and Her-2 expression in the

tumor. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Sant Joan University Hospital (Reus, Spain), and written informed consent was obtained from all participants.

2.2. Targeted NGS

To perform targeted NGS, we modified the Ion AmpliSeq™-BRCA Reflex, Hereditary Cancer Research panel (ThermoFisher Scientific) described by Hirotsu and colleagues [18] that includes 25 genes related to hereditary cancer, most of which are considered moderate and low penetrance breast cancer genes [31]. Using Ion AmpliSeq designer software (ThermoFisher Scientific), we expanded the target amplicon length to 375 base pairs to increase the number of samples analyzed in one chip. The panel now includes 479 primer pairs distributed into two pools, with an amplicon range between 125 and 375 base pairs, with a minimum exon padding of 5 base pairs that enables the detection of splicing variants and with 99.54% coverage (322 bases missed, most of them in the *MUTYH* gene). *BRCA1* and *BRCA2* were not included since they have been previously analyzed. The 25 genes included in the panel are *APC*, *ATM*, *BARD1*, *BMPR1A*, *BRIP1*, *CDH1*, *CDK4*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *SMAD4*, *STK11*, and *TP53*, which are relevant for a considerable number of hereditary cancer syndromes.

Libraries were generated by multiplex PCR amplification of 20 ng of DNA from each sample as described previously [18,33] with the Ion One Touch 2 System (Ion Torrent™) and the Ion Personal Genome Machine (PGM™) system (Ion Torrent™).

2.3. Data analysis, variant prioritization and in silico analysis

The obtained sequences were aligned against the UCSC hg19 human reference genome sequence, and variant calling was performed using Torrent Suite Software v3.6 (Ion Torrent™). Genetic variant annotation of indels, single nucleotide variants and splice-site variants was performed by Ion Reporter Software v5.2 (Ion Torrent™). Regions with at least 20-fold depth of coverage were used to call variants. To prioritize variants detected by NGS-based analysis, we used wANNOVAR [7,36] to obtain those variants that were not present in all the samples. Alignments were verified with Integrative Genomics Viewer (IGV) to visually inspect the detected variants [29], and variants were identified with Alamut Visual version 2.9.0 (Interactive Biosoftware, Rouen, France, www.interactive-biosoftware.com).

2.4. Sanger sequencing

All variants detected by NGS that were suspected to be pathogenic or probably pathogenic were confirmed by bidirectional Sanger sequencing using genomic DNA and primer pairs flanking the variant position (primer sequences and PCR conditions available upon request). Sequencing was performed by capillary electrophoresis on an ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

We also analyzed the missing regions or regions with insufficient read depth coverage (under 20X) for reliable heterozygous variant detection by capillary electrophoresis.

2.5. Variant classification

To classify the detected variants, we used the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) classification standards and guidelines [28]. The five categories included the following: pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign and benign, and the 5-tier classification system previously described [25]. Variants were classified as variants of uncertain significance (VUS) when no functional data were available or the risk was not clearly established according to the literature or gene databases. The following public

databases were used for the interpretation of the variants: ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), Varsome (<https://varsome.com/>), InSIGHT (<https://www.insight-group.org/variants/databases/>), LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/genes>) and the Human Genome Mutation Database (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Last access: December 2018.

3. Results

Our study included the analysis of 25 genes associated with hereditary cancer syndromes with breast cancer as a clinical manifestation. These 25 genes were analyzed in 77 patients fulfilling criteria of hereditary breast cancer and a breast cancer diagnosis: 43 patients were noncarriers of pathogenic variants or VUS in *BRCA1* or *BRCA2* genes, and 32 patients were carriers of VUS. We obtained a total coverage of 99.54% of the selected regions, a mean depth of coverage of 615X and an average coverage uniformity of 96%. Two samples were excluded due to low coverage (less than 20-fold).

We identified 11 putative pathogenic variants, all were resequenced by Sanger sequencing.

Six variants were classified as pathogenic or likely pathogenic variants, and three were considered VUS (Table 1). The pathogenic or likely pathogenic variants were located in the *PALB2* gene (3 variants),

BRIP1 gene (1 variant), *BARD1* gene (1 variant) and *RAD50* gene (1 variant). *PALB2* was the most commonly mutated gene in our participants, with three variants detected (c.2257 T > C, c.2834 + 1G > C, and c.1965dup). Two unique frameshift variants were detected in *BARD1* (c.1509del) and *BRIP1* (c.1702_1703del) and a nonsense variant was identified in *RAD50* (c.2116C > T). The three VUS were detected in *CDH1* (c.44_46dup), *TP53* (c.847C > T) and *CHEK2* (c.190G > A) genes.

In addition, we detected two false positive variants, the *PMS2* c.2337_2338insT variant located in a homopolymer region, and the *PMS2* c.2492dup variant detected due to interference with the homologous pseudogene *PMS2CL*.

No pathogenic variants or VUS were identified in the rest of the genes analyzed.

4. Discussion

In this study, we sought to determine the feasibility of analyzing hereditary cancer-related genes other than *BRCA1* and *BRCA2* in our breast cancer population. Here, we present results from a multigene panel test for pathogenic variants in 25 genes of hereditary cancer among 77 patients who had negative test results for the *BRCA1* and *BRCA2* genes. Pathogenic or likely pathogenic variants were identified in 8% of the patients. These findings were similar to those obtained in

Table 1
 Pathogenic variants, likely pathogenic variants and VUS identified among 77 individuals, who previously tested negative for pathogenic *BRCA1/BRCA2* variants.

Patient ID	Cancer Type	Age at Diagnosis (years)	Family History of Cancer (Age at diagnosis)	Gene (Transcript)	Nucleotide Change	Protein Change	Pathogenicity*	<i>BRCA1/BRCA2</i> Variants Identified
1562	BREAST	56	BREAST (73); BREAST (78); HEAD AND NECK (80); BREAST(78); BREAST (42); GASTRIC (60 ~)	<i>PALB2</i> (NM_024675.3)	c.2257C > T	p.Arg753Ter	PATHOGENIC	<i>BRCA2</i> : c.8860 + 2T > G
1224	BILATERAL BREAST	45; 55	-	<i>RAD50</i> (NM_005732.3)	c.2116C > T	p.Arg706Ter	PATHOGENIC	None
609	BREAST	31	BREAST (44); GASTRIC (40); PANCREATIC (63)	<i>PALB2</i> (NM_024675.3)	c.2834 + 1G > C		LIKELY PATHOGENIC	None
1376	BREAST	47	BREAST (54); PANCREATIC (65); LUNG (44); BREAST (40 ~)	<i>PALB2</i> (NM_024675.3)	c.1965dup	p.Pro656SerfsTer7	LIKELY PATHOGENIC [†]	None
1846	BILATERAL BREAST	50; 52	BREAST (63); LIVER (64); HEAD AND NECK (63)	<i>BARD1</i> (NM_001282543.1)	c.1509del	p.Val504LeufsTer17	LIKELY PATHOGENIC [†]	None
1830	BREAST	44	BREAST (46); BREAST (41)	<i>BRIP1</i> (NM_032043.2)	c.1702_1703del	p.Asn568TrpfsTer9	LIKELY PATHOGENIC	<i>BRCA2</i> : c.5729C > T
1735	BREAST	47	BILATERAL BREAST (66; 70); BREAST (70); PROSTATE (70 ~)	<i>TP53</i> (NM_000546.4)	c.847C > T	p.Arg283Cys	VUS	<i>BRCA1</i> : c.-18T > C
1754	BREAST	50	BREAST (43); LUNG (78); LEUKEMIA (26); ESOPHAGUS (80); GASTRIC (50)	<i>CHEK2</i> (NM_001005735.1)	c.190G > A	p.Glu64Lys	VUS	None
1406	BREAST	57	OVARIAN (79); LUNG (53); GASTRIC (75); BREAST (¿);	<i>CDH1</i> (NM_001317184.1)	c.44_46dup	p.Leu15dup	VUS	<i>BRCA2</i> : c.7787G > A

* Pathogenicity as listed in ClinVar, InSIGHT, LOVD or HGMD databases and categorized according to the ACMG.

† Pathogenicity according to the ACMG guidelines for variants classification.

other studies of hereditary breast cancer [23]. The pathogenic variants identified were found in high- and moderate-risk genes conferring breast cancer and were also related to cancers that were present in personal and family histories of the patients selected for our study. Genes that harbor pathogenic variants are included in the clinical guidelines with management recommendations, such as the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines [39].

The identification of a pathogenic variant in a HBOC patient can result in multiple benefits. Traditionally, only *BRCA* genes were considered when a genetic study was indicated in a patient suggestive of HBOC; however, a considerable percentage of patients who fulfill the criteria of HBOC do not harbor pathogenic variants in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, as it occurs with the 77 patients analyzed in the present study. Due to the linkage of different cancer syndromes with common clinical outcomes, a wide spectrum of candidate genes has been established. For that reason, targeted sequencing of gene panels by NGS has been demonstrated to be widely useful not only for patient's clinical management but also for secondary prevention in healthy relatives [34].

The analysis of 25 genes associated with several cancer syndromes has retrieved a diagnostic yield of 8%. We found a high frequency (4%) of pathogenic mutations in the *PALB2* gene which is in accordance with other studies previously reported. For instance, founder pathogenic variants in *PALB2*, in women with breast cancer and with a family history of breast cancer, account for approximately 4% [20]. The *PALB2* c.2257C > T pathogenic variant was found in a patient with

breast cancer diagnosed at the age of 56 (Fig. 1A). We were not able to obtain DNA samples from other family members affected with cancer, so we could not perform carrier analyses in relatives. The *PALB2* c.2834 + 1G > C is a splice variant classified in the databases as likely pathogenic due to its position in the canonical donor site and its absence in the general population [21]. The patient was a woman diagnosed with triple-negative breast cancer at age 31. We were only able to obtain a sample from her mother, who was also diagnosed with breast cancer and carrier of this variant. We observed that an uncle of the proband's mother was diagnosed with pancreatic cancer (Supplementary Figure 1), but we did not have a DNA sample to perform the carrier analysis. The *PALB2* c.1965dup variant detected in a breast cancer patient has not been previously described. We could not analyze its presence in any affected relative because DNA samples were not available for analysis (Supplementary Figure 2). Interestingly, this patient, in addition to the *PALB2* variant, also carried a controversial variant in the *BRCA2* gene, classified as a variant of uncertain significance or likely pathogenic (class 4) by different authors. However, although this *BRCA2* variant has been classified as likely pathogenic in the databases by its position in a canonical donor site, assuming a negative effect in the splicing, in a previous study, we could not conclude its pathogenic effect due to the lack of alteration effect in the splicing process [30]. This finding reinforces the fact that the *PALB2* gene is strongly related not only to breast cancer but also to pancreatic cancer, as previously reported [19]. The *PALB2* gene product acts as a tumor suppressor and interacts closely with both *BRCA1* and *BRCA2* genes

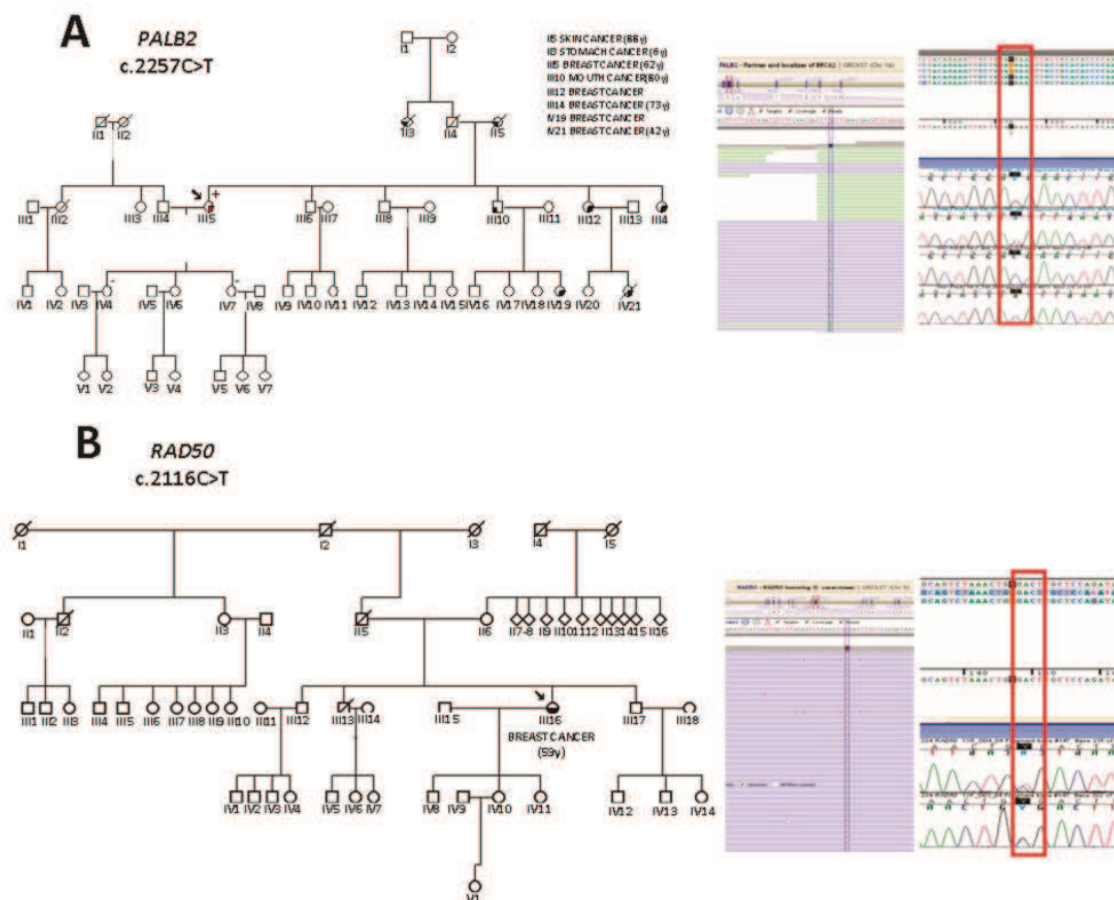


Fig. 1. Pedigrees of the families carrying pathogenic variants and Alamut® Visual BAM viewer screenshot and electropherogram of the variant identified. A: *PALB2* c.2257C > T variant. B: *RAD50* c.2116C > T variant. Cancer and age diagnoses are indicated in affected patients. The arrow indicates the index case analysed.

during the double-strand DNA repair process [19]. In addition, Antoniou et al. suggested that the breast cancer risk for *PALB2* mutation carriers may overlap with that for *BRCA2* mutation carriers [1]. The *PALB2* gene, partner and localizer of *BRCA2*, also known as *FANCN*, is also related to the Fanconi anemia pathway, as well as *BRIPI* and *RAD51C*, all of which are considered to increase the risk of breast cancer. Some studies estimate that pathogenic variants in *PALB2* are associated with a two to four times higher risk of breast cancer [1]. The *PALB2* gene is one of the most mutated genes after *BRCA1* and *BRCA2* genes in HBOC [6,35].

Our results support the incorporation of *PALB2* in the gene panel for the clinical genetic testing of HBOC.

The *RAD50* c.2116C > T is a nonsense variant (p.Arg706Ter) found in a proband with bilateral breast carcinoma without known familial history of cancer (Fig. 1B). This variant has been previously described as pathogenic in public variant databases as ClinVar, Ensembl, HGMD and Varsome. Germline mutations in the *RAD50* gene, although seen at low frequencies and known to be population specific, can be qualified as a novel candidate gene for conferring breast cancer susceptibility in a subset of non-*BRCA1* and *BRCA1/2* families [2]. However, their clinical impact has yet to be determined.

BARD1 c.1509del is a frameshift variant identified in one patient affected by bilateral breast cancer (Supplementary Figure 3). As far as we know, this variant is not described in the databases, but *in silico* predictions show that it creates a premature translational stop signal at codon 520 of the protein, so it is expected to result in an absent or disrupted protein product; consequently, we can consider it as likely pathogenic. *BRCA1* and *BRCA2* possess an amino-terminal RING-finger motif that facilitates *BARD1/BRCA1* heterodimer formation. This stabilizes both proteins and is essential for the expression of the tumor suppressor functions of *BRCA1* [38]). In fact, loss-of-function variants in this gene are known to be pathogenic [8]; however, although *BARD1* mutations can confer cancer susceptibility, larger studies are essential to confirm this.

The *BRIPI* c.1702_1703del variant identified in the studied population (Supplementary Figure 4) is a frameshift variant previously classified as likely pathogenic by *in silico* prediction [13]. Rafnar et al. genotyped this deletion in cancer patients and control subjects from Spain. They showed that this *BRIPI* deletion is very rare (allelic frequency 0.03% in control subjects, N = 1,780), but it is associated with a greatly increased risk of ovarian cancer (OR = 25, P = 0.016) and a significant risk of breast cancer (OR = 12, P = 0.0079) [27]. *BRIPI* encodes a protein that was identified as a binding partner of *BRCA1* and was investigated as a breast cancer predisposing gene [2]. Although germline mutations in the *BRIPI* gene have been described as conferring a moderate risk for ovarian cancer, other authors suggested that the role of *BRIPI* in breast cancer pathogenesis remains controversial [37], and its potential effects cannot be excluded yet.

Three unique VUS were detected in the *CDH1*, *TP53* and *CHEK2* genes. These VUS are missense or duplication variants. *CDH1* c.44_46dup is an in-frame variant found in a breast cancer patient that produces a gain of one amino acid (p.Leudup) (Supplementary Figure 5). It shows a frequency of 0.00083% in population databases (ExAC, rs141568342), so insufficient evidence exists to classify it. The *TP53* c.847C > T (Supplementary Figure 6) missense variant is mainly classified in the databases as VUS because of the lack of evidence to consider it pathogenic. We also identified a *CHEK2* c.190G > A missense variant (p.Glu64Lys) in a patient with a personal and familial history of breast cancer (Supplementary Figure 7), which is not described in databases, and we did not find evidence to consider it as likely pathogenic. Although the amino acid change can be critical by the physicochemical differences in these variants, their presence in population databases and the lack of the possibility to perform segregation analysis make their classification impossible.

In this study, we described that 8% of BRCAX patients are carriers of pathogenic variants in other genes, particularly *PALB2*, *BARD1*, *BRIPI*

and *RAD50*, all of which are functionally related to *BRCA1* and *BRCA2* [9,6,35,24]. Some of these genes were known to be related to ovarian cancer but not breast cancer until now, which reinforces the idea of not segregating gene panels according to specific phenotypes, which takes the possibility of overlapping phenotypes into account. We found VUS and pathogenic variants in genes related to other cancer syndromes, highlighting the need to create multigenic panels, taking into account the high- and moderate-risk genes of the main hereditary cancer syndromes, as well as genes that are important in the DNA repair pathways. In this setting, massive genetic studies have a short track, so results in databases are still not completely available and there is a considerable number of VUS. This panel approach provided some VUS that would require the use of a prioritization system to select those with the highest probability of being associated with risk. This drawback will be solved in the near future with the current implementation of these panels in laboratories and with the collection and collation of VUS in databases, leading to more information to determine the putative pathogenicity of these variants.

A limitation of this approach is that it was not possible to analyze Copy Number variants (CNVs) and to determine the presence of large rearrangements because with this approximation, we did not achieve the necessary coverage uniformity of the amplicons to perform it. Another possibility would be the use of different techniques, such as MLPA, to detect these rearrangements, but currently, this is not a cost-effective alternative for panels that include a large number of genes.

5. Conclusions

In conclusion, our study obtained an increment of the diagnostic yield in patients with HBOC syndrome reinforcing the utility of multigenic panels in patients who previously underwent noninformative genetic screening of *BRCA* genes. Further studies are warranted to better gauge whether the non-*BRCA1/2* familial clusters might contain important single gene subsets associated with higher cancer risk and the role of the candidate genes in the susceptibility to HBOC.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the technicians from the Biobanc-IISPV in Reus (<http://www.iispv.cat>) for sample management. We also thank Helena Torrell and Lorena Garcia from the Genomics facility of the Centre for Omic Sciences (COS) Joint Unit of the Universitat Rovira i Virgili-Eurecat for their contribution to sequencing analysis. Finally, we thank Ximena Terra for her proofreading of the article and her writing assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.11.014>.

References

- [1] Antonis C. Antoniou, Silvia Casadei, Tuomas Heikkinen, Daniel Barrowdale, Katri Pyrkäs, Jonathan Roberts, Andrew Lee, Deepak Subramanian, Kim De Leeener, Florentia Fostira, Eva Tomiak, Susan L. Neuhausen, Zhi L. Teo, Sofia Khan, Kristiina Aittomäki, Jukka S. Moilanen, Clare Turnbull, Sheila Seal, Arto Mannermaa, Anne Kallioniemi, Geoffrey J. Lindeman, Sandra S. Buys, Irene L. Andrulis, Paolo Radice, Carlo Tondini, Siranoush Manoukian, Amanda E. Toland, Penelope Miron, Jeffrey N. Weitzel, Susan M. Domchek, Bruce Poppe, Kathleen B.M. Claes, Drakoulis Yannoukakos, Patrick Concannon, Jonine L. Bernstein, Paul

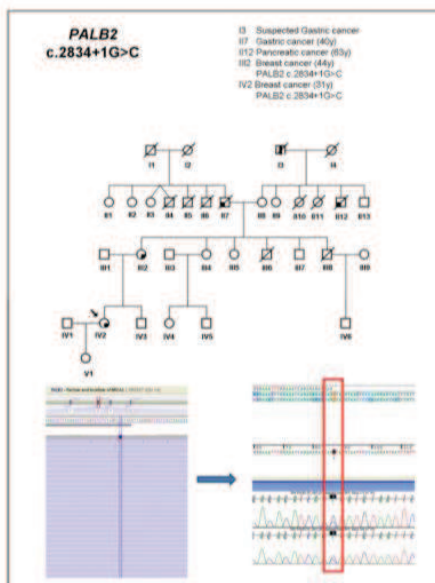
- A. James, Douglas F. Easton, David E. Goldgar, John L. Hopper, Nazneen Rahman, Paolo Peterlongo, Heli Nevanlinna, Mary-Claire King, Fergus J. Couch, Melissa C. Southey, Robert Winquist, William D. Foulkes, Marc Tischkowitz, Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in PALB2, *New England J. Med.* 371 (6) (2014) 497–506.
- [2] Paraskevi Apostolou, Florentia Fostira, Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 747318.
- [3] M.J. Bermejo-Pérez, S. Márquez-Calderón, A. Llanos-Méndez, Effectiveness of preventive interventions in BRCA1/2 gene mutation carriers: a systematic review, *Int. J. Cancer* 121 (2) (2007) 225–231.
- [4] Freddie Bray, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L. Siegel, Lindsey A. Torre, Ahmedin Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 68 (6) (2018) 394–424.
- [5] Luca Brunelli, Rong Mao, Sabrina Malone Jenkins, Steven B. Bleyl, Shale A. Dames, Christine E. Miller, Betsy Ostrander, Tatiana Tvrđik, Seth Andrews, Josue Flores, Shrena Patel, James M. Gudgeon, Susan Schaefer, A rapid gene sequencing panel strategy to facilitate precision neonatal medicine, *Am. J. Med. Genet. Part A* 173 (7) (2017) 1979–1982.
- [6] Sandra S. Buys, John F. Sandbach, Amanda Gammon, Gayle Patel, John Kidd, Krystal L. Brown, Lavania Sharma, Jennifer Saam, Johnathan Lancaster, Mary B. Daly, A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes, *Cancer* 127 (10) (2017) 1721–1730.
- [7] Xiao Chang, Kai Wang, WANNVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web, *J. Med. Genet.* 49 (7) (2012) 433–436.
- [8] Flora Cimmino, Daniela Formicola, Mario Capasso, Dualistic role of BARD1 in cancer, *Genes* 8 (12) (2017) 375.
- [9] Serena L. Clark, Ana M. Rodriguez, Russel R. Snyder, Gary D.V. Hankins, Darren Boehning, Structure-function of the tumor suppressor BRCA1, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 1 (1) (2012).
- [10] G. Coyne, A. Chen, S. Kummur, Cancer therapy, *Cancer* 13 (3) (2011) 57–66.
- [11] D. Easton, J. Peto, The contribution of inherited predisposition to cancer incidence, *Cancer Surv.* 9 (3) (1990) 395–416.
- [12] Douglas F. Easton, How many more breast cancer predisposition genes are there? *Breast Cancer Res.* 1 (1) (1999) 14–17.
- [13] Clara Esteban-Jurado, Sebastián Franch-Expósito, Jenifer Muñoz, Teresa Ocaña, Sabela Carballal, María López-Cerón, Miriam Cuatrecasas, María Vila-Casadesús, Juan José Lozano, Eric Serra, Sergi Beltran, Alejandro Brea-Fernández, Clara Ruiz-Ponte, Antoni Castellà, Luis Bujanda, Pilar Garre, Trinidad Caldés, Joaquín Cubiella, Francesc Balaguer, Sergi Castellví-Bel, The Fanconi anemia DNA damage repair pathway in the spotlight for germline predisposition to colorectal cancer, *Eur. J. Hum. Genet.* 24 (10) (2016) 1501–1505.
- [14] D. Ford, D.F. Easton, M. Stratton, S. Narod, D. Goldgar, P. Devilee, D.T. Bishop, B. Weber, G. Lenoir, J. Chang-Claude, H. Sobol, M.D. Teare, J. Struwing, A. Arason, S. Scherneck, J. Peto, T.R. Rebbeck, P. Tonin, S. Neuhausen, R. Barkardóttir, J. Eyfjord, H. Lynch, B.A. Ponder, S.A. Gayther, M. Zelada-Hedman, Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The breast cancer linkage consortium, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 676–689.
- [15] Melissa K. Frey, Bhavana Pothuri, Homologous recombination deficiency (HRD) testing in ovarian cancer clinical practice: a review of the literature, *Gynecologic Oncology Research and Practice* 4 (1) (2017) 4.
- [16] I. Inés, D.M. Gilkes, BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer, *Integr. Cancer Sci. Ther.* 4 (1) (2017).
- [17] Isabel Chirivella González, Vicenta Garcés Honrubia, Cáncer de Mama Hereditario Más Allá de BRCA1/BRCA2, *Genética Médica y Genómica* 2 (2) (2018) 67–77.
- [18] Yosuke Hirotsu, Hiroshi Nakagomi, Ikuko Sakamoto, Kenji Amemiya, Toshió Oyama, Hitoshi Mochizuki, Masao Omata, Multigene panel analysis identified germline mutations of DNA repair genes in breast and ovarian cancer, *Mol. Genet. Genomic Med.* 3 (5) (2015) 459–466.
- [19] Erin W. Hofstatter, Susan M. Domchek, Alexander Miron, Judy Garber, Molin Wang, Kathryn Compneschi, Leigh Boghossian, Penelope L. Miron, Katherine L. Nathanson, Nadine Tung, PALB2 mutations in familial breast and pancreatic cancer, *Fam. Cancer* 10 (2) (2011) 225–231.
- [20] Marketa Janatova, Jana Soukupova, Jana Stribrna, Petra Kleiblova, Michal Vocka, Petra Boudova, Zdenek Kleibl, Petr Pohlreich, Mutation analysis of the RAD51C and RAD51D genes in high-risk ovarian cancer patients and families from the czech republic, *PLoS ONE* 10 (6) (2015) e0127711.
- [21] Melissa J. Landrum, Jennifer M. Lee, Mark Benson, Garth Brown, Chen Chao, Shanmuga Chitipiralla, Gu. Baoshan, Jennifer Hart, Douglas Hoffman, Jeffrey Hoover, Wonhee Jang, Kenneth Katz, Michael Ovetsky, George Riley, Amanjev Sethi, Ray Tully, Ricardo Villamarin-Salomón, Wendy Rubinstein, Donna R. Maglott, ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants, *Nucleic Acids Res.* 44 (D1) (2016) D862–D868.
- [22] G. Lloir, I. Chirivella, R. Morales, R. Serrano, A. Beatriz Sanchez, A. Teulé, E. Lastra, J. Brunet, J. Balmaña, B. Graña, SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer, *Clin. Transl. Oncol.* 17 (12) (2015) 956–961.
- [23] Olivia Moran, Dina Nikitina, Robert Royer, Aletta Poll, Kelly Metcalfe, Steven A. Narod, Mohammad R. Akbari, Joanne Kotsopoulos, Revisiting breast cancer patients who previously tested negative for BRCA mutations using a 12-gene panel, *Breast Cancer Res. Treat.* 161 (1) (2017) 135–142.
- [24] Marcella Nunziato, Maria Valeria Esposito, Flavio Starnone, Maria Angela Diroma, Alessandra Calabrese, Valentina Del Monaco, Pasqualina Buono, Giuseppe Frasci, Gerardo Botti, Massimiliano D'Auto, Francesco Salvatore, Valeria D'Argenio, A multi-gene panel beyond BRCA1/BRCA2 to identify new breast cancer-predisposing mutations by a picodroplet PCR followed by a next-generation sequencing strategy: a pilot study, *Anal. Chim. Acta* 1046 (2019) 154–162.
- [25] Sharon E. Plon, Diana M. Eccles, Douglas Easton, William D. Foulkes, Maurizio Genuardi, Marc S. Greenblatt, Frans B.L. Hogervorst, Nicoline Hoogerbrugge, Amanda B. Spurdle, Sean V Tavtigian, Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results, *Hum. Mutat.* 29 (11) (2008) 1282–1291.
- [26] Eric Pujade-Lauraine, Jonathan A. Ledermann, Frédéric Selle, Val Gebski, Richard T. Penson, Amit M. Oza, Jacob Korach, Tomasz Huzarski, Andrés Poveda, Sandro Pignata, Michael Friedlander, Nicoletta Colombo, Philipp Harter, Keiichi Fujiwara, Isabelle Ray-Coquard, Susana Banerjee, Joyce Liu, Elizabeth S. Lowe, Ralph Bloomfield, Patricia Pautier, Jacob SOLO2/ENGOT-Ov21 investigators, Tomasz Huzarski, Tomasz Byrski, Patricia Pautier, Michael Friedlander, Philipp Harter, Nicoletta Colombo, Sandro Pignata, Giovanni Scambia, Maria Nicoletto, Fiona Nussey, Andrew Clamp, Richard Penson, Amit Oza, Andrés Poveda Velasco, Manuel Rodríguez, Jean-Pierre Lotz, Frédéric Selle, Isabelle Ray-Coquard, Diane Provencher, Aleix Prat Aparicio, Laura Vilá Boixader, Clare Scott, Kenji Tamura, Mayu Yunokawa, Alla Lisyanskaya, Jacques Medioni, Nicolas Pécuchet, Coraline Dubot, Thibault de la Motte, Marie-Christine Kaminsky Rouge, Béatrice Weber, Alain Lortholary, Christine Parkinson, Jonathan Ledermann, Sarah Williams, Susana Banerjee, Jonathan Cosin, James Hoffman, Richard Penson, Tomasz Huzarski, Alan Covens, Gabe Sonke, Florence Joly, Anne Floquet, Susana Banerjee, Holger Hirte, Annon Amit, Tjoun-Won Park-Simon, Koji Matsumoto, Sergei Tjulandin, Jae Hoon Kim, Laurence Gladieff, Roberto Sabbatini, David O'Malley, Patrick Timmins, Daniel Kredentser, Nuria Lainez Milagro, María Pilar Barretina Ginesta, Ariadna Tibau Martorell, Alfonso Gómez de Liaño, Belén Ojeda Lista, Linda Mileskin González, Masaki Mandai, Ingrid Boere, Petronella Ottevanger, Joo-Hyun Nam, Elias Filho, Salima Hamizi, Francesco Cognetti, David Warshal, Elizabeth Dickson-Michelson, Scott Kamelle, Nathalie McKenzie, Gustavo Rodríguez, Deborah Armstrong, Eva Chalas, Paul Celano, Kian Behbakht, Susan Davidson, Stephen Welch, Limor Helpman, Ami Fishman, Ilan Bruchim, Magdalena Sikorska, Anna Słowińska, Wojciech Rogowski, Mariusz Bidziński, Beata Śpiewankiewicz, Antonio Casado Herrera, César Mendiola Fernández, Martina Gropp-Meier, Toshiaki Saito, Kazuhiko Takehara, Takayuki Enomoto, Hidemichi Watarai, Chel Hun Choi, Byoung-Gie Kim, Jae Won Kim, Roberto Hegg, Ignace Vergote, Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial, *Lancet Oncol.* 18 (9) (2017) 1274–1284.
- [27] Thorunn Rafnar, Daniel F. Gudbjartsson, Patrick Sulem, Aslaug Jonasdóttir, Asgeir Sigurdsson, Adalbjorg Jonasdóttir, Soren Besenbacher, Pär Lundin, Simon N. Stacey, Julius Gudmundsson, Olafur T. Magnusson, Louise le Roux, Gudbjorg Orlygsdóttir, Hafdis T. Helgadóttir, Hrefna Johannsdóttir, Arnaldur Gylfason, Laufey Tryggvadóttir, Jon G. Jonasson, Ana de Juan, Eugenia Ortega, Jose M. Ramon-Cajal, Maria D. Garcia-Prats, Carlos Mayordomo, Angeles Panadero, Fernando Rivera, Katja K.H. Aben, Anne M. van Altna, Leon F.A.G. Massuger, Mervi Aavikko, Paula M. Kujala, Synnöve Staff, Lauri A. Aaltonen, Kristrun Olafsdóttir, Johannes Bjornsson, Augustine Kong, Anna Salvarsdóttir, Hafsteinn Saemundsson, Karl Olafsson, Kristrun R. Benediksdóttir, Jeffrey Gulcher, Gislí Masson, Lambertus A. Kiemeny, Jose I. Mayordomo, Unnur Thorsteinsdóttir, Kari Stefansson, Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer, *Nat. Genet.* 43 (11) (2011) 1104–1107.
- [28] Sue Richards, Nazneen Aziz, Sherri Bale, David Bick, Soma Das, Julie Gastier-Foster, Wayne W. Grody, Madhuri Hegde, Elaine Lyon, Elaine Spector, Karl Voelkerding, Heidi L. Rehm, Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology, *Genet. Med.* 17 (5) (2015) 405–424.
- [29] James T. Robinson, Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Ga.d. Getz, Jill P. Mesirov, Integrative genomics viewer, *Nat. Biotechnol.* 29 (1) (2011) 24–26.
- [30] Marta Rodríguez-Balada, Bàrbara Roig, Lourdes Martorell, Mireia Melé, Mónica Salvat, Elisabet Vilella, Joan Borràs, Josep Gumà, In silico, in vitro and case-control analyses as an effective combination for analyzing BRCA1 and BRCA2 unclassified variants in a population-based sample, *Cancer Genet.* 209 (11) (2016) 487–492.
- [31] Kristen Mahoney Shannon, Anu Chittenden, Genetic testing by cancer site, *Cancer J.* 18 (4) (2012) 310–319.
- [32] Helen A. Shih, Fergus J. Couch, Katherine L. Nathanson, M. Anne Blackwood, Timothy R. Rebbeck, Katrina A. Armstrong, Kathleen Calzone, Jill Stopfer, Sheila Seal, Michael R. Stratton, Barbara L. Weber, BRCA1 and BRCA2 mutation frequency in women evaluated in a breast cancer risk evaluation clinic, *J. Clin. Oncol.* 20 (4) (2002) 994–999.
- [33] Michele Simbolo, Andrea Mafficini, Marco Agostini, Corrado Pedrazzani, Chiara Bedin, Emanuele D. Urso, Donato Nitti, Giona Turri, Maria Scardoni, Matteo Fassan, Aldo Scarpa, Next-generation sequencing for genetic testing of familial colorectal cancer syndromes, *Hereditary Cancer Clin. Pract.* 13 (1) (2015) 18.
- [34] Lisa R. Susswein, Megan L. Marshall, Rachel Nusbaum, Kristen J. Vogel, Scott M. Postula, Lauren Yackowski Weissman, Erica M. Vaccari, Jeffrey Bissonnette, Jessica K. Booker, M. Laura Cremona, Federica Gibellini, Patricia D. Murphy, Daniel E. Pineda-Alvarez, Guido D. Pollevick, Xu. Zhixiong, Gabi Richard, Sherri Bale, Rachel T. Klein, Kathleen S. Hruska, Wendy K. Chung, Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing, *Genet. Med.* 18 (8) (2016) 823–832.
- [35] Gianluca Tedaldi, Michela Tebaldi, Valentina Zampiga, Rita Danesi, Valentina Arcangeli, Mila Ravegnani, Ilaria Cangini, Francesca Pirini,

M. Rodríguez-Balada, et al.

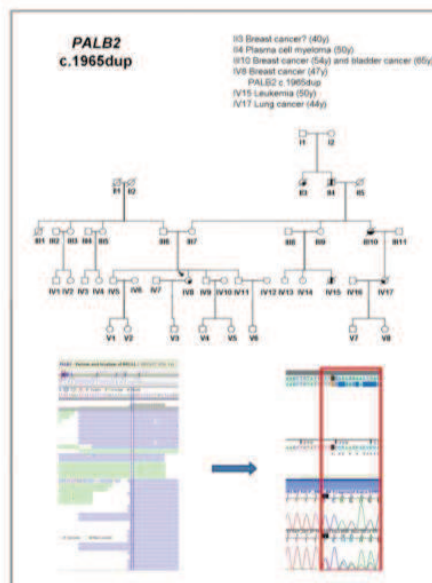
Clinical Biochemistry 76 (2020) 17–23

- Elisabetta Petracci, Andrea Rocca, Fabio Falcini, Dino Amadori, Daniele Calistri, Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer, *Oncotarget* 8 (29) (2017) 47064–47075.
- [36] K. Wang, M. Li, H. Hakonarson, ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data, *Nucleic Acids Res.* 38 (16) (2010) e164.
- [37] Nana Weber-Lassalle, Jan Hauke, Juliane Ramser, Lisa Richters, Eva Groß, Britta Blümcke, Andrea Gehrig, Anne-Karin Kahlert, Clemens R. Müller, Karl Hackmann, Ellen Honisch, Konstantin Weber-Lassalle, Dieter Niederacher, Julika Borde, Holger Thiele, Corinna Ernst, Janine Altmüller, Guido Neidhardt, Peter Nürnberg, Kristina Klaschik, Christopher Schroeder, Konrad Platzer, Alexander E. Volk, Shan Wang-Gohrke, Walter Just, Bernd Auber, Christian Kubisch, Gunnar Schmidt, Judit Horvath, Barbara Wappenschmidt, Christoph Engel, Norbert Arnold, Bernd Dworniczak, Kerstin Rhiem, Alfons Meindl, Rita K. Schmutzler, Eric Hahnen, BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer, *Breast Cancer Res.* 20 (1) (2018) 7.
- [38] Leeju C. Wu, Zhuo Wei Wang, Julia Tsou Tsan, Monique A. Spillman, Anne Phung, Xie L. Xu, Meng-Chun W. Yang, Larn-Yuan Hwang, Anne M. Bowcock, Richard Baer, Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product, *Nat. Genet.* 14 (4) (1996) 430–440.
- [39] J. Saam, et al., Patients tested at a laboratory for hereditary cancer syndromes show an overlap for multiple syndromes in their personal and familial cancer histories, *Oncology* 89 (5) (2015) 288–293.

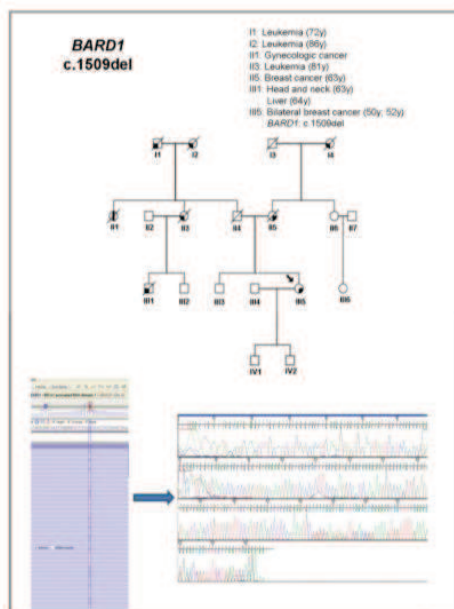
Material suplementari



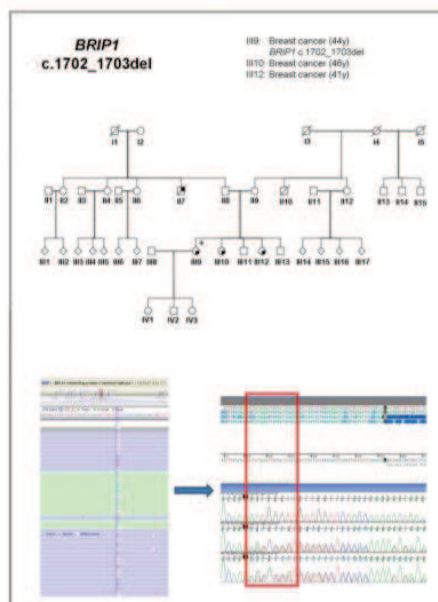
SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Pedigree of the family carrying the *PALB2* c.2834+1G>C likely pathogenic variant, Alamut® Visual BAM viewer screenshot and the electropherogram of the variant identified. Cancer and age diagnoses are indicated in affected patients. The arrow indicates the index case analysed.



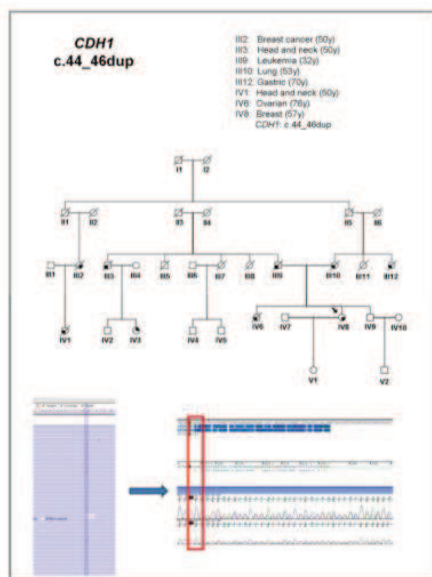
SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Pedigree of the family carrying the *PALB2* c.1965dup likely pathogenic variant, Alamut® Visual BAM viewer screenshot and electropherogram of the variant identified. Cancer and age diagnoses are indicated in affected patients. The arrow indicates the index case analysed.



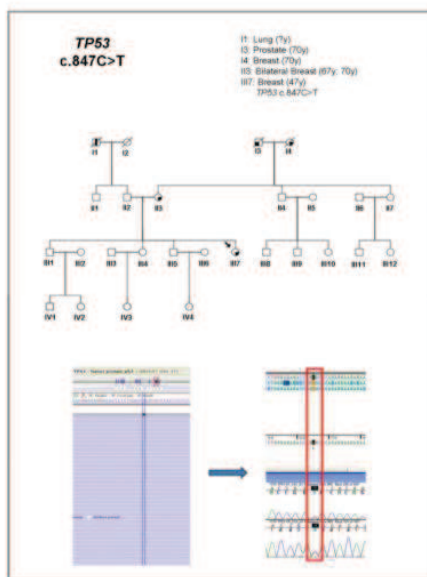
SUPPLEMENTARY FIGURE 3. Pedigree of the family carrying the *BARD1* c.1509del likely pathogenic variant, Alamut® Visual BAM viewer screenshot and electropherogram of the variant identified. Cancer and age diagnoses are indicated in affected patients. The arrow indicates the index case analysed.



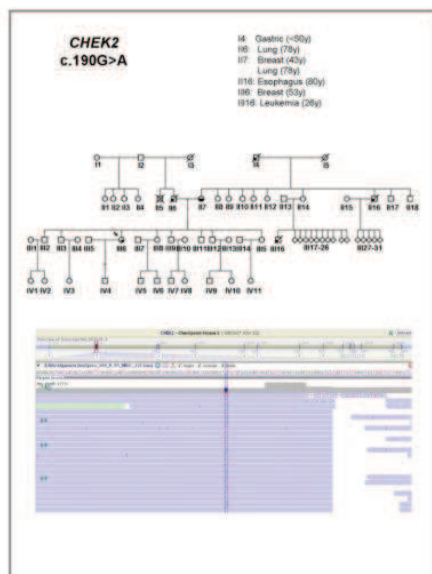
SUPPLEMENTARY FIGURE 4. Pedigree of the family carrying the *BRIP1* c.1702_1703del likely pathogenic variant, Alamut® Visual BAM viewer screenshot and electropherogram of the variant identified. Cancer and age diagnoses are indicated in affected patients. The arrow indicates the index case analysed.



SUPPLEMENTARY FIGURE 5. Pedigree of the family carrying the *CDH1* c.44_46dup variant of uncertain significance, Alamut®. Visual BAM viewer screenshot and electropherogram of the variant identified. Cancer and age diagnoses are indicated in affected patients. The arrow indicates the index case analysed.



SUPPLEMENTARY FIGURE 6. Pedigree of the family carrying the *TP53* c.847C>T variant of uncertain significance, Alamut®. Visual BAM viewer screenshot and electropherogram of the variant identified. Cancer and age diagnoses are indicated in affected patients. The arrow indicates the index case analysed.



SUPPLEMENTARY FIGURE 7. Pedigree of the family carrying the *CHEK2* c.190G>A variant of uncertain significance, Alamut®. Visual BAM viewer screenshot and electropherogram of the variant identified. Cancer and age diagnoses are indicated in affected patients. The arrow indicates the index case analysed.

4. Metabolomics reveals novel blood plasma biomarkers associated to the BRCA1-mutated phenotype of human breast cancer

Bàrbara Roig, **Marta Rodríguez-Balada**, Sara Samino, Eric W-F.Lam, Sandra Guaita-Esteruelas, Ana R. Gomes, Xavier Correig, Joan Borràs, Oscar Yanes, Josep Gumà.

Revista: *Scientific Reports* (2017) 7: 17831

Quartil: Q1 (17/71) *Multidisciplinary sciences*.

Impact factor (2019): 3.998

DOI: [10.1038/s41598-017-17897-8](https://doi.org/10.1038/s41598-017-17897-8)

La metabolòmica és l'estudi de la resposta metabòlica dels éssers vius a modificacions genètiques o estímuls fisiològics. Degut a què permet l'estudi de biofluïds o teixits obtinguts de manera no invasiva, és una ciència òmica candidata a esdevenir un bon mètode per a la detecció i diagnòstic del càncer.

Per altra banda, històricament s'han descrit diferències histològiques i/o moleculars dels tumors de mama amb mutació i sense mutació en els gens *BRCA1* i *BRCA2*. En el cas de *BRCA1*, aquests tumors acostumen a ser tumors de mama triple negatius (sense expressió dels receptors hormonals ni sobre-expressió d'HER2). Per tot això, es va voler observar si es podia determinar un perfil metabolòmic que permetés detectar aquestes diferències. La identificació d'un perfil metabolòmic específic podria ser utilitzat com a biomarcador en estudis germinals (hereditaris) i en tumors somàtics que permetrien tractaments específics.

Amb aquest objectiu es van utilitzar 3 línies cel·lulars sense mutació en els gens *BRCA1* i *BRCA2* i 2 línies cel·lulars amb mutació. Es va realitzar un estudi no dirigit mitjançant cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses. Mitjançant aquesta estratègia es van diferenciar dos dels subtipus moleculars principals en càncer de mama (triple negatiu o basal, i luminal). Així mateix també es podia distingir l'estat mutacional del gen *BRCA1*. El perfil metabolòmic capaç de discriminar aquests grups, estava format principalment per 9 metabòlits: adenina, arginina-aspartat, àcid fòlic, guanosina, N6-metiladenosina, 1-metilguanina, fenilacetilglicina, tiamina pirofosfat i uridina, tots ells amb concentracions inferiors en les línies cel·lulars amb mutació en *BRCA1*. Contra tot pronòstic, es va observar que una línia cel·lular sense mutació en *BRCA1* i *BRCA2*, es comportava metabòlicament com si la presentés. Mitjançant un assaig comercial basat en MLPA (*Multiplex Ligation-dependent probe amplification*), es va poder observar la

no funcionalitat del sistema de reparació homòloga, mimetitzant la no funcionalitat dels gens *BRCA1* i *BRCA2*, fenomen conegut com *BRCAness*.

En un intent de validar *in vivo* aquest experiment, es van analitzar els 9 metabòlits en el plasma d'un grup de pacients (N=35) amb càncer de mama triple negatiu i amb sospita de la síndrome de CMOH: 23 portadors de mutació en *BRCA1* i 12 sense mutació (BRCAX). Es va observar que els metabòlits adenina, N6-metiladenosina i 1-metiladenosina eren significativament inferiors en els portadors de mutació que en els no portadors. Aquests resultats indiquen que aquests metabòlits podrien ser potencials biomarcadors relacionats amb mutacions en el gen *BRCA1*.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Metabolomics reveals novel blood plasma biomarkers associated to the BRCA1-mutated phenotype of human breast cancer

Bàrbara Roig¹, Marta Rodríguez-Balada¹, Sara Samino^{2,3}, Eric W.-F. Lam⁴, Sandra Guaita-Esteruelas¹, Ana R. Gomes⁴, Xavier Correig^{2,3}, Joan Borràs¹, Oscar Yanes^{2,3} & Josep Gumà¹

Hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC) is partly due to the presence of mutations in the *BRCA* genes. Triple-negative (TN) breast cancer (BC) shares histological characteristics with germline *BRCA1* mutation-associated tumours. We have investigated the metabolic profiles of human breast cancer (BC) cell lines carrying *BRCA1* pathogenic mutations by non-targeted liquid chromatography coupled to mass spectrometry technology. Based on our *in vitro* results, we performed a targeted metabolomic analysis of plasma samples from TN HBOC patients taking into account their *BRCA1* genotype. *BRCA1* promoter hypermethylation and the BRCAness phenotype of BC cell lines were also studied. The purpose of this study was to determine the metabolic signature of HBOC syndrome and TNBC patients and to evaluate the potential contribution of the metabolites identified to the genetic diagnosis of breast cancer. The present results show the existence of a differential metabolic signature for BC cells based on the *BRCA1* functionality. None of the studied BC cell lines presented hypermethylation of the *BRCA1* promoter region. We provide evidence of the existence of free methylated nucleotides capable of distinguishing plasma samples from HBOC patients as *BRCA1*-mutated and *BRCA1* non-mutated, suggesting that they might be considered as *BRCA1*-like biomarkers for TNBC and HBOC syndrome.

Pathogenic germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes predispose patients to hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC)¹. Approximately 15–20% of HBOC cases are associated with the presence of germline mutations in *BRCA1* or *BRCA2*. Although the frequency of mutations in these genes is very low in the general population (<0.005%), when they occur, the risk of cancer is very high (relative risk 10). However, it is important to note that the risk associated with these mutations is only approximate because there are other genetic and environmental factors that can modify the penetrance and phenotypic expression of these mutations¹.

BRCA1 and *BRCA2* are classic tumour suppressor proteins that are involved in the DNA homologous recombination repair (HRR) pathway, which is activated in response to DNA double-strand breaks (DSBs)².

Tumours that arise in patients carrying *BRCA1* germline mutations tend to be triple negative breast cancers (TNBC). TNBC is a heterogeneous group of tumours characterized by the absence of expression of histopathological markers such as the oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and ERBB2/HER2 oncogene. TNBC is biologically and clinically more aggressive than receptor- or oncogene-expressing tumours. These tumours frequently arise in younger patients, are generally larger in size at diagnosis, have a high histological grade and are responsible for many BC-related deaths^{3–6}.

Otherwise, the presence of *BRCA1* somatic mutations in sporadic TNBC is rare, accounting for less than 15% of cases⁷. Therefore, other somatic events that inactivate *BRCA1* can predispose to sporadic breast tumours. In

¹Institut d'Oncologia de la Catalunya Sud (IOCS), Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Av. del Dr. Josep Laporte, 43204, Reus, Spain. ²Metabolomics Platform, Department of Electronic Engineering (DEEEA), Universitat Rovira i Virgili, 43003, Tarragona, Catalonia, Spain. ³Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), 28029, Madrid, Spain. ⁴Department of Surgery and Cancer, Imperial Centre for Translational and Experimental Medicine (ICTEM), Imperial College London, Hammersmith Hospital Campus, London, W12 0NN, UK. Bàrbara Roig and Marta Rodríguez-Balada contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.G. (email: jguma@grupsgessa.com)

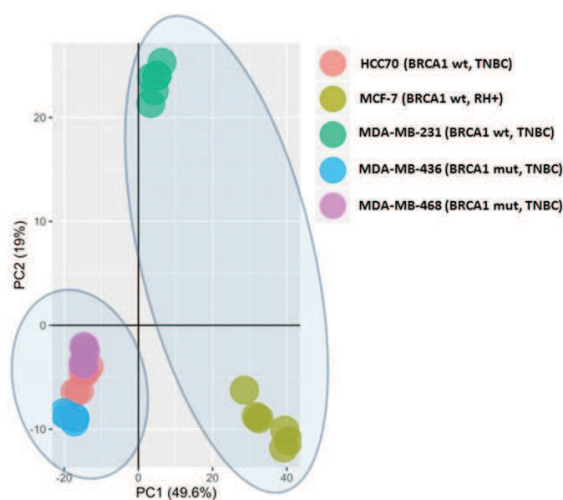


Figure 1. The results of the principal component analysis (PCA) score plots of the breast cancer cell lines analysed by LC-MS. Scrutiny of the analysed breast cancer cell lines indicated the similarities and differences between *BRCA1* genotypes.

fact, approximately 10–30% of sporadic cases of BC show somatic *BRCA1* promoter hypermethylation, which silences its expression^{8–10}. Recently, TNBC specimens were found to frequently present a *BRCA1*-like profile based on comparative genomic hybridization-specific array analysis (aCGH), revealing phenotypic characteristics that are similar to those of hereditary breast tumours from carriers of germline *BRCA1* mutations. This *BRCA1*-like profile is also referred to as “BRCAness”¹¹. BRCAness has been defined as a phenocopy of *BRCA1* or *BRCA2* pathogenic mutations, with the existence of an HRR tumour defect in the absence of a *BRCA1* or *BRCA2* germline mutation¹². Defects in other genes that modulate the HRR process may also cause a BRCAness phenotype.

Metabolomics is the most recently developed of the omics sciences and refers to the study, identification and quantification of metabolites. Metabolites are small molecules (<1500 Da) that are the product of metabolic reactions or the consequences of the activity of genes and proteins. The presence or absence of certain metabolites and the changes in their concentrations may be indicative of a particular disease or predisposing factors¹³. To perform metabolic characterization, metabolomics uses analytical complementary techniques such as mass spectrometry (MS) or nuclear magnetic resonance (NMR). Metabolomic measurements can provide untargeted and semi-quantitative measurement of metabolites in different matrices, such as cell lines¹⁴ and blood serum or plasma¹⁵. Once the measurements are acquired, accumulated data are obtained, and statistical techniques are used to identify relevant biochemical information from these data. Thus, the metabolic profile of a particular disease can be determined^{13,14}. This makes it possible to better characterize the phenotype of a disease, and consequently, the phenotypic expression of genetic mutations.

In recent years, an increasing number of metabolomic studies aimed at biomarker discovery for different diseases, including breast cancer, have been reported^{15–19}. Metabolomics is now considered a powerful technology for the identification of biomarkers and altered metabolic pathways in cancer^{20,21}, which include glycolysis, amino acid metabolism, nucleotide synthesis, phospholipid and fatty acid metabolism^{19,20,22,23}.

One effective source for novel cancer biomarkers that has attracted less attention is the conditioned media of cultured cancer cell (secretome)²⁴. The secretome contains organic molecules released by tumour cells into the extracellular space that could better reflect the activity of cancer in human body fluids such as blood plasma or serum^{25,26}.

The purpose of the present project was to analyse and to characterize the metabolic profile of human breast cancer cell lines and plasma samples of TNBC from HBOC patients who were carriers and non-carriers of germline mutations in the *BRCA1* gene. Alterations in the concentrations of certain metabolites detected in the secretome of these cell profiles can be candidates as future biomarkers of HBOC syndrome. Likewise, alterations in the concentrations of metabolites in cell pellets could provide new insights into the pathological heterogeneity of TN breast tumours and its relationship with *BRCA1*.

Results

BC cell lines segregate into three different metabolic clusters based on their *BRCA1* genotype. An unsupervised principal component analysis (PCA) was carried out to reveal the global metabolic differences in BC cell lines according to their *BRCA1* genotype. The PCA score plot showed clear separations among the BC cell lines that were analysed. As shown in Fig. 1, we identified different clusters based on the metabolic signature of the cell lines according to their *BRCA1* genotype. The first principal component (PC1) accounted for the greatest variability in the data set (49.6%) and revealed a clear homogeneous metabolic cluster composed of

Breast cancer cell line	Phenotype	
	BRCA1_like	Sporadic_like
MCF7	NO (0.02664)	YES (0.97336)
MDA-MB-231	NO (0.01184)	YES (0.98816)
MDA-MB-436	NO (0.00125)	YES (0.99875)
MDA-MB-468	YES (0.97079)	NO (0.02921)
HCC70	YES (0.99405)	NO (0.00595)

Table 1. MLPA BRCAness phenotype of breast cancer cell lines analysed. The cut-off value to classify a cell line as BRCA1-like was set at 0.5. Below this value, the cell line was classified as sporadic-like.

the MDA-MB-436, MDA-MB-468 and HCC70 BC cell lines, which differed from that of the MDA-MB-231 and MCF7 cell lines. Notably, although the HCC70 BC is a non-mutated *BRCA1* BC cell line, it showed a metabolic profile that clustered with the BC cell lines that are carriers of pathogenic *BRCA1* mutations (Fig. 1).

Promoter methylation of the *BRCA1* gene. Considering that, at the metabolic level, the HCC70 cell line showed a phenotype similar to *BRCA1*-mutated BC cell lines, we examined whether its BRCA1-like metabolic phenotype was caused by *BRCA1* promoter methylation. We found that the HCC70 cell line was not hypermethylated in the *BRCA1* promoter region (Supplementary Table S1). None of the other BC cell lines that were analysed showed aberrant methylation of the *BRCA1* promoter region (Supplementary Table S1).

BRCAness phenotype in BC cell lines. A commercial MLPA assay was used to test the BRCA1-like genomic profile of BC cell lines. This profile represents the BRCAness and can be used as a marker of defects in the HRR pathway. The BRCAness phenotype is related to sporadic TNBC, which shares clinical and histological characteristics with germline *BRCA1*-mutated breast tumours (young age, high grade and negativity for the ER, PgR and HER2). Based on the clinicopathological features of the HCC70 cell line (high-grade TNBC from a 45-year-old patient, no *BRCA1* mutation) and according to *BRCA1* protein expression previously reported in the same cell lines²⁷, we hypothesized that the BRCA1-like metabolic profile of the HCC70 cell line can be explained by BRCAness. Our results show that the HCC70 BC cell line presented a BRCAness profile (Table 1). Similarly, we found that the mutated *BRCA1* cell line, MDA-MB-468, also showed a BRCAness profile (Table 1). Both cell lines were derived from a basal BC subtype and showed negativity for expression of the ER, PgR and HER2. The other BC cell lines that were analysed did not show a BRCAness phenotype (sporadic-like breast tumours) (Table 1). Notably, the MDA-MB-436 BC cell line showed a sporadic-like phenotype (Table 1). MDA-MB-436 is a TNBC cell line that is a carrier of a splice-site mutation located in intron 20 of the *BRCA1* gene²⁸. As described, *BRCA1* mutation prediction by BRCAness shows a sensitivity of only 83%^{29,30}. This MLPA BRCAness probe-mix is designed to detect amplifications and deletions of one or more sequences in selected genes and chromosomal regions that were previously reported to be altered in breast cancer and only heterozygous deletions of the recognition sequences gives a BRCAness profile^{29,30}. Specifically, the probes for the *BRCA1* gene are located in intron 19 and exon 2. One possible explanation of the non-BRCAness profile detected in the mutated MDA-MB-436 cell line is that the single nucleotide mutation is located outside the *BRCA1* region probe. In addition, MDA-MB-436 can be carrier of a heterozygous deletion outside of the region selected in the probe-mix so it can not be detected.

Identification of metabolites that define a BRCA1-like BC phenotype. According to the classification of maximum variability (based on PC1 from Fig. 1), we performed univariate statistical analysis considering MCF-7 and MDA-MB-231 as non-BRCA1-like cell lines and HCC70, MDA-MB-436 and MDA-MB-468 as BRCA1-like cell lines. From our non-targeted LC-MS metabolomic study, we identified by exact mass and MS/MS nine metabolites whose distribution was significantly different between the clusters: adenine, arginine-aspartate, folic acid, guanosine, methyladenosine, methylguanine, phenylacetyl-glycine, thiamine pyrophosphate and uridine (Table 2). All metabolites were significantly under-represented in BRCA1-like BC cell lines compared with *BRCA1* wild-type (wt) BC cell lines (Fig. 2).

On the other hand, when we analysed the secretome of the BC cell lines, we found that six of the nine metabolites identified in cell pellets were also secreted (Table 2). We found statistically significant differences in all of these secreted metabolites between the *BRCA1* mutated and non-mutated BC cell lines, except for the adenine metabolite (Table 2).

Metabolite validation in plasma samples from TN HBOC patients. The discriminatory power of the metabolic BRCA1-like phenotype signature was tested in 35 human plasma samples obtained from TN HBOC patients who were carriers and non-carriers of *BRCA1* mutations.

Of the metabolites identified in the secretome of BC cell lines, two metabolites were not detected in all the human plasma samples analysed (Table 3).

With the application of the Kolmogorov test, we found that the levels of adenine, N6-methyladenosine and 1-methylguanine detected in the plasma samples of patients who were carriers of *BRCA1* mutations were significantly lower than those in patients who were not carriers of *BRCA1* mutations (Fig. 3). Interestingly, N6-methyladenosine and 1-methylguanine are metabolites directly related to well-known BC events, such as methylation processes^{31–34}. The other secreted metabolites identified in BC cell lines did not show any statistically significant differences when we compared both groups of HBOC plasma samples analysed (Table 3).

Metabolite	m/z	RT (sec)	Cell Pellet		Secretome		Formula
			P. adj value	FC	P. adj value	FC	
Adenine	136.0612	263.7	3.4E-03	-2.61	1.2E-01	3.10	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄
Arginine-Aspartate	290.1439	65.1	2.9E-03	-3.71	ND	ND	C ₁₀ H ₁₉ N ₃ O ₅
Folic Acid	442.1441	295.5	8.8E-04	-17.4	3.6E-14	-3.6	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆
Guanosine	284.0804	243.3	2.4E-03	-2.28	ND	ND	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅
Methyladenosine	282.1178	261.1	8.4E-03	-5.52	8.4E-04	-3.6	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₄
Methylguanine	166.0712	222.5	1.7E-02	-1.68	1.5E-05	-3.7	C ₆ H ₇ N ₃ O
Phenylacetyl glycine	194.0801	348.6	3.2E-04	-5.09	8.8E-10	-2.3	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃
Thiamine pyrophosphate	425.0413	65.8	5.8E-03	-2.64	2.7E-16	-2.9	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ O ₇ P ₂ S
Uridine	243.0636	190.6	2.4E-03	-4.29	ND	ND	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆

Table 2. Differential significant metabolites identified in the cells and secretome of the breast cancer cell lines to discriminate BRCA1-like and non BRCA1-like breast cancer profile. m/z: mass to charge ratio; RT: retention time; FC: fold change expressed as log₂; ND: not detected.

Discussion

Metabolomics is a useful tool for the identification of biomarkers and metabolic disturbances that are present in cancer. Since cancer is a disease with metabolic alterations, there has been an increasing number of published studies related to BC and metabolomics^{20,35}. In this study, we presented the metabolomic based profile of BC cell lines for the characterization and identification of the breast cancer phenotype linked to the *BRCA1* genotype. For this purpose, we used several human BC cell lines characterized by the presence of pathogenic mutations in the *BRCA1* gene, and we compared them with BC cell lines without *BRCA* mutations. Then, we tested the discriminatory power of the identified metabolites in a sample cohort of plasma samples from patients who were or were not carriers of *BRCA1* mutations. We evaluated the contributions of these metabolites to the genetic diagnosis of HBOC syndrome.

Our results revealed phenotypic similarities based on the metabolic data that make it possible to distinguish between cell lines depending on the presence of alterations linked to *BRCA1*. We also provide evidence of common metabolic features that were identified despite the strong heterogeneity observed among the BC cell lines.

None of the BC cell lines with a *BRCA1* mutation showed *BRCA1* promoter methylation, supporting the hypothesis that genetic and epigenetic inactivation of *BRCA1* is mutually exclusive²⁹.

We herein provide the first description of the BRCAness phenotype of the HCC70 TNBC cell line and report that the BRCAness profile shares common metabolic features with *BRCA1*-mutated tumours. Consistent with previous studies stating that BRCAness phenotypes of TNBC were histologically and clinically similar to those of hereditary BC tumours from patients who were carriers of pathogenic *BRCA1* mutations, our results show a similar observation at metabolic level, evidencing that *BRCA1*-mutated cell lines and genomic BRCAness (and non-*BRCA1* mutated) HCC70 cell line are metabolically similar compared to non-*BRCA1* mutated and non-BRCAness BC cell lines^{29,30}.

There is an urgent need to search for and identify new clinical biomarkers of cancer. The ideal biomarker is one that can be detected easily and non-invasively and is capable of discriminating patient subgroups. Most of the biomarkers routinely used in the clinical setting are secreted and expressed in biological fluids such as blood. In this context, analysing the secretome from the conditioned medium of cultured tumour cells could be a way to discover new tumour-specific biomarkers^{25,26,36}. In this study, we identified alterations in the concentrations of nine metabolites in the metabolic profiles of cell pellets, six of which were also differentially regulated in the cells' secretomes. Thus, these metabolites may represent potential BC biomarkers linked to *BRCA1*. A quantitative validation of these secreted metabolites in human samples showed that the plasma levels of adenine, N6-methyladenosine and 1-methylguanine could distinguish TN HBOC patients who were carriers of pathogenic *BRCA1* mutations from TN HBOC patients who were non-carriers of *BRCA* mutations, supporting their putative role as *BRCA1*-like biomarkers in patients with HBOC syndrome and TNBC.

Adenine is a compound necessary for nucleotide synthesis and is considered as an indicator of abnormal cancer cell proliferation³⁷. A correlation between an increase of adenine and guanine and cancer cell metastasis due to imbalance of enzymatic activity of purine metabolism has been described³⁸. Moreover, a recent metabolomic profile of human breast cancer cell lines has identified adenine as a putative prognostic biomarker of breast cancer metastasis³⁹.

1-Methylguanine is a methylated-derived purine that was originally found to be elevated in urinary and serum samples of breast cancer patients, and it was suspected to alter DNA methylation processes⁴⁰. Recently, 1-methylguanine has been described as one of the N-methyl adducts occurring at the DNA, which are repaired by the adaptive response of AlkB enzyme in order to avoid adverse effect of these DNA lesions³¹.

N6-Methyladenosine is the most frequent methylated nucleoside on RNA in eukaryotes with epitranscriptomic regulation functions³²⁻³⁴. It has been described that 6-methyladenosine RNA editing is linked to breast cancer transformation, and it is suspected to be a DNA methylation marker in eukaryotes involved in transcription regulation^{41,42}.

It is well established that patients with BC present disturbances in gene methylation processes that can silence gene expression. Epigenetic events in conjunction with genetic alterations are important in BC development, and multiple studies have used *BRCA1* as an example^{43,44}. Hypermethylation of the *BRCA1* promoter region and

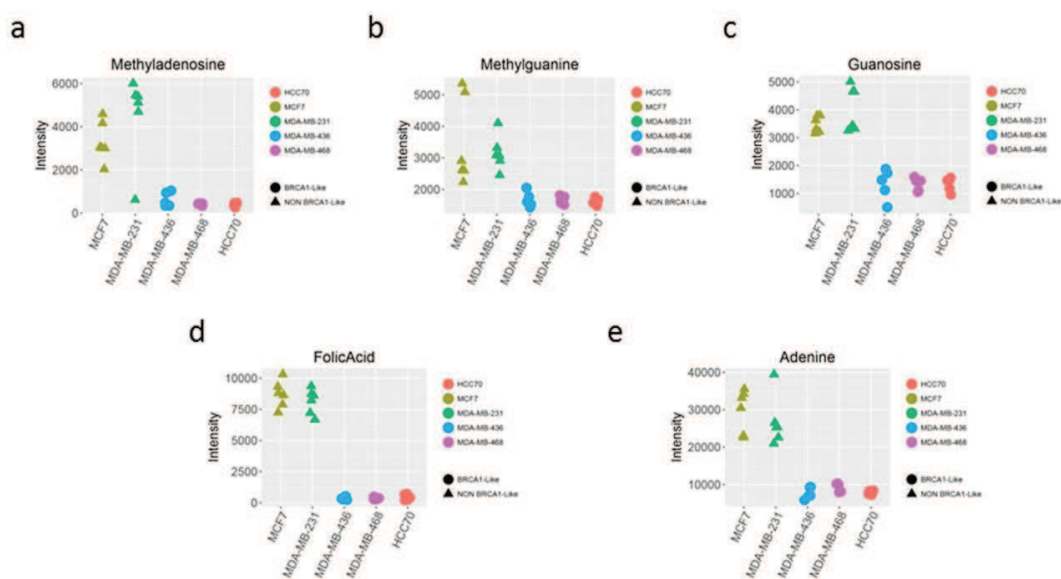


Figure 2. Absolute quantification of the expression levels of the identified metabolites that might be used to define a BRCA1-like breast cancer phenotype. All of these metabolites were down-regulated in cell lines that showed a BRCA1-like metabolic profile compared to the cell lines that showed a non-BRCA1-like phenotype.

Metabolite	TN HBOC BRCA1 mutated		TN HBOC BRCA1 wt		P. adj value
	Mean	SD	Mean	SD	
Adenine	0.32	0.19	0.56	0.42	0.033*
Arginine-Aspartate	ND	ND	ND	ND	ND
Folic Acid	0.04	0.05	0.02	0.02	0.41
Guanosine	0.51	0.21	0.58	0.78	0.10
1-Methyladenosine	34.18	7.81	35.35	9.24	0.76
N6-Methyladenosine	0.42	0.35	0.78	0.42	0.012*
1-Methylguanaine	0.56	0.29	0.76	0.33	0.033*
7-Methylguanaine	9.32	1.85	9.15	2.14	0.55
Phenylacetyl-glycine	1.60	2.55	2.47	2.64	0.18
Thiamine pyrophosphate	ND	ND	ND	ND	ND
Uridine	680.67	262.85	614.48	273.78	0.41

Table 3. Candidate metabolites analysed to discriminate BRCA1-like breast cancer profile in plasma samples of HBOC patients. TN: triple negative; HBOC: hereditary breast and ovarian cancer; wt: wild-type; SD: standard deviation; ND: not detected; * Statistically significant (p value < 0.05).

transcriptional repression of BRCA1 has been described in sporadic breast cancer^{45–47}. These tumours are histologically and molecularly similar to BRCA1-associated breast tumours^{48–50}. Recently, Stefansson *et al.* described the existence of different methylation signatures for BC tumour subtypes. These researchers showed a gene body hypomethylation signature that was exclusively associated with the basal-like subtype, a high-grade subgroup of tumours characterized by negativity for the ER, PgR and HER2 expression and related to a poor prognosis⁴³. Hypomethylation of gene bodies has been described as a characteristic of repressed genes *in vitro*⁵¹. In this context, an hypermethylation analysis of *BRCA1* promoter regions was negative for all of the BC cell lines examined in the present study. In addition, we found under-representation of methylated nucleotides in BC cell lines derived from tumours that were classified as TNBC, in addition to altered BRCA1 functionality. These findings were confirmed in plasma samples of TNBC from HBOC patients who were carriers and non-carriers of *BRCA1* mutations. Taken together, our results suggest that methylation events in DNA and/or RNA could be regulated by BRCA1.

Despite the high heterogeneity of BC as a disease, especially among cases of TNBC, we found a common BRCA1-like signature in BC cell lines according to the presence of defects in *BRCA1* functionality (i.e., caused by a *BRCA1* mutation or BRCAness phenotype). Validation of this metabolic BRCA1-like signature in TNBC is

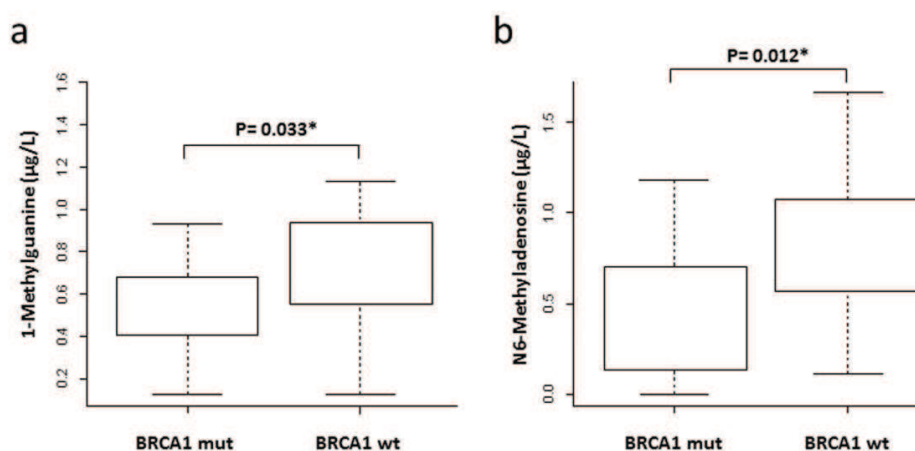


Figure 3. A boxplot representation of the absolute concentrations of N6-methyladenosine and 1-methylguanine metabolites in human plasma samples. Both are methylated nucleotides that were differentially expressed between TNBC samples according to their BRCA1 genotype.

necessary to confirm whether it could facilitate the diagnosis and/or treatment of patients. Specifically, validation of this BRCA1-like metabolic profile in TNBC could aid in the prediction of resistance to taxanes and the sensitivity to platinum and PARP inhibitor agents. PARP1 is a critical enzyme for the base excision repair pathway, and its inhibition by RNA interference or chemical inhibitors leads to severe, highly selective toxicity in BRCA1- and BRCA2-defective cells. This toxicity results in chromosomal instability, cell cycle arrest and subsequent apoptosis, most likely due to the persistence of DNA lesions that are normally repaired by homologous recombination. Therefore, sensitivity to PARP inhibition depends on HRR deficiency^{52–54}.

Further studies in a larger cohort of plasma patients and tumour specimens are needed to validate the present results. The implementation of these biomarkers may refine breast cancer diagnosis and perhaps enable personalized treatments.

Methods

BC cell lines. The BC cell lines analysed in the study were MCF-7, HCC70, MDA-MB-231, MDA-MB-436 and MDA-MB-468. The clinicopathological characteristics of these human BC cell lines are summarized in Supplementary Table S2. Briefly, all cell lines, except for MCF-7, are negative for the expression of hormone receptors, and are classified as basal-like BC. MCF-7, HCC70 and MDA-MB-231 cell lines are considered wild-type cells for BRCA, while the MDA-MB-436 and MDA-MB-468 cell lines are carriers of BRCA1 pathogenic mutations¹⁵.

BC patients. The study included 35 human plasma samples from TNBC patients who underwent BRCA genetic testing at the Genetic Counseling Unit of the Institute of Oncology of South Catalonia (IOCS). Of these, 23 TNBC patients were carriers of a BRCA1 germline mutation and 12 patients were non-carriers of BRCA1 or BRCA2 germline mutations. Plasma was extracted by centrifuging whole blood at 3000 rpm for 10 min at room temperature. All extracted plasma samples were aliquoted and stored at -80°C . We only used plasma samples that had not been previously thawed. Fresh tumour samples from patients were not available because the target of the BRCA genetic testing in hereditary breast cancer susceptibility is blood-DNA.

The study was approved by the Ethics Committee of Clinical Research of Sant Joan University Hospital, written informed consent was obtained from all participants and all experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Cell cultures. MCF-7, HCC70, MDA-MB-231, MDA-MB-436 and MDA-MB-468 BC cells were obtained from the American Type Culture Collection (LGC Standards, Middlesex, UK) and were authenticated by Cancer Research UK (London, UK). MCF-7 and MDA-MB-468 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), 4 mM glutamine and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). HCC70 cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco, Madrid, Spain) supplemented with 10% foetal calf serum. MDA-MB-231 cells were grown in phenol red-free DMEM (Invitrogen, Barcelona, Spain) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), 100 Units/mL penicillin, 100 Units/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine. MDA-MB-436 cells were grown in Leibovitz's L-15 medium (Gibco, Madrid, Spain) supplemented with 10% horse serum (Invitrogen, Barcelona, Spain). All cell lines were grown in an atmosphere of 10% CO₂ at 37°C except MDA-MB-436 cells, which were grown without CO₂ at 37°C.

DNA isolation. Total DNA from human BC cell lines was extracted using a DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. DNA extraction was performed in duplicate for each human breast cell line culture.

Untargeted LC-MS and MS/MS analysis of breast cancer cell lines. A volume of 220 μL of methanol, followed by 440 μL of dichloromethane, was added to each cell pellet. Samples were mixed vigorously for 30 sec and ultrasonicated on ice for 1 min. Then, 140 μL of Milli-Q water was added. Samples were mixed vigorously for 30 sec and were ultrasonicated on ice for 1 min. The samples were then incubated for 30 min on ice followed by centrifugation at 15,000 rpm (4 °C) for 15 min, and the aqueous phase was transferred to an LC-MS vial.

The untargeted metabolomics analysis on cell lines was performed using LC/ESI-QTOF. Samples were injected into an UHPLC system (1290 Agilent) coupled to a quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (6550 Agilent Technologies) operated in positive (ESI+) or negative (ESI-) electrospray ionization mode. Metabolites were separated using C18-RP (ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm , Waters) for ESI+ and C18-RP (ACQUITY UPLC BEH 1.7 μm) for ESI-. When the instrument was operated in positive ionization mode, the solvent system was A = 0.1% formic acid in water and B = 0.1% formic acid in acetonitrile. When the instrument was operated in negative ionization mode, the solvent system was A = 1 mM NH_4F in water and B = acetonitrile⁵⁵. The linear gradient elution started at 100% A (time 0–2 min) and finished at 100% B (10 min). The injection volume was 1 μL for cell pellets. The ESI conditions were as follows: gas temperature, 150 °C; drying gas, 11 L min^{-1} ; nebulizer, 30 psig; and fragmentor, 120 V. The instrument was set to acquire over the m/z range of 100–1200, with an acquisition rate of 3 spectra/sec. Samples were randomized to reduce systematic error associated with instrumental drift. MS/MS was performed in targeted mode, and the instrument was set to acquire over the m/z range of 45–1000, with an iso width (the width half-maximum of the quadrupole mass bandpass used during MS/MS precursor isolation) of 1.3 m/z . Samples were measured in triplicate at collision energies of 10, 20 and 40 V. All metabolites were identified in accordance with Level 1 or 2 of the Metabolomics Standards Initiative⁵⁶, namely, by comparison with authentic chemical standards analysed in our laboratory (methylated nucleosides) or public/commercial spectral libraries, respectively. Quality control samples (QC) consisting of pooled samples of all samples were used. QC samples were injected before the first study samples and were then analysed periodically while analysing the study samples.

BRCA1 promoter methylation. Hypermethylation of the BRCA1 promoter region was assessed using the commercial SALSA MS-MLPA probemix, ME001-C2 Tumour Suppressor-1, SALSA MS-MLPA probemix ME002-C1 Tumour Suppressor-2, and a new developed SALSA MS-MLPA probemix ME053-X1 BRCA1-BRCA2 according to the manufacturer's protocol (MRC-Holland, The Netherlands). DNA fragments were analysed using an ABI 3500 Sequencer (Life Technologies, Spain). The results of multiplex-ligation-dependent probe amplification (MLPA) were normalized and analysed using the Coffalyser program as recommended (www.mlpa.com). Each BC cell line was analysed twice.

BRCAness phenotyping. BRCAness profiling was performed using the commercial multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) probemix P376-B2 BRCA1ness (MRC-Holland, The Netherlands). The MLPA results were normalized and analysed using the combination of the Coffalyser program and the Prediction Analysis for Microarrays (PAM) algorithm in R (www.r-project.com) as suggested by the supplier (www.mlpa.com). The cut-off value to classify a cell line as BRCAness was set at 0.5. Before we performed the cell line analysis, we performed the recommended training data set analysis. Each BC cell line was analysed twice.

Targeted LC-MS/MS analysis of plasma samples from TN HBOC patients. Quantitative determination and validation of the identified cell lines' metabolites were performed in 35 human plasma samples from TN HBOC patients by ultra-high-resolution liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (UHPL-QqQ/MS).

For the chromatographic analysis, an ACQUITY UPLC HSS T3, 1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm chromatographic column was used, which was maintained at 23 °C. Water was used with 0.1% HCOOH as solvent A and acetonitrile was used as solvent B. The column flow was 0.40 mL/min and the mobile phase gradient conditions were as follows: 0–100% B (0–10 min), 100% B isocratic (10–13 min), 100–0% B (13–15 min). A 3 min post-run was applied. The injection volume was 5 μL . The ionization was carried out in an electrospray (ESI) source with positive polarity and applying a temperature and drying gas flow (N_2) of 290 °C and 18 L/min respectively, a pressure of the nebulizer gas (N_2) of 20 psi, and a temperature and sheath gas flow (N_2) of 350° and 10 L/min, respectively. The voltage of the fragmentation was 380 V, the capillary was 3500 V and the nozzle voltage was 750 V. The detection was performed with a triple quadrupole detector (QqQ) by means of acquisition in Multiple Reaction Monitoring mode (MRM), applying a cell acceleration voltage of 5 V. To validate the quantitative method, we evaluated the following parameters: calibration lines, linearity, limits of detection and quantification (LoD and LoQ, respectively), accuracy and precision by analysing standard solutions and samples with standard solutions added to generate different concentrations.

Data analysis and statistical methods. Untargeted LC-MS (ESI+ and ESI- mode) data of BC cell lines were processed using the XCMS software (version 1.38.0) to detect and align features⁵⁷. A feature was defined as a molecular entity with a unique m/z and a specific retention time. The XCMS analysis of these data provided a matrix containing the retention time, m/z value, and an integrated peak area of greater than 11,000 features after the analytical variability had been corrected⁵⁸. Univariate and multivariate statistical analyses were performed using R Studio (version 1.3). For the univariate statistical analysis, a t-test was performed, and the p value was corrected using a false discovery rate. Differentially regulated metabolites (fold-change $>$ 1.5) that passed our

statistical criteria (adjusted p-value < 0.05) were characterized by LC-qTOF MS/MS and identified using the METLIN database or authentic chemical standards acquired in our laboratory with the same analytical method.

Statistical analyses of human plasma were performed using R (www.r-project.org). Continuous data were analysed with the Kolmogorov test (mean \pm standard deviation). Statistical tests were two-sided and p-values < 0.05 were considered statistically significant.

References

1. Kobayashi, H. *et al.* Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes. *Oncol Rep* **30**, 1019–29 (2013).
2. Farmer, H. *et al.* Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917–21 (2005).
3. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–52 (2006).
4. Podo, F. *et al.* For the FEMME Consortium. Triple-negative breast cancer: Present challenges and new perspectives. *Molecular Oncology* **4**, 209–29 (2010).
5. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* **121**, 2750–67 (2011).
6. Collignon, J. *et al.* Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer: Targets and Therapy* **6**, 93–107 (2016).
7. Turner, N. C. *et al.* BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* **26**, 2126–32 (2007).
8. Pang, D. *et al.* Methylation profiles of the BRCA1 promoter in hereditary and sporadic breast cancer among Han chinese. *Med Oncol* **29**, 1561–68 (2012).
9. Rice, J. C. *et al.* Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* **21**, 1761–65 (2000).
10. Esteller, M. *et al.* Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* **92**, 564–69 (2000).
11. Lips, E. H. *et al.* Quantitative copy number analysis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1-associated breast cancer regions identifies BRCAness. *Breast Cancer Res* **13**, R107, <https://doi.org/10.1186/bcr3049> (2011).
12. Lord, C. J. & Ashworth, A. BRCAness revisited. *Nature Reviews* doi:10.1038/nrc.2015.21 (2016).
13. Patti, G. J., Yanes, O. & Siuzdak, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews* **13**, 263–68 (2012).
14. Slebe, F. *et al.* FoxA and LIPG endothelial lipase control the uptake of extracellular lipids for breast cancer growth. *Nat Commun* **7**, 11199, <https://doi.org/10.1038/ncomms11199> (2016).
15. Shen, J. *et al.* Plasma metabolomic profiles in breast cancer patients and healthy controls: by race and tumor receptor subtypes. *Transl Oncol* **6**, 757–65 (2013).
16. Borgan, E. *et al.* Merging transcriptomics and metabolomics advances in breast cancer profiling. *BMC Cancer* **10**, 628–42 (2010).
17. Armitage, E. G. & Southam, A. D. Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics. *Metabolomics* **12**, 146 (2016).
18. Kanaan, Y. M. *et al.* Metabolic profile of triple-negative breast cancer in african-american women reveals potential biomarkers of aggressive disease. *Cancer Genomics and Proteomics* **11**, 279–94 (2014).
19. Asiago, V. M. *et al.* Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer Res* **70**, 8309–18 (2010).
20. Beger, R. D. A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites* **3**, 552–74 (2013).
21. Claudino, W. M. *et al.* Metabolomics in cancer: a bench-to-bedside intersection. *Crit Rev Oncol Hematol* **84**, 1–7 (2012).
22. Budczies, J. *et al.* Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissue—a GC-TOMFS based metabolomics study. *BMC Genomics* **13**, 334 (2012).
23. Sitter, B. *et al.* Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy. *NMR Biomed* **23**, 424–431 (2010).
24. Jain, M. *et al.* Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science* **336**, 1040–1044 (2012).
25. Mustafa, S. *et al.* Comparison of the tumor cell secretome and patient sera for an accurate serum-based diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* **8**, 11963–11976 (2017).
26. Xue, H., Lu, B. & Lai, M. The cancer secretome: a reservoir of biomarkers. *Journal of Translational Medicine* **6**, 52 (2008).
27. Gong, C. *et al.* BRCA1 positively regulates FOXO3 expression by restricting FOXO3 gene methylation and epigenetic silencing through targeting EZH2 in breast cancer. *Oncogenesis* **5**, e214, <https://doi.org/10.1038/oncsis.2016.23> (2016).
28. Elstrodt, F. *et al.* BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res* **66**, 41–5 (2006).
29. Lips, E. H. *et al.* Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *BJC* **108**, 2172–77, <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.144> (2013).
30. Gross, E. *et al.* Identification of BRCA1-like triple-negative breast cancers by quantitative multiplex-ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis of BRCA1-associated chromosomal regions: a validation study. *BMC Cancer* **16**, 811–21 (2016).
31. Chen, F. *et al.* The adaptive response enzyme AlkB preferentially repairs 1-methylguanine and 3-methylthymine adducts in double-stranded DNA. *Chem Res Toxicol* **29**, 687–693 (2016).
32. Niu, Y. *et al.* N⁶-methyl-adenosine (m⁶A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **11**, 8–17 (2013).
33. Yue, Y. *et al.* RNA N⁶-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes & Development* **29**, 1343–1355 (2017).
34. Jaffrey, S. R. & Kharas, M. G. Emerging links between m⁶A and misregulated mRNA methylation in cancer. *Genome Medicine* **9**, 2 (2017).
35. Claudino, W. M. *et al.* Metabolomics in cancer: a bench-to-bedside intersection. *Clinical Reviews in Oncology Hematology* **84**, 1–7 (2012).
36. Karagiannis, G. S., Pavlou, M. P. & Diamandis, E. P. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Molecular Oncology* **4**, 496–510 (2010).
37. Song, H. *et al.* Serum metabolic profiling of human gastric cancer based on gas chromatography/mass spectrometry. *Braz J Med Biol Res* **45**, 78–85 (2012).
38. Weber, G. Enzymes of purine metabolism in cancer. *Clin Biochem* **16**, 57–63 (1983).
39. Kim, H. Y. *et al.* Comparative metabolic and lipidomic profiling of human breast cancer cells with different metastatic potentials. *Oncotarget* **7**, 67111–67127 (2016).
40. Kerr, S. J. Induction of adipocyte formation in 10T1/2 cells by 1-methylguanine and 7-methylguanine. *Tumour Biol* **6**, 115–121 (1985).
41. Luo, G. Z., Blanco, M. A., Greer, E. L., He, C. & Shi, Y. DNA N⁶-methyladenine: a new epigenetic mark in eukaryotes? *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 705–710 (2015).
42. Wang, S. *et al.* Roles of RNA methylation by means of N⁶-methyladenosine (m⁶A) in human cancers. *Cancer Lett.* **408**, 112–120 (2017).
43. Stefansson, O. A. & Esteller, M. Epigenetics modifications in breast cancer and their role in personalized medicine. *Am J Pathol* **183**, 1052–63, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.033>, Review (2013).

44. Daniels, S. L. *et al.* Levels of DNA methylation vary at CpG sites across the *BRCA1* promoter, and differ according to triple negative and “BRCA-like” status, in both blood and tumour DNA. *PLoS One* **11**, e0160174, doi:10.371/journal.pone.0160174 (2016).
45. Esteller, M. *et al.* Promoter hypermethylation and *BRCA1* inactivation in sporadic breast and ovarian tumours. *J Natl Cancer Inst* **92**, 564–569 (2000).
46. Bosviel, R. *et al.* *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls. *Cancer Epidemiology* **36**, e177–e182 (2012).
47. Iwamoto, T., Yamamoto, N., Taguchi, T., Tamaki, Y. & Noguchi, S. *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood cell is associated with increased risk of breast cancer with *BRCA1* promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat* **129**, 69–77 (2011).
48. Alvarez, S. *et al.* A predictor based on the somatic genomic changes of the *BRCA1/BRCA2* breast cancer tumours identifies the non-*BRCA1/BRCA2* tumours with *BRCA1* promoter hypermethylation. *Clin Cancer Res* **11**, 1146–1153 (2005).
49. Gupta, S. *et al.* Methylation of the *BRCA1* promoter in peripheral blood DNA is associated with triple-negative and medullary breast cancer. *Epidemiology* **148**, 615–622 (2014).
50. Pang, D. *et al.* Methylation profiles of the *BRCA1* promoter in hereditary and sporadic breast cancer among Han Chinese. *Med. Oncol* **29**, 1561–1568 (2012).
51. Hon, G. C. *et al.* Global DNA hypomethylation coupled to repressive chromatin domain formation and gene silencing in breast cancer. *Genome Res* **22**, 246–58 (2012).
52. Ito, S. *et al.* PARP inhibitors in clinical use induce genomic instability in normal human cells. *PLoS One* **11**, e0159341, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159341> (2016).
53. Lim, D. & Ngeow, J. Evaluation of the methods to identify patients who may benefit from PARP inhibitor use. *Endocrinology J*, <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0116> (2016).
54. Audeh, M. W. Novel treatment strategies in triple-negative breast cancer: specific role of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibition. *Pharmacogenomics Pers Med* **7**, 307–16 (2014).
55. Yanes, O., Tautenhahn, R., Patti, G. J. & Siuzdak, G. Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Anal Chem* **83**, 2152–61 (2011).
56. Sumner, L. W. *et al.* CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **3**, 211–21 (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group.
57. Smith, C. A. *et al.* XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using non-linear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* **78**, 779–87 (2006).
58. Vinaixa, M. *et al.* A guideline to univariate statistical analysis for LC/MS-based untargeted metabolomics-derived data. *Metabolites* **2**, 775–95 (2012).

Acknowledgements

The metabolomic and genomic analyses were performed using the equipment available in the Centre for Omic Sciences (COS) of the Universitat Rovira i Virgili.

Author Contributions

B.R., M.R.B. and J.G. conceived the study. B.R., M.R.B., O.Y., X.C., E.L., J.B. and J.G. contributed to the study design. A.G. and S.G.E. carried out cell culture experiments. B.R. and M.R.B. carried out methylation and BRCAness experiments and the data analysis. S.S. carried out all L.C.-M.S. and M.S./M.S. analyses and statistical analyses. B.R., M.R.B., S.S. and J.G. drafted the manuscript. O.Y., X.C., J.B., E.L. revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17897-8>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Material suplementari

Supplementary Table 1. BRCA1 and BRCA2 promoter hypermethylation percentages of the breast cancer cell lines analysed by methylation MS-MLPA

Breast cancer cell line	ME001-C2 assay		ME002-C1 assay		ME053-X1 assay							
	BRCA1	BRCA2	BRCA1	BRCA2	BRCA1.1	BRCA1.2	BRCA1.3	BRCA2.1	BRCA2.2	BRCA2.3	BRCA2.4	
MCF7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MDA-MB-231	2%	0%	3%	0%	0%	2%	2%	4%	3%	0%	0%	0%
MDA-MB-436	2%	0%	0%	0%	1%	2%	1%	6%	2%	0%	0%	0%
MDA-MB-468	3%	0%	0%	0%	0%	2%	0%	4%	0%	0%	0%	0%
HCC70	1%	0%	0%	6%	0%	3%	0%	4%	4%	1%	0%	0%

ND: No DNA available

Supplementary Table 2. Clinicopathological characteristics of the human breast cancer cell lines analyzed

Cell Line Name	BRCA1 Genotype	TP53 Status	Immunoprofile	Subtype	Tumour type
MCF-7	WT	WT	ER+, PgR+/-, HER2-	Luminal	Metastatic adenocarcinoma
HCC70	WT	c.743G>A	ER-, PgR-, HER2-	Basal	Ductal carcinoma
MDA-MB-231	WT	c.839G>A	ER-, PgR-, HER2-	Basal	Metastatic adenocarcinoma
MDA-MB-436	c.5396+1G>A	c.? *	ER-, PgR-, HER2-	Basal	Adenocarcinoma
MDA-MB-468	Deletion exon 12	c.818G>A	ER-, PgR-, HER2-	Basal	Metastatic Adenocarcinoma

WT, wild-type; ER, estrogen receptor; PgR, progesterone receptor, HER2, human epidermal growth factor receptor 2; *Breast Cancer Cell line with controversial TP53 status (<http://p53.free.fr/index.html>); <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)

IV. DISCUSSIÓ

Discussió

Segons les dades de l'Associació Internacional de Registres del Càncer, IARC Global Cancer Observatory, de la base de dades GLOBOCAN (<http://gco.iarc.fr/>), s'estima que l'any 2018 hi va haver 18.1 milions de nous casos de càncer en el món, dels quals un 11.6% (2.1 milions) van ser càncer de mama i un 1.6% (295 mil) van ser càncer d'ovari. S'estima que l'any 2019, a Espanya hi van haver 32.536 nous diagnòstics de càncer de mama (el segon més freqüent a l'estat espanyol) i 3.548 nous casos de càncer d'ovari (*REDECAN. Red Española de Registros de Cáncer. Estimaciones de la incidencia y supervivencia del cáncer en España y situación en Europa, 2017*). Els individus amb un o més familiars afectes de la malaltia, veuen

incrementat el risc de patir-la al llarg de la seva vida. Aquest risc encara es veu més incrementat en aquells individus portadors de mutacions germinals en els gens associats a la síndrome de CMOH, tal i com es va descriure en un estudi retrospectiu l'any 2017 (Kuchenbaecker et al., 2017). El risc acumulat de càncer als 70 anys en portadors de mutació en *BRCA1* és del 65% i del 45% en portadors de mutació en *BRCA2*. El risc acumulat de càncer d'ovari als 70 anys és del 39% per portadors de mutació en *BRCA1* i del 11% en portadors de mutació en *BRCA2*, molt superior al 2% esperable de la població general (A. Antoniou et al., 2003). A l'estat espanyol, el risc acumulat als 70 anys en càncer de mama era del 52% per *BRCA1* i del 47% per *BRCA2*. Pel càncer d'ovari, el risc estimat era del 22% per *BRCA1* i del 18% per *BRCA2* (Milne et al., 2008). En l'àmbit de l'assessorament genètic, conèixer l'estat mutacional d'un individu s'utilitza per aplicar estratègies de detecció precoç o de reducció de risc, la qual cosa permet un augment en la supervivència en aquestes patologies. A més a més, també és útil per a predir respostes a dianes moleculars. Recentment s'ha observat que els pacients amb mutació en els gens *BRCA1* i *BRCA2*, poden ser candidats a tractaments específics dirigits amb inhibidors de PARP (poly-ADP-ribose-polimerasa) com per exemple l'Olaparib i el Niraparib (Mirza et al., 2016; M. Robson et al., 2017).

En aquesta tesi doctoral, s'ha intentat reduir els resultats no informatius retrospectius de la cohort en estudi i trobar estratègies per a poder dur-ho a terme, així com estudiar possibles mecanismes que puguin estar involucrats en aquesta síndrome. Això s'ha realitzat mitjançant quatre estudis que han tingut per objectiu: 1) classificar variants de significat biològic desconegut; 2) verificar la fiabilitat de la predicció de les eines *in silico*; 3) trobar altres mecanismes i gens heretables per a la síndrome de CMOH i 4) trobar biomarcadors associats a la presència de mutació en el gen *BRCA1* mitjançant la metabolòmica.

In silico, *in vitro* and cas-control analyses as an effective combination for analyzing *BRCA1* and *BRCA2* unclassified variants in a population-based sample.

El primer article d'aquesta Tesi Doctoral, confirma que els estudis cas-control així com la combinació de les eines *in silico* i l'estudi de l'ARNm, permeten classificar algunes VUS dels gens *BRCA1* i *BRCA2* identificades en famílies de la nostra població. Es va poder comprovar que entre la predicció de les eines *in silico* utilitzades i els resultats de l'estudi *in vitro* de la transcripció de l'ARNm, hi havia una concordança del 100%. Un altre objectiu en aquest article era aclarir si la presència recurrent d'algunes VUS en la nostra cohort podia ser degut a que fossin variants característiques de la nostra població, i per tant podien ser considerades polimorfismes. Aquest estudi cas-control va permetre classificar 3 variants com a polimorfismes ja que estaven presents en més de l'1% en la població control.

Des del punt de vista de la prevenció i de l'assessorament genètic és molt important determinar la patogenicitat de les VUS. S'han descrit diferents abordatges per a la seva classificació. En el cas dels gens *BRCA1* i *BRCA2*, el principal és un model probabilístic multifactorial basat en la combinació de dades de conservació dels aminoàcids i amb probabilitats de causalitat de la malaltia (Lindor et al., 2012). Aquests models són molt útils ja que tenen en compte dades com la distribució del càncer en la família, la presència en *trans* de mutacions patogèniques, la història personal i familiar de càncer i la histopatologia dels tumors de mama associats. Amb totes aquestes dades, s'obté una probabilitat que permet considerar la variant com a patogènica o no, segons un sistema de classificació en 5 categories (Eccles et al., 2015). Aquest càlcul de probabilitat també té en compte la prevalença d'aquesta variant en bases de dades

poblacionals. S'ha establert que aquelles variants amb una freqüència reportada superior a l'1% en una cohort gran no endogàmica de referència, es consideren polimorfismes, i que per tant la probabilitat de què siguin patogèniques és molt baixa ja que es considera que variants d'alt risc no són comunes en la població general. Així mateix, l'existència d'una alteració en el procés d'empalmament, que dóna lloc a una proteïna truncada, és un dels criteris utilitzat en tots els mètodes de classificació coneguts (Richards et al., 2015; Spearman et al., 2008). Tot i això molts dels paràmetres necessaris inclosos en els mètodes de classificació no sempre estan a l'abast dels laboratoris, la qual cosa fa que contínuament es busquin sistemes alternatius per a la classificació de les VUS.

Les eines *in silico* de predicció d'alteració de l'empalmament s'utilitzen per a preveure si un canvi en aquest procés generarà un transcrit diferent a l'esperat (Ernst et al. 2018, Colombo et al. 2013). Tot i això, les guies recomanen comprovar aquesta predicció mitjançant l'anàlisi de l'ARNm *in vitro*. Això no sempre es pot dur a terme, ja sigui per la incapacitat d'obtenir l'ARNm del pacient o per la inexistència de les infraestructures i eines necessàries en el laboratori per estudiar-lo (Whiley et al., 2014). Per tant, és molt necessari comprovar si les prediccions que ens donen les eines bioinformàtiques que actualment s'utilitzen (*Splice site finder* - SSF, *MaxEntScan* - MES, *GeneSplicer* - GS, *NNSplice*, *Human Splicing Finder* - HSF, *Exonic splicing enhancer finder* -ESE-Finder, RESCUE-ESE) són totalment fiables i que no sigui imprescindible l'assaig *in vitro* de l'ARNm. A més de la seva anàlisi, és necessari fer la quantificació de l'ARN obtingut de la transcripció dels gens (Whiley et al., 2014), la qual cosa no es va realitzar en aquest treball. L'objectiu és comprovar si el transcrit no mutat equilibra l'existència de transcrit mutat (Romero et al., 2015). Es realitza mitjançant una tècnica semiquantitativa, que encara no s'ha implementat en la rutina de la pràctica assistencial. Aquesta eina és imprescindible en la caracterització de les alteracions en el procés

d'empalmament. Mitjançant la quantificació dels transcrits resultants, s'ha observat que variants que eren sospitoses de ser patogèniques mantenen parcialment l'activitat gènica, és a dir que l'al·lel mutat esdevé hipomorf (Kraus et al., 2017). És per això que cal trobar eines bioinformàtiques que ens permetin arribar a les mateixes conclusions que l'estudi *in vivo* o *in vitro*.

En el cas de les variants identificades reiteradament en una cohort, però que estan considerades com a VUS, cal tenir altres consideracions. És important estimar la possibilitat de que sigui un polimorfisme propi de la regió geogràfica tot i que no consti com a tal en les bases de dades internacionals. Per poder descartar-ho és important esbrinar si el mostreig de les bases de dades poblacionals internacionals representen fidelment una població homogènia i si estan ben categoritzats els diferents subgrups que poden existir.

Cal tenir en compte que la identificació de VUS continuarà augmentant a mida que s'estudiïn més gens en una determinada patologia. Per tant és imprescindible una millora en les estratègies per a l'estudi i classificació de les variants, per a què siguin aplicables en la rutina dels laboratoris i no oblidar les tecnologies clàssiques que sempre serviran per a fer una comprovació ortogonal dels resultats obtinguts (Oulas, Minadakis, Zachariou, & Spyrou, 2019; Li et al., 2019; Tavgigian et al., 2018; de la Hoya et al., 2016; Fortuno et al., 2018; Cline et al., 2018). Precisament per aquestes dificultats en les classificacions l'*American College of Medical Genetics* va establir uns criteris per a la classificació de les variants que, avui en dia, són els criteris més utilitzats (Amendola et al., 2016; Richards et al., 2015).

Amb tot això, s'ha pogut observar que la combinació de les tres eines utilitzades en aquest estudi és útil per a la classificació de variants de significat incert, tant perquè les eines *in silico* i *in vitro* concorden en els resultats com perquè l'estudi cas control ha permès classificar variants considerades fins ara com a VUS.

Germline promoter hypermethylation in *BRCA1* and *BRCA2* genes is not present in hereditary breast cancer patients.

Amb els resultats obtinguts de l'article que es discuteix a continuació, es pot confirmar que la hipermetilació del promotor dels gens *BRCA1* i *BRCA2* no és una de les causes d'inactivació en la línia germinal que predisposa a la síndrome de CMOH. Dels 99 casos analitzats només un d'ells presentava una discreta hipermetilació que, degut al nivell d'aquesta, no es pot concloure que sigui un possible esdeveniment germinal.

La hipermetilació del promotor d'un gen és un sistema d'inactivació gènica. Des de l'any 2001 fins l'any 2019 s'han publicat al voltant de 130 articles en els quals s'estudia la hipermetilació del promotor dels gens *BRCA1* i *BRCA2*. S'ha estudiat principalment en teixit tumoral, per a poder considerar-ho com a segon esdeveniment en portadors de mutacions germinals, com s'estableix en la hipòtesi "Two-Hits" de Knudson, però també s'ha buscat una possible associació entre la metilació d'aquests gens en sang i el risc de càncer de mama. En aquest estudi es pretenia establir la possibilitat de què la hipermetilació del promotor fos un esdeveniment heretable que produís una agregació familiar de càncer.

Mitjançant l'anàlisi d'ADN obtingut a partir de sang perifèrica, no es van trobar evidències d'hipermetilació en els pacients seleccionats. Altres estudis presentaven una associació entre aquests dos esdeveniments, com per exemple en un estudi australià que incloïa 255 casos de càncer de mama i un estudi japonès que incloïa 200 casos de càncer de mama (Flanagan et al., 2009; Iwamoto et al., 2011). No obstant altres investigacions no confirmen aquests resultats (Bosviel et al., 2012; Cho et al., 2015; Kontorovich et al., 2009; Loveday et al., 2011; Wojdacz

et al., 2011). Chen *et al.* van intentar identificar l'existència d'una hipermetilació germinal en el gen *BRCA1* en 43 pacients no portadores de mutacions en els gens *BRCA* i van determinar que aquesta no era l'explicació del fenotip de CMOH en els pacients seleccionats (Y. Chen et al., 2006). Per altra banda, un estudi que incloïa 7 pacients, analitzaven paral·lelament l'ADN germinal, a partir de limfòcits i ADN somàtic obtingut de tumor, en el qual s'observava en un pacient una lleugera metilació en l'ADN germinal (Snell et al., 2008). En el present estudi també es va observar una lleugera hipermetilació en un pacient, però tot i que la conclusió de Snell *et al.* era que aquesta hipermetilació era la responsable del comportament *BRCA-like* del càncer de pacient, és imprescindible augmentar el nombre de pacients en els estudis per a poder determinar si aquesta extrapolació és correcta. Altres estudis posteriors, mostraven l'existència de metilació en alguns casos (sempre inferiors al 14%), que no es corresponia a una metilació monoal·lèlica. També descriuen unes lleugeres diferències en els nivells de metilació entre el càncer esporàdic i el càncer hereditari, sempre descrivint una menor metilació en el cas del càncer hereditari (Gupta et al., 2014; Pang et al., 2012). Degut a això, en la majoria dels estudis decidien fer una anàlisi qualitativa de la metilació i no quantitativa. Curiosament, la majoria d'aquests estudis estaven basats en una tecnologia diferent a la utilitzada en el nostre estudi, principalment la MS-HRM, seqüenciació automàtica i piroseqüenciació (Gupta et al., 2014; Pang et al., 2012; Wojdacz et al., 2011). Cal tenir en compte també que en la regió promotora dels gens estudiats hi ha més de 30 illes CpG i que per al nostre estudi es va utilitzar un assaig que només n'incloïa 3 en el cas de *BRCA1* i 4 en el cas de *BRCA2* i que no coincidia amb les illes o les regions seleccionades pels altres autors. Com Vos *et al.* apuntaven en els seus estudis, probablement caldria utilitzar una estratègia que inclogués totes les illes CpG per a poder tenir una perspectiva més real de les modificacions que poguessin patir aquestes regions (Vos et al., 2017), tal i com es descriu en un meta-anàlisi on es comparava 40 estudis d'hipermetilació i on sí que

es podien observar diferències en la hipermetilació germinal de pacients en comparació del controls sans (L. Zhang & Long, 2015b).

Tot i que s'estima que hi pugui haver una correlació entre una metilació aberrant del promotor de *BRCA1* i un increment en el risc de càncer de mama, es pot concloure que la hipermetilació no és un factor important en la heretabilitat de la síndrome del CMOH.

Identification of germline pathogenic variants in DNA damage repair genes by a next-generation sequencing multigene panel in BRCAx patients.

Aquest article ha permès identificar altres gens responsables de la síndrome de CMOH en un 8% dels pacients estudiats, així com confirmar que els estudis genètics mitjançant panells de gens permeten augmentar el rendiment diagnòstic. A més a més, ha permès reforçar la importància d'incloure el gen *PALB2* en aquests estudis.

La seqüenciació de panells de gens mitjançant *NGS* s'ha establert com l'eina per excel·lència en l'estudi de malalties d'origen genètic, per la seva rapidesa, fiabilitat i el seu cost-efectivitat. Fins a l'aparició de la *NGS*, l'anàlisi dels gens implicats en la síndrome de CMOH es realitzava de forma seqüencial, el que implicava molt de temps i un cost elevat. Amb l'aparició de la seqüenciació massiva, es va apostar per l'estudi de grups de gens (panells de gens) simultàniament (Shendure & Ji, 2008). Així doncs, els laboratoris han d'establir, complint uns requeriments mínims, quin és el grup de gens que s'analitzaran i estudiaran tenint en compte les característiques pròpies de la població a estudiar. Per això, en aquest estudi es va seleccionar un panell de 25 gens descrits en la bibliografia com a gens associats a

la síndrome de CMOH o a síndromes relacionades que incloguessin el càncer de mama o el càncer d'ovari com a manifestació clínica (Hirotzu et al., 2015). Amb els resultats obtinguts, es va poder reduir el nombre de resultats no informatius en un 8%, coincidint amb altres estudis (Moran et al., 2017). La majoria de les mutacions identificades pertanyien al gen *PALB2*, un gen històricament relacionat amb el càncer de pàncrees familiar però que des de fa un temps ja es postulava com a un bon candidat a incloure en la síndrome de CMOH (Afghahi & Kurian, 2017; Apostolou & Fostira, 2013b; Toss et al., 2015; Tung et al., 2015; Van Der Groep et al., 2011).

La resta de variants patogèniques o probablement patogèniques identificades, es van identificar en els gens *RAD50*, *BARD1* i *BRIP1*. Aquests són gens controvertits pel que fa a la inclusió en els panells de gens de càncer de mama hereditari, ja que no hi ha encara suficients evidències clíniques per al seu maneig en aquesta patologia. En el cas del gen *BRIP1*, es relaciona principalment amb el càncer d'ovari (Ramus et al., 2015), encara que alguns autors l'han descrit també en casos de càncer de mama (Rafnar et al., 2011). Tot i això, degut a què aquests gens estan directament relacionats amb la funcionalitat dels gens *BRCA1* i *BRCA2*, no s'hauria de descartar la seva inclusió en l'estudi d'aquesta síndrome.

L'anàlisi de panells de gens associats a una síndrome poden incrementar la probabilitat d'identificar la causa genètica subjacent d'aquesta. En contrapartida a l'estudi d'exomes o genomes, són una millor opció perquè disminueix la identificació de troballes secundàries que no estiguin associades al fenotip en estudi. En resum, només s'han d'incloure aquells gens accionables, amb una forta o moderada evidència d'associació a la malaltia (Bean et al., 2019), perquè el resultat d'aquest estudi derivarà en mesures terapèutiques i/o de diagnòstic precoç i prevenció en els pacients. El contingut dels panells de gens s'han d'anar revisant i modificant d'acord amb les noves evidències que vagin sorgint

relacionades amb la síndrome o el fenotip a estudiar. Amb aquest objectiu, recentment s'ha publicat un consens internacional on s'ha establert quins són els gens mínims i imprescindibles a analitzar en el cas del càncer de mama hereditari per a decisions terapèutiques, que inclou els gens *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* i *PALB2* (Singer et al., 2019). Així mateix, la secció de càncer hereditari de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) ha publicat una guia relacionada amb la síndrome de CMOH on s'indiquen, no només els criteris per a la selecció dels pacients si no també els gens que s'han d'incloure en aquests panells (González-Santiago et al., 2019), on s'estableixen com a gens a estudiar els gens *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM* i *CHEK2* per al càncer de mama i *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *MLH1*, *MSH2*, i *MSH6* per al càncer d'ovari. També l'any 2019 es va establir un consens d'àmbit català en la selecció i utilització de panells de gens (pendent de publicació), en el que per al CMOH s'inclouen els gens *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D* i en el cas de famílies on només es manifesta càncer d'ovari, els gens *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *BRIP1*, *RAD51C* i *RAD51D*.

Per tant, la tecnologia basada en la NGS afavoreix molt la millora del rendiment diagnòstic en l'estudi del CMOH, ja que permet l'estudi simultani de gens sospitosos i accionables. Tot i això, en l'àmbit assistencial és important no voler abraçar tota la capacitat que ens proporciona aquesta tecnologia, ja que en molts casos pot donar lloc a molta informació difícil d'aplicar a la clínica.

Metabolomics reveals novel blood plasma biomarkers associated to the BRCA1-mutated phenotype of human breast cancer.

L'últim treball d'aquesta Tesi Doctoral, ha permès confirmar l'existència d'un perfil metabòlic diferencial que permet caracteritzar i identificar el fenotip de càncer de mama associat a mutacions en *BRCA1* mitjançant la metabolòmica. La metabolòmica es pot definir com la ciència òmica més emergent, que permet l'obtenció d'una empremta metabòlica d'una mostra biològica, la qual pot provenir de diferents matrius biològiques com ara línies cel·lulars, sang, alè, plasma, saliva, sèrum i orina. Aquest anàlisi es pot realitzar de manera automatitzada i relativament ràpida (Escobar-Morreale et al., 2012; Mallol et al., 2013; Yanes et al., 2011). En els últims anys, aquesta ciència ha esdevingut una eina amb molt de potencial per a la cerca de biomarcadors en diferents malalties, gràcies principalment a la comparació d'aquesta empremta o perfil entre individus sans i malalts. És a dir, possibilita l'observació de la relació directa genotip-fenotip mitjançant la identificació de canvis bioquímics específics per a diferents fenotips, que permet deduir el procés metabòlic alterat en la patogènia de la malaltia que s'està estudiant (Silva et al., 2019).

Aquesta, tot i ser una ciència òmica recent, ja compta amb nombrosos estudis en diferents patologies com són la diabetis, la malaltia d'Alzheimer, l'aterosclerosi i el càncer (Juonala et al., 2019; Mahajan et al., 2020; T. J. Wang et al., 2011; Yu et al., 2020).

Degut a que el càncer és una malaltia que promou alteracions en el metabolisme cel·lular (Clish, 2015), l'estudi d'aquests canvis pot ser útil tant per a la detecció precoç del tumor com per a l'avaluació de tractaments antineoplàstics. Encara que actualment l'aplicació de la metabolòmica en càncer de mama està en les seves fases inicials, existeixen estudis que han explorat la possibilitat d'utilitzar els perfils

metabòlics obtinguts mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN) i/o espectrometria de masses (EM), com a possibles biomarcadors de detecció precoç, de caracterització tumoral i de predicció clínica de la malaltia (Shaw et al., 2002). Aquests estudis reporten l'associació de certs metabolits (glucosa, lactat, lípids, colina i aminoàcids) amb diferents característiques del càncer de mama (pronòstic, progressió de la malaltia, etc) (Sitter et al., 2010). La majoria d'aquests estudis s'han centrat en l'anàlisi de teixit tumoral i/o línies cel·lulars i molt pocs han utilitzat plasma o sèrum dels pacients (Asiago et al., 2010; Shen et al., 2013; Yan et al., 2018). Recentement, Yang *et al.* reporten un perfil lipídomic diferencial en plasma capaç de discriminar els pacients amb lesions tumorals benignes de la mama i les lesions tumorals malignes, i caracteritzen dos potencials biomarcadors lipídics plasmàtics (Yang et al., 2015). Asiago *et al.* reporten el desenvolupament d'un model predictiu de detecció precoç basat en 11 metabolits detectats en sèrum de pacients amb càncer de mama recurrent combinant els mètodes analítics de RMN i EM (Asiago et al., 2010). Shen *et al.*, descriuen que analitzant el plasma de pacients i controls s'observa que existeix un perfil metabòlic diferencial condicionat per la raça i el tipus de receptor hormonal dels pacients (Shen et al., 2013). Per tant, els resultats d'aquests estudis reforcen la importància de la investigació i la futura aplicabilitat de la metabolòmica associada al càncer de mama. Tot i que s'han descrit algunes aproximacions basades en aquesta eina (Dougan et al., 2018; Jove et al., 2017; Lecuyer et al., 2019), totes elles utilitzaven diferents estratègies dintre de la metabolòmica i principalment permetien la discriminació entre individus sans i malalts.

Els resultats d'aquest estudi han evidenciat l'existència d'un perfil metabòlic diferencial en línies cel·lulars de càncer de mama segons el genotip de *BRCA1*, expressió de receptors hormonaals i HER2 i subtipus tumoral. A més a més, s'han identificat 9 metabolits que permeten la diferenciació entre les línies cel·lulars

segons la funcionalitat de BRCA1 i amb una potencial capacitat predictora del fenotip *BRCA-like* de càncer de mama (Lord & Ashworth, 2016). Els nombre de metabòlits amb aquesta capacitat discriminatòria es veuen disminuïts quan el material de partida és el plasma, obtenint principalment dos metabòlits derivats de processos de metilació (N6-metiladenosina i 1-metilguanina) i l'adenina, un metabòlit descrit i relacionat anteriorment amb el càncer de mama (Weber, 1983). Tot i que és important verificar si aquesta capacitat discriminatòria es manté amb una cohort de pacients més àmplia, amb aquests resultats es pot deduir que també un perfil metabolòmic específic podria correlacionar-se amb una determinada mutació germinal, útil en l'àmbit de l'assessorament genètic, i amb una mutació somàtica conductora (*driver*) que condicioni un càncer i per tant un tractament (Lanznaster et al., 2018; Steuer et al., 2019).

Discussió general

Els gens *BRCA1* i *BRCA2* són els principals gens relacionats amb la síndrome de CMOH, però només permeten el diagnòstic d'aproximadament un 15% dels pacients amb sospita d'aquesta síndrome. Per això una millora en el rendiment diagnòstic en aquesta síndrome és imprescindible. En aquest treball, s'han realitzat quatre estudis que ens apropen a l'objectiu de poder realitzar un assessorament genètic més exitós. Des de la classificació de VUS, mitjançant l'aplicació de diferents estratègies basades en evidències directes i indirectes, fins a l'estudi de panells de gens. Cal tenir en compte que amb l'aparició de la seqüenciació massiva i el consegüent abaratiment dels estudis genètics, es corre el

risc d'un increment descontrolat dels estudis genètics que es realitzen i dels gens que s'analitzen, passant d'uns criteris molt restringits a uns criteris molt laxes. En aquesta tesi doctoral, l'estudi mitjançant NGS pretenia trobar un punt mig entre aquestes dues vessants, de tal manera que es poguessin seleccionar els gens que s'havien d'estudiar en la nostra Unitat, sempre incloent els gens mínims definits per les societats científiques internacionals. A més a més, aquest increment en el nombre de gens recomanats també fa incrementar el nombre de VUS identificades, ja que molts d'aquests gens no han estat prou estudiats fins ara. Per això, cal millorar les estratègies per aclarir la patogenicitat d'aquestes. De totes maneres, la utopia dels laboratoris de genètica on s'estudien aquestes síndromes seria trobar un biomarcador de cribatge que permetés identificar quins pacients seran portadors de mutació, per tal de poder reduir el volum dels estudis genètics a realitzar. Aquesta eina hauria de ser mitjançant una tecnologia ràpida i econòmica i on el material de partida fos de fàcil obtenció. És per això que en l'estudi d'aquesta tesi doctoral, basat en metabolòmica, es pretenia trobar aquesta eina tan necessària.

Per tant, amb les publicacions que conformen aquesta tesi doctoral s'ha intentat donar solucions als diferents obstacles que ens trobem en el diagnòstic molecular de la síndrome de CMOH en el procés d'assessorament genètic. Tot i que en conjunt són petites aportacions, poden ser un punt de partida per a estudis més ambiciosos.

V. CONCLUSIONS

Conclusions

Les principals conclusions de la tesi doctoral són:

1. La predicció combinada de les eines bioinformàtiques SSF, MES, GS, NNSplice, HSF, ESE-Finder i RESCUE-ESE és útil per a classificar les VUS en dos grups: un amb baixa probabilitat d'alterar el procés d'empalmament (per tant, probablement benignes) i un altre amb alta probabilitat de produir alteracions (per tant, probablement patogèniques); encara que, seguint les guies de validació internacionals necessitarien una validació amb experiments complementaris.

2. Les variants c.212+1G>A i c.5278-1G>A del gen *BRCA1* i la variant c.516+2T>A i c.8168A>G del gen *BRCA2*, identificades en pacients de CMOH de la nostra població, presenten un empalmament alterat tant *in silico* com *in vitro*.
3. L'anàlisi de casos i controls de base poblacional és una bona aproximació per a classificar en polimorfismes determinades VUS de les quals no hi ha prou informació en les principals bases de dades de CMOH.
4. Les variants c.4068G>A, c.8851G>A i c.7008-62A>G del gen *BRCA2* són polimorfismes característics de la població de la província de Tarragona amb una freqüència de l'al·lel menor de l'1%, 1.3 %, i 2.1% respectivament.
5. La hipermetilació germinal dels promotors dels gens *BRCA1* i *BRCA2* es pot descartar com un mecanisme d'inactivació transcripcional constitucional d'aquests gens en pacients amb sospita de CMOH.
6. El 8% dels pacients estudiats amb manifestacions típiques de la síndrome de CMOH, però sense alteracions en els gens *BRCA1* o *BRCA2*, són portadors de variants patogèniques en els següents gens relacionats amb el càncer hereditari:
 - a. *PALB2*: variants c.2834+1G>C, c.2257T>C i c.1965dup. Aquest gen ja s'havia relacionat amb el càncer de mama per la qual cosa, és un candidat a ésser inclòs inequívocament en els panells de síndrome de CMOH.

- b. *BRIP1*: variant c.1702_1703del. Aquest gen s'ha descrit principalment relacionat amb un risc moderat de càncer d'ovari però no s'ha establert un risc en el càncer de mama.
 - c. *BARD1*: variant c.1509del. No hi ha evidències en la literatura de l'associació d'aquest gen amb el risc de càncer de mama.
 - d. *RAD50*: variant c.2116C>T. Aquest gen està associat amb el càncer d'ovari.
7. Tot i que els estudis fins ara no són concloents, la recent associació dels gens *BRIP1*, *BARD1* i *RAD50* amb el càncer de mama que fins ara només s'havien associat amb el càncer d'ovari, indica que són candidats a incloure'ls en els estudis amb pacients amb síndrome de CMOH que no presenten alteracions en els gens *BRCA1* i *BRCA2*.
8. L'estudi metabolòmic suggereix l'existència d'un perfil metabòlic característic que ens permet distingir cèl·lules amb i sense mutacions en el gen *BRCA1*. La deficiència en la funcionalitat d'aquestes cèl·lules pot ser deguda a una mutació en el gen o bé per un fenotip *BRCAness*. La identificació d'aquesta signatura podria permetre trobar un biomarcador de deficiència en el funcionament de *BRCA*.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Afghahi, A., & Kurian, A. W.** (2017). The Changing Landscape of Genetic Testing for Inherited Breast Cancer Predisposition. In *Current Treatment Options in Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0468-y>
- Amendola, L. M., Jarvik, G. P., Leo, M. C., Mclaughlin, H. M., Akkari, Y., Amaral, M. D., Berg, J. S., Biswas, S., Bowling, K. M., Conlin, L. K., Cooper, G. M., Dorschner, M. O., Dulik, M. C., Ghazani, A. A., Ghosh, R., Green, R. C., Hart, R., Horton, C., Johnston, J. J., ... Rehm, H. L.** (2016). *Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium*. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.03.024>
- Antoniou, A. C., Cunningham, A. P., Peto, J., Evans, D. G., Lalloo, F., Narod, S. A., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Southey, M. C., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Passini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., ... Easton, D. F.** (2008). The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: updates and extensions. *British Journal of Cancer*, *98*(8), 1457–1466. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604305>
- Antoniou, A. C., Pharoah, P. P. D., Smith, P., & Easton, D. F.** (2004). The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, *91*(8), 1580–1590. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602175>
- Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., ... Easton, D. F.** (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics*, *72*(5), 1117–1130. <https://doi.org/10.1086/375033>
- Apostolou, P., & Fostira, F.** (2013a). Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *BioMed Research International*, *2013*, 747318. <https://doi.org/10.1155/2013/747318>
- Apostolou, P., & Fostira, F.** (2013b). Hereditary breast cancer: The Era of new susceptibility genes. In *BioMed Research International* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/747318>
- Asiago, V. M., Alvarado, L. Z., Shanaiah, N., Gowda, G. A. N., Owusu-Sarfo, K., Ballas, R. A., & Raftery, D.** (2010). Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer Research*, *70*(21), 8309–8318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1319>
- Baysal, B. E., DeLoia, J. A., Willett-Brozick, J. E., Goodman, M. T., Brady, M. F., Modugno, F., Lynch, H. T., Conley, Y. P., Watson, P., & Gallion, H. H.** (2004). Analysis of CHEK2 gene for ovarian cancer susceptibility. *Gynecologic Oncology*, *95*(1), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.07.015>

- Bean, L. J. H., Funke, B., Carlston, C. M., Gannon, J. L., Kantarci, S., Krock, B. L., Zhang, S., Bayrak-Toydemir, P., & AssuranceCommittee, ; on behalf of the ACMG Laboratory Quality.** (2019). Diagnostic gene sequencing panels: from design to report—atechnical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics(ACMG). *Genetics in Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0666-z>
- Berger, A. H., Knudson, A. G., & Pandolfi, P. P.** (2011). A continuum model for tumour suppression. In *Nature* (Vol. 476, Issue 7359, pp. 163–169). <https://doi.org/10.1038/nature10275>
- Bewtra, C., Watson, P., Conway, T., Read-Hippee, C., & Lynch, H. T.** (1992). Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. *International Journal of Gynecological Pathology : Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 11(3), 180–187.
- Bonnet, C., Krieger, S., Vezain, M., Rousselin, A., Tournier, I., Martins, A., Berthet, P., Chevrier, A., Dugast, C., Layet, V., Rossi, A., Lidereau, R., Frébourg, T., Hardouin, A., & Tosi, M.** (2008). Screening BRCA1 and BRCA2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription PCR on patient RNA and an ex vivo assay based on a splicing reporter minigene. *Journal of Medical Genetics*, 45(7), 438–446. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.056895>
- Bosviel, R., Garcia, S., Lavediaux, G., Michard, E., Dravers, M., Kwiatkowski, F., Bignon, Y. J., & Bernard-Gallon, D. J.** (2012). BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA was identified in sporadic breast cancer and controls. *Cancer Epidemiology*, 36(3), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.02.001>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A.** (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- BREAST CANCER INFORMATION CORE DATABASE.** (n.d.). National Human Genome Research Institute. Retrieved September 20, 2009, from <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>
- Broca, P.** (1866). *Traité des tumeurs*.
- Cavenee, W. K., Dryja, T. P., Phillips, R. A., Benedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C., & White, R. L.** (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 305(5937), 779–784. <https://doi.org/10.1038/305779a0>
- Chen, X., Truong, T. N., Weaver, J., Bove, B. A., Cattie, K., Brock, A., Daly, M. B., & Ā, A. K. G.** (2006). Intronic Alterations in BRCA1 and BRCA2 : Effect on mRNA Splicing Fidelity and Expression. *HUMANMUTATION*, 27(5), 427–435. <https://doi.org/10.1002/humu>

- Chen, Y., Toland, A. E., Lennan, J. M. C., Fridlyand, J., Crawford, B., Costello, J. F., & Ziegler, J. L.** (2006). Lack of Germ-Line Promoter Methylation in BRCA1 -Negative Families with Familial Breast Cancer. *Genetic Testing*, 10(4), 1–4. <https://doi.org/10.1089/gte.2006.281-284>
- Cho, Y. H., McCullough, L. E., Gammon, M. D., Wu, H.-C., Zhang, Y.-J., Wang, Q., Xu, X., Teitelbaum, S. L., Neugut, A. I., Chen, J., & Santella, R. M.** (2015). Promoter Hypermethylation in White Blood Cell DNA and Breast Cancer Risk. *Journal of Cancer*, 6(9), 819–824. <https://doi.org/10.7150/jca.12174>
- Claes, K., Poppe, B., Machackova, E., Coene, I., Foretova, L., De Paepe, A., & Messiaen, L.** (2003). Differentiating pathogenic mutations from polymorphic alterations in the splice sites of BRCA1 and BRCA2. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 37(3), 314–320. <https://doi.org/10.1002/gcc.10221>
- Claus, E. B., Schildkraut, J., Iversen, E. S., Berry, D., & Parmigiani, G.** (1998). Effect of BRCA1 and BRCA2 on the Association Between Breast Cancer Risk and Family History. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 90(23), 1824–1829. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.23.1824>
- Cline, M. S., Liao, R. G., Parsons, M. T., Paten, B., Alquaddoomi, F., Antoniou, A., Baxter, S., Brody, L., Cook-Deegan, R., Coffin, A., Couch, F. J., Craft, B., Currie, R., Dlott, C. C., Dolman, L., den Dunnen, J. T., Dyke, S. O. M., Domchek, S. M., Easton, D., ... Spurdle, A. B.** (2018). BRCA Challenge: BRCA Exchange as a global resource for variants in BRCA1 and BRCA2. *PLoS Genetics*, 14(12), e1007752. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007752>
- Clish, C. B.** (2015). Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*, 1(1), a000588–a000588. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>
- Colombo, M., de Vecchi, G., Caleca, L., Foglia, C., Ripamonti, C. B., Ficarazzi, F., Barile, M., Varesco, L., Peissel, B., Manoukian, S., & Radice, P.** (2013). Comparative In Vitro and In Silico Analyses of Variants in Splicing Regions of BRCA1 and BRCA2 Genes and Characterization of Novel Pathogenic Mutations. *PLoS ONE*, 8(2).
- de la Hoya, M., Soukarieh, O., López-Perolio, I., Vega, A., Walker, L. C., van Ierland, Y., Baralle, D., Santamariña, M., Lattimore, V., Wijnen, J., Whaley, P., Blanco, A., Raponi, M., Hauke, J., Wappenschmidt, B., Becker, A., Hansen, T. V. O., Behar, R., Investigators, Kc., ... Spurdle, A. B.** (2016). Combined genetic and splicing analysis of BRCA1 c.[594-2A>C; 641A>G] highlights the relevance of naturally occurring in-frame transcripts for developing disease gene variant classification algorithms. *Human Molecular Genetics*, 25(11), 2256–2268. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw094>
- Domagala, P., Hybiak, J., Cybulski, C., & Lubinski, J.** (2017). BRCA1/2-negative hereditary triple-negative breast cancers exhibit BRCAness. *International Journal of Cancer*,

140(7), 1545–1550. <https://doi.org/10.1002/ijc.30570>

- Dougan, M. M., Li, Y., Chu, L. W., Haile, R. W., Whittemore, A. S., Han, S. S., Moore, S. C., Sampson, J. N., Andrulis, I. L., John, E. M., & Hsing, A. W.** (2018). Metabolomic profiles in breast cancer: a pilot case-control study in the breast cancer family registry. *BMC Cancer*, *18*(1), 532. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4437-z>
- Easton, D. F., Deffenbaugh, A. M., Pruss, D., Frye, C., Wenstrup, R. J., Allen-Brady, K., Tavtigian, S. V., Monteiro, A. N. A., Iversen, E. S., Couch, F. J., & Goldgar, D. E.** (2007). A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer-predisposition genes. *American Journal of Human Genetics*, *81*(5), 873–883. <https://doi.org/10.1086/521032>
- Eccles, D. M., Evans, D. G., & Mackay, J.** (2000). Guidelines for a genetic risk based approach to advising women with a family history of breast cancer. UK Cancer Family Study Group (UKCFSG). *Journal of Medical Genetics*, *37*(3), 203–209. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.3.203>
- Eccles, D. M., Mitchell, G., Monteiro, A. N. A., Schmutzler, R., Couch, F. J., Spurdle, A. B., Gómez-García, E. B., & Group, E. C. W.** (2015). BRCA1 and BRCA2 genetic testing-pitfalls and recommendations for managing variants of uncertain clinical significance. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *26*(10), 2057–2065. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv278>
- Ernst, C., Hahnen, E., Engel, C., Nothnagel, M., Weber, J., Schmutzler, R. K., & Hauke, J.** (2018). Performance of in silico prediction tools for the classification of rare BRCA1/2 missense variants in clinical diagnostics. *BMC Medical Genomics*, *11*(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0353-y>
- Escala-Garcia, M., Guo, Q., Dörk, T., Canisius, S., Keeman, R., Dennis, J., Beesley, J., Lecarpentier, J., Bolla, M. K., Wang, Q., Abraham, J., Andrulis, I. L., Anton-Culver, H., Arndt, V., Auer, P. L., Beckmann, M. W., Behrens, S., Benitez, J., Bermisheva, M., ... Schmidt, M. K.** (2019). Genome-wide association study of germline variants and breast cancer-specific mortality. *British Journal of Cancer*, *120*(6), 647–657. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0393-x>
- Escobar-Morreale, H. F., Samino, S., Insenser, M., Vinaixa, M., Luque-Ramirez, M., Lasuncion, M. A., & Correig, X.** (2012). Metabolic heterogeneity in polycystic ovary syndrome is determined by obesity: plasma metabolomic approach using GC-MS. *Clinical Chemistry*, *58*(6), 999–1009. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.176396>
- Esteller, M., Fraga, M. F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A. K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y. J., Ramus, S., Benitez, J., Caldes, T., Akiyama, Y., Yuasa, Y., Launonen, V., Canal, M. J., Rodriguez, R., Capella, G., Peinado, M. A., ... Herman, J. G.** (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet*, *10*(26), 3001–3007. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.26.3001>

- Flanagan, J. M., Munoz-Alegre, M., Henderson, S., Tang, T., Sun, P., Johnson, N., Fletcher, O., Dos Santos Silva, I., Peto, J., Boshoff, C., Narod, S., & Petronis, A.** (2009). Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. *Human Molecular Genetics*, *18*(7), 1332–1342. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp033>
- Fortuno, C., James, P. A., Young, E. L., Feng, B., Olivier, M., Pesaran, T., Tavtigian, S. V., & Spurdle, A. B.** (2018). Improved, ACMG-compliant, in silico prediction of pathogenicity for missense substitutions encoded by TP53 variants. *Human Mutation*, *39*(8), 1061–1069. <https://doi.org/10.1002/humu.23553>
- Gabai-Kapara, E., Lahad, A., Kaufman, B., Friedman, E., Segev, S., Renbaum, P., Beerli, R., Gal, M., Grinshpun-Cohen, J., Djemal, K., Mandell, J. B., Lee, M. K., Beller, U., Catane, R., King, M.-C., & Levy-Lahad, E.** (2014). Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to *BRCA1* and *BRCA2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(39), 14205–14210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415979111>
- Gerson, S. L.** (2002). Clinical Relevance of MGMT in the Treatment of Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *20*(9), 2388–2399. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.06.110>
- Ghousaini, M., Pharoah, P. D. P., & Easton, D. F.** (2013). Inherited genetic susceptibility to breast cancer: the beginning of the end or the end of the beginning? *The American Journal of Pathology*, *183*(4), 1038–1051. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.07.003>
- González-Santiago, S., y Cajal, T., Aguirre, E., Alés-Martínez, J. E., Andrés, R., Balmaña, J., Graña, B., Herrero, A., Llorca, G., González-del-Alba, A., & the SEOM Hereditary Cancer Working Group.** (2019). SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer (2019). *Clinical and Translational Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02262-0>
- Goyal, G., Fan, T., & Silberstein, P. T.** (2016). Hereditary cancer syndromes: utilizing DNA repair deficiency as therapeutic target. *Familial Cancer*, *15*(3), 359–366. <https://doi.org/10.1007/s10689-016-9883-7>
- Grønbaek, K., Hother, C., & Jones, P. A.** (2007). Epigenetic changes in cancer. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, *115*(10), 1039–1059. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_636.xml.x
- Guidugli, L., Carreira, A., Caputo, S. M., Ehlen, A., Galli, A., Monteiro, A. N. A., Neuhausen, S. L., Hansen, T. V. O., Couch, F. J., & Vreeswijk, M. P. G.** (2014). Functional assays for analysis of variants of uncertain significance in *BRCA2*. *Human Mutation*, *35*(2), 151–164. <https://doi.org/10.1002/humu.22478>
- Gupta, S., Jaworska-Bieniek, K., Narod, S. A., Lubinski, J., Wojdacz, T. K., & Jakubowska, A.** (2014). Methylation of the *BRCA1* promoter in peripheral blood DNA is associated

with triple-negative and medullary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 148(3), 615–622. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3179-0>

Hakem, R., de la Pompa, J. L., Sirard, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A., Potter, J., Reitmair, A., Billia, F., Firpo, E., Hui, C. C., Roberts, J., Rossant, J., & Mak, T. W. (1996). The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell*, 85(7), 1009–1023. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81302-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81302-1)

Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., & King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4988), 1684–1689.

Han, W., Kang, D., Park, I. A., Kim, S. W., Bae, J. Y., Chung, K.-W., & Noh, D.-Y. (2004). Associations between Breast Cancer Susceptibility Gene Polymorphisms and Clinicopathological Features. *Clinical Cancer Research*, 10(1), 124 LP – 130. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0834-3>

Heikkinen, K., Karppinen, S.-M., Soini, Y., Makinen, M., & Winqvist, R. (2003). Mutation screening of Mre11 complex genes: indication of RAD50 involvement in breast and ovarian cancer susceptibility. In *Journal of medical genetics* (Vol. 40, Issue 12, p. e131). <https://doi.org/10.1136/jmg.40.12.e131>

Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042–2054. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>

Hess, M. T., Schwitter, U., Petretta, M., Giese, B., & Naegeli, H. (1997). Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6664–6669. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6664>

Hirotsu, Y., Nakagomi, H., Sakamoto, I., Amemiya, K., Oyama, T., Mochizuki, H., & Omata, M. (2015). Multigene panel analysis identified germline mutations of dna repair genes in breast and ovarian cancer. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 3(5), 459–466. <https://doi.org/10.1002/mgg3.157>

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, A. R. (2012). *Cancer Facts and figures, 2012*.

Hsu, H.-M., Wang, H.-C., Chen, S.-T., Hsu, G.-C., Shen, C.-Y., & Yu, J.-C. (2007). Breast cancer risk is associated with the genes encoding the DNA double-strand break repair Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(10), 2024–2032. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0116>

- Iwamoto, T., Yamamoto, N., Taguchi, T., Tamaki, Y., & Noguchi, S.** (2011). BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation. *Breast Cancer Research and Treatment*, *129*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1188-1>
- Jacobsen, Oluf and Fraser, R.** (1946). *Heredity in Breast Cancer. A Genetic and Clinical Study of Two Hundred Probands.*(Translation by Robert Fraser.). Copenhagen; HK Lewis & Company: London.
- Jove, M., Collado, R., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, M.-C., Sol, J., Ruiz-Sanjuan, M., Fernandez, M., de la Torre Cabrera, C., Ramirez-Tortosa, C., Granados-Principal, S., Sanchez-Rovira, P., & Pamplona, R.** (2017). A plasma metabolomic signature discloses human breast cancer. *Oncotarget*, *8*(12), 19522–19533. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14521>
- Juonala, M., Ellul, S., Lawlor, D. A., Santos Ferreira, D. L., Carlin, J. B., Cheung, M., Dwyer, T., Wake, M., Saffery, R., & Burgner, D. P.** (2019). A Cross-Cohort Study Examining the Associations of Metabolomic Profile and Subclinical Atherosclerosis in Children and Their Parents: The Child Health CheckPoint Study and Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Journal of the American Heart Association*, *8*(14), e011852. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011852>
- Kane, M. F., Loda, M., Gaida, G. M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J. M., & Kolodner, R.** (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Research*, *57*(5), 808–811.
- Keupp, K., Hampp, S., Hübbel, A., Maringa, M., Kostezka, S., Rhiem, K., Waha, A., Wappenschmidt, B., Pujol, R., Surrallés, J., Schmutzler, R. K., Wiesmüller, L., & Hahnen, E.** (2019). Biallelic germline BRCA1 mutations in a patient with early onset breast cancer, mild Fanconi anemia-like phenotype, and no chromosome fragility. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *7*(9), e863–e863. <https://doi.org/10.1002/mgg3.863>
- Knudson, A. G. J.** (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *68*(4), 820–823. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820>
- Kontorovich, T., Cohen, Y., Nir, U., & Friedman, E.** (2009). Promoter methylation patterns of ATM, ATR, BRCA1, BRCA2 and p53 as putative cancer risk modifiers in Jewish BRCA1/BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Research and Treatment*, *116*(1), 195–200. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0121-3>
- Korde, L. A., Mueller, C. M., Loud, J. T., Struewing, J. P., Nichols, K., Greene, M. H., & Mai, P. L.** (2011). No evidence of excess breast cancer risk among mutation-negative women from BRCA mutation-positive families. *Breast Cancer Research and Treatment*, *125*(1), 169–173. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0923-y>

- Kotsopoulos, J., Sopik, V., Rosen, B., Fan, I., McLaughlin, J. R., Risch, H., Sun, P., Narod, S. A., & Akbari, M. R.** (2017). Frequency of germline PALB2 mutations among women with epithelial ovarian cancer. *Familial Cancer*, 16(1), 29–34. <https://doi.org/10.1007/s10689-016-9919-z>
- Kraus, C., Hoyer, J., Vasileiou, G., Wunderle, M., Lux, M. P., Fasching, P. A., Krumbiegel, M., Uebe, S., Reuter, M., Beckmann, M. W., & Reis, A.** (2017). Gene panel sequencing in familial breast/ovarian cancer patients identifies multiple novel mutations also in genes others than BRCA1/2. *International Journal of Cancer*, 140(1), 95–102. <https://doi.org/10.1002/ijc.30428>
- Krylova, N. Y., Ponomariova, D. N., Sherina, N. Y., Ogorodnikova, N. Y., Logvinov, D. A., Porhanova, N. V., Lobeiko, O. S., Urmancheyeva, A. F., Maximov, S. Y., Togo, A. V., Suspitsin, E. N., & Imyanitov, E. N.** (2007). CHEK2 1100 delC mutation in Russian ovarian cancer patients. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 5(3), 153–156. <https://doi.org/10.1186/1897-4287-5-3-153>
- Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K.-A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M.-J., Jervis, S., van Leeuwen, F. E., Milne, R. L., Andrieu, N., Goldgar, D. E., Terry, M. B., Rookus, M. A., Easton, D. F., Antoniou, A. C., McGuffog, L., Evans, D. G., Barrowdale, D., Frost, D., ... Olsson, H.** (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, 317(23), 2402. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>
- Lakhani, S. R., Manek, S., Penault-Llorca, F., Flanagan, A., Arnout, L., Merrett, S., McGuffog, L., Steele, D., Devilee, P., Klijn, J. G. M., Meijers-Heijboer, H., Radice, P., Pilotti, S., Nevanlinna, H., Butzow, R., Sobol, H., Jacquemier, J., Lyonet, D. S., Neuhausen, S. L., ... Easton, D. F.** (2004). Pathology of ovarian cancers in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(7), 2473–2481.
- Lanznaster, D., de Assis, D. R., Corcia, P., Pradat, P.-F., & Blasco, H.** (2018). Metabolomics Biomarkers: A Strategy Toward Therapeutics Improvement in ALS. *Frontiers in Neurology*, 9, 1126. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01126>
- Lecuyer, L., Dalle, C., Lyan, B., Demidem, A., Rossary, A., Vasson, M.-P., Petera, M., Lagree, M., Ferreira, T., Centeno, D., Galan, P., Herberg, S., Deschasaux, M., Partula, V., Srour, B., Latino-Martel, P., Kesse-Guyot, E., Druesne-Pecollo, N., Durand, S., ... Touvier, M.** (2019). Plasma Metabolomic Signatures Associated with Long-term Breast Cancer Risk in the SU.VI.MAX Prospective Cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 28(8), 1300–1307. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0154>
- Lee, A., Mavaddat, N., Wilcox, A. N., Cunningham, A. P., Carver, T., Hartley, S., Babb de Villiers, C., Izquierdo, A., Simard, J., Schmidt, M. K., Walter, F. M., Chatterjee, N., Garcia-Closas, M., Tischkowitz, M., Pharoah, P., Easton, D. F., & Antoniou, A. C.**

- (2019). BOADICEA: a comprehensive breast cancer risk prediction model incorporating genetic and nongenetic risk factors. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 21(8), 1708–1718. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0406-9>
- Li, H., LaDuca, H., Pesaran, T., Chao, E. C., Dolinsky, J. S., Parsons, M., Spurdle, A. B., Polley, E. C., Shimelis, H., Hart, S. N., Hu, C., Couch, F. J., & Goldgar, D. E.** (2019). Classification of variants of uncertain significance in BRCA1 and BRCA2 using personal and family history of cancer from individuals in a large hereditary cancer multigene panel testing cohort. *Genetics in Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0729-1>
- Lindahl, T.** (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709–715.
- Lindor, N. M., Guidugli, L., Wang, X., Vallée, M. P., Monteiro, A. N. a, Tavgian, S., Goldgar, D. E., & Couch, F. J.** (2012). A review of a multifactorial probability-based model for classification of BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance (VUS). *Human Mutation*, 33(1), 8–21. <https://doi.org/10.1002/humu.21627>
- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica (BOE, 4 de julio de 2007)., Law and the human genome review = Revista de derecho y genoma humano / Chair in Law and the Human Genome, BBV Foundation-Provincial Government of Biscay, University of Deusto 283 (2007).
- Lord, C. J., & Ashworth, A.** (2016). BRCAness revisited. *Nature Reviews Cancer*, 16(2), 110–120. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.21>
- Loveday, C., Turnbull, C., Ramsay, E., Hughes, D., Ruark, E., Frankum, J. R., Bowden, G., Kalmyrzaev, B., Warren-Perry, M., Snape, K., Adlard, J. W., Barwell, J., Berg, J., Brady, A. F., Brewer, C., Brice, G., Chapman, C., Cook, J., Davidson, R., ... Rahman, N.** (2011). Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nature Genetics*, 43(9), 879–882. <https://doi.org/10.1038/ng.893>
- Lynch, H T, Shaw, M. W., Magnuson, C. W., Larsen, A. L., & Krush, A. J.** (1966). Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Archives of Internal Medicine*, 117(2), 206–212.
- Lynch, Henry T.** (1967). *Hereditary factors in carcinoma*.
- Lynch, Henry T, Silva, E., Snyder, C., & Lynch, J. F.** (2008). Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. *The Breast Journal*, 14(1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2007.00515.x>
- Ma, W. W., & Adjei, A. A.** (2009). Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 59(2), 111–137. <https://doi.org/10.3322/caac.20003>
- Macklin, M. T.** (1959). Inheritance of retinoblastoma in Ohio. *AMA Archives of*

Ophthalmology, 62(5), 842–851.

- Mahajan, U. V., Varma, V. R., Griswold, M. E., Blackshear, C. T., An, Y., Oommen, A. M., Varma, S., Troncoso, J. C., Pletnikova, O., O'Brien, R., Hohman, T. J., Legido-Quigley, C., & Thambisetty, M.** (2020). Dysregulation of multiple metabolic networks related to brain transmethylation and polyamine pathways in Alzheimer disease: A targeted metabolomic and transcriptomic study. *PLoS Medicine*, 17(1), e1003012. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003012>
- Mallol, R., Rodríguez, M. A., Brezmes, J., Masana, L., & Correig, X.** (2013). Human serum/plasma lipoprotein analysis by NMR: application to the study of diabetic dyslipidemia. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 70, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2012.09.001>
- Margison, G., & Koref, M.** (2002). Margison GP, Santibanez-Koref MF.. O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenesis and chemotherapy. *Bioessays* 24: 255-266. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24, 255–266. <https://doi.org/10.1002/bies.10063>
- Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., Freund, M., Lichtner, P., Hartmann, L., Schaal, H., Ramser, J., Honisch, E., Kubisch, C., Wichmann, H. E., Kast, K., Deissler, H., Engel, C., Muller-Myhsok, B., Neveling, K., ... Hanenberg, H.** (2010). Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature Genetics*, 42(5), 410–414. <https://doi.org/10.1038/ng.569>
- Merajver, S. D., Frank, T. S., Xu, J., Pham, T. M., Calzone, K. A., Bennett-Baker, P., Chamberlain, J., Boyd, J., Garber, J. E., & Collins, F. S.** (1995). Germline BRCA1 mutations and loss of the wild-type allele in tumors from families with early onset breast and ovarian cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 1(5), 539–544.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., & Ding, W.** (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5182), 66–71.
- Millot, G. A., Carvalho, M. A., Caputo, S. M., Vreeswijk, M. P. G., Brown, M. A., Webb, M., Rouleau, E., Neuhausen, S. L., Hansen, T. v O., Galli, A., Brandao, R. D., Blok, M. J., Velkova, A., Couch, F. J., & Monteiro, A. N. A.** (2012). A guide for functional analysis of BRCA1 variants of uncertain significance. *Human Mutation*, 33(11), 1526–1537. <https://doi.org/10.1002/humu.22150>
- Milne, R. L., Osorio, A., Cajal, T. R. Y., Vega, A., Llorca, G., de la Hoya, M., Diez, O., Alonso, M. C., Lazaro, C., Blanco, I., Sanchez-de-Abajo, A., Caldes, T., Blanco, A., Grana, B., Duran, M., Velasco, E., Chirivella, I., Cardenosa, E. E., Tejada, M.-I., ... Benitez, J.** (2008). The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of

- mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(9), 2861–2869. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4436>
- Mirza, M. R., Monk, B. J., Herrstedt, J., Oza, A. M., Mahner, S., Redondo, A., Fabbro, M., Ledermann, J. A., Lorusso, D., Vergote, I., Ben-Baruch, N. E., Marth, C., Mądry, R., Christensen, R. D., Berek, J. S., Dørum, A., Tinker, A. V, du Bois, A., González-Martín, A., ... Matulonis, U. A.** (2016). Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(22), 2154–2164. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611310>
- Mohammadi, L., Vreeswijk, M. P., Oldenburg, R., van den Ouweland, A., Oosterwijk, J. C., van der Hout, A. H., Hoogerbrugge, N., Ligtenberg, M., Ausems, M. G., van der Luit, R. B., Dommering, C. J., Gille, J. J., Verhoef, S., Hogervorst, F. B., van Os, T. a, Gómez García, E., Blok, M. J., Wijnen, J. T., Helmer, Q., ... van Houwelingen, H. C.** (2009). A simple method for co-segregation analysis to evaluate the pathogenicity of unclassified variants; BRCA1 and BRCA2 as an example. *BMC Cancer*, 9, 211. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-211>
- Moran, O., Nikitina, D., Royer, R., Poll, A., Metcalfe, K., Narod, S. A., Akbari, M. R., & Kotsopoulos, J.** (2017). Revisiting breast cancer patients who previously tested negative for BRCA mutations using a 12-gene panel. *Breast Cancer Research and Treatment*, 161(1), 135–142. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-4038-y>
- Nagy, R., Sweet, K., & Eng, C.** (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*, 23(38), 6445–6470. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207714>
- Newman, B., Austin, M. A., Lee, M., & King, M. C.** (1988). Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(9), 3044–3048. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.9.3044>
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M., & Perou, C. M.** (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(16), 5367–5374. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0220>
- Oulas, A., Minadakis, G., Zachariou, M., & Spyrou, G. M.** (2019). Selecting variants of unknown significance through network-based gene-association significantly improves risk prediction for disease-control cohorts. *Scientific Reports*, 9(1), 3266. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39796-w>
- Pal, T, Akbari, M. R., Sun, P., Lee, J.-H., Fulp, J., Thompson, Z., Coppola, D., Nicosia, S., Sellers, T. A., McLaughlin, J., Risch, H. A., Rosen, B., Shaw, P., Schildkraut, J., & Narod, S. A.** (2012). Frequency of mutations in mismatch repair genes in a

population-based study of women with ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 107(10), 1783–1790. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.452>

Pal, Tuya, Permuth-Wey, J., Betts, J. A., Krischer, J. P., Fiorica, J., Arango, H., LaPolla, J., Hoffman, M., Martino, M. A., Wakeley, K., Wilbanks, G., Nicosia, S., Cantor, A., & Sutphen, R. (2005). BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer*, 104(12), 2807–2816. <https://doi.org/10.1002/cncr.21536>

Pang, D., Zhao, Y., Xue, W., Shan, M., Chen, Y., Zhang, Y., Zhang, G., Liu, F., Li, D., & Yang, Y. (2012). Methylation profiles of the BRCA1 promoter in hereditary and sporadic breast cancer among Han Chinese. *Medical Oncology*, 29(3), 1561–1568. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-0100-0>

Peltomäki, P. (2001). DNA mismatch repair and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 488(1), 77–85. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00058-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00058-2)

Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>

Plon, S. E., Eccles, D. M., Easton, D., Foulkes, W. D., Genuardi, M., Greenblatt, M. S., Hogervorst, F. B. L., Hoogerbrugge, N., Spurdle, A. B., & Tavtigian, S. V. (2008). Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. In *Human Mutation* (Vol. 29, Issue 11, pp. 1282–1291). <https://doi.org/10.1002/humu.20880>

Prat, A., Cruz, C., Hoadley, K. A., Díez, O., Perou, C. M., & Balmaña, J. (2014). Molecular features of the basal-like breast cancer subtype based on BRCA1 mutation status. *Breast Cancer Research and Treatment*, 147(1), 185–191. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3056-x>

Rafnar, T., Gudbjartsson, D. F., Sulem, P., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Besenbacher, S., Lundin, P., Stacey, S. N., Gudmundsson, J., Magnusson, O. T., le Roux, L., Orlygsdottir, G., Helgadóttir, H. T., Johannsdóttir, H., Gylfason, A., Tryggvadóttir, L., Jonasson, J. G., de Juan, A., ... Stefansson, K. (2011). Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nature Genetics*, 43(11), 1104–1107. <https://doi.org/10.1038/ng.955>

Ramus, S. J., Song, H., Dicks, E., Tyrer, J. P., Rosenthal, A. N., Intermaggio, M. P., Fraser, L., Gentry-Maharaj, A., Hayward, J., Philpott, S., Anderson, C., Edlund, C. K., Conti, D., Harrington, P., Barrowdale, D., Bowtell, D. D., Alsop, K., Mitchell, G., Group, A. S., ... Gayther, S. A. (2015). Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*,

107(11), djv214. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv214>

Rañola, J. M. O., Liu, Q., Rosenthal, E. A., & Shirts, B. H. (2018). A comparison of cosegregation analysis methods for the clinical setting. *Familial Cancer*, 17(2), 295–302. <https://doi.org/10.1007/s10689-017-0017-7>

Ratajska, M., Antoszewska, E., Piskorz, A., Brozek, I., Borg, A., Kusmierek, H., Biernat, W., & Limon, J. (2012). Cancer predisposing BARD1 mutations in breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Research and Treatment*, 131(1), 89–97. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1403-8>

REDECAN. *Red Española de Registros de Cáncer. Estimaciones de la incidencia y supervivencia del cáncer en España y situación en Europa.* (2017). <http://redecn.org/es/index.cfm>

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Roberts, M. E., Jackson, S. A., Susswein, L. R., Zeinomar, N., Ma, X., Marshall, M. L., Stettner, A. R., Milewski, B., Xu, Z., Solomon, B. D., Terry, M. B., Hruska, K. S., Klein, R. T., & Chung, W. K. (2018). MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genetics in Medicine*, 20(10), 1167–1174. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.254>

Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg1655>

Robson, M. E., Bradbury, A. R., Arun, B., Domchek, S. M., Ford, J. M., Hampel, H. L., Lipkin, S. M., Syngal, S., Wollins, D. S., & Lindor, N. M. (2015). American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(31), 3660–3667. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.0996>

Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., & Conte, P. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 523–533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>

Rodríguez-Balada, M., Roig, B., Mele, M., Albacar, C., Serrano, S., Salvat, M., Querol, M., Borrás, J., Martorell, L., & Guma, J. (2020). Identification of germline pathogenic variants in DNA damage repair genes by a next-generation sequencing multigene panel in BRCA patients. *Clinical Biochemistry*, 76, 17–23.

<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.11.014>

- Romero, A., García-García, F., López-Perolio, I., Ruiz de Garibay, G., García-Sáenz, J. A., Garre, P., Ayllón, P., Benito, E., Dopazo, J., Díaz-Rubio, E., Caldés, T., & de la Hoya, M.** (2015). BRCA1 Alternative splicing landscape in breast tissue samples. *BMC Cancer*, *15*(1), 219. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1145-9>
- Rosenthal, E. A., Ranola, J. M. O., & Shirts, B. H.** (2017). Power of pedigree likelihood analysis in extended pedigrees to classify rare variants of uncertain significance in cancer risk genes. *Familial Cancer*, *16*(4), 611–620. <https://doi.org/10.1007/s10689-017-9989-6>
- Rubin, S. C., Benjamin, I., Behbakht, K., Takahashi, H., Morgan, M. A., LiVolsi, V. A., Berchuck, A., Muto, M. G., Garber, J. E., Weber, B. L., Lynch, H. T., & Boyd, J.** (1996). Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1. *The New England Journal of Medicine*, *335*(19), 1413–1416. <https://doi.org/10.1056/NEJM199611073351901>
- Sawyer, S. L., Tian, L., Kahkonen, M., Schwartzentruber, J., Kircher, M., Majewski, J., Dymant, D. A., Innes, A. M., Boycott, K. M., Moreau, L. A., Moilanen, J. S., & Greenberg, R. A.** (2015). Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer Discovery*, *5*(2), 135–142. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1156>
- Shaw, P. A., McLaughlin, J. R., Zweemer, R. P., Narod, S. A., Risch, H., Verheijen, R. H. M., Ryan, A., Menko, F. H., Kenemans, P., & Jacobs, I. J.** (2002). Histopathologic features of genetically determined ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Pathology : Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, *21*(4), 407–411.
- Shen, J., Yan, L., Liu, S., Ambrosone, C. B., & Zhao, H.** (2013). Plasma metabolomic profiles in breast cancer patients and healthy controls: by race and tumor receptor subtypes. *Translational Oncology*, *6*(6), 757–765. <https://doi.org/10.1593/tlo.13619>
- Shendure, J., & Ji, H.** (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* <https://doi.org/nbt1486> [pii]\r10.1038/nbt1486
- Silva, C., Perestrelo, R., Silva, P., Tomás, H., & Câmara, J. S.** (2019). Breast Cancer Metabolomics: From Analytical Platforms to Multivariate Data Analysis. A Review. *Metabolites*, *9*(5), 102. <https://doi.org/10.3390/metabo9050102>
- Singer, C. F., Balmaña, J., Bürki, N., Delalogue, S., Filieri, M. E., Gerdes, A. M., Grindedal, E. M., Han, S., Johansson, O., Kaufman, B., Krajc, M., Loman, N., Olah, E., Paluch-Shimon, S., Plavetic, N. D., Pohlodek, K., Rhiem, K., Teixeira, M., & Evans, D. G.** (2019). Genetic counselling and testing of susceptibility genes for therapeutic decision-making in breast cancer—an European consensus statement and expert recommendations. *European Journal of Cancer*, *106*, 54–60.

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.10.007>

- Sitter, B., Bathen, T. F., Singstad, T. E., Fjøsne, H. E., Lundgren, S., Halgunset, J., & Gribbestad, I. S.** (2010). Quantification of metabolites in breast cancer patients with different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy. *NMR in Biomedicine*, 23(4), 424–431. <https://doi.org/10.1002/nbm.1478>
- Snell, C., Krypuy, M., Wong, E. M., investigators, kConFab, Loughrey, M. B., & Dobrovic, A.** (2008). BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Research : BCR*, 10(1), R12–R12. <https://doi.org/10.1186/bcr1858>
- Spearman, A. D., Sweet, K., Zhou, X.-P., McLennan, J., Couch, F. J., & Toland, A. E.** (2008). Clinically applicable models to characterize BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(33), 5393–5400. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.8228>
- Spurdle, A. B., Healey, S., Devereau, A., Hogervorst, F. B. L., Monteiro, A. N. a, Nathanson, K. L., Radice, P., Stoppa-Lyonnet, D., Tavtigian, S., Wappenschmidt, B., Couch, F. J., & Goldgar, D. E.** (2012). ENIGMA--evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: an international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in BRCA1 and BRCA2 genes. *Human Mutation*, 33(1), 2–7. <https://doi.org/10.1002/humu.21628>
- Steuer, A. E., Brockbals, L., & Kraemer, T.** (2019). Metabolomic Strategies in Biomarker Research—New Approach for Indirect Identification of Drug Consumption and Sample Manipulation in Clinical and Forensic Toxicology? . In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 7, p. 319).
- Tavtigian, S. V, Greenblatt, M. S., Harrison, S. M., Nussbaum, R. L., Prabhu, S. A., Boucher, K. M., Biesecker, L. G., & SVI), on behalf of the C. S. V. I. W. G. (ClinGen.** (2018). Modeling the ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework. *Genetics in Medicine*, 20(9), 1054–1060. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.210>
- Thomassen, M., Gerdes, A.-M., Cruger, D., Jensen, P. K. A., & Kruse, T. A.** (2006). Low frequency of large genomic rearrangements of BRCA1 and BRCA2 in western Denmark. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 168(2), 168–171. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2005.12.016>
- Thompson, D., & Easton, D.** (2004). The genetic epidemiology of breast cancer genes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 9(3), 221–236. <https://doi.org/10.1023/B:JOMG.0000048770.90334.3b>
- Toss, A., Tomasello, C., Razzaboni, E., Contu, G., Grandi, G., Cagnacci, A., Schilder, R. J., & Cortesi, L.** (2015). Hereditary ovarian cancer: Not only BRCA 1 and 2 Genes. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation.

<https://doi.org/10.1155/2015/341723>

- Tung, N., Battelli, C., Allen, B., Kaldate, R., Bhatnagar, S., Bowles, K., Timms, K., Garber, J. E., Herold, C., Ellisen, L., Krejdosky, J., DeLeonardis, K., Sedgwick, K., Soltis, K., Roa, B., Wenstrup, R. J., & Hartman, A. R.** (2015). Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.29010>
- Van Der Groep, P., Van Der Wall, E., & Van Diest, P. J.** (2011). Pathology of hereditary breast cancer. *Cellular Oncology*, *34*(2), 71–88. <https://doi.org/10.1007/s13402-011-0010-3>
- Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., Neveling, K., Endt, D., Kesterton, I., Autore, F., Fraternali, F., Freund, M., Hartmann, L., Grimwade, D., Roberts, R. G., Schaal, H., Mohammed, S., Rahman, N., Schindler, D., & Mathew, C. G.** (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature Genetics*, *42*(5), 406–409. <https://doi.org/10.1038/ng.570>
- Vos, S., Moelans, C. B., & van Diest, P. J.** (2017). BRCA promoter methylation in sporadic versus BRCA germline mutation-related breast cancers. *Breast Cancer Research : BCR*, *19*(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0856-z>
- Walsh, T., Casadei, S., Lee, M. K., Pennil, C. C., Nord, A. S., Thornton, A. M., Roeb, W., Agnew, K. J., Stray, S. M., Wickramanayake, A., Norquist, B., Pennington, K. P., Garcia, R. L., King, M.-C., & Swisher, E. M.** (2011). Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(44), 18032–18037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115052108>
- Wang, Q.** (2016). Cancer predisposition genes: molecular mechanisms and clinical impact on personalized cancer care: examples of Lynch and HBOC syndromes. *Acta Pharmacologica Sinica*, *37*(2), 143–149. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.89>
- Wang, T. J., Larson, M. G., Vasan, R. S., Cheng, S., Rhee, E. P., McCabe, E., Lewis, G. D., Fox, C. S., Jacques, P. F., Fernandez, C., O'Donnell, C. J., Carr, S. A., Mootha, V. K., Florez, J. C., Souza, A., Melander, O., Clish, C. B., & Gerszten, R. E.** (2011). Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature Medicine*, *17*(4), 448–453. <https://doi.org/10.1038/nm.2307>
- Weber-Lassalle, N., Borde, J., Weber-Lassalle, K., Horváth, J., Niederacher, D., Arnold, N., Kaulfuß, S., Ernst, C., Paul, V. G., Honisch, E., Klaschik, K., Volk, A. E., Kubisch, C., Rapp, S., Lichey, N., Altmüller, J., Lepkes, L., Pohl-Rescigno, E., Thiele, H., ... Hauke, J.** (2019). Germline loss-of-function variants in the BARD1 gene are associated with early-onset familial breast cancer but not ovarian cancer. *Breast Cancer Research*, *21*(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1137-9>
- Weber-Lassalle, N., Hauke, J., Ramser, J., Richters, L., Groß, E., Blümcke, B., Gehrig, A.,**

- Kahlert, A.-K., Müller, C. R., Hackmann, K., Honisch, E., Weber-Lassalle, K., Niederacher, D., Borde, J., Thiele, H., Ernst, C., Altmüller, J., Neidhardt, G., Nürnberg, P., ... Hahnen, E.** (2018). BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Research*, 20(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0935-9>
- Weber, G.** (1983). Enzymes of purine metabolism in cancer. *Clinical Biochemistry*, 16(1), 57–63. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(83\)94432-6](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(83)94432-6)
- Whiley, P. J., De La Hoya, M., Thomassen, M., Becker, A., Brandão, R., Pedersen, I. S., Montagna, M., Menéndez, M., Quiles, F., Gutiérrez-Enríquez, S., Leeneer, K. De, Tenés, A., Montalban, G., Tserpelis, D., Yoshimatsu, T., Tirapo, C., Raponi, M., Caldes, T., Blanco, A., ... Brown, M. A.** (2014). Comparison of mRNA splicing assay protocols across multiple laboratories: Recommendations for best practice in standardized clinical testing. *Clinical Chemistry*, 60(2), 341–352. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.210658>
- Wojdacz, T. K., Thestrup, B. B., Cold, S., Overgaard, J., & Hansen, L. L.** (2011). No difference in the frequency of locus-specific methylation in the peripheral blood DNA of women diagnosed with breast cancer and age-matched controls. *Future Oncology (London, England)*, 7(12), 1451–1455. <https://doi.org/10.2217/fon.11.123>
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., Micklem, G., Barfoot, R., Hamoudi, R., Patel, S., Rices, C., Biggs, P., Hashim, Y., Smith, A., Connor, F., Arason, A., ... Stratton, M. R.** (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378, 789.
- Wu, L. C., Wang, Z. W., Tsan, J. T., Spillman, M. A., Phung, A., Xu, X. L., Yang, M.-C. W., Hwang, L.-Y., Bowcock, A. M., & Baer, R.** (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature Genetics*, 14(4), 430–440. <https://doi.org/10.1038/ng1296-430>
- Yan, F., Zhao, H., & Zeng, Y.** (2018). Lipidomics: a promising cancer biomarker. *Clinical and Translational Medicine*, 7(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0199-0>
- Yanes, O., Tautenhahn, R., Patti, G. J., & Siuzdak, G.** (2011). Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Analytical Chemistry*, 83(6), 2152–2161. <https://doi.org/10.1021/ac102981k>
- Yang, L., Cui, X., Zhang, N., Li, M., Bai, Y., Han, X., Shi, Y., & Liu, H.** (2015). Comprehensive lipid profiling of plasma in patients with benign breast tumor and breast cancer reveals novel biomarkers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(17), 5065–5077. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8484-x>
- Yu, L., Li, K., Li, X., Guan, C., Sun, T., & Zhang, X.** (2020). Metabolomic profiling of dried blood spots reveals gender-specific discriminant models for the diagnosis of small cell lung cancer. *Aging*, 12(1), 978–995. <https://doi.org/10.18632/aging.102670>

- Yuan, Y., Mendez, R., Sahin, A., & Dai, J. L.** (2001). Hypermethylation leads to silencing of the SYK gene in human breast cancer. *Cancer Research*, *61*(14), 5558–5561.
- Zhang, H., Ahearn, T. U., Lecarpentier, J., Barnes, D., Beesley, J., Qi, G., Jiang, X., O'Mara, T. A., Zhao, N., Bolla, M. K., Dunning, A. M., Dennis, J., Wang, Q., Ful, Z. A., Aittomäki, K., Andrulis, I. L., Anton-Culver, H., Arndt, V., Aronson, K. J., ... García-Closas, M.** (2020). Genome-wide association study identifies 32 novel breast cancer susceptibility loci from overall and subtype-specific analyses. *Nature Genetics*, *52*(6), 572–581. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0609-2>
- Zhang, L., & Long, X.** (2015a). Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: Evidence from 40 studies. *Scientific Reports*, *5*(August), 17869. <https://doi.org/10.1038/srep17869>
- Zhang, L., & Long, X.** (2015b). Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: Evidence from 40 studies. *Scientific Reports*, *5*, 17869. <https://doi.org/10.1038/srep17869>
- Zhou, B.-B. S., & Elledge, S. J.** (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, *408*(6811), 433–439. <https://doi.org/10.1038/35044005>

Glossari

Accionable	Amb utilitat clínica
ADN	Àcid desoxiribonucleic (en anglès DNA, desoxiribonucleic acid). Àcid nucleic constituït per nucleòtids de desoxiribosa, àcid fosfòric i les bases nitrogenades adenina, citosina, guanina i timina, que es troba fonamentalment en el nucli, en els mitocondris i en els cloroplasts, i que constitueix la base molecular de l'herència biològica.
Al·lel	Cadascuna de les formes alternatives d'un gen que ocupen el mateix locus en cromosomes homòlegs.
Anàlisi de lligament	El lligament és l'associació física entre dos <i>loci</i> , degut a la seva proximitat hi ha poca probabilitat d'entrecreuament i per tant augmenta la possibilitat d'una herència conjunta (mai es segreguen). Això s'utilitza per a conèixer la disposició d'uns <i>loci</i> sobre un cromosoma.
Antineoplàstic	Fàrmac o agent que actua eliminant els tumors o inhibint-ne el creixement.
Apoptosi	Mort cel·lular programada. Procés pel qual l'organisme elimina les cèl·lules danyades, no desitjades o innecessàries. Els mecanismes d'autodestrucció que s'utilitzen en l'apoptosi comporten la degradació i la fragmentació nuclear i l'alliberament de cossos residuals que són fagocitats, sense que els teixits i les cèl·lules veïnes en quedin afectats, a diferència del que succeeix en la necrosi.
ARN	Àcid ribonucleic (en anglès RNA, <i>ribonucleic acid</i>). Molècula sintetitzada a partir del motlle d'ADN; conté ribosa en lloc de la desoxiribosa present en l'ADN. N'hi ha tres tipus principals: missatger (ARNm), de transferència (ARNt) i ribosòmic (ARNr).

Assessorament genètic o consell genètic	Procediment destinat a informar una persona sobre les possibles conseqüències per a ella o la seva descendència dels resultats d'una anàlisi o cribratge genètics i els seus avantatges i riscos i, si s'escau, per assessorar-la en relació amb les possibles alternatives derivades de l'anàlisi. Té lloc tant abans com després d'una prova o cribratges genètics, i fins i tot en absència d'aquests.
Autosòmic dominant	Terme que s'utilitza para descriure un tret associat a un al·lel ubicat en un cromosoma no sexual i que està present en tots els individus que han heretat una còpia d'aquell al·lel. La probabilitat de que el portador de l'al·lel el transmeti a la descendència és de 50% per cada descendent.
Autosòmic recessiu	Tret o patologia associada a un cromosoma no sexual, que requereix la presència de les dues còpies d'un determinat al·lel per a que s'expressi el fenotip.
Biomarcador	Característica mesurable i avaluable que és indicadora d'un procés biològic normal, d'un procés patogènic o de la resposta a un tractament.
BRCAness	Defineix el dèficit en el sistema de reparació per recombinació homòloga, mimetitzant la pèrdua de BRCA1 o BRCA2.
BRCAx	Terme que designa famílies amb sospita de síndrome de càncer de mama i ovari hereditari, no portadores d'una variant patogènica ens els gens <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> .
Clonació posicional	Identificació d'un gen causant d'una malaltia basant-se en la seva localització en el genoma, determinada per diferents mètodes, inclòs l'anàlisi de lligament.
Codó	Seqüència de tres nucleòtids que codifica per un determinat aminoàcid o indica el començament o el final del procés de traducció (codó d'inici, parada o final).
Desequilibri de lligament	En anglès, <i>linkage disequilibrium</i> , LD. Herència simultània i transmesa d'un conjunt de marcadors d'ADN específics durant generacions successives sense que es produeixi recombinació entre ells.

Empalmament	En anglès, <i>splicing</i> . Procés d'eliminació dels introns d'un transcrit primari i connexió posterior dels exons per a produir un ARN madur.
Encebador	En anglès, <i>primer</i> . És una cadena d'àcid nucleic o molècula relacionada d'uns 20 nucleòtids que serveix com a punt de partida per a la replicació de l'ADN.
Epigenètica	Branca de la genètica que estudia els canvis hereditaris d'expressió gènica que no comporten una modificació en la seqüència de l'ADN. Aquests canvis inclouen la modificació de l'estructura de la cromatina mitjançant l'addició de grups metil i la modificació de les histones. La formació de modificacions epigenètiques s'ha relacionat amb diversos factors ambientals, com l'alimentació i les experiències individuals, com un mecanisme d'adaptació individual a cada ambient concret. La major part d'aquestes modificacions dinàmiques són eliminades durant la formació dels gàmetes, per la qual cosa no es transmeten a la descendència. També n'hi ha que es transmeten als descendents i que condicionen llur expressió gènica i d'altres que s'estableixen específicament durant la formació dels gàmetes, fet pel qual només afecten els descendents.
Exó	Seqüència codificant d'ADN.
Expressivitat	També coneguda com heterogeneïtat clínica , defineix el grau de manifestació d'un gen en diferents individus amb una mateixa alteració genètica. Per exemple, en el cas de la síndrome de CMOH es poden presentar tumors en mama, ovari, pàncrees i a més a més en pròstata i estómac en el cas dels homes.
Familiar de primer grau	Qualsevol individu que estigui separat per una meiosi d'un dels membres de la seva família (pare, mare, germans, fills).
Familiar de segon grau	Qualsevol individu que estigui separat per dues meiosis d'un dels membres de la seva família; familiar amb el que un individu comparteix una quarta part dels seus gens (avis, nets, tiets, nebots).

Fenocòpia	Fenotip que, per causes externes, ha canviat fins a assemblar-se a un altre fenotip que normalment correspon a un genotip diferent. Fenotip no hereditari, deguda a causes ambientals, que mimetitza un fenotip produït per un genotip específic.
Fenotip	Conjunt de característiques clíniques d'un individu amb un genotip determinat.
Gen	Unitat física i funcional de l'herència formada per un segment d'ADN que codifica una proteïna específica o un segment d'una proteïna.
Gen supressor	Gen que té com a principal funció suprimir el creixement tumoral. És necessària la inactivació de les seves dues còpies genòmiques per a que es manifesti el fenotip tumoral.
Genotip	Constitució genètica d'un organisme o cèl·lula; també es refereix al grup específic dels al·lels heretats en un locus.
Heterozigot	Individu que té dos al·lels diferents en un locus, un en cada cromosoma, cada un heretat d'un dels progenitors.
Homozigot	Individu que té dos al·lels idèntics en un locus determinat, un en cada cromosoma, heretats de cada un dels progenitors.
Hotspot (àrea hotspot) genètica	Qualsevol regió o seqüència en un gen o cromosoma, susceptible a presentar mutacions amb una freqüència més elevada que les regions o seqüències del voltant.
In silico	Expressió que significa "realitzat mitjançant ordinador o via simulació computacional".
Intró	Seqüència no codificant d'ADN que separa els exons

Letalitat sintètica	Situació en la que dues mutacions, que per sí mateixes no ocasionen cap dany a l'organisme, tenen efectes letals sobre la cèl·lula en combinar-se entre elles. Per exemple, això es produeix quan la via de reparació per escissió de bases i la via de la recombinació homòloga es bloquegen simultàniament, la qual cosa impedeix la reparació de l'ADN, la qual cosa precipita l'apoptosi. En portadors de mutació en els gens <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> , només les cèl·lules tumorals són homozigotes per a la mutació, mentre que les cèl·lules normals mantenen la recombinació homòloga mitjançant l'al·lel funcional. Per tant, la inhibició de PARP només és letal per a les cèl·lules tumorals.
Línia germinal	Línia cel·lular de la que procedeixen o deriven directament els òvuls o els espermatozoides (gàmetes).
Línia somàtica	Línia cel·lular de la que procedeixen totes les cèl·lules d'un organisme excepte els gàmetes.
Locus	Lloc o localització física d'un gen específic en un cromosoma. En plural <i>loci</i> .
LOD score	Logaritme de les probabilitats de què dos gens o <i>loci</i> o un gen i el gen d'una malaltia estiguin lligats i per tant s'heretin junts amb una freqüència superior a l'habitual.
Malaltia monogènica	Malaltia produïda per un sol gen.
Malaltia poligènica	Malaltia produïda per més d'un gen.
Meiosi	Procés de divisió cel·lular consistent en dues divisions nuclears que tenen lloc successivament i en les quals només hi ha una divisió longitudinal dels cromosomes. El nombre de cromosomes de les cèl·lules resultants és la meitat dels de la cèl·lula que es divideix. Les cèl·lules resultants són els gàmetes.
Metabolòmica	Branca de la biologia molecular que s'ocupa de la caracterització dels metabolomes, és a dir, del patró complet dels metabòlits produïts per un organisme, un teixit o una cèl·lula, o dels corresponents a una condició fisiològica concreta.

Microsatèl·lits	<p>Són repeticions de seqüències d'ADN en tàndem (d'1 a 6 nucleòtids) amb una elevada susceptibilitat a l'error durant el procés de replicació.</p> <p>Inestabilitat de microsatèl·lits Alteració en la mida dels microsatèl·lits en les cèl·lules tumorals respecte a les cèl·lules sanes, degut a un mal funcionament dels sistema de reparació de l'ADN MMR.</p>
MLPA	<p><i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>. Tècnica que consisteix en el cribratge de regions de l'ADN mitjançant l'estudi de sondes que hibridaran en diferents punts de la regió d'interès i posteriorment s'amplificaran. Aprofitant les diferents mides dels fragments amplificats, es poden identificar pèrdues o guanys de material genètic. S'utilitza per a l'estudi de grans reordenaments de material genètic.</p>
Mutació	<p>Qualsevol alteració de la seqüència normal d'un gen.</p>
Mutacions deletèries	<p>Mutacions que donen lloc a una funció anòmala del gen i per tant a un fenotip alterat.</p>
Mutació fundadora	<p>Mutació recurrent que prové d'un únic ancestre comú portador, generalment en una població petita amb cert grau d'endogàmia on, després de successives generacions augmenta la seva presència en la població, passant a ser alteracions característiques d'un grup ètnic i/o àrea geogràfica concreta.</p>
Odds Ratio (OR)	<p>Relació que compara la probabilitat de desenvolupar la malaltia en portadors (casos en portadors / no casos en portadors) amb la probabilitat de desenvolupar la malaltia en no portadors (casos en no portadors/no-casos en no portadors).</p>

- Òmiques** Les òmiques (neologisme provinent del sufix llatí <<-oma>> que significa <<conjunt de>>) són un conjunt de tècniques basades en l'anàlisi de la totalitat o un conjunt d'un camp d'estudi gran, en comptes d'analitzar part per part. Les primeres -i principals- òmiques van ser la genòmica, la transcriptòmica, la proteòmica i la metabolòmica, no obstant a mesura que es van millorant les tecnologies d'anàlisi i s'obtenen més dades aquestes es van ramificant i en neixen de noves.
- PCR** *Polymerase chain reaction*, reacció en cadena de la polimerasa. Tècnica d'amplificació de l'ADN que genera milions de còpies d'un segment curt d'ADN en un termociclador (aparell que permet augment i disminució de la temperatura) i mitjançant cicles repetits de : 1) Desnaturalització i per tant separació de les cadenes de la doble hèlix d'ADN (*Melt*), 2) Unió dels primers a l'ADN monocatenari (*Anneal*), fent-lo servir com a motlle, i 3) Extensió mitjançant l'acció de l'enzim ADN polimerasa que allarga l'extrem 3' del primer i copia l'ADN corresponent. El cicle es pot repetir 30 vegades o més i cada ADN nou sintetitzat actua com un nou motlle, per la qual cosa es tracta d'una reacció exponencial. Quan es finalitza aquests procés, es poden arribar a produir més d'un milió de còpies d'ADN.
- Penetrància** Freqüència, expressada en tant per cent, amb què una alteració genètica causant d'una malaltia, present en un conjunt d'individus, es manifesta fenotípicament manifestant signes clínics d'aquesta patologia. La major part de les síndromes de càncer hereditari, a part de presentar un patró d'herència autosòmic dominant, tenen la característica de presentar una penetrància incompleta. La penetrància representa el percentatge de persones que expressen el fenotip, és a dir que desenvolupen càncer, quan són portadores d'una alteració patogènica en el gen que s'estudia. Degut a que el càncer és una malaltia multifactorial, aquesta característica pot ser deguda altres característiques genètiques de l'individu, a causes no genètiques que han influït en l'individu (ambient) i també a característiques pròpies del gen afectat com pot ser la funció que desenvolupa i la localització del gen on es troba alteració.

Pèrdua d'heterozigositat (LOH, loss of heterozygosity)	Situació en la que es produeix la pèrdua al·lèlica d'un gen. Quan en un locus determinat, que es heterozigot per un al·lel mutant deleteri i un al·lel normal, es produeix una deleció o un altre esdeveniment mutacionals en l'al·lel normal, que converteix la cèl·lula en hemizigota (amb 1 sol al·lel deleteri) o homozigota per l'al·lel deleteri.
Polimorfisme	Mutació, amb una freqüència mínima de l'1% en la població genera i que presumiblement no té efectes adversos sobre la funció del gen i per tant no origina un fenotip alterat (la malaltia).
Proband	Individu amb una malaltia hereditària que és investigat en un estudi genètic.
Protooncogen	Gen en el qual l'alteració d'un únic al·lel és suficient per a produir l'activació tumoral. Els protooncogens humans controlen punts estratègics del creixement i diferenciació cel·lular de tal manera que el guany de funció degut a una mutació, un reordenament cromosòmic o una amplificació, els transforma en oncogens que produeixen cèl·lules immortals capaces d'evitar l'apoptosi.
Recombinació homòloga	Mecanisme de reparació de l'ADN que utilitza la cromàtide germana no danyada per a reparar la cadena d'ADN amb doble trencament.
Reordenament cromosòmic	Eliminació, transferència, o multiplicació de segments cromosòmics que origina inestabilitat genòmica.
Risc relatiu (RR)	Probabilitat que compara el risc de desenvolupar una malaltia del grup d'individus que han estat exposats al factor de risc que s'està estudiant, amb el risc de desenvolupar la malaltia del grup no exposat.
Senescència cel·lular	Resposta de les cèl·lules a estímuls que tenen la potencialitat de causar transformacions neoplàsiques.
Seqüenciació massiva (Next generation sequencing, NGS)	Seqüenciació d'alt rendiment. Procés de determinació de la seqüència de nucleòtids d'una molècula d'ADN o d'ARN efectuat amb un mètode que tracta una gran quantitat de dades de manera ràpida i eficaç.

Seqüències ALU	Seqüències d'ADN distribuïdes en el genoma. Són les seqüències repetides més freqüents, i representen el 5% del genoma humà. El seu nom és degut a que l'enzim de restricció Alu les reconeix i les talla.
SNP o Polimorfismes d'un únic nucleòtid	<i>(Single Nucleotide Polymorphism)</i> Variació en la seqüència de l'ADN (respecte a una seqüència consens) que afecta a una única base en posicions concretes del genoma i que s'observa en la població amb una freqüència igual o superior a l'1%.
Supressors tumorals	Aquells gens/proteïnes que regulen la divisió cel·lular evitant un creixement excessivament ràpid o descontrolat.
Ubiqüitinació	Modificació post-traducciona l en la qual es produeix el marcat d'una molècula amb ubiquitina, una proteïna ubi qua altament conservada. El procés d'ubiquitinació és essencial en molts processos com la degradació de proteïnes mitjançant el proteasoma, la reparació de l'ARN o la inflamació. Les cèl·lules eucariotes utilitzen aquest procés per marcar les proteïnes que han de ser destruïdes en els proteasomes.
Variant de significat incert (VUS)	Canvi en la seqüència normal d'un gen, de la qual es desconeix el seu significat biològic (patogenicitat o benignitat).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

APLICACIÓ DE TÈCNiques ÒMIQUES PER A LA MILLORA DEL DIAGNÒSTIC EN LA SÍNDROME DE CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI.

Marta Rodríguez Balada

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

APLICACIÓ DE TÈCNiques ÒMIQUES PER A LA MILLORA DEL DIAGNÒSTIC EN LA SÍNDROME DE CÀNCER DE MAMA I OVARI HEREDITARI.

Marta Rodríguez Balada