

# **GENÓMICA FUNCIONAL PARA LA DESCRIPCIÓN DE MUTACIONES APLICABLES AL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE SENO EN POBLACIÓN COLOMBIANA: ESTUDIO A GRAN ESCALA EN CASOS NO SELECCIONADOS**

**Autor**

**Diana Carolina Sierra-Díaz MD, MSc.**

**Trabajo presentado como requisito para optar por el título de Doctor en  
Ciencias Biomédicas y Biológicas.**

**Director de tesis**

**Carlos M. Restrepo Fernández MD, PhD**

Director del Centro de Investigación en Genética y Genómica de la Universidad del  
Rosario (CIGGUR)

Profesor Titular de Carrera de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud  
(EMCS), Universidad del Rosario

**Co-directora de tesis**

**Dora Janeth Fonseca-Mendoza PhD**

Coordinadora del laboratorio del Centro de Investigación en Genética y Genómica  
de la Universidad del Rosario (CIGGUR)

Profesora Titular de Carrera de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud  
(EMCS), Universidad del Rosario

**Universidad del Rosario**

**Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biológicas**

**Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud**

**2024**

## Tabla de contenido

Lista de tablas .....	6
Lista de figuras .....	8
Lista de anexos .....	10
Lista de abreviaturas .....	11
Resumen .....	13
Summary .....	16
1. Introducción general.....	19
1.2 Epidemiología del cáncer de seno.....	19
1.3 Clasificación y fisiopatología del cáncer de seno.....	20
1.3 Variantes germinales en el cáncer.....	26
2. Capítulo 1: Análisis de una selección comprensiva de genes mediante secuenciación de exoma completo, en 400 mujeres colombianas con cáncer de seno no seleccionado. ....	28
2.1 Introducción.....	28
2.1.1 Variantes germinales en el cáncer de seno.....	28
2.2 Metodología .....	32
2.2.1 Diseño de estudio.....	32
2.2.2 Determinación del tamaño muestral .....	34
2.2.3 Criterios de selección .....	34
2.2.5 Extracción del ADN genómico .....	34
2.2.6 Secuenciación de siguiente generación ( <i>next generation sequencing- NGS</i> ) – Secuenciación de exoma completo ( <i>whole exome sequencing-WES</i> ). 35	
2.2.7 Diseño de la selección comprensiva de genes relacionados con el cáncer de seno .....	36
2.2.8 Análisis bioinformático terciario y determinación de la patogenicidad de las variantes germinales .....	37

2.2.9	Clasificación de las 400 pacientes en los subtipos moleculares de cáncer de seno .....	41
2.2.10	Análisis de regresión logística multivariada (árboles de decisión) de los cinco subtipos moleculares de cáncer de seno.....	41
2.2.11	Análisis ontológico y de vías de señalización de los genes con variantes germinales P/LP.....	42
2.2.12	Confirmación mediante secuenciación de Sanger de las variantes germinales P/LP identificadas por WES en los diez genes con impacto clínico y análisis de segregación familiar.....	42
2.2.13	Detección de CNVs ( <i>copy number variants</i> -CNVs) en los genes <i>BRCA1/2</i> mediante MLPA ( <i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> -MLPA). 42	
2.2.14	Ensayos <i>In vitro</i> para validación funcional de variantes germinales de interés. 44	
2.3	Resultados .....	52
2.3.1	Caracterización de la población de estudio .....	52
2.3.2	Identificación de variantes germinales P/LP en los diez genes con impacto clínico, análisis de segregación familiar y validación funcional de variante intrónica recurrente identificada en el gen <i>ATM</i> c.5496+2_5496+5delTAAG....	55
2.3.3	Identificación de variantes germinales P/LP en 253 genes relacionados con cáncer de seno y análisis de regresión logística multivariada (árboles de decisión) de los cinco subtipos moleculares de cáncer de seno.....	56
2.3.4	Análisis de procesos biológicos y de vías de señalización de los genes con variantes germinales P/LP.....	83
2.3.5	Ensayo de minigenes para la determinación del efecto en el proceso de <i>splicing</i> de las variantes intrónicas candidatas .....	99
2.3.6	Validación funcional de variantes germinales localizadas en la región 3'UTR ( <i>untranslated region</i> -UTR) del gen <i>BRCA1</i> .....	102
2.3.7	Mutagénesis dirigida de variantes germinales, identificadas en el gen <i>BRCA2</i> , candidatas a validación funcional.....	103

2.4	Discusión .....	103
3.	Capítulo 2: Determinación del efecto de las variantes germinales sinónimas en el proceso de <i>splicing</i> .....	126
3.1	Introducción.....	126
3.1.2	Variantes sinónimas asociadas a enfermedades .....	131
3.2	Metodología .....	132
3.2.1	Análisis bioinformático terciario .....	132
3.2.2	Análisis <i>in silico</i> del potencial efecto de las variantes sinónimas en el proceso de <i>splicing</i> .....	132
3.2.3	Análisis de asociación caso-control.....	132
3.2.4	Ensayo de minigenes y RT-PCR.....	133
3.3	Resultados .....	133
3.3.1	Identificación de variantes sinónimas en los diez genes con impacto clínico	133
3.3.2	Predicción <i>In silico</i> del efecto en el proceso de <i>splicing</i> de las variantes sinónimas y determinación de asociación de entre casos y controles .....	134
3.3.3	Determinación del efecto de las variantes sinónimas en el proceso de <i>splicing</i> mediante ensayo de minigenes y RT-PCR pos-transfección .....	147
3.4	Discusión .....	148
4.	Capítulo 3: Descripción de variantes de múltiple nucleótido identificadas de manera incidental en los genes <i>POLD1</i> y <i>BLM</i> .....	151
4.1	Introducción.....	151
4.1.1	Clasificación de las MNVs .....	152
4.1.2	Frecuencia de los MNVs.....	154
4.1.3	Mecanismos causales de las MNVs .....	155
4.2	Metodología .....	161
4.2.1	Determinación de la presencia de MNVs mediante lecturas.....	162
4.2.2	Determinación de la presencia de MNVs mediante separación alélica..	162

4.3	Resultados .....	162
4.4	Discusión .....	164
4.4.1	Patologías asociadas con la presencia de MNVs.....	164
4.4.2	Soluciones para detectar los MNVs.....	167
5.	Conclusiones.....	169
6.	Perspectivas .....	171
7.	Referencias.....	172
8.	Anexos .....	224
8.1	Anexo 1: selección comprensiva de genes relacionados con el cáncer de seno. .....	224
8.2	Anexo 2: publicación titulada “ <i>Germline mutations of breast cancer susceptibility genes through expanded genetic analysis in unselected Colombian patients</i> ”...	243
8.3	Anexo 3: protocolo del CIGGUR: Clonaje en el vector pSpliceExpress - Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix.....	243
8.4	Anexo 4: publicación titulada “ <i>Functional Analysis of BRCA1 3'UTR Variants Predisposing to Breast Cancer</i> ”.....	243
8.5	Anexo 5: lista de procesos biológicos anotados para los genes con variantes germinales P/LP .....	243

## Lista de tablas

Tabla 1. Variables clinicopatológicas, de factores de riesgo y familiares recolectadas .....	32
Tabla 2. Criterios para la clasificación de los subtipos moleculares del cáncer de seno. ....	41
Tabla 3. Variantes germinales intrónicas candidatas para validación funcional y secuencia de primers para clonaje en el plásmido pSpliceExpress. ....	45
Tabla 4. Variantes missense identificadas en los plásmidos de expresión pCAG- <i>BRCA1</i> y pCIN- <i>BRCA2</i> adquiridos de Addgene y secuencia de primers diseñados para realizar mutagénesis dirigida con el kit QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis. ....	50
Tabla 5. Variantes germinales identificadas en la región codificante del gen <i>BRCA2</i> candidatas para validación funcional. ....	51
Tabla 6. Test de normalidad de Shapiro Wilk. ....	52
Tabla 7. Características clinicopatológicas, de factores de riesgo y familiares de las 400 mujeres colombianas con cáncer de seno no seleccionado. ....	53
Tabla 8. Descripción molecular, frecuencias poblacionales y criterios de patogenicidad variantes germinales P/LP identificadas en 105 genes. ....	58
Tabla 9. Características genéticas y de herencia de las pacientes con cáncer de seno Luminal A con variantes germinales P/LP. ....	70
Tabla 10. Características genéticas y de herencia de las pacientes con cáncer de seno Luminal B HER-2 negativo con variantes germinales P/LP. ....	72
Tabla 11. Características genéticas y de herencia de las pacientes con cáncer de seno Luminal B HER-2 positivo con variantes germinales P/LP. ....	74
Tabla 12. Características genéticas y de herencia de las pacientes con cáncer de seno HER-2 enriquecido con variantes germinales .....	75
Tabla 13. Características genéticas y de herencia de las pacientes con TNBC con variantes germinales P/LP. ....	75

Tabla 14. Características genéticas y de herencia de las pacientes sin subtipo molecular de cáncer de seno con variantes germinales P/LP.....	76
Tabla 15. Procesos biológicos anotados para genes con variantes germinales P/LP en el cáncer de seno Luminal A.....	85
Tabla 16. Procesos biológicos anotados para genes con variantes germinales P/LP en el cáncer de seno Luminal B HER-2 negativo.....	87
Tabla 17. Procesos biológicos anotados para genes con variantes germinales P/LP en el cáncer de seno Luminal B HER-2 positivo.....	90
Tabla 18. Procesos biológicos anotados para genes con variantes germinales P/LP en el cáncer de seno HER-2 enriquecido.....	92
Tabla 19. Procesos biológicos anotados para genes con variantes germinales P/LP en el TNBC.....	93
Tabla 20. Vías de señalización KEGG anotadas para los genes con variantes P/LP.....	95
Tabla 21. Descripción molecular, predictores in silico y análisis de asociación de las variantes sinónimas identificadas en los diez genes con impacto clínico en cáncer de seno.....	135
Tabla 22. Características histopatológicas y genéticas de las pacientes con la variante sinónima <i>ATM</i> : c.1176C>G (p.Gly392=).....	148
Tabla 23. Anotación inicial y anotación correcta de las MNVs identificados en los genes <i>POLD1</i> y <i>BLM</i> .....	164

## Lista de figuras

Figura 1. Esquema de las moléculas que intervienen en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga.....	27
Figura 2. Esquema de la interacción gen–ambiente, la presencia de mutación germinal y el efecto que tiene en los procesos celulares que favorecen la carcinogénesis.....	28
Figura 3. Algoritmo detección y determinación de la patogenicidad de variantes germinales identificadas en los diez genes con impacto clínico.....	40
Figura 4. Algoritmo de detección y determinación de la patogenicidad de las variantes germinales identificadas en los 243 genes.....	42
Figura 5. Algoritmo de ensayos <i>In vitro</i> .....	46
Figura 6. Distribución de las 400 pacientes y porcentaje de pacientes con variantes P/LP en los cinco subtipos moleculares.....	71
Figura 7. Análisis de árbol de decisión cáncer de seno Luminal A.....	80
Figura 8. Análisis de árbol de decisión cáncer de seno Luminal B HER-2 Negativo.....	82
Figura 9. Análisis árbol de decisión cáncer de seno Luminal B HER-2 positivo...	83
Figura 10. Análisis árbol de decisión cáncer de seno HER-2 enriquecido.....	84
Figura 11. Análisis de árbol de decisión TNBC.....	85
Figura 12. PCR de las variantes intrónicas identificadas en el gen BRCA1.....	102
Figura 13. PCR de las variantes intrónicas identificadas en el gen BRCA2.....	103
Figura 14. Secuenciación de Sanger de las construcciones WT (pCR4-ATM WT) y Mut ( pCR4-ATM Mut).....	104
Figura 15. Mecanismos de reparación del daño al ADN: BER, NER y MMR.....	108
Figura 16. Mecanismos de reparación al daño en el ADN: NHEJ, HRR y vía de señalización FA.....	109
Figura 17. Generación de aductos de ADN.....	113
Figura 18. Generación de especies reactivas de oxígeno.....	115
Figura 19. Otros procesos/vías de señalización relacionados con la carcinogénesis.....	122
Figura 20. Esquema del flujo de trabajo para el análisis de las variantes sinónimas con herramientas <i>in silico</i> .....	133

Figura 21. RT-PCR y densitometría variante sinónima <i>ATM</i> : c.1176C>G, p.Gly392=.....	149
Figura 22. Tipos de MNVs.....	154
Figura 23. Clasificación de las MNVs intra-codón.....	156
Figura 24. Ejemplo SRS como mecanismo causal de MNVs.....	160
Figura 25. Distribución de MNVs en el genoma y mecanismo causal.....	162
Figura 26. Imágenes tomadas con el programa IGV de las regiones cromosómicas donde se identifica la presencia de las MNVs.....	165
Figura 27. Alineamiento secuenciación de Sanger, MNVs identificados en los genes <i>POLD1</i> y <i>BLM</i> .....	165

## Lista de anexos

Anexo 1: selección comprensiva de genes relacionados con el cáncer de seno.....	220
Anexo 2: publicación titulada “ <i>Germline mutations of breast cancer susceptibility genes through expanded genetic analysis in unselected Colombian patients</i> ”....	239
Anexo 3: protocolo del CIGGUR: Clonaje en el vector pSpliceExpress - Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix.....	239
Anexo 4: publicación titulada “ <i>Functional Analysis of BRCA1 3'UTR Variants Predisposing to Breast Cancer</i> ”.....	239
Anexo 5: lista de procesos biológicos anotados para los genes con variantes germinales P/LP.....	239

## Lista de abreviaturas

WES: whole exome sequencing	SAI: Splice AI
MAF: minor allele frequency	HSF: human splicing finder
MLPA: multiplex ligation-dependent probe amplification	NNS: NNSplice
CNVs: copy number variants	NMD: nonsense mediated decay
P/LP: pathogenic/likely pathogenic	VAF: variant allele frequency
TNBC: triple negative breast cancer	DAVID: database for annotation, visualization and integrated Discovery
MNV: multiple nucleotide variant	WT: wild type
ESS: exon splicing silencer	UTR: untranslated region
ER: estrogen receptor	ORF: open reading frame
PR: progesterone receptor	IMC: índice de masa corporal
BLBC: basal-like breast cancer	LBH2Neg: Luminal B HER-2 negativo
CNAs: copy number aberrations	LBH2Pos: Luminal B HER-2 positivo
NGS: next generation sequencing	GO_BP: gene ontology_biological process
PRE: progesterone response elements	KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes
EMT: epithelial-to-mesenchymal transition	BER: base excision repair
CSCs: cancer stem-like Cells	NHEJ: non-homologous end joining
LOH: loss-of-heterozygosity	NER: nucleotide excision repair
GWAS: genome wide association studies	NT: no transfected
LGR: large genomic rearrangements	Ctrl-: control negativo
WGS: whole genome sequencing	MMR: mismatch repair
NCCN: national comprehensive cancer network	HRR: homologous recombination repair
HGNC: HUGO gene nomenclature committee	FA: Fanconi Anemia
ACMG/AMP: American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology	PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons
ENIGMA: evidence-based Network for Interpretation of germline mutant alleles	COMT: Catecol-O-Metil Transferasa
	CAFs: carcinoma-associated fibroblasts
	IDH: isocitrato deshidrogenasa

SDH: succinato deshidrogenasa  
FH: fumarato hidratasa  
PCK2: phosphoenolpyruvate  
carboxykinase  
MICs: metastasis-initiating cells  
AR: androgen receptor  
SASP: senescence-associated  
secretory phenotype  
GM-CSF: granulocyte macrophage  
colony-stimulating factor  
bFGF: basic fibroblast growth factor  
HMTV: human mammary tumor virus  
VPH: virus del papiloma humano  
HCMV: human citomegalovirus  
SNP: single nucleotide polymorphism  
ESE: exonic splicing enhancer  
RBPs: RNA binding proteins  
SNV: single nucleotide variant  
NGD: No-go mRNA Decay  
ROS: reactive oxygen species

HSR: heat shock response  
ISR: integrated stress response  
pisSNVs: posttranscriptionally impaired  
synonymous SNVs  
MNVs: multiple nucleotide variants  
MNS: multiple nucleotide substitutions  
CSMM: closely spaced multiple  
mutations  
MNPs: multinucleotide polymorphisms  
TBS: tandem bases substitutions  
HGMD: human genome Mutation  
database  
DDT: DNA damage tolerance pathway  
TLS: translesion DNA synthesis  
SRS: serial replication slippage  
TCGA: The Cancer Genome Atlas  
MAC: multi-nucleotide variant  
annotation corrector  
PTC: premature termination codon

## Resumen

**Introducción:** El cáncer de seno es la neoplasia más frecuente a nivel mundial y el tipo de cáncer más importante para la mujer, atribuido hasta en el 10% a mutaciones germinales. A nivel mundial, grandes consorcios han centrado el estudio de variantes germinales en población de origen caucásico. En América Latina, específicamente en Colombia los casos hereditarios y familiares se han estudiado de manera predominante, centrandó el análisis en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. En nuestra población no se ha identificado el perfil genómico en casos no seleccionados en genes diferentes a los mencionados previamente.

**Métodos:** Se analizaron 400 mujeres colombianas con cáncer de seno no seleccionado, mediante WES (*whole exome sequencing*-WES) para 253 genes relacionados con el cáncer de seno. Se generó un algoritmo bioinformático para identificar las variantes moleculares *missense*, *nonsense*, *frameshift* y de *splicing*, con MAF (*minor allele frequency*-MAF)  $\leq 0.01$ . Se realizó análisis de segregación familiar para algunas de las variantes P/LP identificadas en los genes *BRCA2*, *ATM* y *PALB2*. Mediante MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*-MLPA) se evaluó la presencia de CNVs (*copy number variants*-CNVs) en los genes *BRCA1/2*. Adicionalmente se realizó la anotación de los procesos biológicos y las vías de señalización en los genes con variantes germinales P/LP (*pathogenic/likely pathogenic*-P/LP). A nivel estadístico realizó un análisis bivariado para establecer asociaciones entre la presencia de variantes germinales P/LP, en diez genes con impacto clínico (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2*, *TP53*, *RAD51C* y *RAD51D*) y las características clinicopatológicas y de factores de riesgo recolectadas; adicionalmente se realizó un análisis de regresión multivariada (árboles de decisión) de los diferentes subtipos moleculares de cáncer de seno (Luminal A, Luminal B HER-2 negativo, Luminal B HER-2 positivo, HER-2 enriquecido y TNBC (*triple negative breast cancer*-TNBC)). Mediante ensayos *in vitro* se evaluó el efecto de tres variantes germinales.

**Resultados:** Se identificaron 211 variantes germinales P/LP en el 41.5% (105/253) de los genes estudiados, las cuales se encontraron en el 56.7% (227/400) de los casos analizados. 21 de las 211 variantes se identificaron, en el 6% de los casos, en siete de los diez genes con impacto clínico (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* y *RAD51D*). Se realizó análisis de segregación familiar en las familias de los

casos índice con variantes germinales P/LP en los genes *BRCA2* (c.2808\_2811delACAA, p.Ala938Profs\*21; c.3860delA, p.Asn1287Ilefs\*6; c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25), *ATM* (c.5496+2\_5496+5delTAAG) y *PALB2* (c.3350+4A>G). En total se evaluaron 36 familiares, y en 13 de ellos se identificó la variante P/LP estudiada (11 para las variantes del gen *BRCA2* y dos para el gen *ATM*). Se identificó segregación en dos de las variantes analizadas en el gen *BRCA2* (c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25 y c.3860delA, p.Asn1287Ilefs\*6). No se identificaron CNVs en los genes *BRCA1/2*. En los genes con variantes germinales P/LP, se identificaron varios procesos y vías de señalización relacionadas con los *hallmarks* del cáncer, tales como proliferación celular, angiogénesis, inestabilidad genómica (ocasionada por diferentes causas como generación de aductos-ADN debidos al metabolismo de componentes exógenos y al metabolismo de los estrógenos), alteraciones en el microambiente tumoral (secundario a hipoxia y especies reactivas de oxígeno), alteraciones en diferentes vías de reparación del ADN (reparación por recombinación homóloga, reparación *mismatch*, alteraciones en la vía de señalización de la Anemia de Fanconi), alteraciones metabólicas (metabolismo del colesterol, alteración del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y de la glicólisis). Se identificó que las vías de señalización *Pathways in cancer*, *MicroRNAs in cancer*, *Breast cancer* y *Cell cycle*, entre otras, contenían el mayor número de genes portadores de variantes germinales P/LP. El análisis bivariado determinó que las pacientes con variantes P/LP en los genes *BRCA1/2* tenían una edad de diagnóstico menor (mediana de edad: 36 vs 54,  $p=0.0003$ ), la menor parte eran postmenopáusicas (15.35% vs 57.68%,  $p=0.009$ ) y el estadio nodal 2 fue más frecuente en estas pacientes (30.77% vs 9.26%,  $p=0.0425$ ), en comparación con las pacientes sin variante P/LP en los diez genes con impacto clínico. Los análisis de árboles de decisión permitieron establecer predicciones de riesgo para cada subtipo molecular de cáncer de seno; por ejemplo, las pacientes con cáncer de seno luminal B HER-2 negativo, mostraron en el árbol de decisión que la presencia de una variante P/LP en el gen *IRF6* les da una predicción del 88%. El análisis genómico evidenció la presencia de un tipo de variante denominada MNV (*multiple nucleotide variant*-MNV) en los genes *POLD1* y *BLM*, este tipo de variante puede modificar la interpretación del cambio nucleotídico a nivel proteico y dado que no se identifica por los algoritmos bioinformáticos convencionales también puede llevar a resultados falsos positivos o falsos negativos. Los ensayos *in vitro* de las variantes estudiadas demostraron que la

variante intrónica identificada en el gen *ATM* (c.5496+2\_5496+5delTAAG) altera el proceso de *splicing* ocasionando *exon skipping* con un efecto deletéreo potencial en el dominio Pincer de la proteína ATM; la variante sinónima identificada en el mismo gen (c.1176C>G, p.Gly392=), altera un ESS (*exon splicing silencer*-ESS) llevando a la disminución del transcrito con la mutación; y la variante localizada en la región 3'UTR del gen *BRCA1*: c.\*36C>G altera la interacción con el microARN miR-99a-3p, lo que potencialmente evita el desarrollo de TNBC.

Conclusiones: Los resultados obtenidos resaltan la importancia de realizar estudios genómicos en nuestra población ya que cada diferentes procesos migratorios y mutacionales probablemente favorecen la selección de cierto tipo de variantes genéticas, generando un perfil mutacional particular para cada población. Adicionalmente, es importante resaltar el análisis ampliado de genes en las pacientes con cáncer de seno y no solo considerar los diez usualmente aplicados al diagnóstico molecular. En adición, nuestros hallazgos apoyan la importancia de analizar otro tipo de variantes como las sinónimas las cuales aparentemente no alteran la secuencia proteica pero si pueden afectar procesos importantes como el *splicing*, o como las MNVs que pueden llevar a falsos positivos o negativos en el diagnóstico, así como analizar otras regiones del genoma diferentes a las codificantes que podrían alterar la interacción con moléculas que regulan la expresión génica como es el caso de los microARNs.

## Summary

**Introduction:** Breast cancer is the most common neoplasm worldwide and the type of cancer most important for women, with up to 10% attributed to germline mutations. Worldwide, large consortia have focused on the study of germline variants in the Caucasian population. In Latin America, specifically in Colombia, hereditary and familial cases have been predominantly studied, focusing the analysis on the *BRCA1* and *BRCA2* genes. In our population, the genomic profile has not been identified in unselected cases in genes other than those mentioned previously.

**Methods:** 400 Colombian women with unselected breast cancer were analyzed using WES (whole exome sequencing-WES) for 253 genes related to breast cancer. A bioinformatics algorithm was generated to identify missense, nonsense, frameshift, and splicing molecular variants, with MAF  $\leq 0.01$ . Family segregation was analyzed for some P/LP variants identified in the *BRCA2*, *ATM*, and *PALB2* genes. Using MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification-MLPA) the presence of CNVs (copy number variants-CNVs) in the *BRCA1/2* genes was evaluated. Additionally, the annotation of the biological processes and signaling pathways in the genes with P/LP germline variants was carried out. At a statistical level, a bivariate analysis was performed to establish associations between the presence of P/LP germline variants in the ten genes with clinical impact (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2*, *TP53*, *RAD51C*, and *RAD51D*) and the clinicopathological and risk factor characteristics collected; A multivariate regression analysis (decision trees) was also performed on the different molecular subtypes of breast cancer (Luminal A, Luminal B HER-2 negative, Luminal B HER-2 positive, HER-2 enriched and TNBC (triple negative breast cancer-TNBC)). Through in vitro assays, the effect of three germline variants was evaluated; *ATM*: c.5496+2\_5496+5delTAAG, c.1176C>G (p.Gly392=) and *BRCA1*: c.\*36C>G.

**Results:** 211 germline P/LP variants were identified in 56.7% (227/400) of the cases analyzed in 41.5% (105/253) of the genes analyzed, 21 of the 211 variants were identified in seven of the ten genes with impact clinical (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* and *RAD51D*). Family segregation analysis was performed in the families of the index cases with P/LP germline variants in the *BRCA2* (c.2808\_2811delACAA, p.Ala938Profs\*21; c.3860delA, p.Asn1287Ilefs\*6; c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25), *ATM* (c.5496+2\_5496+5delTAAG) and

*PALB2* (c.3350+4A>G) genes. In total, 36 relatives were evaluated, of which 13 tested positive for the presence of the P/LP variant 11 for the *BRCA2* gene variants, and two for the *ATM* gene. Segregation was identified in two of the variants analyzed in the *BRCA2* gene (c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25 and, c.3860delA, p.Asn1287Ilefs\*6). No CNVs were identified in the *BRCA1/2* genes. In the annotation of biological processes and signaling pathways, applied to genes with germline P/LP variants, several processes and signaling pathways related to the hallmarks of cancer were identified, for example, cell proliferation, angiogenesis, genomic instability (caused by different causes such as generation of DNA-adducts due to the metabolism of exogenous components and the metabolism of estrogens), alterations in the tumor microenvironment (secondary to hypoxia and reactive species of oxygen), alterations in different DNA repair pathways (repair by homologous recombination, mismatch repair, alterations in the Fanconi Anemia signaling pathway), metabolic alterations (cholesterol metabolism, alteration of the tricarboxylic acid cycle and glycolysis); Within the signaling pathways annotated for genes with germline P/LP variants, those with the greatest number of genes with mutations were Pathways in cancer, MicroRNAs in cancer, Breast cancer and Cell cycle, among others. The bivariate analysis determined that patients with P/LP variants in the *BRCA1/2* genes have a younger age at diagnosis (median age: 36 vs 54,  $p=0.0003$ ), the minority were postmenopausal (15.35% vs 57.68%,  $p=0.009$ ) and nodal stage 2 is more frequent in these patients (30.77% vs 9.26%,  $p=0.0425$ ), compared to patients without P/LP variant in the ten genes with clinical impact. Decision tree analyzes allowed risk predictions to be established for each molecular subtype of breast cancer. For example, patients with Luminal B HER-2 negative breast cancer showed in the decision tree that the presence of a P/LP variant in the *IRF6* gene gives them a prediction of 88%. The genomic analysis showed the presence of a type of variant called MNV (multiple nucleotide variant-MNV) in the *POLD1* and *BLM* genes. This type of variant can modify the interpretation of the nucleotide change at the protein level and since it is not identified by the conventional bioinformatic algorithms can also lead to false positive or false negative results. In vitro assays of the variants studied demonstrated that the intronic variant identified in the *ATM* gene (c.5496+2\_5496+5delTAAG) alters the splicing process, causing exon skipping with a potentially deleterious effect on the Pincer domain of the ATM protein; the synonymous variant identified in the same gene (c.1176C>G, p.Gly392=), alters an

ESS (exon splicing silencer-ESS) leading to a decrease in the transcript with the mutation; and the variant located in the 3'UTR region of the *BRCA1* gene: c.\*36C>G alters the interaction with the microRNA miR-99a-3p, apparently preventing the development of TNBC.

Conclusions: The results obtained highlight the importance of carrying out population genomic studies since each population is subject to different migratory and mutational processes that probably favor the selection of certain types of genetic variants, generating a particular mutational profile for each population. Additionally, it is important to highlight the analysis of genes additional to those usually evaluated in breast cancer patients, such as the ten genes with clinical impact previously described; analyze other types of variants such as synonymous variants, which apparently do not alter the protein sequence but can affect important processes such as splicing, or MNVs that can lead to false positives or negatives results in the diagnosis, as well as analyzing other regions of the genome other than the coding ones that could alter the interaction with molecules that regulate gene expression, such as microRNAs.

## **1. Introducción general**

### **1.2 Epidemiología del cáncer de seno**

El cáncer es la principal causa de muerte tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo. Su incidencia se encuentra en aumento debido al crecimiento y envejecimiento de la población, así como factores de riesgo como el tabaquismo, el sobrepeso, la inactividad física, y los cambios en los perfiles de reproducción asociados con procesos de urbanización y desarrollo económico. En el año 2022, a nivel mundial se diagnosticaron 20 millones de nuevos casos de cáncer y 9.7 millones de muertes ocasionadas por esta enfermedad (1).

Las tasas de incidencia del cáncer de seno son influenciadas por desigualdades geográficas, encontrándose los mayores valores en regiones con índices sociodemográficos altos, como Norte América y algunas partes de Europa, en comparación con las bajas tasas observadas en algunas partes de África y Asia, regiones con bajos índices sociodemográficos (1–3). Es de resaltar que las tasas de incidencia y de mortalidad no se correlacionan de manera directa, ya que algunos países en transición, a pesar de presentar una baja incidencia tienen altas tasas de mortalidad, que se estiman secundarias al acceso limitado a medidas de detección temprana y tratamientos efectivos o dirigidos (3,4).

El cáncer de seno en mujeres ocupó el segundo lugar en incidencia a nivel mundial en el 2022, con una estimación de 2.3 millones de casos nuevos (11.6% de todos los tipos de cáncer); y es la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo, con 666,000 muertes (6.9% de todas las muertes por cáncer). Para el caso específico de las mujeres, el cáncer de seno es el que se diagnostica con mayor frecuencia y es la principal causa de muertes por cáncer a nivel mundial (1).

En varios países con altos ingresos, a pesar del aumento en la incidencia, se observa una disminución en la tasa de mortalidad debida a la mejoría en los tratamientos y en las políticas de detección temprana, así como la conciencia de la población del cáncer de seno (5). Por el contrario, en los países en transición de Sur América, África y Asia, se observan incrementos tanto en la incidencia como en la mortalidad del cáncer de seno, aparentemente como consecuencia de la poca cobertura de los servicios de salud (6–10).

En Colombia, las tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de seno para el año 2018, fueron de 18.69 y 10.48 por 100,000 respectivamente (11). Adicionalmente, un

estudio reciente evidenció que el MIR (*mortality-to-incidence ratio*-MIR) del cáncer de seno en Colombia fue del 0.30, sugiriendo una elevada tasa de mortalidad en comparación con la tasa de incidencia. Adicionalmente, este estudio evidenció que la carga del cáncer de seno está incrementando debido a factores como el envejecimiento de la población y otros factores de riesgo modificables (12).

La edad promedio en la que se diagnostica el cáncer de seno es a los 61 años, el 20% de los casos se identifican en mujeres menores de 50 años y el 43% se presentan en mujeres con edades mayores o iguales a los 65 años (13). El cáncer de seno es una enfermedad multifactorial de etiología compleja en la que convergen factores de riesgo genéticos y ambientales. Dentro de los factores de riesgo ambientales se encuentran el sobrepeso o la obesidad, el tabaquismo, la exposición a radiación, el uso de terapia de reemplazo hormonal en el período postmenopáusico, la inactividad física, el consumo de alcohol, una historia menstrual larga (menarquia temprana y menopausia tardía), el uso de anticonceptivos orales, la nuliparidad o una edad tardía del primer nacimiento (14). Algunos de estos factores de riesgo son modificables, lo que ha permitido una disminución en la incidencia del cáncer de seno.

De acuerdo con un estudio realizado en gemelos monocigóticos y dicigóticos de origen noruego, sueco, danés y finlandés, el cáncer de seno no familiar tiene una heredabilidad del 31% en esas poblaciones de estudio, lo que resalta la importancia de los factores de riesgo genéticos en el desarrollo de la patología (15). Por lo tanto, se considera un factor de riesgo el antecedente de un familiar en primer grado de consanguinidad afectado por cáncer de seno.

### **1.3 Clasificación y fisiopatología del cáncer de seno**

El cáncer de seno es una patología heterogénea que puede ser clasificado utilizando distintas variables como las células a partir de las cuales se origina, el patrón histológico, el inmunofenotipo y su naturaleza en hereditario (incluye el familiar) o esporádico, los cuales se detallan en los siguientes párrafos.

El cáncer de seno hereditario representa del 5-10% de todos los casos y presenta un patrón de herencia autosómico dominante; se manifiesta de manera temprana, puede ser bilateral o afectar a hombres o presentarse junto con cáncer de ovario, en lo que se denomina síndrome de cáncer de seno y ovario hereditario (16). En el cáncer de seno hereditario, se han identificado variantes germinales causales en diferentes

genes como *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN* y *ATM*, entre otros, siendo los dos primeros los que tienen una mayor correlación (medida a través de la correlación entre el genotipo y el fenotipo). La penetrancia es una variable genética que estima la proporción de individuos portadores de una mutación particular que expresan el rasgo y evidencian los signos clínicos de la enfermedad asociada, pertenecientes a una población específica con este tipo de cáncer (17,18).

En adición, existen otras condiciones de cáncer hereditario asociadas a la glándula mamaria como el cáncer de seno hereditario asociado a los genes *BRCA1* y *BRCA2*, el síndrome de Li-Fraumeni (debido a variantes en el gen *TP53*), la ataxia telangiectasia (gen *ATM*), el síndrome Cowden (gen *PTEN*), el síndrome Peutz–Jeghers (gen *STK11*), el síndrome de Lynch tipo II (variantes en los genes *MLH1* y *MSH2*), incluyendo algunas variaciones consideradas de herencia autosómica recesiva (18).

La clasificación histológica del cáncer de seno se basa en el tipo de células que lo originan y el patrón de crecimiento: el 70-80% de los carcinomas invasivos se clasifican como ductales infiltrantes de tipo no específico y el 10% son clasificados como carcinomas lobulares invasivos. Los demás carcinomas de seno invasivos hacen parte de los tipos mucinoso, cribiforme, micropapilar, papilar, tubular, medular, metaplásico y apocrino (19).

De acuerdo con el inmunofenotipo y observando la expresión de los receptores de estrógenos, de progesterona y la sobreexpresión de la proteína HER-2, el cáncer de seno se clasifica en receptor de estrógenos positivo (*estrogen receptor positive-ER+*), receptor de progesterona positivo (*progesterone receptor positive-PR+*) y HER-2 positivo (HER-2+). ER y PR son receptores nucleares de esteroides sexuales que favorecen el crecimiento del tejido epitelial del seno; estos receptores se encuentran expresados en ~75% de los cánceres de seno y su presencia es predictor de una adecuada respuesta a la terapia hormonal, debido a que usualmente el cáncer de seno positivo para receptores hormonales ER y PR suele ser menos agresivo (20). La sobreexpresión de la oncoproteína HER-2 en el cáncer de seno se debe a un fenómeno de amplificación génica (localización citogenética de HER-2 en 17q12, región que se encuentra amplificada en diferentes tipos de tumores), y se observa en aproximadamente el 15% de los cánceres de seno. La sobreexpresión de HER-2 se asocia a una evolución clínica más agresiva y un peor pronóstico, aunque también es predictor de respuesta a los medicamentos anti-HER-2 como el anticuerpo

monoclonal trastuzumab (21). El cáncer de seno que no expresa receptores hormonales y no sobreexpresa HER-2, se clasifica como triple negativo (*triple negative breast cancer-TNBC*), el cual representa el 10-15% de los cánceres de seno, tiene un pronóstico pobre y no se beneficia de las terapias actuales (22).

En cuanto a los aspectos moleculares, el cáncer de seno es clasificado de acuerdo con el perfil de expresión génica en 4 tipos (subtipos intrínsecos –PAM50): en Luminal A, Luminal B, sobreexpresión de HER-2, y el cáncer de seno de tipo BLBC (*basal-like breast cancer* o BLBC). El cáncer de seno Luminal A (ER+, PR mayor o igual que 20%, HER-2 -, Ki67<20%), es el subtipo molecular más frecuente (40-50% del carcinoma de seno invasivo), tiene el mejor pronóstico y se beneficia de la terapia hormonal. El subtipo Luminal B (ER+, PR<20% y/o HER-2+ y/o Ki67 mayor o igual que 20%), tiene peor pronóstico que el Luminal A porque evidencia menor expresión de genes relacionados con ER, presenta mayor expresión de genes relacionados con proliferación celular y puede ser candidato para adicionar quimioterapia a la terapia hormonal. El subtipo con sobreexpresión de HER-2 (ER-, PR-, HER-2+), corresponde al aproximadamente 15% de los carcinomas de seno invasivo, se caracteriza por la sobreexpresión de los genes localizados en la región cromosómica 17q12, tiene una evolución clínica agresiva, aunque responde favorablemente a la terapia anti-HER-2. El cáncer de seno tipo BLBC (ER-, PR- y HER-2-), se asocia con la disfunción de genes normalmente expresados en las células mamarias basales/mioepiteliales, incluyendo citoqueratinas, por lo que tiene un alto índice de proliferación y pobre pronóstico y el 40% de los pacientes presentan recidiva tumoral en los cinco años posteriores al diagnóstico (23).

Adicionalmente, el cáncer de seno se clasifica basándose en la presencia de variantes genéticas heredadas, junto con alteraciones en el número de copias adquiridas (*copy number aberrations-CNAs*), que contribuyen a la carcinogénesis, mediante la expresión anormal de ciertos genes. Este tipo de clasificación fue denominada “*integrative clusters*” (IntClust) o agrupamientos integradores. En la actualidad, el cancer de seno ha sido clasificado molecularmente en 10 subtipos de IntClust (24). Con el uso de NGS (*next generation sequencing-NGS*), se detectan simultáneamente diversos tipos de variantes y alteraciones en el número de copias que afectan genes implicados en procesos biológicos necesarios para el adecuado funcionamiento celular, a lo que se le ha denominado firma mutacional (*mutational signature*) (23,25).

En cuanto a la fisiopatología se encuentran involucradas distintas vías de señalización que inicialmente favorecen el desarrollo normal de la glándula mamaria. Una de estas vías de señalización involucra a los receptores de estrógenos (ER). ER comprende una familia de proteínas de receptores de membrana (la mayoría acoplados a proteínas G) y receptores nucleares ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$  que son codificados por los genes *ESR1* y *ESR2*, respectivamente). Los receptores nucleares funcionan como factores de transcripción que regulan la expresión de genes blanco de forma directa o mediante la interacción con los llamados ERE (elementos de respuesta a estrógenos o ERE).  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  actúan mediante la formación de homodímeros o heterodímeros. Cuando los estrógenos interactúan con  $ER\alpha$ , se expresa ciclina D1, que activa a CDK4 y CDK6 y favorece el paso en el ciclo celular de la fase G1 a la fase S, con lo cual se promueve la proliferación celular (y de forma patológica el crecimiento tumoral). La comprensión de esta vía de señalización permitió el desarrollo de medicamentos como el tamoxifeno y el fulvestrant que son antagonistas de  $ER\alpha$ , y el palbociclib y el ribaciclib que son inhibidores de CDK4/6. En la medida que avanza el desarrollo del tumor de la mama, se ha evidenciado una disminución en la expresión del receptor  $ER\beta$ , lo que sugiere una función de supresor tumoral de este receptor. Otro factor supresor tumoral que inhibe la vía de señalización mediada por  $ER\alpha$  es la proteína del gen *BRCA1* (26).

Por otra parte, los receptores de progestágenos (PR) son una familia de super-receptores de membrana esteroideos que actúan como factores de transcripción dependientes de la unión con el ligando. Están compuestos por un dominio C-terminal de interacción con el ligando, un dominio central de unión al DNA y un dominio N-terminal. En su interior se identifican dos dominios de activación transcripcional, llamados AF1 que se localiza en el dominio N-Terminal y AF2 presente en el dominio de interacción con el ligando, sobre los que interactúan proteínas co-reguladoras. Existen dos isoformas de PR producidas mediante promotores alternativos: PR-B es el receptor de tamaño completo que contiene un dominio AF3 que está ausente en la isoforma PR-A y PR-A con ausencia de los primeros 164 aminoácidos. Los PR se dimerizan para regular la transcripción de los genes blanco, a través de la interacción con los PRE (*progesterone response elements*-PRE). La activación de los PR es secundaria a la interacción con la progesterona y se relaciona con el cáncer de seno mediante la regulación de vías de señalización involucradas en procesos como la

proliferación celular mediante la interacción con HER-2, proteína que posteriormente forma un complejo transcripcional con STAT3, favoreciendo la expresión de Ciclina D1. Además del aumento de la expresión de Ciclina D1, la interacción entre PR y EGFR permite la activación de las vías de señalización de c-Src, MAPKs y PI3K/AKT, las que finalmente se traducen en el aumento en la proliferación celular. También se ha demostrado que ER y PR interactúan entre sí, regulando la expresión de genes blanco de PR. Estudios *In vitro* han mostrado que la progesterona regula la migración celular y disminuye la expresión de E-cadherina, evento necesario para la transición epitelio-mesenquimática (*epithelial-to-mesenchymal transition*-EMT). La activación de los PR también se ha asociado con la sobre-expresión de la proteína Wnt1, miembro de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina, la cual se encuentra desregulada en el cáncer de seno (27).

Otra vía de señalización que se asocia con el desarrollo del cáncer de seno es la vía regulada por los receptores de los factores de crecimiento epidérmicos humanos (EGFRs o HERs). La proteína HER-2 pertenece a esta familia de receptores, los cuales son del tipo tirosina quinasa, tienen un dominio extracelular (unión con el ligando), un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Luego de la unión con el ligando, HER-2 sufre un proceso de dimerización y fosforilación del dominio intracelular, que posteriormente activa las vías de señalización MAPK y PI3K relacionadas con la progresión del ciclo celular, la supervivencia y proliferación celular. Recientemente se han identificado nuevos actores en esta vía de señalización, como la proteína MED1, que actúa como intermediario en la génesis tumoral mediada por HER-2. HER-2 también favorece el desarrollo de procesos inflamatorios y la expansión de las células madre-similares *stem-like* cancerosas (*cancer stem-like Cells* -CSCs) en el cáncer de seno. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales dirigidos contra HER-2, como el trastuzumab, pertuzumab, lapatinib y el T-MD1, estos medicamentos han mejorado el pronóstico de las pacientes que sobre-expresan HER-2 (26,28,29).

Como se mencionó previamente, en el cáncer de seno se encuentra desregulada la vía de señalización canónica Wnt/ $\beta$ -Catenina. Esta vía se activa cuando las proteínas Wnt interactúan con los receptores Frizzled y LRP5/6; interacción que lleva al reclutamiento de las proteínas Axina y Dishevelled y a la posterior inhibición de la proteína GSK-3 $\beta$  (proteína relacionada con el proceso de la degradación proteosómica de la

$\beta$ -Catenina). La inhibición de GSK-3 $\beta$  conduce a la acumulación citoplasmática de la  $\beta$ -Catenina, ésta se transloca al núcleo donde actúa como un activador co-transcripcional, junto con la proteína CBP y los factores de transcripción TCF/LEF, regulando de manera positiva la expresión de oncogenes como *MYC* y *CCND1*. Se ha demostrado una expresión estable de  $\beta$ -Catenina en el 50% de los cánceres de seno, principalmente en el tipo TNBC y también la activación de esta vía se ha asociado con resistencia a la radioterapia y a algunos medicamentos anti cáncer y con el mantenimiento de las propiedades de las células madre mamarias (26).

Un proceso biológico que se encuentra alterado en el cáncer de seno es la reparación por recombinación homóloga: cuando ocurre una ruptura de doble hebra en el DNA por agentes como la radiación o por especies reactivas de oxígeno, la célula puede sufrir procesos como senescencia, apoptosis o el desarrollo de mutagénesis. Uno de los mecanismos por los cuales se repara este daño es el de recombinación homóloga a través de proteínas como MRE11, NBS1, RAD50, ATM, BRCA1, BRCA2, PALB2, RAD52 y RAD51, entre otras (Figura 1) (30,31).

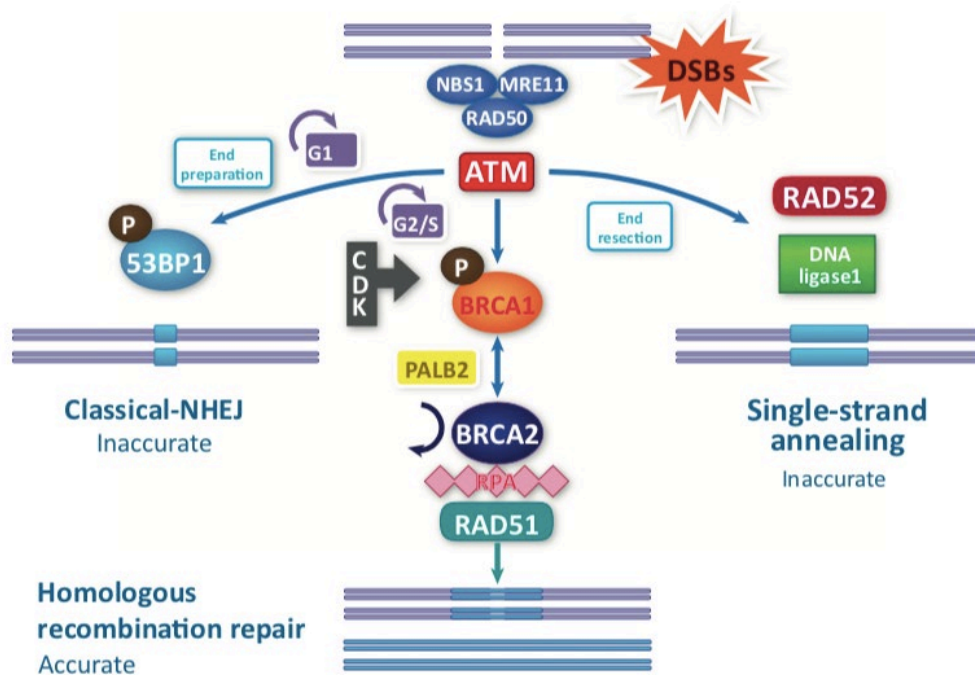


Figura 1. Esquema de las moléculas que intervienen en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga. Figura tomada de la referencia (31).

### 1.3 Variantes germinales en el cáncer

La carcinogénesis es un proceso complejo que es desencadenado por factores externos (ambientales) y genéticos. El evento inicial que favorece la carcinogénesis es el desarrollo de mutaciones conductoras o *driver* en genes (supresores tumorales u oncogenes), que codifican para proteínas que regulan vías de señalización o procesos celulares. Estas mutaciones alteran el funcionamiento proteico: en los genes supresores tumorales las mutaciones inactivan la proteína y en los oncogenes las mutaciones favorecen la activación proteica o confieren nuevas funciones; ambos mecanismos llevan a la transformación de la célula normal a una célula cancerosa. Posteriormente, el genoma de la célula cancerosa continúa acumulando mutaciones (mutaciones *passenger*), que producen inestabilidad genética (Figura 2) (32,33).

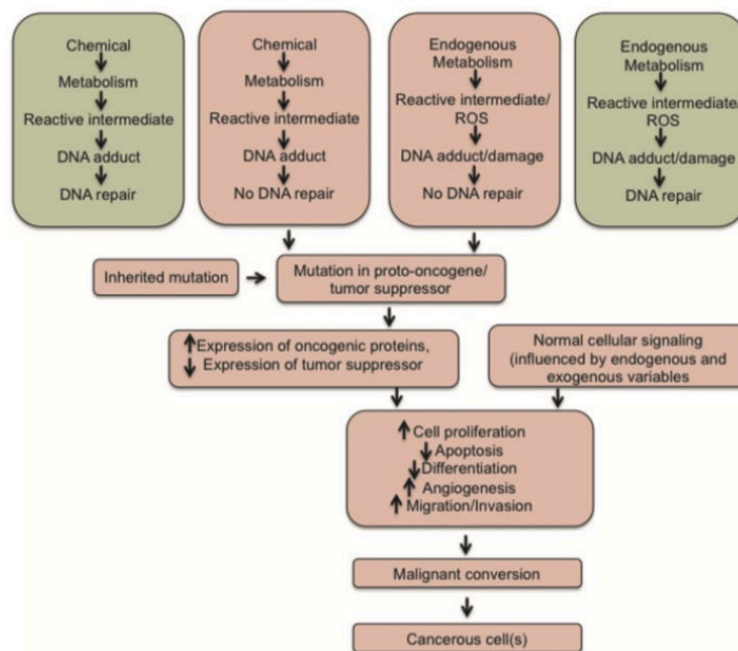


Figura 2. Esquema de la interacción gen–ambiente, la presencia de mutación germinal y el efecto que tiene en los procesos celulares que favorecen la carcinogénesis. Figura tomada de la referencia (32)

Las vías de señalización que se encuentran afectadas en mayor medida por mutaciones *driver*, son las de crecimiento y proliferación celular, la angiogénesis (reguladas a la alta), y la apoptosis (regulada a la baja). Durante la tumorigénesis (carcinogénesis), la célula es sometida a diversos tipos de estrés como la señalización excesiva, los daños en el ADN, la hipoxia, la escasez de nutrientes y la terapia anticáncer. Sin embargo, la célula cancerosa es capaz de sobrevivir al estrés

ocasionado por este proceso (34). La identificación de mutaciones *driver* es esencial para entender la biología tumoral y para el desarrollo de terapias dirigidas.

Las alteraciones genéticas que afectan el funcionamiento normal de la célula pueden ser germinales o somáticas. Las variantes germinales se han asociado con diferentes características de los tumores como los subtipos histopatológicos, las huellas mutacionales, la inestabilidad microsatelital, cambios en el número de copias y la pérdida de la heterocigosidad (35). Por ejemplo, se ha descrito la alta prevalencia de mutaciones germinales en el gen *BRCA1* y su asociación con el cáncer de seno TNBC (36). En relación con las huellas mutacionales, se ha determinado una mayor frecuencia de sustituciones C>T en los dinucleótidos CpG (35).

Las variantes germinales se asocian con las variantes somáticas, que ocurren en el mismo locus, a través de un proceso denominado pérdida de la heterocigosidad (*loss-of-heterozygosity*-LOH). LOH representa lo que Albert Knudson planteó en 1971 y hoy en día se conoce como la hipótesis del doble golpe. Knudson observó que los pacientes que heredaban variantes germinales patogénicas presentaban retinoblastoma de manera más temprana que la población general (37). De acuerdo con lo mencionado previamente, las variantes germinales en el cáncer se asocian a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, a una presentación más temprana y a fenotipos específicos.

## **2. Capítulo 1: Análisis de una selección comprensiva de genes mediante secuenciación de exoma completo, en 400 mujeres colombianas con cáncer de seno no seleccionado.**

### **2.1 Introducción**

#### 2.1.1 Variantes germinales en el cáncer de seno

Se ha informado que el 5-10% de los cánceres de seno están asociados a variantes germinales en los genes *BRCA1/2* (38,39). Estudios previos han mostrado la asociación entre la presencia de variantes germinales en los genes *BRCA1/2* y el riesgo acumulado de desarrollar cáncer de seno, cáncer de seno contralateral, cáncer de seno a una edad más temprana, y el riesgo de desarrollar otros tipos de cáncer (cáncer de próstata, gástrico, páncreas y melanoma) (40–47).

Los estudios realizados en América Latina se han enfocado principalmente en identificar mutaciones germinales en *BRCA1/2* en el cáncer de seno y ovario familiar, y algunos otros, en casos no seleccionados de cáncer de seno y de ovario (48–54). En Colombia, la mayoría de los estudios se han centrado en analizar casos familiares y hereditarios de cáncer de seno y ovario. El objetivo de estos estudios se ha enfocado en determinar la prevalencia de las mutaciones identificadas en los genes *BRCA1/2* (55–58). Pocos estudios han analizado casos no seleccionados de cáncer mamario; sin embargo, los genes analizados en esta población particular fueron *BRCA1/2* (56,59).

Probablemente este tipo de estudios se están realizando debido a que las mutaciones germinales identificadas en los genes *BRCA1/2*, no explican completamente la heredabilidad del cáncer de seno. Hasta la fecha, este tipo de estudios no han sido realizados en una muestra representativa de la población colombiana, por lo que hace algunos años, se están realizando estudios cuyo objetivo es identificar mutaciones germinales en pacientes con cáncer de seno más allá de los genes *BRCA1/2*. La mayoría de estos estudios analizaron aquellos genes considerados como de penetrancia alta y moderada) (60–63). Métodos para la identificación de genes y de variantes genéticas asociadas con la etiología del cáncer

La identificación de las variantes genéticas (germinales y somáticas) es fundamental para determinar cuáles son los *loci* asociados a enfermedades complejas como el cáncer, seguidos de el mapeo fino de la región cromosómica y así poder identificar los genes asociados al fenotipo. Dentro de las aproximaciones utilizadas para este fin

se han realizado análisis de ligamiento, estudios de asociación del genoma completo (*genome wide association studies*-GWAS) y la secuenciación de siguiente generación (*next generation sequencing*-NGS), entre otras (64,65).

- El análisis de ligamiento

En el análisis de ligamiento, se observa la co-segregación de marcadores genéticos que están en desequilibrio de ligamiento con las regiones donde se encuentran los genes asociados a un fenotipo. Los marcadores genéticos se localizan en diferentes cromosomas, permitiendo la identificación de una región particular del genoma o *locus*, donde se ubican los genes asociados a un rasgo de interés. Se fundamenta en un modelo de herencia de genotipos y fenotipos observados en un pedigrí. Este es uno de los métodos que permite realizar el mapeo genético mediante la obtención de las distancias génicas expresadas en unidades de recombinación (centiMorgan-cM). Un cM corresponde a un millón de pares de bases en la especie humana (66,67). En el cáncer de seno, específicamente, genes hoy considerados como de alta penetrancia como *BRCA1* y *BRCA2* han sido identificados a través de esta aproximación (68,69).

- El estudio de asociación del genoma completo (GWAS)

El GWAS es un estudio de asociación fundamentado en la hipótesis que propone que los polimorfismos comunes (clásicamente definidos como aquellos con una frecuencia alélica mínima, *minor allele frequency* -MAF mayor al 1%), pueden contribuir al desarrollo de las enfermedades comunes (70). En el GWAS se realiza la genotipificación de variaciones de nucleótido único o SNPs distribuidos a lo largo del genoma, con el objetivo de encontrar las variantes genéticas frecuentes relacionadas con un fenotipo o variantes relacionadas con rasgos cuantitativos heredables (71). A diferencia de los análisis de ligamiento, en el GWAS se estudian casos y controles no emparentados de una población particular. El tamaño de la muestra de estudio y el número de SNPs evaluados es importante, ya que influye en el poder de detección de los polimorfismos relacionados con la enfermedad. Adicionalmente, se debe evitar la estratificación poblacional en los casos, definida esta como la presencia de múltiples subgrupos en una población que difieren en la prevalencia de la enfermedad. Esto puede conducir a una sobrerrepresentación de un subgrupo poblacional en el que la frecuencia del marcador genético sea diferente, conduciendo a una falsa o espuria asociación (71).

Un SNP con una frecuencia mayor en casos que en controles se relaciona con el fenotipo de estudio. Esta asociación es directa cuando el SNP es la variante implicada con el rasgo e indirecta cuando el SNP se encuentra en desequilibrio de ligamiento con un *locus* donde se localizan los genes asociados (72,73).

Hasta el año 2017, en cáncer de seno se habían realizado 28 GWAS, mediante los cuales se identificaron un número de *loci* de susceptibilidad para diferentes poblaciones: 70 para población transétnica, 70 para población europea, ocho para asiáticos del este, tres para africanos, dos para latinos, y un *locus* para la población judía Ashkenazi (74).

- MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification-MLPA)

El MLPA es un método que permite la identificación de CNVs (*copy number variants*-CNVs), mediante un ensayo de PCR múltiplex en el que se utilizan en promedio 40 sondas específicas para diferentes regiones del gen de interés; así, MLPA evalúa el número de copias relativo de cada secuencia de ADN. Las sondas están compuestas por dos mitades (mitad 5' y 3', una de estas mitades tiene un marcaje fluorescente), las cuales están compuestas por una secuencia específica de la región blanco, y también hay un *primer* universal que permite la amplificación en la PCR múltiplex de todas las sondas. Además de la característica mencionada, las sondas contienen una secuencia *stuffer*, necesaria para la diferenciación de la longitud de la sonda durante la electroforesis y, por consiguiente, el tamaño del producto amplificado (75,76).

Este método tiene diversas aplicaciones debido a que los CNVs se encuentran relacionados con múltiples enfermedades. En el cáncer de seno, se ha utilizado para detectar LGR (*large genomic rearrangements*-LGRs) en genes como *BRCA1* (1/3 de todas las alteraciones que pueden ser patogénicas en varias poblaciones) y *BRCA2* (los LGRs en este gen son menos frecuentes). La alta frecuencia de LGRs en el gen *BRCA1* está explicada por la alta densidad de repeticiones Alu intrónicas, en comparación con el gen *BRCA2*, lo que favorece alteraciones en la recombinación homóloga en estas regiones, generando un "hot spot" mutacional (77).

- Secuenciación de siguiente generación (NGS)

El desarrollo de la tecnología de NGS ha permitido la genotipificación de alta resolución de numerosos genes de manera simultánea, lo que es ideal para el estudio de enfermedades como el cáncer. Mediante NGS se puede realizar secuenciación del genoma completo (*whole genome sequencing*-WGS), secuenciación del exoma completo (*whole exome sequencing*-WES) y secuenciación de un número particular

de genes asociados a fenotipos específicos (paneles multigénicos, dirigidos o comprensivos), permitiendo la detección de mutaciones o variantes en el ADN que pueden estar asociadas con síndromes de cáncer hereditario o con cáncer esporádico. A través de la tecnología de NGS también se pueden detectar transcritos alternativos de un gen mediante RNA-seq (78).

Algunas de las metodologías antes citadas se fundamentan en la identificación de variantes frecuentes o comunes asociadas al fenotipo complejo de estudio. Sin embargo, las patologías complejas como el cáncer de seno también son influenciadas por variantes genéticas de baja frecuencia (MAF del 1% al 5%) y variantes raras (MAF menor al 1%). Cuando se analizan este tipo de variantes, la hipótesis se basa en que el efecto sobre el fenotipo va a ser mayor, en especial, si las variantes se encuentran en las regiones codificantes ya que pueden influir en el funcionamiento proteico (79). En los últimos años, estas hipótesis basadas en MAF han sido la base de varios estudios con el objetivo principal de determinar la heredabilidad perdida en varios tipos de cáncer, tales como el cáncer de próstata, los gliomas, el cáncer de seno y los cánceres de pulmón, tiroides, de ovario, páncreas y melanoma. En estos estudios se ha intentado demostrar la asociación entre la presencia de variantes germinales raras con efecto deletéreo o patogénico y el riesgo de desarrollar cáncer, la severidad y, en algunos casos, la respuesta a tratamientos como la radioterapia (80–95).

Aunque los resultados de algunos de estos estudios no son concluyentes, los autores indican la necesidad de continuar realizándolos en poblaciones específicas y con tamaños de muestra apropiados, ya que a partir de los resultados positivos se pueden identificar probables nuevos biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y tratamiento. En este mismo sentido, se han combinado el método de análisis de ligamiento con WES (para variantes germinales raras), como herramienta para la identificación de genes candidatos, en patologías como el cáncer colorrectal y el síndrome de poliposis serrada (96,97).

Con todo lo mencionado hasta ahora, se da contexto y se demuestra la complejidad de la fisiopatología molecular del cáncer de seno, la importancia de explorar a profundidad el funcionamiento de los genes implicados en diferentes vías de señalización y procesos celulares, y la importancia de variantes germinales (específicamente las variantes germinales raras), en la determinación de la heredabilidad de esta enfermedad. A partir de este entendimiento será posible identificar nuevos genes o reformular el papel de genes ya conocidos que confieran

susceptibilidad a desarrollar el fenotipo, así como a detectar posibles blancos terapéuticos, como se ha venido haciendo desde el pasado.

## 2.2 Metodología

### 2.2.1 Diseño de estudio

Se realizó un estudio observacional prospectivo de prevalencia y multicéntrico. Se incluyeron pacientes en cinco regiones y/o departamentos de Colombia: Caribe, Antioquia, Valle del Cauca, Centro y Santanderes.

El protocolo fue aprobado por los Comités de Ética institucionales de la Fundación Cardioinfantil-Instituto de Cardiología y de la Universidad del Rosario, se realizó basado en los lineamientos de la declaración de Helsinki y las normas nacionales e internacionales para el manejo de datos personales. Todas las pacientes firmaron consentimiento informado previo a su enrolamiento.

Se recolectaron variables clinicopatológicas, de factores de riesgo y familiares de las pacientes. En la Tabla 1 se describen y definen las variables recolectadas:

Tabla 1. Variables clinicopatológicas, de factores de riesgo y familiares recolectadas

<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Definición Operativa</b>
<i>Identificación</i>	Número único de Identificación	Secuencia numérica
<i>Fecha de nacimiento</i>	Fecha de nacimiento del paciente	Fecha en Formato DD:MM:AAAA
<i>Fecha de diagnostico</i>	Fecha de diagnóstico del cáncer de seno	Fecha en Formato DD:MM:AAAA
<i>Edad</i>	Edad en años al momento del diagnostico	Tiempo transcurrido entre fecha de nacimiento y fecha de diagnóstico
<i>Diagnostico histopatológico</i>	Diagnóstico histopatológico del cáncer de mama (ductal, lobulillar, otro)	Diagnóstico histopatológico reportado en informe de patología
<i>Receptor de estrógenos</i>	Estado de expresión del receptor de estrógeno establecido por inmunohistoquímica	Estado del receptor de estrógeno reportado en informe de patología
<i>Receptor de Progestágenos</i>	Estado de expresión del receptor de progesterona establecido por inmunohistoquímica	Estado del receptor de progesterona reportado en informe de patología
<i>HER-2</i>	Estado de expresión de HER-2 establecido por inmunohistoquímica, 0 o + se considera negativo, ++ se considera equivoco, +++ se considera positivo	Estado del receptor de HER-2 reportado en informe de patología
<i>Ki67</i>	Estado de expresión del Ki67	Estado de expresión del Ki67 reportado en informe de patología
<i>Tamaño tumoral</i>	Tamaño tumoral al momento del diagnóstico, establecido por métodos clínicos, imagenológicos o anatomopatológicos	Tamaño tumoral en milímetros establecido mediante la técnica disponible en orden: medición clínica, estudio imagenológico y estudio anatomopatológico

<i>Estadio nodal</i>	Compromiso nodal por cáncer de seno	Presencia de compromiso nodal establecido por la técnica disponible en orden: valoración clínica, estudio imagenológico y estudio anatomopatológico
<i>Número de ganglios comprometidos</i>	Número de ganglios comprometidos	Número de ganglios comprometidos por cáncer de seno establecido por la técnica disponible en orden: valoración clínica, estudio imagenológico y estudio anatomopatológico
<i>Invasión linfovascular</i>	Invasión linfovascular por el tumor	Presencia de invasión linfovascular reportado en informe de patología
<i>Metástasis</i>	Presencia de metástasis de cáncer de seno	Presencia de metástasis de cáncer de seno establecido por TAC, radiografías, ecografía o técnicas de medicina nuclear
<i>Estadio tumoral</i>	Estadio tumoral establecido mediante la clasificación TNM del AJCC	Estadio tumoral establecido mediante la clasificación TNM del AJCC
<i>Paridad</i>	Estado de reproductivo (presencia de embarazos)	Presencia de embarazos previos al diagnóstico de cáncer de seno
<i>Número de hijos</i>	Número de hijos	Número de hijos nacidos vivos
<i>Lactancia materna</i>	Alimentación con lactancia materna a hijos	Alimentación con lactancia materna a hijos
<i>Peso</i>	Peso en kilogramos	Peso en Kilogramos medido en la 1ra visita
<i>Talla</i>	Talla en centímetros	Talla en centímetros medido en la 1ra visita
<i>Índice de masa corporal</i>	Índice de masa corporal	Cálculo de peso en kg/talla en metros elevado al cuadrado
<i>Sobrepeso</i>	Presencia de sobrepeso	Presencia de sobrepeso establecido como un IMC mayor a 25 y menor a 28
<i>Tabaquismo</i>	Presencia de historia personal de tabaquismo	Presencia de historia personal de tabaquismo
<i>Menarquia</i>	Edad de aparición del primer ciclo menstrual	Tiempo transcurrido entre edad de nacimiento y edad del primer ciclo menstrual en años
<i>Menopausia</i>	Ausencia de ciclos menstruales durante 2 años	Ausencia de ciclos menstruales durante 2 años
<i>Edad de menopausia</i>	Edad de último ciclo menstrual	Tiempo transcurrido desde fecha de nacimiento hasta fecha de último ciclo menstrual
<i>Anticoncepción hormonal</i>	Uso previo de anticonceptivos hormonales	Uso previo de anticonceptivos hormonales
<i>Terapia de reemplazo hormonal</i>	Uso previo de terapia de reemplazo hormonal	Uso previo de terapia de reemplazo hormonal
<i>Tipo de herencia</i>	De acuerdo con lo observado en los árboles genealógicos determinar el tipo de herencia	Esporádico, familiar o hereditario
<i>Criterios NCCN v1.2023</i>	Determinar si cumple criterios NCCN para tamizaje molecular	Determinar si cumple criterios NCCN para tamizaje molecular
<i>Antecedente personal de cáncer</i>	Antecedente personal de una segunda neoplasia diferente al cáncer de seno	Antecedente personal de una segunda neoplasia diferente al cáncer de seno
<i>Antecedente familiar de cáncer</i>	Antecedente de cáncer en familiares en primer, segundo y tercer grado de consanguinidad	Antecedente de cáncer en familiares en primer, segundo y tercer grado de consanguinidad

El tipo de herencia fue evaluado en los árboles genealógicos y la definición de casos esporádicos, hereditarios y familiares fue tomado de la referencia (98), de la siguiente manera: 1. Cáncer de seno hereditario: patrón de herencia autosómico dominante, que involucra al menos tres generaciones y

considera cánceres asociados a síndromes como, por ejemplo, el síndrome Lynch, entre otros. 2. Cáncer de seno familiar: cáncer de seno con historia familiar de uno o más familiares afectados en primer o segundo grado de consanguinidad, que no cumplen con la definición de cáncer de seno hereditario y 3. Cáncer de seno esporádico: cáncer de seno que no cumple criterios para clasificarse como hereditario o familiar. Los criterios NCCN v.1.2023 para tamizaje molecular de genes de susceptibilidad para cáncer de seno de alta penetrancia fueron evaluados (99).

### 2.2.2 Determinación del tamaño muestral

Se realizó un tamaño muestral a conveniencia teniendo en cuenta los casos recolectados desde el mes de marzo del 2019 hasta el mes de mayo del 2022 (n=400 casos).

### 2.2.3 Criterios de selección

Criterios de inclusión: ser mujer; tener una edad mayor a 18 años al momento de la firma del consentimiento informado; diagnóstico nuevo de cáncer de seno establecido en los 360 días previos a la firma del consentimiento informado y efectuado a partir de una biopsia y/o resección quirúrgica que demuestre un carcinoma (epitelial) invasivo.

Criterios de exclusión: antecedente personal y /o familiar de mutaciones detectadas en los genes *BRCA1* o *BRCA2*.

### 2.2.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables. Se determinó la distribución de las variantes continuas con el test de normalidad de *Shapiro Wilk*. Posteriormente, las variables cualitativas fueron resumidas en frecuencias y porcentajes y las variables cuantitativas en medianas y rangos intercuartílicos.

Adicionalmente, para las variantes germinales P/LP identificadas en los genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* y *RAD51D*, se realizó un análisis bivariado para determinar correlación genotipo-fenotipo entre las pacientes en quienes se identificaron mutaciones germinales y los datos clinicopatológicos y de factores de riesgo recolectados. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa R versión 4.3.0 (100).

### 2.2.5 Extracción del ADN genómico

El ADN genómico fue extraído a partir de las muestras de sangre periférica de las pacientes, de acuerdo con el método de *salting out* y al protocolo del kit Quick-DNA Miniprep plus (Zymo Research, Orange, California, USA). La calidad y cantidad del

ADN fueron evaluadas mediante la medición de absorbancias con el Nanodrop (OD260/280 y OD260/230).

## 2.2.6 Secuenciación de siguiente generación (*next generation sequencing*-NGS) – Secuenciación de exoma completo (*whole exome sequencing*-WES)

Para 350 muestras el procesamiento de material genético se describe a continuación: El DNA que se usó en el análisis de NGS fue monitoreado en el control de calidad de degradación, contaminación (mediante geles de agarosa al 1%) y concentración (usando un fluorómetro Qubit 2.0). Un total de 1ug de DNA genómico fue usado para la preparación de la librería de DNA. Las librerías de secuenciación fueron generadas usando el kit Agilent SureSelect Human All Exon v6 (Agilent), según las instrucciones del fabricante. La fragmentación fue realizada mediante sonicación (Covaris, Massachusetts, USA), para generar fragmentos del tamaño de 180-280bp. Los extremos fueron convertidos en extremos romos mediante actividades de polimerasas/exonucleasa. Los oligonucleótidos adaptadores fueron ligados luego de la adenilación de los extremos 3' del ADN. Los fragmentos de DNA con las moléculas adaptadoras ligadas en ambos extremos fueron selectivamente enriquecidos en una reacción de PCR. Luego de la reacción de PCR, las librerías fueron hibridadas con sondas marcadas con biotina, y capturadas utilizando perlas magnéticas con estreptavidina. Las librerías fueron enriquecidas mediante PCR para agregar *index tags*. A continuación, los productos de PCR fueron purificados con el sistema AMPure XP (Beckman Coulter, Beverly, USA) y se cuantificaron con el sistema Agilent Bioanalyzer 2100. Si la librería cumplía con los controles de calidad (asignada como "PASS"), las lecturas fueron secuenciadas por ambos extremos (*paired-end*) en la plataforma Illumina NovaSeq 6000. Se realizó el llamado de bases a partir de los archivos crudos y los datos fueron almacenados en el formato FASTQ. Los archivos FASTQ crudos fueron procesados de la siguiente forma: 1. Lecturas que incluían adaptadores fueron removidas. 2. Lecturas en las cuales más del 10% de las bases no fueron identificadas fueron removidas, 3. Lecturas en las cuales más del 50% de las bases eran de baja calidad fueron removidas. Para asegurar la calidad de las lecturas, se consideraron dos parámetros: que la mayoría de las lecturas tuvieran calidad en la escala phred >20, y que más del 80% de las lecturas tuvieran una calidad mayor de 30 en la escala phred (Q30). Se utilizó el algoritmo BWA (Burrows-Wheeler Aligner –BWA) para mapear las lecturas *paired-end* limpias con el genoma de

referencia humano (hg19) y se utilizó GATK v3.8 para realizar el llamado de las variantes. La anotación (localización y predicción de la función) de las variantes fue realizada con ANNOVAR. La secuenciación de exoma y el análisis primario fue realizado con la plataforma Novogene Inc. (Beijing, China).

Las 50 muestras restantes fueron secuenciadas y analizadas bioinformáticamente (análisis primario) con la plataforma de Gencell Pharma (Bogotá, Colombia). A continuación, se describe la metodología de NGS realizada por el laboratorio en mención. La librería fue preparada a partir de 250ng con el kit *MGIEasy FS DNA Library Prep* y se generaron fragmentos de ADN de aproximadamente 200-400pb mediante método enzimático. Los fragmentos de ADN fueron reparados, amplificados por PCR y capturados con las sondas Exome Capture v5, las cuales contienen perlas de estreptavidina. Las regiones de interés (regiones codificantes) fueron enriquecidas utilizando primers específicos. Posteriormente, se realizó la circularización del ADN, desnaturalización de la librería previa ligación de los *split oligo*, digestión y purificación con las perlas específicas. El ADN circularizado fue utilizado para generar las nanobolas (*nanoballs-DNB*), este proceso consiste en la amplificación cíclica a través de un mecanismo de *rolling circle amplification*. Las DNB fueron cuantificadas y cargadas en la *flowcell* (FCL\_PE100) para posteriormente ser secuenciadas por la plataforma DNBseqG400. Para asegurar la calidad de las lecturas, se consideró que el 90% de ellas tuvieran una calidad mayor de 30 en la escala *phred* (Q30). Las lecturas fueron mapeadas con el genoma de referencia hg19, utilizando el algoritmo BWA y organizadas con el programa SAMtools. Las lecturas duplicadas fueron eliminadas con el programa Picard. El llamado de variantes fue realizado con algoritmo *Haplotype* de Sentieon software v4.0.5.1, el cual es análogo al *Haplotypecaller* de GATK. La evaluación de la profundidad y cobertura promedio fue realizada con el programa BAMBA, garantizando un cubrimiento homogéneo del exoma a una profundidad de 50x. La secuenciación de exoma y el análisis primario fue realizado con la plataforma Gencell Pharma. (Bogotá, Colombia).

#### 2.2.7 Diseño de la selección comprensiva de genes relacionados con el cáncer de seno

La selección de los genes (n=253), que fueron evaluados en la población de estudio se basó en los siguientes criterios, los cuales se encuentran categorizados en tres sets (Anexo 1: selección comprensiva de genes relacionados con cáncer de seno):

- Set High (H, n=65): genes presentes en paneles comerciales para el diagnóstico de cáncer de seno. Los paneles utilizados fueron: myRisk, BRCAplus, BreastNext, CancerNext, BreastGyn CancerPanel, BreastOvarian Cancer panel, Centogene - Breast ovarian cancer panel, Fulgent - Breast cancer comprehensive panel, Invitae Breast cancer panel y SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes), Color Panel, y Qiagen's Breast cancer panel.
- Set Medium/high (MH, n=67): genes que cumplen criterios para pertenecer al Set Medium pero que son evaluados en los paneles de Novogene (panel para cáncer en general) y/o FoundationOne (panel para farmacogenómica en cáncer).
- Set Medium (M, n=44): genes involucrados en vías de señalización celular que se encuentran desreguladas en el cáncer de seno, genes que tienen estudios de expresión en cáncer de seno, estudios poblacionales o meta-análisis, y que adicionalmente se hayan realizado estudios de variantes germinales en cancer en dichos genes.
- Set Low (L, n=77): genes que no cumplen criterios para pertenecer a los genes H o M, como factores de transcripción, y que previamente no haya sido evaluada la presencia de variantes germinales en éstos, pero que se han asociado con el cáncer de seno, por ejemplo, a través de estudios como GWAS.

Adicionalmente, se realizó la búsqueda de los alias de los genes seleccionados a través de la herramienta bioinformática HGNC (HUGO *gene nomenclature committee*) (<https://www.genenames.org>).

#### 2.2.8 Análisis bioinformático terciario y determinación de la patogenicidad de las variantes germinales

Parte de la metodología que se describirá a continuación hace parte de la publicación de los resultados obtenidos a partir de la misma. (Anexo 2: publicación titulada "*Germline mutations of breast cancer susceptibility genes through expanded genetic analysis in unselected Colombian patients*").

Para realizar el análisis bioinformático terciario, las variantes fueron filtradas con el programa Golden Helix (VarSeq v2.3.0) usando los archivos VCF. Los criterios de

filtrado se describen a continuación, tipo de variantes: *missense*, *nonsense*, *frameshift*, *inframe* e intrónicas (15 pares de bases flanqueando las regiones exónicas), y un filtro de frecuencia poblacional ( $MAF \leq 0.01$  en exomas, genomas y población latina de la base de datos gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org> v2.1.1), aplicados a los genes de interés.

La patogenicidad de las variantes identificadas en los genes de interés fue determinada teniendo en cuenta dos algoritmos. Para las variantes identificadas en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2*, *TP53*, *RAD51C* y *RAD51D*, se siguieron los criterios descritos en las guías ACMG/AMP (*American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*) (101), ClinGen (102–108), y los criterios ENIGMA (*evidence-based Network for Interpretation of germline mutant alleles-ENIGMA*) (109), siendo este último aplicado específicamente a las variantes identificadas en los genes *BRCA1/2* (Figura 3)

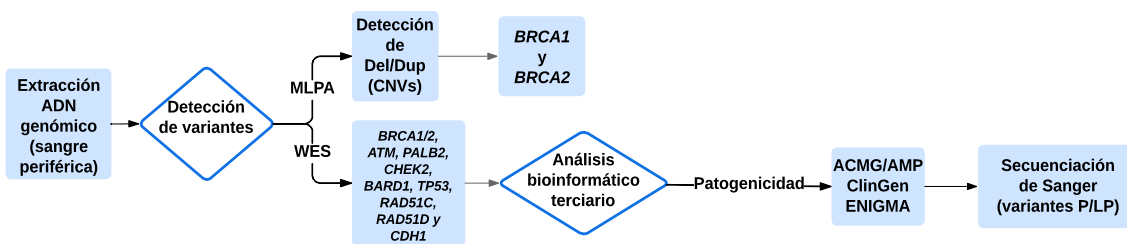


Figura 3. Algoritmo detección y determinación de la patogenicidad de variantes germinales identificadas en los diez genes con impacto clínico.

Para las variantes germinales identificadas en los 243 genes restantes (pertenecientes a los sets descritos en el Anexo 1), la patogenicidad fue determinada teniendo en cuenta metodologías descritas previamente en la literatura (60,110). Inicialmente, se evaluó el estatus de revisión de las variantes en la base de datos ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), las que tuvieran un estatus mayor o igual a dos estrellas no fueron analizadas y se aceptó la patogenicidad descrita en dicha base de datos. En el caso de las variantes con un estatus menor a dos estrellas, se desarrolló la siguiente metodología: las variantes intrónicas no canónicas fueron evaluadas en predictores *In silico* (splice AI-<https://spliceailookup.broadinstitute.org/>, human splicing finder-HSF <https://hsf.genomnis.com/home>, y NNSplice v0.9-

[https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), para determinar la probabilidad de alterar el proceso de *splicing*. Las variantes en las que al menos dos de los tres predictores coincidieran en reportar efecto deletéreo, fueron consideradas como patogénicas/probablemente patogénicas (P/LP). Las variantes de tipo *inframe* (deleciones o inserciones nucleotídicas múltiplo de tres) localizadas en un dominio proteico se clasificaron como P/LP. La determinación de los dominios proteicos fue realizada con las bases de datos DECIPHER v11.21 (<https://www.deciphergenomics.org/>) (111), UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (112) e InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (113). En el caso de las variantes de tipo *missense*, fueron catalogadas como P/LP las que tuvieran un puntaje del predictor *In silico* REVEL  $\geq 0.5$  (114) y estuvieran localizadas en dominios proteicos. Por último, las variantes *frameshift*, *nonsense* y canónicas de *splicing* que fueran degradadas por el sistema NMD (*nonsense mediated decay*-NMD), fueron clasificadas como P/LP. El algoritmo descrito previamente se encuentra resumido en la Figura 4. Adicionalmente, las variantes P/LP identificadas luego de la aplicación del algoritmo mencionado con anterioridad, fueron evaluadas en términos de calidad y profundidad de NGS, las variantes con una profundidad  $< 10X$  y con una VAF (*variant allele frequency*-VAF)  $< 0.25$  fueron consideradas como falsos positivos. Las variantes germinales P/LP identificadas en los 243 genes no fueron confirmadas mediante secuenciación de Sanger.

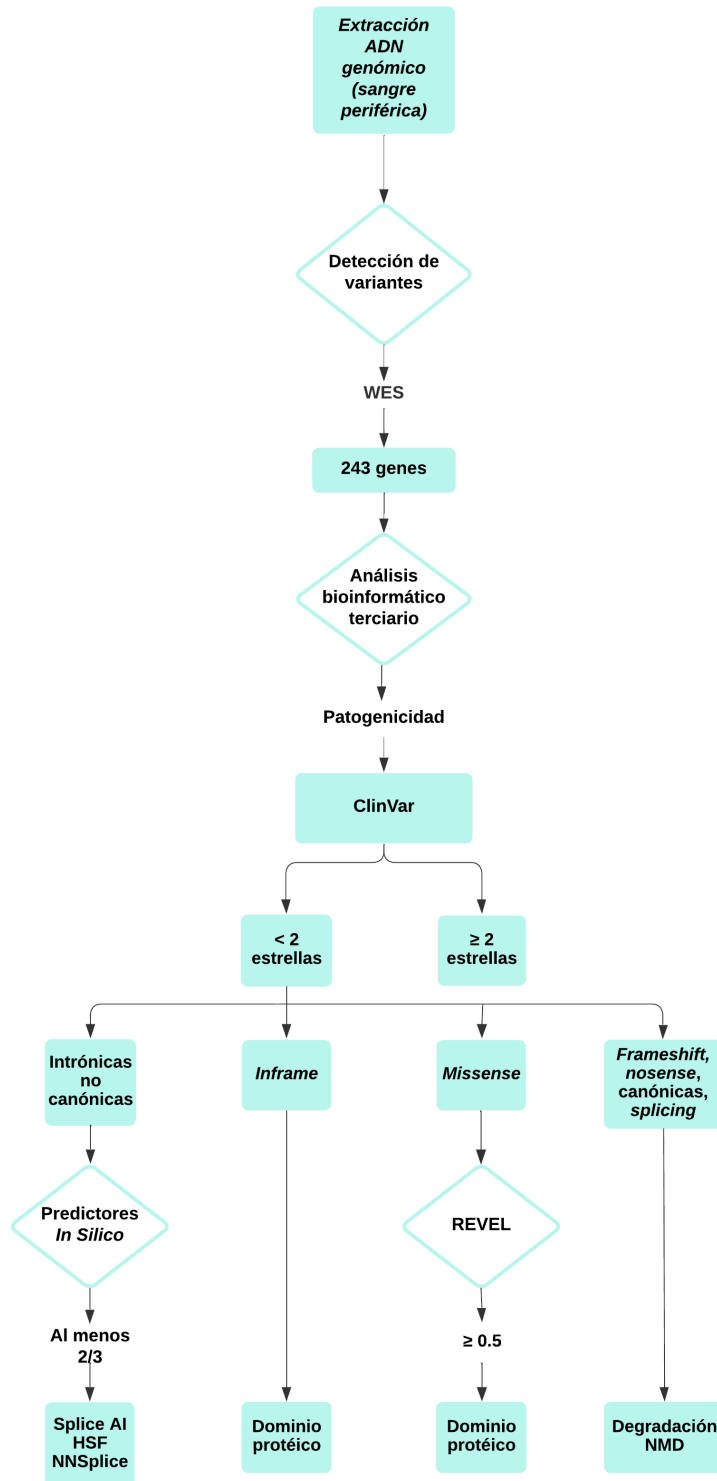


Figura 4. Algoritmo de detección y determinación de la patogenicidad de las variantes germinales identificadas en los 243 genes.

### 2.2.9 Clasificación de las 400 pacientes en los subtipos moleculares de cáncer de seno

Se realizó la clasificación de los tumores identificados en las 400 mujeres con cáncer de seno no seleccionado en los cinco subtipos moleculares de cáncer de seno de acuerdo con lo reportado en la literatura y los datos histopatológicos (Tabla 2) (115,116).

Tabla 2. Criterios para la clasificación de los subtipos moleculares del cáncer de seno.

<b>Subtipo molecular</b>	<b>Expresión receptores hormonales (ER/PR)</b>	<b>Expresión HER-2</b>	<b>Porcentaje Ki67</b>
<i>Luminal A</i>	Presencia de ER y/o PR	Ausencia de HER-2	<20%
<i>Luminal B HER-2 Negativo (LBH2Neg)</i>	Presencia de ER y/o PR	Ausencia de HER-2	≥20%
<i>Luminal B HER-2 positivo (LBH2Pos)</i>	Presencia de ER y/o PR	HER-2 positivo	NA
<i>HER-2 enriquecido</i>	Ausencia de ER y PR	HER-2 positivo	NA
<i>TNBC (triple negative breast cancer)</i>	Ausencia de ER y PR	Ausencia de HER-2	NA

ER: estrogen receptor, PR: progesterone receptor, NA: No aplica

### 2.2.10 Análisis de regresión logística multivariada (árboles de decisión) de los cinco subtipos moleculares de cáncer de seno

Se realizó un análisis de regresión logística multivariada de los cinco subtipos moleculares de cáncer de seno, para determinar si además de los criterios histopatológicos que los definen, existen algunas variables clínicas, de factores de riesgo o genéticas, que predigan un aumento en el riesgo de desarrollar cada subtipo molecular.

La metodología adoptada incluyó una detallada exploración de la base de datos, centrándose especialmente en las variables de respuesta multivariadas: Lumil\_A (Luminal A), Lumil\_B\_HER-2neg (Luminal B HER-2 negativo), Lumil\_B\_HER-2pos (Luminal B HER-2 positivo), HER-2\_enriched (HER-2 enriquecido), y TNBC\_status (TNBC). La elección de un enfoque de regresión logística multivariada (árbol multivariado), implementado en Python mediante la regresión logística y *MultiOutputClassifier*, se fundamentó en el reconocimiento de la interrelación entre

estas variables (117–120). Este análisis fue realizado con el asesoramiento de la Dra. Danna Cruz, profesora asistente de carrera de la Universidad del Rosario.

#### 2.2.11 Análisis ontológico y de vías de señalización de los genes con variantes germinales P/LP

Se realizó un análisis ontológico con el programa DAVID (*database for annotation, visualization and integrated Discovery*-DAVID) (121,122) para identificar los procesos biológicos y vías de señalización en los que están involucrados los genes en los que se identificaron las variantes P/LP.

#### 2.2.12 Confirmación mediante secuenciación de Sanger de las variantes germinales P/LP identificadas por WES en los diez genes con impacto clínico y análisis de segregación familiar.

Las variantes germinales P/LP identificadas en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D* y *TP53*, fueron confirmadas mediante secuenciación de Sanger, utilizando primers específicos diseñados con la herramienta bioinformática Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>).

Adicionalmente, esta metodología fue utilizada para identificar las variantes P/LP en los familiares de los casos índice con mutaciones germinales en los diez genes mencionados con anterioridad. Se realizó análisis de segregación familiar en seis familias pertenecientes a los casos índice con las variantes P/LP en los genes *BRCA2* (c.2808\_2811delACAA, p.Ala938Profs\*21; c.3860delA, p.Asn1287Ilefs\*6; c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25), *ATM* (c.5496+2\_5496+5delTAAG) y *PALB2* (c.3350+4A>G). En total se evaluaron 36 parientes.

#### 2.2.13 Detección de CNVs (*copy number variants*-CNVs) en los genes *BRCA1/2* mediante MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*-MLPA).

La técnica de MLPA fue realizada con los kits comerciales SALSA MLPA *probemix* P002-D1 para *BRCA1* y P090-C1 para *BRCA2* (MRC-Holland, Ámsterdam). De acuerdo con lo descrito en los *kits*, las *probemix* P002-D1-*BRCA1* y P090-C1-*BRCA2* contienen 48 y 50 sondas de MLPA respectivamente. El ensayo genera productos de amplificación con un tamaño que varía entre 130 y 469 nucleótidos. Al menos una sonda del MLPA se encuentra presente en cada exón en ambos genes. Adicionalmente, se incluyen tres sondas para analizar el exón 1b y las secuencias

localizadas a 4.7Kb y a 0.85 Kb corriente arriba del gen *BRCA1*. Para *BRCA2*, una de las sondas detecta el cambio c.156\_157insAlu. Las *probemix* contienen fragmentos de control de calidad para la cantidad de ADN, para la desnaturalización del ADN, y un control de género (*X and Y specific fragments*) (<https://www.mlpa.com>). Según las instrucciones del fabricante, 50ng de ADN fueron desnaturalizados durante 5 min a 98°C. La *probemix* y el buffer del MLPA fueron agregados a cada muestra, luego de enfriar las muestras a 25°C y, posteriormente, se realizó una incubación a 95°C durante 1 minuto, seguido por una hibridación a 60°C durante 18.5 horas. La reacción de ligación se realizó incubando a 54°C y calentando a 98°C la ligase-65 mix durante 5 minutos. La PCR (*polymerase chain reaction-PCR*) fue realizada utilizando *primers* universales marcados. La PCR consistió en 35 ciclos de amplificación: 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto) y una extensión final durante 10 minutos a 72°C. El equipo 3500 *Genetic Analyzer* fue utilizado para separar los productos amplificados mediante electroforesis capilar usando GeneScan350 ROX como tamaño estándar interno.

Los datos fueron analizados con el software Coffalyser.Net (<https://www.mrcholland.com/technology/software/coffalyser-net>). Para la normalización intra-muestra, se comparó cada pico de las sondas con los picos de las sondas de referencia. Las proporciones finales de las sondas son evaluadas mediante la comparación del pico relativo de la sonda en el ADN del paciente, con el total de las muestras de referencia. El control de calidad y la normalización de los datos se realizó con las sondas de referencia incluidas en la SALSA MLPA *Probemix* P002-D1 y P090-C1. Las DQs (*dosage quotient distribution* o DQs: basadas en un gran número de muestras del fabricante MRC-Holland), fueron utilizadas para determinar el genotipo del paciente. Una delección homocigota, tendría un valor DQ de 0; una delección heterocigota entre 0.40 y 0.65; un alelo normal, tiene valores de DQ de 0.80 y 1.20; en una duplicación heterocigota los valores estarían entre 1.30 y 1.65; una duplicación homocigota tendría valores entre 1.75 y 2.15; Los valores que no se encontraron dentro de los rangos descritos previamente fueron considerados como resultados ambiguos ([www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)).

Las variaciones en el número de copias, detectadas con las *probemix* P002-BRCA1 y P090-BRCA2, fueron verificadas con las SALSA MLPA *probemix* P087 y P077, respectivamente. Los sitios de ligación de las sondas confirmatorias tienen una

distancia de al menos 20 nucleótidos desde los sitios de ligación de las sondas del kit de diagnóstico.

### 2.2.14 Ensayos *In vitro* para validación funcional de variantes germinales de interés.

Las variantes germinales candidatas a ser validadas funcionalmente, fueron las que, hasta la fecha, no hay reportes en la literatura de experimentos *In vitro* que determinen el efecto de la variante en la función génica/proteica. Para este objetivo se diseñó un algoritmo en el que se proponen diferentes tipos de experimentos de acuerdo con el tipo de variante y a la localización de esta en la proteína (Figura 5). En verde se encuentran resaltados los experimentos realizados en la tesis doctoral.

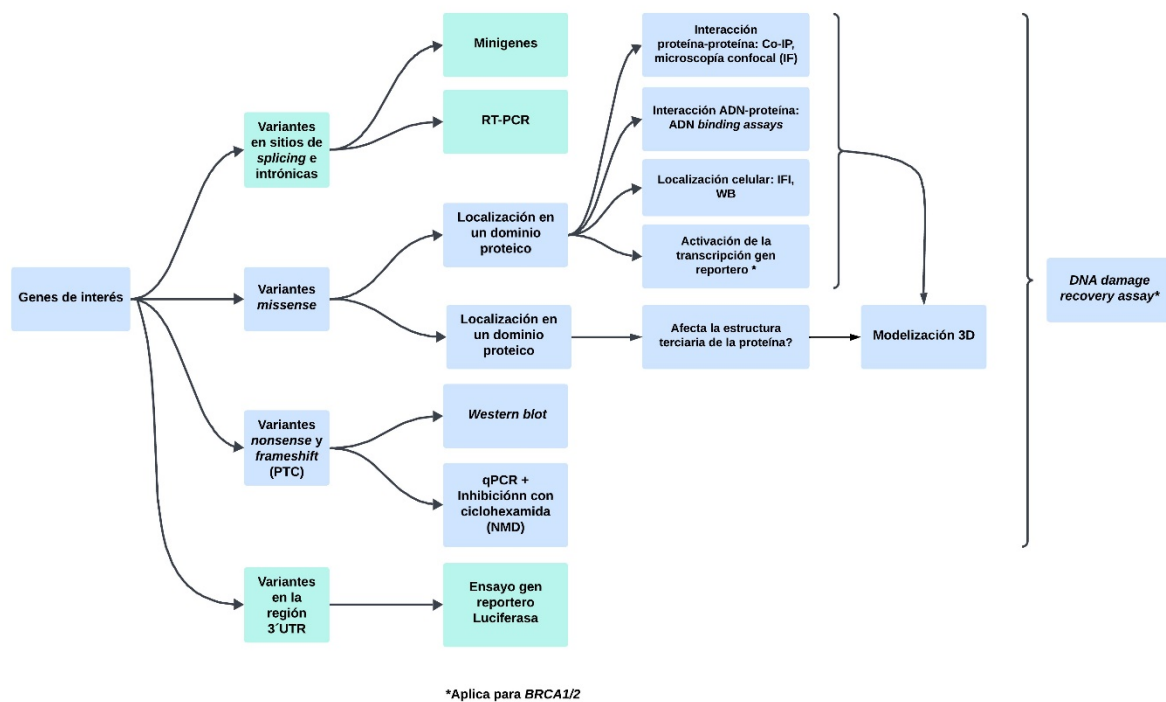


Figura 5. Algoritmo de ensayos *In vitro*.

#### 2.2.14.1 Ensayo de minigenes y RT-PCR pos-transfección

La metodología que se describirá a continuación hace parte de la publicación de los resultados obtenidos a partir de la misma (Anexo 2).

Para desarrollar este objetivo se realizó la estandarización del protocolo de construcción de minigenes mediante el plásmido pSpliceExpress (Addgene #32485)

(10.1016/j.gene.2008.09.021, 10.1038/s41431-017-0007-0), la polimerasa Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs M0492S), y el kit Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix (ThermoFisher Scientific). Se obtuvieron productos de PCR que contengan la variante intrónica a evaluar en el plásmido de expresión (pSpliceExpress), mediante reacción de recombinación. El protocolo se describe en detalle en el Anexo 3: Protocolo del CIGGUR: Clonaje en el vector pSpliceExpress - Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix.

Siguiendo el protocolo mencionado en el Anexo 3, se diseñaron *primers* para evaluar el efecto, en el proceso de *splicing*, de las variantes intrónicas identificadas en los genes *BRCA1* (n=7), *BRCA2* (n=3) y *ATM* (n=1). En la Tabla 3 se describen las variantes y la secuencia de los primers.

Tabla 3. Variantes germinales intrónicas candidatas para validación funcional y secuencia de primers para clonaje en el plásmido pSpliceExpress.

Gen	Variante	Secuencia primers (5' - 3')	Tamaño del exón (pb)
BRCA1	c.5406+8T>C	H_BRCA1_Int19_pSpliceExpress_F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTttatggagactgataaccagagta H_BRCA1_Int20_pSpliceExpress_R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcagcctccagcccatcttc	74
	c.548-9delA	H_BRCA1_Int6_pSpliceExpress_F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtgtttcagtagaaaacgggggtct H_BRCA1_Int7_pSpliceExpress_R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgggaagagggagaaattcagaaaag	46
	c.4358-10C>T	H_BRCA1_Int12_pSpliceExpress_F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTttttatcattcaggccaaggaa H_BRCA1_Int13_pSpliceExpress_R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgcttatgttatagttcaaaaaac	127
	c.81-6T>C	H_BRCA1_Int2_pSpliceExpress_F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTgaaatgaattcgtacgaactatta H_BRCA1_Int3_pSpliceExpress_R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgataatatgtcaaaacttacc	54
	c.81-12C>G		
	c.81-14C>T*		
	c.4485-10A>G*	H_BRCA1_Int13_pSpliceExpress_F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTagctactgacctgttttaaacag H_BRCA1_Int14_pSpliceExpress_R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgagtacaccaagactccctcatc	191
BRCA2	c.7806-6delG	H_BRCA2_Int16_pSpliceExpress_F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtcaactatgttgctagctggctc H_BRCA2_Int17_pSpliceExpress_R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgcaatgcatgaatgtgtgatctct	171
	c.68-7T>A	H_BRCA2_Int2_pSpliceExpress_F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatagttttgattccgaacctga	249

	H_BRCA2_Int3_pSpliceExpress_R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTtcatcgtctccattttcgagtga	
c.794-101G>A	H_BRCA2_Int9_pSpliceExpress_F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTaggtagagtttaattgttagaac H_BRCA2_Int10_pSpliceExpress_R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTaaagacctaacaatcatgtatac	1116
ATM c.5496+2_5496+5delTAAG	H_ATM_Int35_pSpliceExpress_F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcattttgaaatcaagtctctgtgg H_ATM_Int36_pSpliceExpress_R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTctccttttctattcaagaaagc	177

Las variantes que tienen (\*) fueron tomadas como controles negativos experimentales, ya que en la literatura se ha reportado que no afectan el proceso de *splicing* (c.81-14C>T (123), c.4485-10A>G (124)).

Los clonajes en el vector pSpliceExpress fueron confirmados mediante secuenciación de Sanger, con los *primers* utilizados para el clonaje, como fue mencionado en el protocolo descrito con anterioridad. El clonaje no funcionó para dos de las variantes identificadas en el gen *BRCA2* (c.7806-6delG y c.794-101G>A).

- Transfección de los minigenes y RT-PCR:

Los minigenes que tenían tanto la versión WT como mutante de las variantes a evaluar, fueron cultivados en 100mL de LB caldo (suplementado con ampicilina a una concentración de [100µg/mL]) durante 16-20 horas a 37°C en agitación (200 – 220rpm). El ADN plasmídico fue extraído con el kit de Qiagen *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Germantown, MD, USA). Las líneas celulares utilizadas para la transfección de los minigenes fueron las siguientes: HEK-293, MDA-MB-231, MCF-7 y BT-474. La siembra de las células fue realizada en placas de 24 pozos, 24 horas previa transfección, garantizando una confluencia del 50 – 80% el día de la transfección, en medio de cultivo DMEM F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Por cada condición (minigen WT y mutante) se sembraron tres pozos. Como control negativo experimental, se sembraron tres pozos con células que no fueron transfectadas. Las transfecciones fueron realizadas con el reactivo Eugene 6 (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante, manteniendo una relación reactivo:ADN de 3:1 (<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/fugene-6-transfection-reagent-protocol.pdf>). Las células fueron transfectadas con 750ng de ADN plasmídico e incubadas durante 48 horas a 37°C con CO2 al 5%. Previa extracción de ARN, se hizo pool de los tres pozos transfectados con el minigen

WT, mutante o las células no transfectadas. Luego, se extrajo el ARN total de las células transfectadas utilizando TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante ([https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)). La calidad y cantidad del ARN extraído fue evaluado mediante la medición de absorbancias con el Nanodrop (OD260/280 y OD260/230). Después el ARN fue tratado con *DNase I Amplification grade* (Sigma-Aldrich) de acuerdo con el protocolo del fabricante (<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/708/494/ampd1bul.pdf>). Posteriormente, se realizó la síntesis del cDNA utilizando el kit *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* con primers oligo [dT], siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/18080051>). La PCR fue realizada con *GoTaq® Green Master Mix* teniendo en cuenta el protocolo del fabricante (Promega, <https://worldwide.promega.com/es-es/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-m712-protocol/>) y los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1.5%. Los primers utilizados en la PCR se localizan en el esqueleto del vector pSpliceExpress, específicamente en los exones 2 y 3 de insulina de rata (RatIns\_Ex2\_pSpliceExpress\_For: 5'-GATCGATCCGCTTCCTGCCCC-3', RatIns\_Ex3\_pSpliceExpress\_Rev: 5'-CTGCCGGGCCACCTCCAGTGCC-3', tamaño del producto de PCR de únicamente los exones de rata: 244pb) los cuales están flanqueando el fragmento intrón-exón-intrón humano introducido mediante recombinación. Adicionalmente, se realizó PCR del gen constitutivo *GAPDH* (hGAPDH\_2qPCR\_For: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', hGAPDH\_2qPCR\_Rev: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

#### 2.2.14.2 Identificación y validación funcional de variantes germinales localizadas en la región 3'UTR (*untranslated region*-UTR) del gen *BRCA1*

La metodología que se describirá a continuación hace parte de la publicación de los resultados obtenidos a partir de la misma (Anexo 4: publicación titulada "*Functional Analysis of BRCA1 3'UTR Variants Predisposing to Breast Cancer*").

La identificación de las variantes localizadas en la región de interés se realizó con el programa Golden Helix (VarSeq v2.3.0) y utilizando un filtro de frecuencia poblacional (MAF  $\leq 0.01$  en exomas de la base de datos poblacional gnomAD v2.1.1 (<https://gnomad.broadinstitute.org>)). Luego de la identificación de las variantes germinales localizadas en la región 3'UTR del gen *BRCA1*, se determinó la potencial interacción de los microARNs con la región de interés utilizando el paquete miRanda v1.9 en Linux (<https://cbio.mskcc.org/miRNA2003/miranda.html>).

La validación funcional del efecto de las variantes germinales localizadas en la región 3'UTR del gen *BRCA1* con respecto a la interacción con los microARN, se realizó de la siguiente manera:

- Clonaje de la región de interés en el vector pMIR-Report:

A partir del ADN genómico, de las pacientes con las variantes germinales de interés, se realizó la PCR con la polimerasa *GoTaq Green Master Mix* (Promega), utilizando primers diseñados para la región de interés (huBRCA1\_3UTR\_For: 5'-CCCACTAGTCTGCAGCCAGCCACAGGTAC-3', huBRCA1\_3UTR\_Rev: 5'-CCCAAGCTTCGATCCCAAGCACTCTCCTTC-3'). Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se realizó el clonaje de los productos de PCR en el vector de almacenamiento pCR4-TOPO (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante ([https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/topotaseq\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/topotaseq_man.pdf)). Los productos de clonaje fueron transformados en las bacterias *E.coli* quimiocompetentes One Shot Top 10 (Invitrogen). Luego se realizaron micocultivos y el ADN plasmídico fue extraído con el kit de Qiagen *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Germantown, MD, USA). Finalmente, a partir de las regiones de interés clonadas en el vector pCR4-TOPO, se realizó el clonaje en el vector *pMIR-Report<sup>TM</sup> Luciferase* (Invitrogen, cat#AM5795) mediante digestión-ligación utilizando las enzimas de restricción SpeI y HindIII (New England Biolabs, cat# R0133S and # R0104S), siguiendo el protocolo estandarizado en el laboratorio del CIGGUR. Luego de la confirmación del clonaje en el vector de interés mediante secuenciación de Sanger, se procedió al cultivo y extracción del ADN plasmídico (Midiprep) con el kit de Qiagen *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Germantown, MD, USA), para posterior transfección.

- Cultivo celular:

Para esta validación funcional se utilizaron dos líneas celulares de cáncer de seno, MDA-MB-231 y MCF-7. Las células fueron cultivadas siguiendo el mismo protocolo descrito en el numeral 2.2.12, en el apartado titulado “Transfección de los minigenes y RT-PCR pos-transfección”.

- Ensayo del gen reportero Luciferasa:

Las células fueron transfectadas con 1µg de ADN plasmídico y 30ng del vector reportero Renilla, utilizando el reactivo Fugene 6 (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante, manteniendo una relación reactivo:ADN de 3:1 (<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/fugene-6-transfection-reagent-protocol.pdf>). Luego de la transfección, las células se incubaron durante 48 horas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, se realizó la lisis celular con el reactivo *Passive Buffer of Dual-Glo luciferase assay* (Promega, cat#E2980) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las lecturas de luminiscencia se realizaron a 570nm para la Luciferasa, con el reactivo LARII, y a 480nm para Renilla con el reactivo *STOP&Glo*. Las lecturas de luminiscencia con el equipo *GloMax system* (Promega). Los ensayos fueron realizados por triplicado, los valores obtenidos de RLU (*relative luciferase units*-RLU) fueron normalizados por cada réplica y comparados.

- Análisis estadístico del ensayo gen reportero Luciferasa: Los valores de RLU normalizados, obtenidos por cada réplica del experimento, fueron comparados con la prueba estadística Mann-Whitney utilizando el programa GraphPad Prism v10.

2.2.14.3 Ensayos *in vitro* para las variantes para las variantes *missense*, *nonsense*, *frameshift* e *inframe* identificadas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*

- Para realizar este objetivo, realizó la verificación del ORF (*open reading frame*-ORF) de los plásmidos de expresión obtenidos de Addgene ([www.addgene.org](http://www.addgene.org)), pCAG-*BRCA1* (número de catálogo: #119007) y pCIN-*BRCA2* (número de catálogo: # 16245), mediante secuenciación de Sanger. Se identificaron 5 variantes *missense* en el ORF del gen *BRCA1* (NM\_007294.3; NP\_009225.1) y una variante *missense* en el ORF del gen *BRCA2* (NM\_000059.3; NP\_000050.2). De acuerdo con este resultado, se

diseñaron primers (teniendo en cuenta las recomendaciones del kit *QuickChange II XL-Agilent*, <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/200521.pdf>), para revertir estas variantes mediante la técnica de mutagénesis dirigida utilizando el kit *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies), siguiendo el protocolo del fabricante. La secuencia de los primers diseñados se describe en la Tabla 4.

Tabla 4. Variantes missense identificadas en los plásmidos de expresión pCAG-*BRCA1* y pCIN-*BRCA2* adquiridos de Addgene y secuencia de primers diseñados para realizar mutagénesis dirigida con el kit QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis.

Plásmido	Variante	Secuencia primers (5' - 3')
pCAG- <i>BRCA1</i>	c.2612C>T; p.Pro871Leu	Hu_BRCA1_QC_c.2612T>C_F: CAAAGCGCCAGTCATTTGCTC <b>C</b> GTTTTCAAATCCAGGAAATG
		Hu_BRCA1_QC_c.2612T>C_R: CATTTCTGGATTGAAAAC <b>C</b> GAGCAAATGACTGGCGCTTGG
	c.3113A>G; p.Glu1038Gly	Hu_BRCA1_QC_c.3113G>A_F: GAGAAAATGTTTTTAAAG <b>A</b> AGCCAGCTCAAGCAATATTAATGAAG
		Hu_BRCA1_QC_c.3113A>G_R: CTTCATTAATATTGCTTGAGCTGGCT <b>T</b> CTTAAAAACATTTTCTC
	c.3424G>A; p.Ala1142Thr	Hu_BRCA1_QC_c.3424A>G_F: GCCTATGGGAAGTAGTCATG <b>C</b> CATCTCAGGTTTGTCTGAG
		Hu_BRCA1_QC_c.3424A>G_R: CTCAGAACAAACCTGAGATG <b>C</b> ATGACTACTTCCCATAGGC
c.3548A>G; p.Lys1183Arg	Hu_BRCA1_QC_c.3548G>A_F: GTTTTTAGCAAAGCGTCCAGAA <b>A</b> AGGAGAGCTTAGCAGGAGTC	
	Hu_BRCA1_QC_c.3548G>A_R: GACTCCTGCTAAGCTCTCCT <b>T</b> TCTGGACGCTTTTGCTAAAAAC	
c.4837A>G; p.Ser1613Gly	Hu_BRCA1_QC_c.4837G>A_F: GAAAGTTGCAGAATCTGCCAG <b>A</b> GTCCAGCTGCTGCTCATACTAC	
	Hu_BRCA1_QC_c.4837G>A_R: GTAGTATGAGCAGCAGCTGGAC <b>T</b> CTGGGCAGATTCTGCAACTTTC	
pCIN- <i>BRCA2</i>	c.7397T>C; p.Val2466Ala	Hu_BRCA2_QC_c.7397C>T_F: CAACTCCAATCAAGCAG <b>T</b> AGCTGTAACCTTTCACAAAGTG
		Hu_BRCA2_QC_c.7397C>T_R: CACTTGTGAAAGTTACAGCT <b>A</b> CTGCTTGATTGGAGTTG

En rojo se encuentran señaladas las posiciones de las variantes que se quieren revertir.

En el caso del plásmido pCAG-*BRCA1* la transformación bacteriana no funcionó. Por otra parte, el plásmido pCIN-*BRCA2*, que contenía la variante *missense* (c.7397T>C; p.Val2466Ala), la mutagénesis fue exitosa y este constructo WT es un aporte de este trabajo para futuras validaciones funcionales. En este contexto, se seleccionaron variantes candidatas localizadas en el gen *BRCA2* y se realizaron los ensayos de mutagénesis dirigida que permitirán la realización de validaciones funcionales, según el algoritmo de experimentos *in vitro* propuesto anteriormente (Figura 5 y Tabla 5).

Tabla 5. Variantes germinales identificadas en la región codificante del gen *BRCA2* candidatas para validación funcional.

Variante	Tipo de variante	Experimento propuesto	Secuencia primers mutagénesis (5' - 3')
c.2380dupA; p.Met794Asnfs*8	Frameshift	WB, inhibición cicloheximida (NMD)	Hu_BRCA2_QC_2380dupA_F: GAGGCAAAGAATCATACAAAAAATGTCAGACAAGCTCAAAGGTAAC Hu_BRCA2_QC_2380dupA_R: GTTACCTTTGAGCTTGTCTGACAATTTTGTATGATTCTTTGCCTC
c.3860delA; p.Asn1287Ilefs*6	Frameshift	WB, inhibición cicloheximida (NMD)	Hu_BRCA2_QC_3860delA_F: GATAAACTGTAAGTGAAAAATAATAAATGCCAACTGATATTAC Hu_BRCA2_QC_3860delA_R: GTAATATCAGTTGGCATTATTATTTTTTCACTTACAGTTTTATC
c.5773C>T; p.Gln1925Ter	Nonsense	WB, inhibición cicloheximida (NMD)	Hu_BRCA2_QC_5773C>T_F: CACATAAGGTTTTGCTGACATTAGAGTGAAGAAATTTTACAAC Hu_BRCA2_QC_5773C>T_R: GTTGTAAAATTTCTTCACTCTAATGTCAGCAAAACCTTATGTG
c.5851_5854delAGTT; p.Ser1951Trpfs*11	Frameshift	WB, inhibición cicloheximida (NMD)	Hu_BRCA2_QC_5851_5854del_F: CTAAAATATCACCTTGTGATGTTTGGAACTTCAGATATATG Hu_BRCA2_QC_5851_5854del_R: CATATATCTGAAGTTTCCAAACATCACAAGGTGATATTTAG
c.2808_2811delACAA; p.Ala938Profs*21	Frameshift	WB, inhibición cicloheximida (NMD)	Hu_BRCA2_QC_2808_2811del_F: GGAGACACAGGTGATAAGCAACCCAAGTGTC Hu_BRCA2_QC_2808_2811del_R: GACACTGGGTTGCTTATCACCTGTGTCTCC
c.4312G>A; p.Val1438Ile	Missense	Co-IP (POLH)	Hu_BRCA2_QC_4312G>A_F: GCAAGTGGGAAAAATATTAGTATCGCCAAAGAGTCATTTAATAA Hu_BRCA2_QC_4312G>A_R: TTATTAATGACTCTTTGGCGAATACTAATATTTTCCCCTTGC
c.7051G>C; p.Ala2351Pro	Missense	Co-IP (FANCD2)	Hu_BRCA2_QC_7051G>C_F: GATACAGAATCCAAATTTTACCACCTGGTCAAGAATTTCTGTGTC Hu_BRCA2_QC_7051G>C_R: GACAGAAATCTTGACCAGGTGGGTAATAATTTGGATTCTGTATC
c.8850G>T; p.Lys2950Asn	Missense	Modelización proteica 3D	Hu_BRCA2_QC_8850G>T_F: GATCCAGTTGGAAATTAGGAAAGCCATGGAATCTGCTGAAC Hu_BRCA2_QC_8850G>T_R: GTTTCAGCAGATTCCATGGCAATTCCTAATTTCCAACCTGGATC

<p>c.8768A&gt;G; p.Glu2923Gly</p>	<p>Missense</p>	<p>Modelización proteica 3D</p>	<p>Hu_BRCA2_QC_8768A&gt;G_F: CCTTGAGGGTTATTTTCAGTGAGAGCAGTTAAGAGCCTTG Hu_BRCA2_QC_8768A&gt;G_R: CAAGGCTCTTAAGTCTCTCACTGAAATAACCCCTCAAGG</p>
<p>c.4933_4935delAAA; p.Lys1645del</p>	<p>Inframe</p>	<p>Co-IP (POLH)</p>	<p>Hu_BRCA2_QC_4933_4935del_F: GTTAAAGTACATGAAAATGTAGAAGAAACAGCAAAAAGTCCTGC Hu_BRCA2_QC_4933_4935del_R: GCAGGACTTTTTGCTGTTTCTTCTACATTTTCATGTACTTTAAC</p>

En rojo se encuentran señaladas las posiciones de las variantes que se quieren introducir en el ORF del gen *BRCA2*.

Los diferentes experimentos propuestos surgen a partir del algoritmo descrito en la Figura 5. Los sitios de interacción con otras proteínas, en el caso de las variantes missense, fue determinado con la base de datos Uniprot ([https://www.uniprot.org/uniprotkb/P51587/entry#family\\_and\\_domains](https://www.uniprot.org/uniprotkb/P51587/entry#family_and_domains)).

- Mutagénesis dirigida para introducción de variantes germinales identificadas en el gen *BRCA2*, en el plásmido pCIN-*BRCA2* WT, candidatas para validación funcional. Para desarrollar este objetivo se utilizó el kit *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies). Se siguió el protocolo del fabricante.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Caracterización de la población de estudio

Como se mencionó en la metodología, Para determinar la distribución de las variables continuas se realizó la prueba de normalidad de *Shapiro Wilk*. Todas las variables continuas presentaron una distribución no normal (valor  $p < 0.05$ ). Los resultados de la prueba de normalidad se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Test de normalidad de *Shapiro Wilk*.

Variable	valor p
Edad de diagnóstico	0.00013774
Ki67	1.2207E-14
Tamaño tumoral	1.0902E-24
Nódulos positivos	5.1329E-32
Paridad	1.3511E-19
Hijos nacidos vivos	1.7086E-21
Edad al primer hijo	6.4977E-10
Peso	5.1886E-07

Talla	0.01481619
IMC	5.5249E-06
Edad de menarquia	4.4072E-10
Edad de menopausia	0.00013903

En las 400 personas con cáncer de seno no seleccionado del presente estudio, la mediana de edad de diagnóstico fue 53 años, el 55.5% de las pacientes eran postmenopáusicas, el 60.25% de las pacientes tenían sobrepeso u obesidad, el diagnóstico histopatológico más frecuente fue el carcinoma de seno ductal invasivo (85.5% de los casos), más de 69% de las pacientes presentaban receptores hormonales positivos, el 11.5% de las pacientes fueron diagnosticadas con TNBC, el 4% de las pacientes tenían metástasis, el 68.75% de las pacientes tenían antecedentes familiares de cáncer, 60.75% cumplían criterios NCCN para tamizaje molecular de variantes germinales de riesgo para cáncer de seno, el 39.50% de los casos eran esporádicos, 46.75% familiares y 12.5% hereditarios. En la mayoría de los casos no fue posible obtener la información relacionada con la invasión linfovascular, por esta razón esta variable no fue analizada. Las características clinicopatológicas, de factores de riesgo y familiares se encuentran descritas en la Tabla 7.

Tabla 7. Características clinicopatológicas, de factores de riesgo y familiares de las 400 mujeres colombianas con cáncer de seno no seleccionado.

<b>Variable</b>	<b>n=400</b>	<b>%</b>
<i>Edad de diagnóstico (mediana - rango)</i>	53	43-64
<i>Tamaño tumoral (mediana - rango)</i>	20	12-30
<i>Nódulos positivos (mediana - rango)</i>	0	0-1
<i>Ki67 (mediana - rango)</i>	25	13-45
<i>Diagnóstico histológico</i>	<i>Ductal</i>	342 85.50
	<i>Lobular</i>	21 5.25
	<i>Otro</i>	35 8.75
	<i>ND</i>	2 0.50
<i>ER estatus</i>	<i>Negativo</i>	87 21.75
	<i>Positivo</i>	308 77
<i>PR estatus</i>	<i>ND</i>	5 1.25
	<i>Negativo</i>	117 29.25
	<i>Positivo</i>	278 69.5
	<i>ND</i>	5 1.25

<i>HER-2 estatus</i>	<i>Negativo</i>	298	74.5
	<i>Positivo</i>	95	23.75
	<i>ND</i>	7	1.75
<i>TNBC estatus</i>	<i>No</i>	349	87.25
	<i>Si</i>	46	11.50
	<i>ND</i>	5	1.25
<i>Estadio nodal</i>	<i>0</i>	204	51
	<i>1</i>	134	33.50
	<i>2</i>	39	9.75
	<i>3</i>	14	3.50
	<i>ND</i>	9	2.25
<i>Estadio tumoral</i>	<i>I</i>	91	22.75
	<i>II</i>	183	45.75
	<i>III</i>	104	26
	<i>IV</i>	16	4
	<i>ND</i>	6	1.50
<i>Edad de menarquia (mediana - rango)</i>		13	12-14
<i>Hijos nacidos vivos (mediana - rango)</i>		2	1.50-3
<i>Edad al primer hijo (mediana - rango)</i>		23	19-28
<i>Lactancia materna</i>	<i>No</i>	76	19
	<i>Si</i>	322	80.50
	<i>ND</i>	2	0.50
<i>Menopausia</i>	<i>No</i>	173	43.25
	<i>Si</i>	222	55.50
	<i>ND</i>	5	1.25
<i>Edad de menopausia (mediana - rango)</i>		50	46-52
<i>Peso (mediana - rango)</i>		65	58-73.30
<i>Talla (mediana - rango)</i>		1.58	1.55-1.63
<i>IMC (mediana - rango)</i>		25.96	23.57-29.14
<i>Sobrepeso - obesidad</i>	<i>No</i>	153	39
	<i>Si</i>	241	60.25
	<i>ND</i>	3	0.75
<i>Anticoncepción hormonal</i>	<i>No</i>	201	50.25
	<i>Si</i>	196	49
	<i>ND</i>	3	0.75
<i>Terapia de reemplazo hormonal</i>	<i>No</i>	372	93
	<i>Si</i>	24	6
	<i>ND</i>	4	1
<i>Tabaquismo</i>	<i>No</i>	296	74

	<i>Si</i>	102	25.50
	<i>ND</i>	2	0.50
<i>Consumo de alcohol</i>	<i>No</i>	347	86.75
	<i>Si</i>	50	12.50
	<i>ND</i>	3	0.75
<i>Exposición a radiación</i>	<i>No</i>	346	86.50
	<i>Si</i>	25	6.25
	<i>ND</i>	29	7.25
<i>Antecedente personal de cáncer</i>	<i>No</i>	377	94.25
	<i>Si</i>	21	5.25
	<i>ND</i>	2	0.50
<i>Antecedente familiar de cáncer</i>	<i>No</i>	120	30
	<i>Si</i>	275	68.75
	<i>ND</i>	5	1.25
<i>Criterios NCCN v1.2023</i>	<i>No</i>	155	38.75
	<i>Si</i>	243	60.75
	<i>ND</i>	2	0.50
<i>Herencia</i>	<i>Esporádico</i>	158	39.50
	<i>Familiar</i>	187	46.75
	<i>Hereditario</i>	50	12.50
	<i>ND</i>	5	1.25

Otro: mixto, medular, mucinoso, metaplásico, tubular, micropapilar, papilar, adenocarcinoma, apocrino y cribiforme. ER: *estrogen receptor*. PR: *progesterone receptor*. IMC: índice de masa corporal. ND: no hay datos.

### 2.3.2 Identificación de variantes germinales P/LP en los diez genes con impacto clínico, análisis de segregación familiar y validación funcional de variante intrónica recurrente identificada en el gen *ATM* c.5496+2\_5496+5delTAAG

Los resultados correspondientes al título de este apartado se encuentran descritos y discutidos en detalle en la publicación titulada "*Germline mutations of breast cancer susceptibility genes through expanded genetic analysis in unselected Colombian patients*" (Anexo 2).

Se identificaron variantes germinales P/LP en el 6% de las mujeres con cáncer de seno no seleccionado, distribuidas en los genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* Y *RAD51D*. En total se identificaron 21 mutaciones germinales, once se encontraron en los genes *BRCA1/2* y diez en los genes *ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* y *RAD51D*. El gen con mayor frecuencia de pacientes y de variantes

germinales P/LP fue *BRCA2* (2.5% y 38.1%, respectivamente), seguido por los genes *ATM*, *BRCA1*, *PALB2*, *CHEK2*, *BARD1* y *RAD51D*. Se identificaron variantes recurrentes en el 1.75% de la población estudiada, en los genes *BRCA2* y *ATM*. No se identificaron variantes germinales P/LP en los genes *CDH1*, *RAD51C* y *TP53*. Tampoco se identificaron CNVs en los genes *BRCA1/2*.

El análisis bivariado determinó que las pacientes con variantes P/LP en los genes *BRCA1/2* tenían una edad de diagnóstico menor (mediana de edad: 36 vs 54,  $p=0.0003$ ), la menor parte eran postmenopáusicas (15.35% vs 57.68%,  $p=0.009$ ) y el estadio nodal 2 fue más frecuente en estas pacientes (30.77% vs 9.26%,  $p=0.0425$ ), en comparación con las pacientes sin variante P/LP en los diez genes con impacto clínico.

El análisis de segregación familiar identificó segregación en dos de las variantes analizadas en el gen *BRCA2*. En la familia evaluada para la variante c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25, uno de los familiares del caso índice fue diagnosticado con cáncer de seno a los 41 años, el caso índice fue diagnosticado a los 35 años, mientras que el caso índice con la variante c.3860delA, p.Asn1287Ilefs\*6, tiene un familiar con diagnóstico de cáncer de seno y tiroides a los 64 años de edad. Se realizó la validación funcional de la variante intrónica identificada en el gen *ATM*: c.5496+2\_5496+5delTAAG mediante el ensayo de minigenes y RT-PCR en las líneas celulares HEK-293, MCF-7, BT-474 y MDA-MB-231; identificando el efecto *exon skipping* en el proceso de *splicing* del exón 36 del gen en mención, generando la delección de 59 aminoácidos localizados en el dominio Pincer de la proteína ATM.

### 2.3.3 Identificación de variantes germinales P/LP en 253 genes relacionados con cáncer de seno y análisis de regresión logística multivariada (árboles de decisión) de los cinco subtipos moleculares de cáncer de seno

Se identificaron 211 variantes germinales P/LP en 105 genes de los 253 evaluados. Las mutaciones germinales se identificaron en el 56.7% (227/400) de las mujeres con cáncer de seno no seleccionado, el 35.7% (81/227) de ellas tenían dos o más genes con variantes. De las 211 mutaciones germinales detectadas, el 57.3% (121/211) son del tipo *missense*, 14.7% (31/211) son *frameshift*, 11.4% (24/211) son intrónicas, 10.4% (22/211) son del tipo *nonsense* y el 6.2% (13/211) son *inframe*. El gen donde se identificaron mayor número de variantes germinales P/LP fue *AR* (n=11), seguido de *CYP2D6* (n=9), *BRCA2* y *MUC16* (n=8, cada uno), *CYP1B1* (n=7), *CYP1A1* (n=5),

*FANCM* y *PTCH1* (n=4, cada uno); en los genes *BRCA1*, *ATM*, *PALB2*, *COL11A1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *ERBB2*, *PMS2*, *PTPRF*, *VDR*, *WRN*, *TGFBR2*, *VPS13B* y *XRCC1* se identificaron tres mutaciones germinales en cada uno. En relación con la distribución de las pacientes por gen; *COMT* es el gen con mayor número mujeres con variantes germinales P/LP: 9.5% (38/400); seguido por el gen *CYP2D6* (4%, 20/400); *ADAMTSL1* y *AR* (3%, 12/400 para cada gen); *BRCA2*, *MUC16* y *PMS2* (2.5%, 10/400 para cada gen); *COL11A1* e *IRF6* (2.25%, 9/400 para cada gen); *MUTYH*, *S1PR3* y *CYP1B1* (2%, 8/40 para cada gen); *MSR1*, *VPS13B* y *CDKN2A* (1.5%, 6/400 para cada gen); y el 1.25% (5/400) para cada uno de estos genes *RET*, *XRCC1* y *ATM*. Es importante resaltar que, de los diez genes con impacto clínico, solo dos de ellos, *BRCA2* y *ATM*, se encuentran en los primeros 18 genes con mayor número de pacientes con variantes germinales P/LP.

En la Tabla 8 se encuentra la descripción molecular, las frecuencias poblacionales y los criterios patogenicidad de las variantes germinales P/LP identificadas en la población de estudio.

Tabla 8. Descripción molecular, frecuencias poblacionales y criterios de patogenicidad variantes germinales P/LP identificadas en 105 genes.

Gen	Variante ADNc (nomenclatura HGVS)	Variante proteína (nomenclatura HGVS)	Tipo de variante	SNP ID	FA exomas (gnomAD v2.1.1)	FA latino (gnomAD v2.1.1)	FA Población de estudio	Patogenicidad	Casos
ADAMTS1	NM_006988.5:c.1726G>A	NP_008919.3:p.Gly576Ser	Missense	rs146313892	0.0005171	0.0004515	0.00122249	REVEL: 0.646, dominio: TSP_1	Md043
ADAMTSL1	NM_001040272.6:c.281C>T	NP_001035362.3:p.Ser94Leu	Missense	rs190050504	0.000330422	0.002259	0.0134474	REVEL: 0.578, dominio: ADAMTS_CR_3	HM37, HM50, Bt069, Bt135, Bt149, Bt009, Bt031, Cl002, Cl021, Md71, Vu011
ADAMTSL1	NM_001040272.6:c.1177G>C	NP_001035362.3:p.Gly393Arg	Missense	rs199787607	0.000101082	0.0001707	0.00122249	REVEL: 0.554, dominio: TSP1_ADAMTS	Bg034
ANKLE1	NM_152363.6:c.296G>T	NP_689576.6:p.Gly99Val	Missense	rs1010008939	2.75961e-05	0.00004014	0.00122249	REVEL: 0.617, dominio: Ank_2	Pe016
ANKLE1	NM_152363.6:c.750delA	NP_689576.6:p.Leu251Phefs*21	Frameshift	rs570135309	0.0002197	0.00008470	0.00244499	PTC NMD	Md024, Md050
APC	NM_000038.6:c.7574G>A	NP_000029.2:p.Arg2525His	Missense	rs762034315	0.000143533	0.0006211	0.00122249	REVEL: 0.579, dominio: APC_basic	Md71
APOBEC3B	NM_004900.5:c.166C>T	NP_004891.5:p.Arg56Ter	Nonsense	rs199817842	0.0003954	0.002176	0.00122249	PTC NMD	Bt141
APOBEC3B	NM_004900.5:c.394C>T	NP_004891.5:p.Arg132Ter	Nonsense	rs138025991	0.0001551	0.00006036	0.00122249	PTC NMD	Bt016
APOE	NM_000041.4:c.487C>T	NP_000032.1:p.Arg163Cys	Missense	rs769455	0.00142069	0.001538	0.00122249	REVEL: 0.695, dominio: Apolipoprotein	Md069
APOE	NM_000041.4:c.890T>C	NP_000032.1:p.Leu297Pro	Missense	rs1039600156	4.48527e-06	0.00002961	0.00122249	REVEL: 0.639, dominio: Apolipoprotein	Md072
AR	NM_000044.6:c.1174C>T	NP_000035.2:p.Pro392Ser	Missense	rs201934623	0.00447995	0.001807	0.00122249	REVEL: 0.766, dominio: Androgen_recep	Bt099
AR	NM_000044.6:c.1186G>C	NP_000035.2:p.Gly396Arg	Missense	rs202150225	0.000131617	-	0.00122249	REVEL: 0.696, dominio: Androgen_recep	Bt118
AR	NM_000044.6:c.169_170insAGCAGC	NP_000035.2:p.Leu56_Leu57insGlnGln	Inframe	rs755686403	0.00007685	0.0001039	0.00122249	Dominio: Androgen_recep	Bt092
AR	NM_000044.6:c.170_175delITGCAGC	NP_000035.2:p.Leu57_Gln58del	Inframe	rs1489924686	0.00007685	-	0.00122249	Dominio: Androgen_recep	Bt103
AR	NM_000044.6:c.170_181delITGCAGCAGCAGC	NP_000035.2:p.Leu57_Gln60del	Inframe	rs1206352213	0.00006987	0.00005098	0.00122249	Dominio: Androgen_recep	Bt087
AR	NM_000044.6:c.1412_1420dupGCGGCGGCG	NP_000035.2:p.Gly471_Gly473dup	Inframe	rs746853821	NR	NR	0.00244499	Dominio: Androgen_recep	Bt013, Md038
AR	NM_000044.6:c.1409_1420dupGCGGCGGCGGCG	NP_000035.2:p.Gly470_Gly473dup	Inframe	rs746853821	NR	NR	0.00122249	Dominio: Androgen_recep	Bt025
AR	NM_000044.6:c.1406_1420dupGCGGCGGCGGCGGCG	NP_000035.2:p.Gly469_Gly473dup	Inframe	rs746853821	NR	NR	0.00122249	Dominio: Androgen_recep	Md055
AR	NM_000044.6:c.1373_1374insTGGTGGCGGCGG	NP_000035.2:p.Gly470_Gly473dup	Inframe	rs1555969949	NR	NR	0.00122249	Dominio: Androgen_recep	Md045
AR	NM_000044.6:c.2481C>A	NP_000035.2:p.Phe827Leu	Missense	rs200801099	0.000131469	-	0.00122249	REVEL: 0.555, dominio: Hormone_recep	Bt27
AR	NM_000044.6:c.1153G>T	NP_000035.2:p.Ala385Ser	Missense	rs200067740	0.00003274	0.0001921	0.00122249	REVEL: 0.535, dominio: Androgen_recep	HM28
ATM	NM_000051.3:c.4507C>T	NP_000042.3:p.Gln1503Ter	Nonsense	rs2227945	0.00000795817	0.00005783	0.00125	ACMG/AMP: Patogénica (PVS1+PS4 moderado+PM2 soporte)	Cl004
ATM	NM_000051.3:c.3510dupA	NP_000042.3:p.Gln1171Thrfs*8	Frameshift	rs876658899	0.00000397874	0.00002891	0.00125	ACMG/AMP: Patogénica (PVS1+PS4 soporte+PM2)	Bt065

ATM	NM_000051.3:c.5496+2_5496+5delTAAG	-	splice_donor_variant	rs1565479572	NR	NR	0.00375	ACMG/AMP: Probablemente patogénica (PVS1 moderado+PS4 moderado+PM2)	Bt002, Bt084, HM28
ATR	NM_001184.4:c.684dupA	NP_001175.2:p.Leu229Thrfs*13	Frameshift	rs2034926909	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	Bt084
BACH1	NM_001186.4:c.109A>G	NP_001177.1:p.Thr37Ala	Missense	rs746632871	1.59051e-05	0.00008673	0.00122249	REVEL: 0.609, dominio: BTB/POZ	Bt022
BARD1	NM_000465.3:c.176_177delAG	NP_000456.2:p.Glu59Alafs*8	Frameshift	rs1057517589	NR	NR	0.00125	ACMG/AMP: Patogénica (PVS1+PM1+PM2)	Bt036
BLM	NM_000057.4:c.2333C>G	NP_000048.1:p.Ser778Cys	Missense	rs139610577	0.000174968	0.0001411	0.00122249	REVEL: 0.656, dominio: DEAD/DEAD box	Md005
BLM	NM_000057.4:c.2205_2212delinsATTAGATTC	NP_000048.1:p.Tyr736Leufs*3	Frameshift (MNV)	NR	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	Bt055
BRCA1	NM_007294.3:c.5123C>A	NP_009225.1:p.Ala1708Glu	Missense	rs28897696	0.00001990	0.00005784	0.00125	Patogénica (BRCAexchange)	Bt059
BRCA1	NM_007294.3:c.5324T>G	NP_009225.1:p.Met1775Arg	Missense	rs41293463	0.00001193	0	0.00125	Patogénica (BRCAexchange)	Cl010
BRCA1	NM_007294.3:c.1674delA	NP_009225.1:p.Gly559Valfs*13	Frameshift	rs80357600	NR	NR	0.00125	Patogénica (BRCAexchange)	Bg013
BRCA2	NM_000059.3:c.2380dupA	NP_000050.2:p.Met794Asnfs*8	Frameshift	rs730881602	NR	NR	0.00125	Patogénica (BRCAexchange)	Bt004
BRCA2	NM_000059.3:c.3860delA	NP_000050.2:p.Asn1287Ilefs*6	Frameshift	rs80359406	0.0000153412	0	0.00125	Patogénica (BRCAexchange)	Bt054
BRCA2	NM_000059.3:c.4889C>G	NP_000050.2:p.Ser1630Ter	Nonsense	rs80358711	0.0000080323 2	0	0.00125	Patogénica (BRCAexchange)	Bt063
BRCA2	NM_000059.3:c.5773C>T	NP_000050.2:p.Gln1925Ter	Nonsense	rs80358806	0.0000039890 2	0	0.00125	Patogénica (BRCAexchange)	Cl006
BRCA2	NM_000059.3:c.5851_5854delAGTT	NP_000050.2:p.Ser1951Trpfs*11	Frameshift	rs80359543	NR	NR	0.00125	Patogénica (BRCAexchange)	Bg003
BRCA2	NM_000059.3:c.2808_2811delACAA	NP_000050.2:p.Ala938Profs*21	Frameshift	rs80359351	0.0000079728 3	0	0.0025	Patogénica (BRCAexchange)	Bt107, Bt146
BRCA2	NM_000059.4:c.1763_1766delATAA	NP_000050.3:p.Asn588Serfs*25	Frameshift	rs80359303	NR	NR	0.0025	Patogénica (BRCAexchange)	Bt148, Bt152
BRCA2	NM_000059.4:c.9097dupA	NP_000050.3:p.Thr3033Asnfs*11	Frameshift	rs397507419	NR	0	0.00125	Patogénica (BRCAexchange)	Pe012
CASP10	NM_032977.4:c.1202_1208delGCCAAGG	NP_116759.2:p.Cys401Leufs*15	Frameshift	rs747900630	0.0003666	0.001270	0.00122249	PTC NMD	Bg026
CASP10	NM_032977.4:c.922+1G>A	-	Splice_donor_variant	rs200221261	4.0332e-06	0.00002966	0.00122249	SAI: 0.75 (Donor loss); HSF: Broken WT Donor Site : Alteration of the WT Donor site, most probably affecting splicing (HSF), Broken WT Donor Site : Alteration of the WT Donor site, most probably affecting splicing (MaxEnt)	Pe023
CDKN2A	NM_000077.5:c.176T>G	NP_000068.1:p.Val59Gly	Missense	rs104894099	4.56421e-06	0.00002956	0.00122249	ClinVar: Likely Pathogenic	Md050
CDKN2A	NM_058195.4:c.32T>G	NP_478102.2:p.Ile11Ser	Missense	rs1820535713	NR	NR	0.00611247	REVEL: 0.716, dominio: P19Arf_N	HM20, HM21, HM22, HM26, HM27
CHEK2	NM_007194.3:c.1100delC	NP_009125.1:p.Thr367Metfs*15	Frameshift	rs555607708	0.00204432	0.00005649	0.00125	ACMG/AMP: Patogénica (PVS1+PS3+PS4 moderado+PM1)	Md030

CHEK2	NM_007194.3:c.349A>G	NP_009125.1:p.Arg117Gly	Missense	rs28909982	0.00011941	0.0001129	0.00125	ACMG/AMP: Probablemente patogénica (PS3+PS4 moderado+PM1+PP3)	Bg009
CLGN	NM_004362.3:c.800T>C	NP_004353.1:p.Ile267Thr	Missense	rs748640655	3.97823e-06	0.00002892	0.00122249	REVEL: 0.669, dominio: calreticulin	Bt129
CLGN	NM_004362.3:c.561_563delAGA	NP_004353.1:p.Glu187del	Inframe	rs1232078275	0.000003990	0.00002906	0.00122249	Dominio: calreticulin	HM53
COL10A1	NM_000493.4:c.1703C>T	NP_000484.2:p.Pro568Leu	Missense	rs191382529	0.000007954	0.00005782	0.00366748	REVEL: 0.789, dominio: C1q	Bt074, Bt003, Cl029
COL11A1	NM_001854.4:c.4628T>G	NP_001845.3:p.Ile1543Ser	Missense	NR	NR	NR	0.00733496	REVEL: 0.785, dominio: repeat collagen	HM20, HM22, HM23, HM24, HM26
COL11A1	NM_001854.4:c.1321G>A	NP_001845.3:p.Glu441Lys	Missense	rs995254814	7.96191e-06	-	0.00122249	REVEL: 0.628, dominio: repeat collagen	HM51
COL11A1	NM_001854.4:c.652-9_652-6dupTTTT	-	splice_region_variant	rs36076089	0.001828	0.001943	0.00244499	HFS: New Acceptor splice site : Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (cryptic exon activation) (HSF), New Acceptor splice site : Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (cryptic exon activation) (HSF), Broken WT Acceptor Site : Alteration of the WT Acceptor site, most probably affecting splicing (HSF), New Acceptor splice site : Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (cryptic exon activation) (MaxEnt), Broken WT Acceptor Site : Alteration of the WT Acceptor site, most probably affecting splicing (MaxEnt); NNSplice: Acc increased (gDNA: 77254, mut: 0.67)	Cl025, Cl031
COL11A1	NM_001854.4:c.1771C>A	NP_001845.3:p.Pro591Thr	Missense	rs1259922538	0.000007955	0.00005785	0.00122249	REVEL: 0.841, dominio: collagen	HM43
COMT	NM_000754.4:c.1-5T>A	-	splice_region_variant	rs1601526844	NR	NR	0.04767726	SAI: 0.61 (Acceptor gain); NNSplice: Acc decreased (gDNA: 20920, mut: 0.77), Donor increased (gDNA: 20916 variante de interés, mut: 0.92), Donor gained (gDNA: 20911, mut: 0.83)	Bg026, Bt044, Bt051, Bt054, Bt061, Bt077, Bt079, Bt083, Bt084, Bt089, Bt098, Bt104, Bt133, Bt152, Bt011, Bt014, Bt015, Bt019, Bt031, Bt033, Cl028, Cl030, Md001, Md005, Md024, Md031, Md061, Md074, Pe007, Pe012, Pe013, Pe016, Pe021, Vu002, Vu007, Vu008, Vu012, Vu014
CST1	NM_001898.3:c.229-5T>A	-	splice_region_variant	rs761798325	7.95539e-06	0.00005784	0.00122249	SAI: 0.22 (Acceptor gain); NNSplice: Acc gained (gDNA: 2134, mut: 0.33), Donor gained (gDNA: 2135 variante de interés, mut: 0.41), Donor gained (gDNA: 2130, mut: 0.30)	Bt052
CST2	NM_001322.3:c.342+5G>A	-	splice_region_variant	rs145461994	0.00056872	0.0002540	0.00244499	SAI: 0.30 (Donor gain); NNSplice: Donor increased (gDNA:1532, mut: 0.58)	Cl009, Md026

CXCL12	NM_001033886.2:c.268G>A	NP_001029058.1:p.Gly90Arg	Missense	rs200785547	8.8187e-05	0.00002853	0.00244499	HSF: New Acceptor splice site : Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF); NNSplice: Acceptor lost (gDNA: 10461.5, sequence motif lost), Donor increased (gDNA: 10466, mut: 0.92), Donor gained (gDNA 10458, mut: 0.64)	Bt027, Md008
CYP17A1	NM_000102.4:c.889G>A	NP_000093.1:p.Gly297Arg	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.576, dominio: p450	HM13
CYP1A1	NM_001319217.2:c.1122G>T	NP_001306146.1:p.Glu374Asp	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.897, dominio: p450	Bt060
CYP1A1	NM_001319217.2:c.403C>T	NP_001306146.1:p.Arg135Trp	Missense	rs45442501	0.000296988	0.0002541	0.00122249	REVEL: 0.808, dominio: p450	Cl008
CYP1A1	NM_001319217.2:c.175C>T	NP_001306146.1:p.Pro59Ser	Missense	rs2063185796	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.654, dominio: p450	Bt053
CYP1A1	NM_001319217.2:c.1172_1174delCAA	NP_001306146.1:p.Thr391del	Inframe	rs752891625	0.0001392	0.0002541	0.00122249	Dominio: p450	Md024
CYP1A1	NM_001319217.2:c.205C>T	NP_001306146.1:p.Gln69Ter	Nonsense	rs572138243	0.00004775	0.0002541	0.00122249	PTC NMD	Cl019
CYP1B1	NM_000104.4:c.1168C>T	NP_000095.2:p.Arg390Cys	Missense	rs148542782	2.40354e-05	0.00002823	0.00122249	REVEL: 0.965, dominio: p450	HM3
CYP1B1	NM_000104.4:c.1103G>A	NP_000095.2:p.Arg368His	Missense	rs79204362	0.00582106	0.002234	0.00244499	REVEL: 0.751, dominio: p450	Bt061, Bt008
CYP1B1	NM_000104.4:c.830delT	NP_000095.2:p.Leu277Ter	Nonsense	rs766425037	2.91866e-05	0.0002329	0.00122249	ClinVar: Likely Pathogenic	Bt148
CYP1B1	NM_000104.4:c.182G>A	NP_000095.2:p.Gly61Glu	Missense	rs28936700	0.000317922	0.0001621	0.00122249	ClinVar: Pathogenic	Bt144
CYP1B1	NM_000104.4:c.1387T>G	NP_000095.2:p.Phe463Val	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.972, dominio: p450	Md039
CYP1B1	NM_000104.4:c.1235A>G	NP_000095.2:p.Tyr412Cys	Missense	rs768138533	1.19426e-05	0.0001130	0.00122249	REVEL: 0.771, dominio: p450	Bg017
CYP1B1	NM_000104.4:c.241T>A	NP_000095.2:p.Tyr81Asn	Missense	rs9282671	0.00355493	0.002077	0.00122249	REVEL: 0.811, dominio: p450	HM49
CYP2D6	NM_000106.6:c.1318C>T	NP_000097.3:p.Arg440Cys	Missense	rs777560972	2.05903e-05	-	0.00122249	REVEL: 0.624, dominio: p450	Bt131
CYP2D6	NM_000106.6:c.514_522dupTTTCGCCCC	NP_000097.3:p.Phe172_Pro174dup	Inframe	rs72549356	0.00009984	-	0.00122249	Dominio: p450	Bt013
CYP2D6	NM_000106.6:c.522_523ins(18)	NP_000097.3:p.Pro174_Asn175ins6	Inframe	rs72549356	0.0003716	0.0004706	0.00122249	Dominio: p450	Cl010
CYP2D6	NM_000106.6:c.352G>T	NP_000097.3:p.Gly118Trp	Nonsense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.658, dominio: p450	Pe017
CYP2D6	NM_000106.6:c.1251delC	NP_000097.3:p.Glu418Asnfs*11	Frameshift	rs758788054	0.00007670	0.0001343	0.00244499	PTC NMD	Bt113, Md002
CYP2D6	NM_000106.6:c.631dupG	NP_000097.3:p.Glu211Glyfs*43	Frameshift	rs763609904	0.0005977	0.0003994	0.00244499	PTC NMD	Bt049, Bt056
CYP2D6	NM_000106.6:c.1291G>C	NP_000097.3:p.Glu431Gln	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.512, dominio: p450	Md014
CYP2D6	NM_000106.6:c.1064A>G	NP_000097.3:p.Tyr355Cys	Missense	rs202102799	0.00217051	0.004017	0.0134474	REVEL: 0.512, dominio: p450	HM4, HM5, HM15, HM36, Bg012, Bg034, Bt063, Bt072, Bt105, Bt020, Md067
CYP2D6	NM_000106.6:c.638T>C	NP_000097.3:p.Leu213Pro	Missense	rs199535154	0.000539018	0.0003136	0.00244499	REVEL: 0.557, dominio: p450	Bt049, Bt056
EGFR	NM_005228.5:c.1724G>A	NP_005219.2:p.Gly575Glu	Missense	rs1249099747	0.000007957	0.00002891	0.00244499	REVEL: 0.517, dominio: GF_recep_IV	Bg022, Vu014

<i>EOMES</i>	NM_005442.4:c.1462C>T	NP_005433.2:p.Arg488Cys	Missense	rs759891392	1.59422e-05	0.00002891	0.00122249	REVEL: 0.612, dominio: T-box_assoc	HM27
<i>EP300</i>	NM_001429.4:c.1727C>A	NP_001420.2:p.Thr576Asn	Missense	rs201036817	0.000003977	0.00002891	0.00122249	REVEL: 0.0671, dominio: KIX	Md70
<i>ERBB2</i>	NM_004448.4:c.1013G>A	NP_004439.2:p.Cys338Tyr	Missense	NR	NR	NR	0.00244499	REVEL: 0.862, dominio: Furin-like	CI019, Md067
<i>ERBB2</i>	NM_004448.4:c.170A>G	NP_004439.2:p.Gln57Arg	Missense	rs140441229	0.00009909	0.0001791	0.00244499	REVEL: 0.579, dominio: Recep_L_domain	Bt057, Bt110
<i>ERBB2</i>	NM_004448.4:c.236A>C	NP_004439.2:p.Glu79Ala	Missense	rs61737968	0.0008326	0.0008758	0.00122249	REVEL: 0.955, dominio: Recep_L_domain	Vu013
<i>EXOC2</i>	NM_018303.6:c.1657dupC	NP_060773.3:p.Gln553Profs*8	Frameshift	NR	NR	NR	0.00122249	PCT NMD	Vu006
<i>FA2H</i>	NM_024306.5:c.1055C>T	NP_077282.3:p.Thr352Ile	Missense	rs375479162	0.00001186	0.00007701	0.00122249	REVEL: 0.659, dominio: FA_hydroxylase	Bt143
<i>FANCI</i>	NM_001113378.2:c.3493delG	NP_001106849.1:p.Asp1165Thrfs*34	Frameshift	rs758597713	5.16927e-05	0.0003950	0.00122249	ClinVar: Likely Pathogenic	Pe007
<i>FANCM</i>	NM_020937.4:c.107delG	NP_065988.1:p.Gly36Alafs*35	Frameshift	rs1885473805	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	Bt047
<i>FANCM</i>	NM_020937.4:c.997C>T	NP_065988.1:p.Gln333Ter	Nonsense	rs1886813093	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	Md010
<i>FANCM</i>	NM_020937.4:c.5707G>T	NP_065988.1:p.Glu1903Ter	Nonsense	NR	NR	NR	0.00244499	PTC NMD	Bt080, Md005
<i>FANCM</i>	NM_020937.4:c.5791C>T	NP_065988.1:p.Arg1931Ter	Nonsense	rs144567652	0.00101062	0.0003387	0.00122249	PTC NMD	HM33
<i>FGFR1</i>	NM_023110.3:c.1954G>A	NP_075598.2:p.Asp652Asn	Missense	rs751038400	4.00622e-06	-	0.00122249	REVEL: 0.625, dominio: PK_Tyr_Ser-Thr	Bg011
<i>FGFR4</i>	NM_213647.3:c.1590C>A	NP_998812.1:p.His530Gln	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.929, dominio: PK_Tyr_Ser-Thr	HM15
<i>GSTT1</i>	NM_000853.3:c.301T>C	NP_000844.2:p.Trp101Arg	Missense	rs141759372	0.000369206	0.00009959	0.00122249	REVEL: 0.7, dominio: Glutathione S-transferase, C-terminal-like	Bt097
<i>HELQ</i>	NM_133636.5:c.2129G>A	NP_598375.3:p.Arg710His	Missense	rs180763973	2.84801e-05	0.0001208	0.00122249	REVEL: 0.936, dominio: Helicase_C	Md064
<i>HELQ</i>	NM_133636.5:c.3095delA	NP_598375.3:p.Tyr1032Serfs*4	Frameshift	rs761786816	0.00002390	0.00005663	0.00244499	PTC NMD	Md045, Md057
<i>IGFBP5</i>	NM_000599.4:c.120dupC	NP_000590.1:p.Ser41Glnfs*78	Frameshift	rs748087175	0.0001653	0.00004781	0.00122249	PTC NMD	Bt097
<i>IRAK4</i>	NM_016123.4:c.651+2dupT	-	splice_donor_variant	rs1940935618	NR	NR	0.00366748	PTC NMD	HM3, CI007, CI022
<i>IRF6</i>	NM_006147.4:c.868T>G	NP_006138.1:p.Phe290Val	Missense	NR	NR	NR	0.0122249	REVEL: 0.858, dominio: IRF-3	HM19, HM20, HM21, HM22, HM23, HM24, HM26, HM27, HM28
<i>ITGA6</i>	NM_000210.4:c.2929G>A	NP_000201.2:p.Ala977Thr	Missense	rs770788393	2.8265e-05	-	0.00122249	REVEL: 0.597, dominio: Integrin_alpha2	Md026
<i>ITGAL</i>	NM_002209.3:c.259+2T>C	-	splice_donor_variant	rs765719200	2.79653e-05	0.0001705	0.00122249	PTC MND	Bt049
<i>ITGAL</i>	NM_002209.3:c.956A>G	NP_002200.2:p.Lys319Arg	Missense	rs2050603766	NR	NR	0.00244499	REVEL: 0.548, dominio: VWA	HM27, Md044
<i>ITGAX</i>	NM_000887.5:c.1357C>T	NP_000878.2:p.Gln453Ter	Nonsense	NR	NR	NR	0.00122249	PTC MND	Bt064
<i>ITGAX</i>	NM_000887.5:c.2257C>G	NP_000878.2:p.Leu753Val	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.503, dominio: Integrin_alpha2	Bt056
<i>L3MBTL3</i>	NM_032438.4:c.1076T>G	NP_115814.1:p.Phe359Cys	Missense	rs1205491825	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.959, dominio: MBT	Bt113
<i>LGR6</i>	NM_001017403.2:c.515A>G	NP_001017403.1:p.Asn172Ser	Missense	rs376357186	0.0001433	0.0001129	0.00122249	REVEL: 0.718, dominio: LRR_8	Bt141

MDC1	NM_014641.3:c.638_642delCCTTC	NP_055456.2:p.Ala213Gluufs*5	Frameshift	rs770872172	0.00231051	0.004995	0.00122249	PTC NMD	Bt020
MDC1	NM_014641.3:c.618_636del	NP_055456.2:p.Gly207Profs*4	Frameshift	rs776938080	0.002339	0.005067	0.00122249	PTC NMD	Bt020
MDM4	NM_002393.5:c.1361C>T	NP_002384.2:p.Thr454Met	Missense	rs1270135772	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.872, dominio: zf-C3HC4_3	Bt124
MMP14	NM_004995.4:c.215A>G	NP_004986.1:p.Tyr72Cys	Missense	rs762770552	1.19473e-05	-	0.00122249	REVEL: 0.652, dominio: PG_binding_1	HM46
MMP2	NM_004530.6:c.481C>T	NP_004521.1:p.Arg161Ter	Nonsense	NR	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	Pe014
MMP3	NM_002422.5:c.559C>T	NP_002413.1:p.Pro187Ser	Missense	rs140794544	0.000458452	0.0007388	0.00122249	REVEL: 0.626, dominio: Peptidase_M10	HM14
MMP3	NM_002422.5:c.963delG	NP_002413.1:p.Lys321Asnfs*8	Frameshift	rs781978638	0.00001194	0.00005794	0.00122249	PTC NMD	CI009
MRPS30	NM_016640.4:c.889A>G	NP_057724.2:p.Thr297Ala	Missense	rs759097657	2.39286e-05	0.00005824	0.00122249	REVEL: 0.618, dominio: PDCD9	HM46
MRPS30	NM_016640.4:c.384_389dupGCCCGA	NP_057724.2:p.Glu134_Pro135dup	Inframe	rs760461308	0.004762	0.002093	0.00122249	Dominio: PDCD9	Bg030
MSH2	NM_000251.3:c.1045C>G	NP_000242.1:p.Pro349Ala	Missense	rs267607939	9.14753e-05	0.0003669	0.00122249	REVEL: 0.993, dominio: MutS_III	Bt028
MSH2	NM_000251.3:c.80C>T	NP_000242.1:p.Pro27Leu	Missense	rs750746034	3.66217e-05	0.00003256	0.00122249	REVEL: 0.683, dominio: MutS_I	HM2
MSH2	NM_000251.3:c.435T>G	NP_000242.1:p.Ile145Met	Missense	rs63750124	0.000322162	0.0003951	0.00122249	REVEL: 0.557, dominio: MutS_II	Bt151
MSH6	NM_000179.3:c.3727A>T	NP_000170.1:p.Thr1243Ser	Missense	rs147453999	0.000274671	0.0006216	0.00122249	REVEL: 0.587, dominio: MutS_V	Md044
MSH6	NM_000179.3:c.3758T>A	NP_000170.1:p.Val1253Glu	Missense	rs202066386	0.000163223	0.00002825	0.00122249	REVEL: 0.952, dominio: MutS_V	Bt149
MSH6	NM_000179.3:c.3788G>A	NP_000170.1:p.Arg1263His	Missense	rs147852216	0.000175145	0.0003106	0.00122249	REVEL: 0.66, dominio: MutS_V	Bt129
MSR1	NM_138715.3:c.847G>C	NP_619729.1:p.Asp283His	Missense	rs140186172	0.000215622	0.0002270	0.00122249	REVEL: 0.642, dominio: collagen	CI012
MSR1	NM_138715.3:c.877C>T	NP_619729.1:p.Arg293Ter	Nonsense	rs41341748	0.008293	0.01171	0.00611247	PTC NMD	HM9, Bt086, Bt034, CI008, Md015
MUC16	NM_024690.2:c.36670+1G>A	-	splice_donor_variant	rs760411734	4.02046e-06	-	0.00122249	PTC NMD	HM6
MUC16	NM_024690.2:c.31208_31211delAGAG	NP_078966.2:p.Glu10403Alafs*7	Frameshift	rs2045538190	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	Bg004
MUC16	NM_024690.2:c.2211_2212delGT	NP_078966.2:p.Ala739Aspfs*19	Frameshift	NR	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	Bt060
MUC16	NM_024690.2:c.1742G>A	NP_078966.2:p.Trp581Ter	Nonsense	rs750655863	2.81131e-05	0.0001159	0.00122249	PTC NMD	HM3
MUC16	NM_024690.2:c.40542+5G>A	-	splice_region_variant	rs200335034	0.000651849	0.0005947	0.00122249	SAI: 0.22 (Donor loss); HSF: Broken WT Donor Site: Alteration of the WT Donor site, most probably affecting splicing (HSF y MaxEnt)	Bt003
MUC16	NM_024690.2:c.36670+4A>T	-	Splice_region_variant	rs7256403	0.000530786	0.0001702	0.00244499	SAI: 0.67 (Donor loss); HSF: Broken WT Donor Site : Alteration of the WT Donor site, most probably affecting splicing (HSF y MaxEnt)	Bt138, CI011
MUC16	NM_024690.2:c.5731C>T	NP_078966.2:p.Arg1911Ter	Nonsense	rs371327216	6.02376e-05	0.00008696	0.00122249	PTC NMD	Md033

MUC16	NM_024690.2:c.37738-7_37738-3delTCTAC	-	Splice_region_variant	rs143697754	0.00174514	0.001329	0.00244499	SAI: 0.50 (Acceptor loss); HSF: New Acceptor splice site : Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (cryptic exon activation) (HSF), New Donor splice site : Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF), Broken WT Acceptor Site : Alteration of the WT Acceptor site, most probably affecting splicing (HSF), New Acceptor splice site : Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (cryptic exon activation) (HSF), New Acceptor splice site : Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (cryptic exon activation) (MaxEnt)	Md006, Md074
MUTYH	NM_001128425.2:c.1187G>A	NP_001121897.1:p.Gly396Asp	Missense	rs36053993	0.00302712	0.003077	0.00366748	ClinVar: Likely Pathogenic	Bg006, Bt040, Md021
MUTYH	NM_001128425.2:c.544C>T	NP_001121897.1:p.Arg182Cys	Missense	rs747993448	3.97681e-06	-	0.00122249	ClinVar: Likely Pathogenic	CI009
MUTYH	NM_001128425.2:c.536A>G	NP_001121897.1:p.Tyr179Cys	Missense	rs34612342	0.00153507	0.001185	0.00488998	ClinVar: Likely Pathogenic	Bt072, CI008, Md007, Md031
NAT2	NM_000015.3:c.364G>C	NP_000006.2:p.Asp122His	Missense	rs4986996	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.527, dominio: Acetyltransf_2	Bt080
NCOA3	NM_181659.3:c.3792_3793insG	NP_858045.1:p.Gln1265Alafs*21	Frameshift	rs1555818299	0.0006506	0.0002653	0.00122249	PTC NMD	Bt063
NOTCH2	NM_024408.4:c.1450C>T	NP_077719.2:p.Pro484Ser	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.771, dominio: EGF	Bt037
NOTCH2	NM_024408.4:c.860C>T	NP_077719.2:p.Pro287Leu	Missense	rs782688677	1.59599e-05	0.00008685	0.00122249	REVEL: 0.762, dominio: EGF	Bt090
PALB2	NM_024675.3:c.984delT	NP_078951.2:p.Leu329Terfs	Frameshift	Novel	NR	NR	0.00125	ACMG/AMP: Patogénica (PVS1+PM2)	CI008
PALB2	NM_024675.3:c.986delT	NP_078951.2:p.Leu329Glnfs*17	Frameshift	Novel	NR	NR	0.00125	ACMG/AMP: Patogénica (PVS1+PM2)	CI008
PALB2	NM_024675.3:c.3350+4A>G	-	Splice_region_variant	rs180177136	0.000003977	0	0.00125	ACMG/AMP: Probablemente patogénica (PS3 muy fuerte+PM2+BP4)	Bt031
PCGF2	NM_007144.3:c.76_78delATC	NP_009075.1:p.Ile26del	Inframe	NR	NR	NR	0.00122249	Dominio: zf-C3HC4_2	Bg019
PHIP	NM_017934.7:c.3503T>C	NP_060404.4:p.Ile1168Thr	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.558, dominio: Bromodomain	Pe003
PMS1	NM_000534.5:c.329C>G	NP_000525.1:p.Thr110Arg	Missense	rs372752293	6.76854e-05	0.0002314	0.00122249	REVEL: 0.959, dominio: HATPase_c	HM12
PMS1	NM_000534.5:c.1888C>T	NP_000525.1:p.Arg630Ter	Nonsense	rs139932286	0.0001481	0.0001414	0.00122249	PTC NMD	Bt082
PMS2	NM_000535.7:c.953A>G	NP_000526.2:p.Tyr318Cys	Missense	rs139438201	0.000433751	0.0001975	0.00244499	REVEL: 0.832, dominio: DNA_mis_repair	Bt097, Bt027
PMS2	NM_000535.7:c.2395C>T	NP_000526.2:p.Arg799Trp	Missense	rs149202766	0.00051245	0.003103	0.00855746	REVEL: 0.977, dominio: MutL_C	HM3, HM5, HM30, Bg031, Bt118, CI039, Vu009

<i>PMS2</i>	NM_000535.7:c.857A>G	NP_000526.2:p.Asp286Gly	Missense	rs116788608	0.000119316	0.0001693	0.00122249	REVEL: 0.626, dominio: DNA_mis_repair	Md013
<i>POLD1</i>	NM_002691.3: c.1374_1377delinsTCCT	NP_002682.2:p.Met459Pro	Missense (MNV)	rs1601216017	NR	NR	0.00122249	Dominio: DNA_pol_B_exo1	Cl025
<i>PPP2R1B</i>	NM_002716.5:c.1554+1G>A	-	Splice_donor_variant	rs538152364	6.0845e-05	0.0003221	0.00122249	PTC MND	Bt094
<i>PPP2R5B</i>	NM_006244.4:c.311G>A	NP_006235.1:p.Arg104Gln	Missense	rs1945169542	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.852, dominio: B56	Md038
<i>PRKDC</i>	NM_006904.7:c.5748-6C>G	-	Splice_region_variant	NR	NR	NR	0.00122249	SAI: 0.27 (Acceptor gain); NNSplice: Donor gained (gDNA: 97635, mut: 0.31)	Bt119
<i>PTCH1</i>	NM_000264.5:c.3487G>A	NP_000255.2:p.Gly1163Ser	Missense	rs113663584	0.000528974	0.0005645	0.00122249	REVEL: 0.853, dominio: Patched	Md022
<i>PTCH1</i>	NM_000264.5:c.3241G>A	NP_000255.2:p.Val1081Met	Missense	rs587778629	9.15182e-05	0.0002602	0.00244499	REVEL: 0.779, dominio: Patched	Bt048, Bt11
<i>PTCH1</i>	NM_000264.5:c.3100G>A	NP_000255.2:p.Val1034Met	Missense	rs760902564	1.59127e-05	0.00002822	0.00122249	REVEL: 0.663, dominio: Patched	Cl025
<i>PTCH1</i>	NM_000264.5:c.1808G>A	NP_000255.2:p.Arg603His	Missense	rs199523893	0.000111336	0.0003668	0.00122249	REVEL: 0.84, dominio: Sterol-sensing	Bt129
<i>PTPRF</i>	NM_002840.5:c.4138C>T	NP_002831.2:p.Arg1380Cys	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.786, dominio: Y_phosphatase	Bt023
<i>PTPRF</i>	NM_002840.5:c.4661G>A	NP_002831.2:p.Arg1554His	Missense	rs778737593	8.01385e-06	0.00002828	0.00122249	REVEL: 0.775, dominio: Y_phosphatase	Bt061
<i>PTPRF</i>	NM_002840.5:c.4462T>C	NP_002831.2:p.Tyr1488His	Missense	rs371587895	3.58466e-05	-	0.00122249	REVEL: 0.555, dominio: Y_phosphatase	Bg001
<i>RAB34</i>	NM_031934.6:c.769T>G	NP_114140.4:p.Cys257Gly	Missense	rs2033011176	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.688, dominio: Ras	Bt070
<i>RAD50</i>	NM_005732.4:c.3036+5G>A	-	Splice_region_variant	rs181016343	0.00138738	0.003391	0.00244499	HFS: Broken WT Donor Site : Alteration of the WT Donor site, most probably affecting splicing; NNSplice: 0.25 (Donor increased)	HM8, Bt145
<i>RAD51D</i>	NM_002878.3:c.556C>T	NP_002869.3:p.Arg186Ter	Nonsense	rs387906843	0.00004011	0	0.00125	ACMG/AMP: Patogénica (PVS1+PS4+PM1)	Cl020
<i>RB1</i>	NM_000321.3:c.539+1G>A	-	Splice_donor_variant	rs1566187856	NR	NR	0.00122249	ClinVar: Likely Pathogenic	HM29
<i>RET</i>	NM_020975.6:c.785T>C	NP_066124.1:p.Val262Ala	Missense	rs139790943	0.000247452	0.00008506	0.00122249	REVEL: 0.748, dominio: Cadherin	Bt096
<i>RET</i>	NM_020975.6:c.166C>A	NP_066124.1:p.Leu56Met	Missense	rs145633958	0.00273353	0.001552	0.00488998	REVEL: 0.506, dominio: RET_CLD1	Bg013, Bt056, Md058, Md075
<i>RINT1</i>	NM_021930.6:c.2159G>T	NP_068749.3:p.Cys720Phe	Missense	rs201892348	7.97989e-06	0.00002842	0.00122249	REVEL: 0.562, dominio: RINT1_TIP1	Cl014
<i>RINT1</i>	NM_021930.6:c.1886+5G>A	-	Splice_region_variant	rs775416861	0.00001599	0.00002907	0.00122249	SAI: 0.70 (Donor gain); Donor increased (gDNA:31871 mut: 0.80)	Pe005
<i>RUNX1</i>	NM_001754.5:c.463G>A	NP_001745.2:p.Val155Ile	Missense	rs763464804	0.000007955	-	0.00122249	REVEL: 0.746, dominio: Runt	Bt145
<i>RUNX1</i>	NM_001754.5:c.257C>T	NP_001745.2:p.Pro86Leu	Missense	rs2057999909	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.854, dominio: Runt	Pe007
<i>S1PR3</i>	NM_005226.4:c.458G>A	NP_005217.2:p.Arg153His	Missense	rs117829798	0.00318626	0.003331	0.00977995	REVEL: 0.645, dominio: 7tm-1	HM24, HM35, Bg019, Bt3, Bt31, Md040, Md067, Vu006
<i>SCNN1A</i>	NM_001038.6:c.1484C>T	NP_001029.1:p.Ser495Leu	Missense	rs148749888	0.00112945	0.0008183	0.00122249	REVEL: 0.654, dominio: ASC	Bt082
<i>SCNN1A</i>	NM_001038.6:c.418T>G	NP_001029.1:p.Tyr140Asp	Missense	rs564898684	5.10795e-05	0.0001854	0.00122249	REVEL: 0.548, dominio: ASC	Md047

<i>SDHD</i>	NM_003002.4:c.224T>C	NP_002993.1:p.Leu75Ser	Missense	rs1060503777	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.588, dominio: CybS	Pe025
<i>SEMA4D</i>	NM_001371194.2:c.1196T>C	NP_001358123.1:p.Leu399Ser	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.78, dominio: Sema	Bt012
<i>SLC4A7</i>	NM_001321103.2:c.2416C>T	NP_001308032.1:p.Leu806Phe	Missense	rs201738916	6.44351e-05	0.0004025	0.00122249	REVEL: 0.616, dominio: cotransp	HM45
<i>SLC4A7</i>	NM_001321103.2:c.2482C>G	NP_001308032.1:p.Pro828Ala	Missense	rs143008404	0.000107682	-	0.00122249	REVEL: 0.584, dominio: cotransp	Bt138
<i>SMC1A</i>	NM_006306.4:c.2421-3_2421-2delCA	-	Splice_acceptor_variant	rs2075664421	NR	NR	0.00244499	PTC NMD	CI019, Pe011
<i>SSBP4</i>	NM_032627.5:c.841+3A>G	-	Splice_region_variant	rs1023740683	NR	NR	0.00122249	SAI: 0.47 (Donor gain); NNSplice: Donor gained (gDNA: 13470, mut: 0.62)	CI006
<i>TCF7L2</i>	NM_030756.5:c.598G>A	NP_110383.2:p.Asp200Asn	Missense	rs776719680	1.19318e-05	-	0.00122249	REVEL: 0.729, dominio: CTNNB1_binding	CI030
<i>TCF7L2</i>	NM_030756.5:c.1093-6dupC	-	Splice_region_variant	rs768263298	0.00001591	0.0001411	0.00122249	HSF: Broken WT Acceptor Site : Alteration of the WT Acceptor site, most probably affecting splicing (HSF); New Acceptor splice site : Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF); NNSplice: Acc gained (gDNA: 202075, mut: 0.38)	Bt024
<i>TERT</i>	NM_198253.3:c.2768C>T	NP_937983.2:p.Pro923Leu	Missense	rs387907251	4.01188e-06	-	0.00122249	REVEL: 0.741, dominio: RVT_1	Bt028
<i>TET2</i>	NM_001127208.3:c.1970C>G	NP_001120680.1:p.Ser657Ter	Nonsense	NR	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	HM48
<i>TET2</i>	NM_001127208.3:c.3699G>A	NP_001120680.1:p.Trp1233Ter	Nonsense	NR	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	Md010
<i>TGFB1</i>	NM_000660.7:c.466C>T	NP_000651.3:p.Arg156Cys	Missense	rs200482214	NR	NR	0.00366748	ClinVar: Likely Pathogenic	Bt072, Bt006, Pe003
<i>TGFB2</i>	NM_003242.6:c.1159G>A	NP_003233.4:p.Val387Met	Missense	rs35766612	0.00103401	0.0003954	0.00244499	REVEL: 0.79, dominio: PK_Tyr_Ser-Thr	Bg018, Bt152
<i>TGFB2</i>	NM_003242.6:c.985G>A	NP_003233.4:p.Ala329Thr	Missense	rs148665451	0.000103598	-	0.00122249	REVEL: 0.59, dominio: PK_Tyr_Ser-Thr	CI007
<i>TGFB2</i>	NM_003242.6:c.1159G>T	NP_003233.4:p.Val387Leu	Missense	rs35766612	0.000351325	0.00002824	0.00122249	REVEL: 0.536, dominio: PK_Tyr_Ser-Thr	Bg036
<i>TIE1</i>	NM_005424.5:c.2959G>C	NP_005415.1:p.Val987Leu	Missense	rs1165084270	3.97636e-06	0.00002891	0.00122249	REVEL: 0.608, dominio: PK_Tyr_Ser-Thr	Bt148
<i>TIMP3</i>	NM_000362.5:c.361G>A	NP_000353.1:p.Val121Met	Missense	rs145285380	0.0001909	0.0001975	0.00122249	REVEL: 0.522, dominio: TIMP	Md041
<i>TNS1</i>	NM_022648.7:c.622C>T	NP_072174.3:p.Arg208Cys	Missense	rs755548915	4.77236e-05	0.0001412	0.00122249	REVEL: 0.686, dominio: PTEN_C2	Bg031
<i>TNS1</i>	NM_022648.7:c.607T>C	NP_072174.3:p.Cys203Arg	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.874, dominio: PTEN_C2	HM43
<i>TOP2A</i>	NM_001067.4:c.2321A>T	NP_001058.2:p.Asn774Ile	Missense	rs61756342	0.001201	0.0008182	0.00488998	REVEL: 0.54, dominio: DNA_topoisolV	Bt007, Mz002, Pe020
<i>TP53BP1</i>	NM_005657.4:c.2702-2dupA	-	Splice_acceptor_variant	rs2046069135	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	Bt146

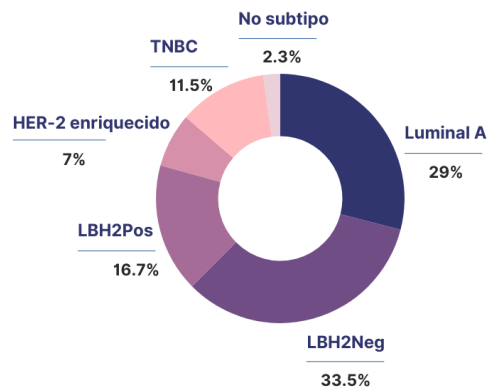
TP53BP1	NM_005657.4:c.2702-5_2702-4delTT	-	Splice_region_variant	rs749575788	NR	NR	0.00244499	HSF: Broken WT Acceptor Site : Alteration of the WT Acceptor site, most probably affecting splicing (HSF), New Acceptor splice site : Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (cryptic exon activation) (HSF), New Acceptor splice site : Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (cryptic exon activation) (MaxEnt); NNSplice: Acc increased (gDNA: 63246, mut: 0.44)	Bg005
UGT1A1	NM_000463.3:c.1228G>T	NP_000454.1:p.Gly410Ter	Nonsense	NR	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	CI015
VDR	NM_001017535.2:c.1121C>T	NP_001017535.1:p.Pro374Leu	Missense	rs200556498	3.18215e-05	-	0.00122249	REVEL: 0.729, dominio: Hormone_recep	Bt052
VDR	NM_001017535.2:c.725T>C	NP_001017535.1:p.Ile242Thr	Missense	rs560458649	0.00002387	0.00002891	0.00122249	REVEL: 0.889, dominio: Hormone_recep	Md056
VDR	NM_001017535.2:c.176C>T	NP_001017535.1:p.Thr59Ile	Missense	rs145002466	0.0002071	0.0001411	0.00244499	REVEL: 0.683, dominio: zf-C4	Md020, Md044
VPS13B	NM_017890.5:c.972T>G	NP_060360.3:p.Tyr324Ter	Nonsense	rs1243094816	NR	NR	0.00488998	PTC NMD	HM22, HM23, HM26, HM28
VPS13B	NM_017890.5:c.11695_11698delAGTG	NP_060360.3:p.Ser3901Argfs*40	Frameshift	rs386834066	1.59072e-05	-	0.00122249	ClinVar: Likely Pathogenic	CI037
VPS13B	NM_017890.5:c.4159_4160delICT	NP_060360.3:p.Leu1387Trpfs*19	Frameshift	NR	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	Bt062
WNT7A	NM_004625.4:c.950A>C	NP_004616.2:p.Gln317Pro	Missense	rs1029521855	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.841, dominio: wnt	Vu011
WRN	NM_000553.6:c.3688-2A>G	-	Splice_acceptor_variant	NR	NR	NR	0.00122249	PTC NMD	HM53
WRN	NM_000553.6:c.95A>G	NP_000544.2:p.Lys32Arg	Missense	rs34477820	0.00305066	0.001469	0.00244499	HSF: Alteration of auxiliary sequences : Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-2); NNSplice: Donor loss (gDNA: 24742 sitio de la variante, sequence motif lost), Donor increased (gDNA: 24736, mut: 0.99)	HM26, Pe003
WRN	NM_000553.6:c.326G>A	NP_000544.2:p.Cys109Tyr	Missense	rs142346721	0.00003580	-	0.00122249	REVEL: 0.604, dominio: DNA_pol_A_exo1	Bt040
XRCC1	NM_006297.3:c.1145G>A	NP_006288.2:p.Arg382His	Missense	rs146443634	0.000338187	-	0.00122249	REVEL: 0.531, dominio: BRCT	CI012
XRCC1	NM_006297.3:c.1138A>G	NP_006288.2:p.Ile380Val	Missense	rs751456113	1.59156e-05	0.00002892	0.00122249	REVEL: 0.551, dominio: BRCT	Vu008
XRCC1	NM_006297.3:c.379C>T	NP_006288.2:p.Arg127Trp	Missense	rs199854803	3.19213e-05	-	0.00366748	REVEL: 0.585, dominio: XRCC1_N	Bg030, Bg032, Bt044
XRCC6	NM_001469.5:c.128A>G	NP_001460.1:p.Asp43Gly	Missense	NR	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.807, dominio: Ku_N	HM32
ZNF226	NM_001032373.2:c.1787T>C	NP_001027545.1:p.Phe596Ser	Missense	rs1217782464	NR	NR	0.00122249	REVEL: 0.503, dominio: zf-C2H2	CI017

NR: no reportada. PTC: premature termination codon

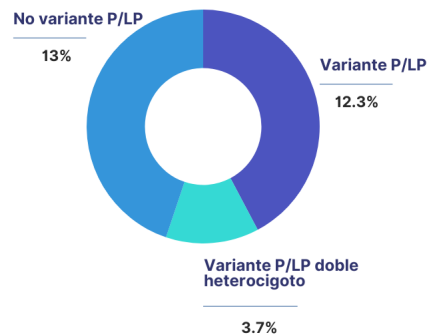
Luego de realizar la determinación de la patogenicidad de las variantes germinales identificadas en los 253 genes, se estableció la distribución de estas en los cinco subtipos moleculares de cáncer de seno. En la Figura 6 se describe la distribución de las 400 pacientes en los cinco subtipos moleculares, así como el porcentaje de pacientes con variantes germinales P/LP en cada subtipo de cáncer de seno. El 33.5% de los casos fueron clasificados como LBH2Neg, seguido por Luminal A (29%), LBH2Pos (16.7%), TNBC (11.5%), HER-2 enriquecido (7%) y el 2.3% de los casos no tenían datos para realizar la clasificación en los subtipos histológicos.

Como se mencionó previamente, se identificaron variantes germinales P/LP en el 56.7% de las mujeres con cáncer de seno no seleccionado, la distribución de estas pacientes en los cinco subtipos moleculares es la siguiente: LBH2Neg: 19.2%, Luminal A: 16%, LBH2Pos: 9.7%, TNBC: 6.7%, HER-2 enriquecido: 3.2% y pacientes sin subtipo molecular: 1.7%.

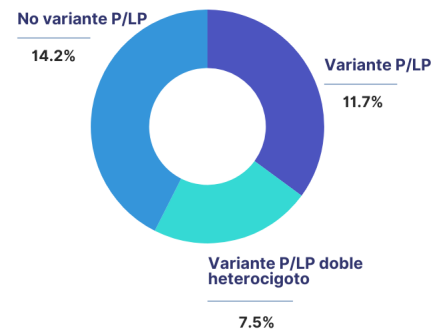
**A. Distribución de las 400 pacientes en los subtipos moleculares**



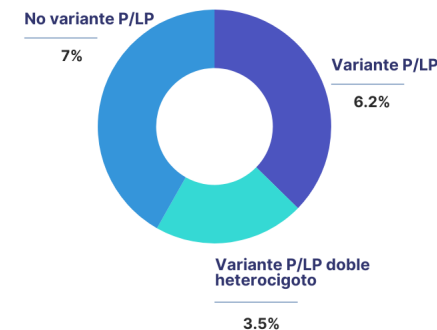
**B. Pacientes con cáncer de seno Luminal A**



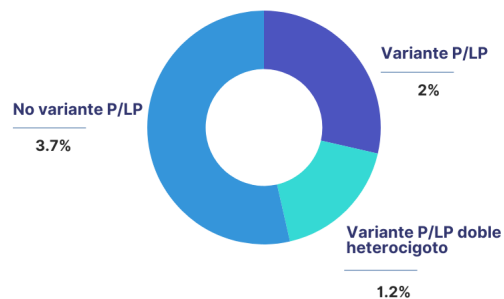
**C. Pacientes con cáncer de seno Luminal B HER-2 negativo**



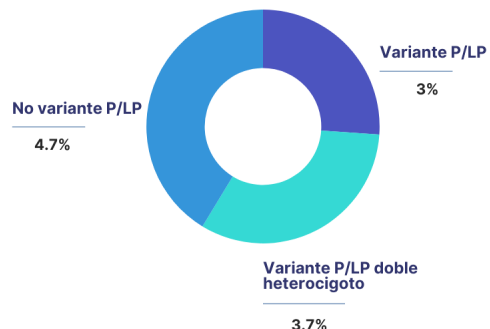
**D. Pacientes con cáncer de seno Luminal B HER-2 positivo**



**E. Pacientes con cáncer de seno HER-2 enriquecido**



**F. Pacientes con cáncer de seno TNBC**



**G. Pacientes con cáncer de seno sin subtipo molecular**

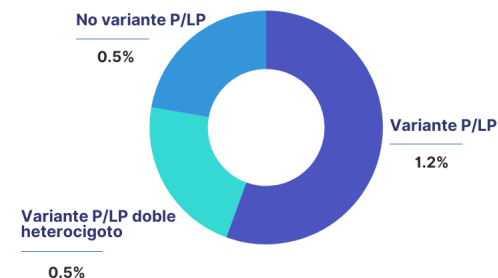


Figura 6. Distribución de las 400 pacientes y porcentaje de pacientes con variantes P/LP en los cinco subtipos moleculares. A. Luminal A: 116 pacientes, LBH2Neg: 134 pacientes, LBH2Pos: 67 pacientes, HER-2 enriquecido: 28 pacientes, TNBC: 46 pacientes, No subtipo: 9 pacientes. B. Pacientes con cáncer de seno Luminal A: variante P/LP: 49, variante P/LP doble heterocigoto: 15, no variante P/LP: 52. C. Pacientes con cáncer de seno LBH2Neg: variante P/LP: 47, variante P/LP doble heterocigoto: 30, no variante P/LP: 57. D. Pacientes con cáncer de seno LBH2Pos: variante P/LP: 25, variante P/LP doble heterocigoto: 14, no variante P/LP: 28. E. Pacientes con cáncer de seno HER-2 enriquecido: variante P/LP: 8, variante P/LP doble heterocigoto: 5, no variante P/LP: 15. F. Pacientes con TNBC: variante P/LP: 12, variante P/LP doble heterocigoto: 15, no variante P/LP: 19. G. Pacientes sin subtipo molecular: variante P/LP: 5, variante P/LP doble heterocigoto: 2, no variante P/LP: 2.

Se identificó que algunos genes eran exclusivos de los subtipos moleculares de cáncer de seno. En el subtipo Luminal A los genes exclusivos se identificaron en el 3.75% de las pacientes. En el cáncer de seno LBH2Neg se identificaron en el 7.25% de los casos. En el subtipo molecular LBH2Pos, el 2.5% de las mujeres con cáncer de seno no seleccionado tenían variantes germinal en genes exclusivos para este subtipo. En el cáncer de seno HER-2 enriquecido los genes exclusivos se identificaron en el 0.75% de las pacientes. Por último, en el TNBC los genes exclusivos estaban distribuidos en el 1.75% de los casos. En las Tablas 9-13 se describen las características genéticas y de herencia por subtipos moleculares de cáncer de seno, en cada uno de los pacientes con variantes germinales P/LP; en la Tabla 14 se describen las características genéticas y de herencia en los casos donde no fue posible determinar el subtipo molecular de cáncer de seno.

Tabla 9. Características genéticas y de herencia de las pacientes con cáncer de seno Luminal A con variantes germinales P/LP.

<b>Paciente (código)</b>	<b>Genes con variantes P/LP</b>	<b>Herencia</b>	<b>Criterios NCCN v1.2023</b>
Bg001	<i>PTPRF</i>	Familiar	Si
Bg005	<i>TP53BP1</i>	Esporádico	No
Bg009	<i>CHEK2, S1PR3</i>	Familiar	Si
Bg018	<i>TGFBR2</i>	Esporádico	Si
Bg019	<i>PCGF2</i>	Hereditario	Si
Bg032	<i>XRCC1</i>	Familiar	Si
Bt002	<i>ATM</i>	Esporádico	Si
Bt025	<i>AR</i>	Hereditario	No
Bt033	<i>COMT</i>	Familiar	No
Bt034	<i>MSR1</i>	Esporádico	No
Bt037	<i>NOTCH2</i>	Familiar	Si
Bt048	<i>PTCH1</i>	Esporádico	No
Bt052	<i>CST1, VDR</i>	Esporádico	No
Bt055	<i>BLM</i>	Hereditario	Si
Bt060	<i>CYP1A1, MUC16</i>	Familiar	No
Bt061	<i>COMT, CYP1B1, PTPRF</i>	Esporádico	No
Bt070	<i>RAB34</i>	Esporádico	No
Bt074	<i>COL10A1</i>	Familiar	Si
Bt083	<i>COMT</i>	Esporádico	Si
Bt086	<i>MSR1</i>	Familiar	Si
Bt090	<i>NOTCH2</i>	Familiar	Si
Bt096	<i>RET</i>	Hereditario	Si

Bt097	<i>GSTT1, IGFBP5, PMS2</i>	Hereditario	No
Bt098	COMT	Esporádico	Si
Bt104	COMT	Esporádico	No
Bt107	BRCA2	Hereditario	Si
Bt133	COMT	Esporádico	No
Bt135	ADAMTSL1	Familiar	No
Bt146	BRCA2, <i>TP53BP1</i>	Familiar	Si
CI002	ADAMTSL1	Esporádico	Si
CI004	ATM	Esporádico	No
CI021	ADAMTSL1	Esporádico	Si
CI022	IRAK4	Esporádico	Si
CI028	COMT	Esporádico	No
CI037	VPS13B	Esporádico	No
CI039	PMS2	Esporádico	No
HM003	CYP1B1, IRAK4, MUC16, PMS2	Familiar	No
HM009	MSR1	Esporádico	No
HM013	<i>CYP17A1</i>	Esporádico	No
HM014	MMP3	Familiar	Si
HM029	<i>RB1</i>	Hereditario	No
HM033	FANCM	Esporádico	No
HM036	CYP2D6	Esporádico	Si
HM043	COL11A1, TNS1	Familiar	Si
HM049	CYP1B1	Familiar	No
HM053	CLGN, WRN	Familiar	No
Md001	COMT	Familiar	No
Md002	CYP2D6	Familiar	Si
Md005	<i>BLM, COMT, FANCM</i>	Esporádico	Si
Md020	VDR	Familiar	Si
Md021	MUTYH	Esporádico	No
Md031	COMT, MUTYH	Familiar	No
Md033	MUC16	Familiar	Si
Md041	<i>TIMP3</i>	Familiar	Si
Md055	AR	Familiar	Si
Pe007	COMT, <i>FANCI, RUNX1</i>	Hereditario	Si
Pe012	BRCA2, COMT	Esporádico	Si
Pe013	COMT	Familiar	Si
Pe016	ANKLE1, COMT	Familiar	No
Pe017	CYP2D6	Familiar	Si
Pe023	CASP10	Esporádico	No
Pe025	<i>SDHD</i>	Familiar	Si
Vu009	PMS2	Hereditario	Si

Vu014

COMT, EGFR	Esporádico	No
------------	------------	----

Los genes exclusivos para el subtipo molecular Luminal A están escritos en rojo.

Tabla 10. Características genéticas y de herencia de las pacientes con cáncer de seno Luminal B HER-2 negativo con variantes germinales P/LP.

Paciente (código)	Genes con variantes P/LP	Herencia	Criterios NCCN v1.2023
Bg004	MUC16	Esporádico	Si
Bg006	MUTYH	Familiar	Si
Bg012	CYP2D6	Hereditario	Si
Bg022	EGFR	Familiar	No
Bg026	CASP10, COMT	Familiar	No
Bg030	MRPS30, XRCC1	Familiar	No
Bt004	BRCA2	Esporádico	No
Bt012	SEMA4D	Familiar	No
Bt014	COMT	Esporádico	No
Bt019	COMT	Hereditario	Si
Bt027	CXCL12, PMS2	Familiar	No
Bt028	MSH2, TERT	Familiar	No
Bt044	COMT, XRCC1	Esporádico	Si
Bt047	FANCM	Familiar	No
Bt049	CYP2D6, ITGAL	Esporádico	Si
Bt054	BRCA2, COMT	Familiar	Si
Bt063	BRCA2, CYP2D6, NCOA3	Esporádico	No
Bt065	ATM	Familiar	Si
Bt079	COMT	Esporádico	No
Bt080	FANCM, NAT2	Familiar	No
Bt082	PMS1, SCNN1A	Familiar	Si
Bt084	ATM, ATR, COMT	Familiar	Si
Bt087	AR	Familiar	Si
Bt089	COMT	Familiar	No
Bt099	AR	Hereditario	No
Bt105	CYP2D6	Esporádico	No
Bt110	ERBB2	Esporádico	No
Bt119	PRKDC	Familiar	No
Bt124	MDM4	Esporádico	Si
Bt131	CYP2D6	Familiar	Si
Bt138	MUC16, SLC4A7	Hereditario	No
Bt141	APOBEC3B, LGR6	Familiar	Si
Bt145	RAD50, RUNX1	Esporádico	Si
Bt148	BRCA2, CYP1B1, TIE1	Hereditario	Si
Bt149	ADAMTSL1, MSH6	Esporádico	No

Bt151	<b>MSH2</b>	Familiar	Si
CI006	<b>BRCA2, SSBP4</b>	Familiar	Si
CI020	<b>RAD51D</b>	Esporádico	Si
CI029	<b>COL10A1</b>	Familiar	Si
CI030	<b>COMT, TCF7L2</b>	Esporádico	Si
HM002	<b>MSH2</b>	Familiar	Si
HM008	<b>RAD50</b>	Esporádico	No
HM012	<b>PMS1</b>	Familiar	No
HM019	<b>IRF6</b>	Hereditario	No
HM021	<b>CDKN2A, IRF6</b>	Familiar	No
HM023	<b>COL11A1, IRF6, VPS13B,</b>	Familiar	No
HM024	<b>COL11A1, IRF6, S1PR3</b>	Esporádico	No
HM026	<b>CDKN2A, COL11A1, IRF6, VPS13B, WRN</b>	Familiar	No
HM027	<b>CDKN2A, EOMES, IRF6, ITGAL</b>	Esporádico	No
HM028	<b>ATM, AR, IRF6, VPS13B</b>	Familiar	No
HM030	<b>PMS2</b>	Esporádico	No
HM035	<b>S1PR3</b>	Familiar	No
HM037	<b>ADAMTSL1</b>	Familiar	No
HM045	<b>SLC4A7</b>	Esporádico	No
HM048	<b>TET2</b>	Familiar	No
HM050	<b>ADAMTSL1</b>	Esporádico	No
HM051	<b>COL11A1</b>	Esporádico	No
Md007	<b>MUTYH</b>	Familiar	No
Md010	<b>FANCM, TET2</b>	Familiar	Si
Md014	<b>CYP2D6</b>	Familiar	Si
Md039	<b>CYP1B1</b>	Familiar	No
Md043	<b>ADAMTS1</b>	Familiar	No
Md044	<b>ITGAL, MSH6, VDR</b>	Familiar	Si
Md050	<b>ANKLE1, CDKN2A</b>	Esporádico	Si
Md056	<b>VDR</b>	Familiar	No
Md057	<b>HELQ</b>	Familiar	Si
Md061	<b>COMT</b>	Esporádico	Si
Md070	<b>EP300</b>	Familiar	Si
Md074	<b>COMT, MUC16</b>	Hereditario	Si
Md075	<b>RET</b>	Esporádico	Si
Pe003	<b>PHIP, TGFB1</b>	Hereditario	Si
Pe005	<b>RINT1</b>	Familiar	Si
Pe014	<b>MMP2</b>	Hereditario	Si
Vu002	<b>COMT</b>	Hereditario	Si
Vu007	<b>COMT</b>	Esporádico	Si
Vu011	<b>ADAMTSL1, WNT7A</b>	Familiar	No

Vu013

ERBB2

Esporádico

Si

Los genes exclusivos para el subtipo molecular Luminal B HER-2 negativo están escritos en rojo.

Tabla 11. Características genéticas y de herencia de las pacientes con cáncer de seno Luminal B HER-2 positivo con variantes germinales P/LP.

<b>Paciente (código)</b>	<b>Genes con variantes P/LP</b>	<b>Herencia</b>	<b>Criterios NCCN v1.2023</b>
Bg003	BRCA2	Familiar	Si
Bt007	TOP2A	Hereditario	No
Bt009	ADAMTSL1	Esporádico	Si
Bt011	COMT, PTCH1	Familiar	No
Bt013	AR, CYP2D6	Familiar	Si
Bt015	COMT	Esporádico	Si
Bt020	CYP2D6, MDC1	Familiar	No
Bt024	TCF7L2	Familiar	No
Bt051	COMT	Familiar	Si
Bt053	CYP1A1	Esporádico	Si
Bt057	ERBB2	Familiar	Si
Bt069	ADAMTSL1	Esporádico	No
Bt072	CYP2D6, MUTYH, TGFB1	Familiar	Si
Bt092	AR	Hereditario	Si
Bt094	PPP2R1B	Esporádico	No
Bt103	AR	Esporádico	Si
Bt129	CLGN, MHS6, PTCH1	Familiar	Si
Bt143	FA2H	Familiar	Si
Bt144	CYP1B1	Esporádico	No
CI008	PALB2, CYP1A1, MSR1, MUTYH	Esporádico	No
CI010	BRCA1, CYP2D6	Esporádico	Si
CI011	MUC16	Esporádico	No
CI015	UGT1A1	Esporádico	Si
CI017	ZNF226	Esporádico	No
CI019	CYP1A1, ERBB2, SMC1A	Esporádico	No
HM004	CYP2D6	Familiar	No
HM015	CYP2D6, FGFR4	Esporádico	No
Md008	CXCL12	Hereditario	Si
Md013	PMS2	Familiar	No
Md024	ANKLE1, COMT, CYP1A1	Esporádico	No
Md026	CST2, ITGA6	Esporádico	No
Md030	CHEK2	Familiar	Si
Md045	AR, HELQ	Familiar	Si
Md047	SCNN1A	Familiar	Si

Md067	CYP2D6, ERBB2, S1PR3	Esporádico	Si
Md069	APOE	Familiar	Si
Mz002	TOP2A	Esporádico	No
Pe011	SMC1A	Familiar	No
Vu006	EXOC2, S1PR3	Familiar	Si

Los genes exclusivos para el subtipo molecular Luminal B HER-2 positivo están escritos en rojo.

Tabla 12. Características genéticas y de herencia de las pacientes con cáncer de seno HER-2 enriquecido con variantes germinales

Paciente (código)	Genes con variantes P/LP	Herencia	Criterios NCCN v1.2023
Bt040	MUTYH, WRN	Familiar	Si
Bt062	VPS13B	Familiar	No
Bt118	AR, PMS2	Hereditario	Si
CI009	CST2, MMP3, MUTYH	Esporádico	No
CI025	COL11A1, <b>POLD1</b> , PTCH1	Familiar	Si
CI031	COL11A1	Esporádico	Si
HM032	<b>XRCC6</b>	Familiar	No
HM046	<b>MMP14</b> , MRPS30	Familiar	Si
Md006	MUC16	ND	Si
Md015	MSR1	Familiar	Si
Md040	S1PR3	Familiar	Si
Md072	APOE	Esporádico	Si
Pe020	TOP2A	Esporádico	No

Los genes exclusivos para el subtipo molecular HER-2 enriquecido están escritos en rojo. ND: no hay datos.

Tabla 13. Características genéticas y de herencia de las pacientes con TNBC con variantes germinales P/LP.

Paciente (código)	Genes con variantes P/LP	Herencia	Criterios NCCN v1.2023
Bg013	BRCA1, RET	Familiar	Si
Bg031	PMS2, TNS1	Familiar	Si
Bg034	ADAMTSL1, CYP2D6	Esporádico	Si
Bt003	COL10A1, MUC16, S1PR3	Esporádico	Si
Bt006	APOBEC3B, TGFB1	Esporádico	Si
Bt008	CYP1B1	Esporádico	Si
Bt022	<b>BACH1</b>	Familiar	Si
Bt023	PTPRF	Familiar	Si

<i>Bt031</i>	<i>PALB2, ADAMTSL1, COMT, S1PR3</i>	Familiar	Si
<i>Bt036</i>	<i>BARD1</i>	Esporádico	Si
<i>Bt056</i>	<i>CYP2D6, ITGAX, RET</i>	Hereditario	Si
<i>Bt059</i>	<i>BRCA1</i>	Esporádico	Si
<i>Bt064</i>	<i>ITGAX</i>	Esporádico	Si
<i>Bt077</i>	<i>COMT</i>	Familiar	Si
<i>Bt113</i>	<i>CYP2D6, L3MBTL3</i>	Familiar	Si
<i>Bt152</i>	<i>BRCA2, COMT, TGFBR2</i>	Familiar	Si
<i>CI007</i>	<i>IRAK4, TGFBR2</i>	Esporádico	Si
<i>CI012</i>	<i>MSR1, XRCC1</i>	Familiar	Si
<i>CI014</i>	<i>RINT1</i>	Esporádico	Si
<i>HM020</i>	<i>CDKN2A, COL11A1, IRF6</i>	Familiar	Si
<i>Md022</i>	<i>PTCH1</i>	Familiar	Si
<i>Md038</i>	<i>AR, PPP2R5B</i>	Familiar	Si
<i>Md058</i>	<i>RET</i>	Esporádico	Si
<i>Md064</i>	<i>HELQ</i>	Familiar	Si
<i>Md071</i>	<i>ADAMTSL1, APC</i>	Familiar	Si
<i>Pe021</i>	<i>COMT</i>	Familiar	Si
<i>Vu008</i>	<i>COMT, XRCC1</i>	Familiar	Si

Los genes exclusivos para el subtipo molecular TNBC están escritos en rojo.

Tabla 14. Características genéticas y de herencia de las pacientes sin subtipo molecular de cáncer de seno con variantes germinales P/LP.

<b>Paciente (código)</b>	<b>Genes con variantes P/LP</b>	<b>Herencia</b>	<b>Criterios NCCN v1.2023</b>
<i>Bg011</i>	<i>FGFR1</i>	Familiar	Si
<i>Bg017</i>	<i>CYP1B1</i>	Familiar	Si
<i>Bg036</i>	<i>TGFBR2</i>	ND	ND
<i>HM005</i>	<i>CYP2D6, PMS2</i>	Esporádico	No
<i>HM006</i>	<i>MUC16</i>	Esporádico	No
<i>HM022</i>	<i>CDKN2A, COL11A1, IRF6, VPS13B</i>	Esporádico	No
<i>Vu012</i>	<i>COMT</i>	Familiar	Si

ND: no hay datos

En cuanto al tipo de herencia observada en las 227 pacientes con variantes germinales P/LP en los 105 genes relacionados con el cáncer de seno, el 22.25% (89/400) se presentaron en casos esporádicos (Luminal A: 28, LBH2Neg: 26, LBH2Pos: 18, HER-2 enriquecido: 4, TNBC: 10 y sin subtipo molecular: 3), el 28% (112/400) fueron familiares (Luminal A: 27, LBH2Neg: 41, LBH2Pos: 18, HER-2 enriquecido: 7, TNBC: 16 y sin subtipo molecular: 3), el 6% (24/400) cumplieron criterios para considerarse casos hereditarios (Luminal A: 9, LBH2Neg: 10, LBH2Pos: 3, HER-2 enriquecido: 1 y TNBC: 1) y en el 0.5% (2/400) de los casos no fue posible determinar el tipo de herencia (HER-2 enriquecido: 1 y sin subtipo molecular: 1).

El 57.7% (131/227) de las pacientes con variantes germinales P/LP cumplían los criterios de tamizaje molecular indicados por la NCCN v1.2023 (99). Sin embargo, es importante resaltar que, si se realizara el cribado molecular, siguiendo los criterios NCCN, aproximadamente la mitad de las pacientes con mutaciones germinales con potencial efecto patogénico no serían evaluadas.

Para determinar si algunas de las características clínicas, de factores de riesgo genéticas (presencia de variantes germinales P/LP), se asociaban con un probable aumento en el riesgo de desarrollar algunos de los cinco subtipos moleculares de cáncer de seno, se realizó un análisis de regresión logística multivariado, también denominado árboles de decisión para cada uno de los subtipos. A continuación, se describen los resultados obtenidos de este análisis.

- Análisis de árbol de decisión cáncer de seno Luminal A:

Para el subtipo molecular Luminal A se determinó que las pacientes con estadio tumoral I y un tamaño tumoral menor que 9.55mm tienen una predicción del 76% de ser de este subtipo molecular. La predicción es del 73% cuando hay un estadio tumoral I, un tamaño tumoral mayor o igual que 9.55mm y el diagnóstico histológico no es ductal. La predicción baja a un 67% cuando las pacientes tienen un estadio tumoral I, tamaño tumoral mayor o igual que 9.55mm, diagnóstico histológico ductal y cáncer de tipo hereditario. En pacientes con estadio tumoral I, tamaño tumoral mayor o igual que 9.55mm, diagnóstico histológico ductal, cáncer familiar o esporádico, paridad mayor o igual que 1.5, IMC menor que 29.005 y edad al primer hijo menor que 22.5 años la predicción del riesgo continúa siendo 67%. La predicción del riesgo baja al 64% cuando las pacientes tienen un estadio tumoral II, III o IV y diagnóstico histológico lobular. Por último, las pacientes con estadio tumoral II, III o IV, edad de

menopausia menor que 49.5 años y diagnóstico histológico diferente a ductal o lobular, la predicción del riesgo es del 71%. Todos estos hallazgos son descritos en la Figura 7.

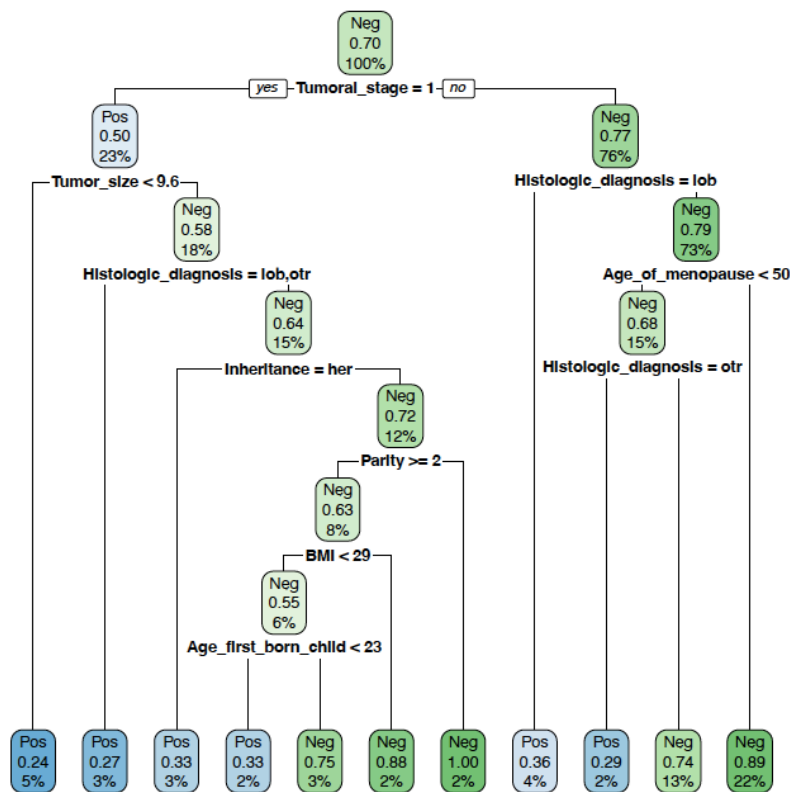


Figura 7. Análisis de árbol de decisión cáncer de seno Luminal A.

- Análisis de árbol de decisión cáncer de seno Luminal B HER-2 Negativo (LBH2Neg):

Para el subtipo molecular LBH2Neg, las predicciones del riesgo son las siguientes: La presencia de variantes germinales P/LP en el gen *IRF6* evidenciaron un riesgo del 88%.

En caso de no presentar variantes germinales en el gen *IRF6*, las predicciones del riesgo son: pacientes con una edad de diagnóstico mayor o igual que 33 años, edad de menarquia menor que 11.5 años y paridad mayor o igual que 3.5 dan una predicción del 89%. El riesgo es del 69% cuando la edad de diagnóstico es mayor o igual que 33 años, edad de menarquia menor que 11.5 años, paridad menor que 3.5, peso mayor o igual que 67.55 Kg y estadio nodal igual que 1, 2. Pacientes con una edad de diagnóstico mayor o igual que 33 años, edad de menarquia mayor o igual

que 11.5 años, edad al primer hijo menor que 35.5 años, altura entre 154.5 – 160.4 cm, nódulos positivos mayor o igual que 1.5 y cáncer esporádico, tienen un riesgo del 89%. La predicción del riesgo es del 78% en pacientes con una edad de diagnóstico mayor o igual que 33 años, edad de menarquia mayor o igual que 11.5 años, edad al primer hijo menor que 35.5 años, altura entre 154.4 – 160.4 cm, nódulos positivos menor que 1.5 y edad de menopausia mayor o igual que 52.5 años. En la Figura 8 se muestran los resultados del árbol de decisión.

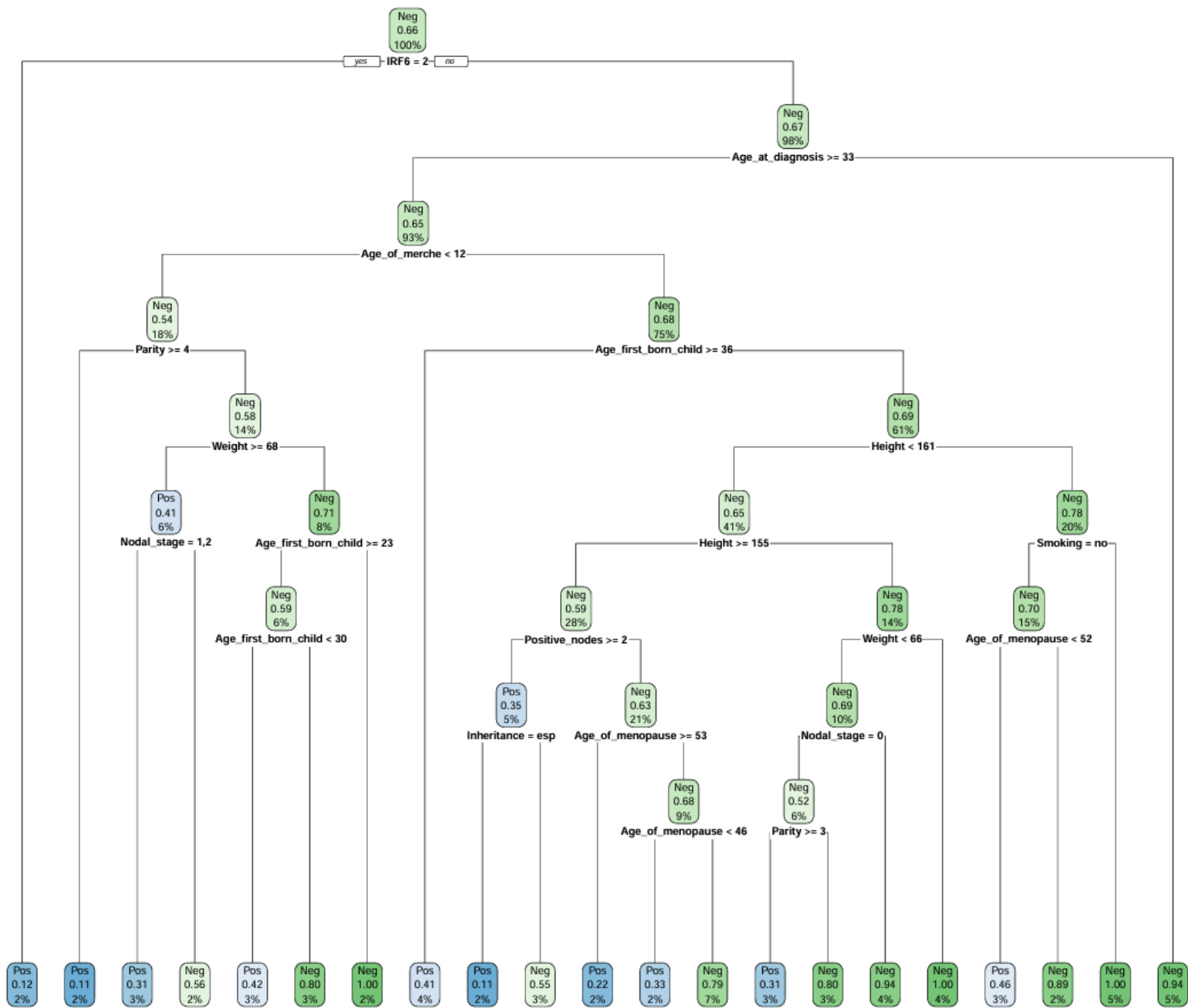


Figura 8. Análisis de árbol de decisión cáncer de seno Luminal B HER-2 Negativo

- Análisis árbol de decisión cáncer de seno Luminal B HER-2 positivo (LBH2Pos):

La predicción del riesgo para este subtipo molecular de cáncer de seno fue del 58% en las pacientes con las siguientes características: edad de diagnóstico menor que 36.5, edad al primer hijo menor que 34.5, y peso menor que 70.8 Kg (Figura 9).

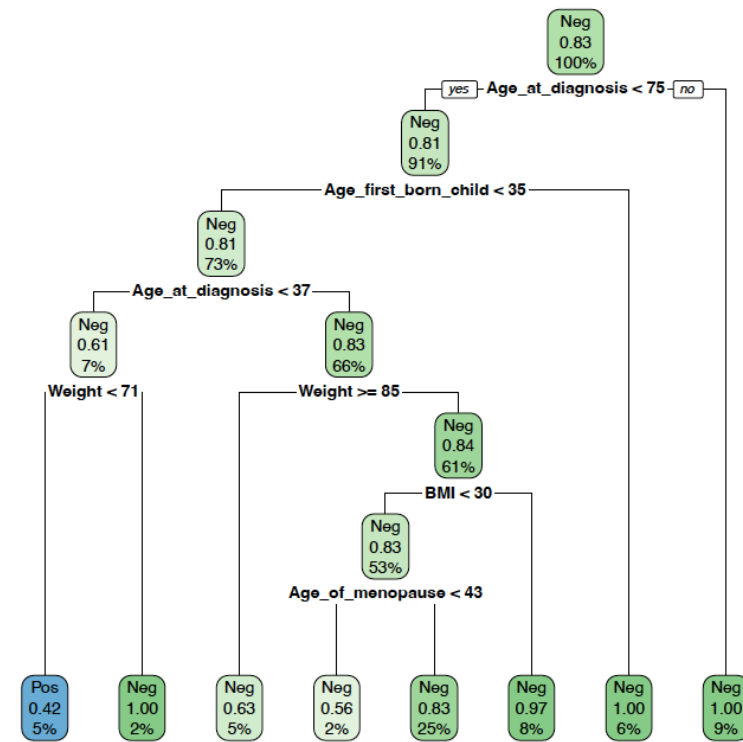


Figura 9. Análisis árbol de decisión cáncer de seno Luminal B HER-2 positivo

- Análisis árbol de decisión cáncer de seno HER-2 enriquecido

Las pacientes con las siguientes características tienen una predicción del riesgo del 57% de tener cáncer de seno HER-2 enriquecido: tamaño tumoral mayor o igual que 39.5mm y menor que 52.5mm, nódulos positivos menor que 1.5 y estadio tumoral 3. Los resultados descritos se ilustran en la Figura 10.

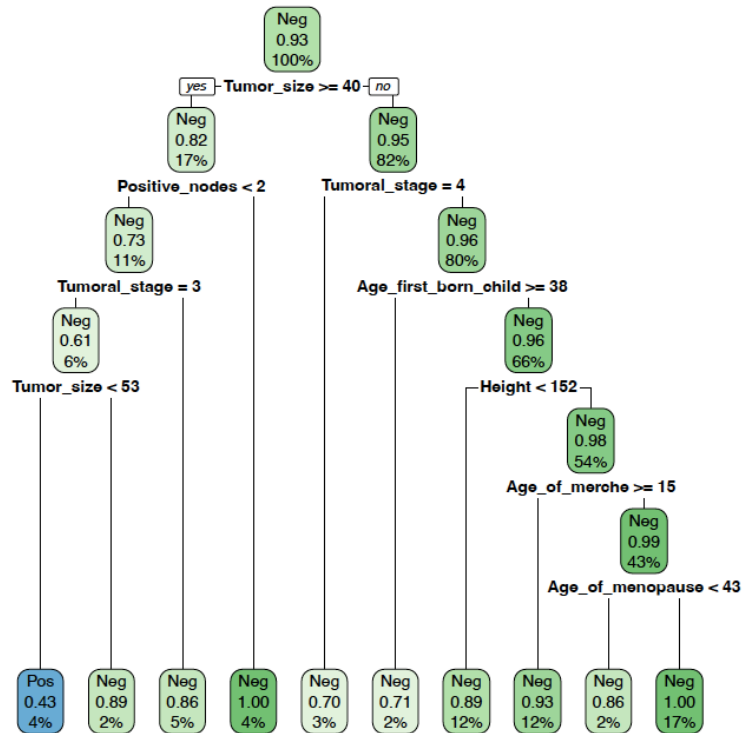


Figura 10. Análisis árbol de decisión cáncer de seno HER-2 enriquecido

- Análisis árbol de decisión TNBC:

Para el caso de las pacientes con subtipo molecular TNBC la predicción del riesgo fue del 75% cuando satisfacen las siguientes condiciones: cumplen criterios NCCN, edad de menopausia mayor o igual que 45.5 años y sin historia familiar de cáncer (Figura 11).

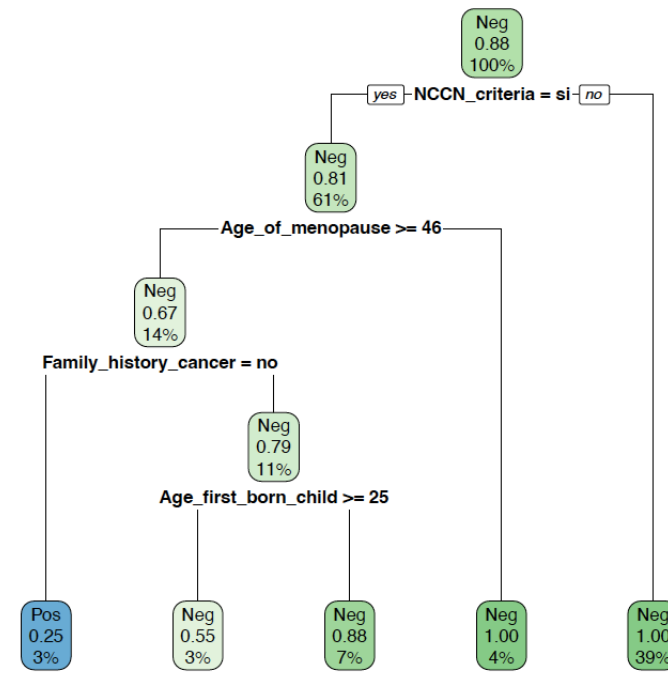


Figura 11. Análisis de árbol de decisión TNBC

### 2.3.4 Análisis de procesos biológicos y de vías de señalización de los genes con variantes germinales P/LP.

Para desarrollar este objetivo se realizó la anotación, en los genes con mutaciones germinales, de los procesos biológicos (*gene ontology\_biological process-GO\_BP*) y de las vías de señalización (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes-KEGG*) con el programa DAVID. En el Anexo 5 se listan todos los términos GO\_BP anotados para los 105 genes con variantes germinales P/LP. Posteriormente, se realizó la agrupación de los genes con mutaciones germinales y los procesos biológicos, anotados para cada uno de ellos, por subtipos moleculares de cáncer de seno. Esto permitió determinar que hay algunos procesos biológicos que son comunes para todos los subtipos moleculares, y en los que se observa mayor cantidad de genes con variantes germinales P/LP, como son las alteraciones en la regulación de la transcripción, alteraciones en la expresión génica, reparación del ADN, transducción de señal y procesos que involucran la activación de diferentes tipos de receptores (quinasas y acoplados a proteínas G), entre otros. Sin embargo, en algunos subtipos moleculares, estos perfiles pueden variar de acuerdo con el número de genes afectados anotados para los diferentes procesos. A continuación, se describen algunos ejemplos:

- Cáncer de seno LBH2Neg: a diferencia del cáncer de seno Luminal A, en este subtipo molecular, hay más genes con variantes germinales P/LP que se asocian con la regulación de la migración, proliferación y adhesión celular, el proceso de apoptosis, la organización de la matriz extracelular, la angiogénesis, la respuesta celular a especies reactivas de oxígeno, la regulación del ciclo celular y la respuesta inflamatoria. De manera particular, el análisis de árbol de decisión del cáncer de seno LBH2Neg, evidenció que tener variantes germinales P/LP en el gen *IRF6* incrementan la predicción del riesgo de tener este subtipo molecular de cáncer de seno en un 88%. Los procesos biológicos asignados a este gen son: procesos del sistema inmune, desarrollo celular, la vía de señalización mediada por interferón gamma, la vía de señalización del interferón tipo I.
- Cáncer de seno LBH2Pos: en este subtipo llama la atención la identificación del proceso biológico respuesta a virus anotado para los genes *CXCL12* y *CYP1A1*.
- Cáncer de seno HER-2 enriquecido: en este subtipo fue donde se encontraron menos genes con variantes germinales P/LP en comparación con los otros subtipos. Además, no se identificaron mutaciones germinales no-sinónimas en los genes con impacto clínico, a saber, *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D* y *TP53*. Por lo tanto, el proceso de reparación del ADN solo tiene tres genes con variantes germinales P/LP (*MUTYH*, *POLD1* y *WRN*), dentro de los procesos de reparación se anotaron la reparación *mismatch* y BER (*base excision repair*-BER), ambos procesos con dos genes, y la reparación de las rupturas de doble hebra mediante NHEJ (*non-homologous end joining*-NHEJ), teniendo este último un solo gen, *XRCC6*, el cual en nuestra cohorte es exclusivo para el subtipo molecular de cáncer de seno HER-2 enriquecido. Otro gen exclusivo de este subtipo de cáncer es *POLD1* para el cual se anotaron los procesos de síntesis de ADN involucrados en procesos de reparación, como NER (*nucleotide excision repair*-NER) y BER, y en la síntesis translesión libre de errores; procesos necesarios para el mantenimiento de la estabilidad genómica.
- TNBC: a diferencia de los subtipos moleculares descritos previamente, es este subtipo, la reparación del ADN se encuentra en séptimo lugar, antecedido por los procesos regulación de la transcripción, regulación de la expresión génica,

la adhesión y proliferación celular, la respuesta a estímulos xenobióticos y la apoptosis. En este subtipo de cáncer de seno la respuesta a radiación ionizante tiene el mayor número de genes con variantes germinales P/LP en comparación con los demás subtipos.

La respuesta celular al factor de necrosis tumoral es un proceso que comparte con el subtipo LBH2Pos, en ambos tipos de cáncer de seno los genes involucrados en dicho proceso biológico son *BRCA1* y *CYP1B1*.

Al igual que en el cáncer de seno LBH2Pos, en el subtipo TNBC se identificó un proceso biológico relacionado con la respuesta a virus, en este caso el término es GO:0051607~*defense response to virus*, el cual es un término hijo del proceso biológico identificado en el subtipo LBH2Pos, GO:0009615~*response to virus*. Para el caso de TNBC los genes anotados con este proceso son *APOBEC3B* e *ITGAX*.

La proliferación de las células madre es un proceso biológico que comparten los subtipos LBH2Neg y TNBC, a expensas de variantes germinales P/LP en los genes *WNT7A* y *CDKN2A* para el primero, *IRF6* para ambos y *PTCH1* para el segundo.

Un proceso biológico exclusivo del TNBC es la regulación de la transición epitelio-mesenquimática, proceso en el que convergen los genes *TGFB1* y *TGFBR2*.

En las Tablas 15-19 se resumen los procesos biológicos anotados para los genes con variantes germinales P/LP en cada subtipo molecular de cáncer de seno. En las tablas se describen los procesos en donde se realizó la anotación del proceso biológico para al menos tres genes.

Tabla 15. Procesos biológicos anotados para genes con variantes germinales P/LP en el cáncer de seno Luminal A.

<b>Término GO_BP</b>	<b>Genes</b>	<b>Número de genes</b>
GO:0045893~ <i>positive regulation of transcription, DNA-templated</i>	<i>BRCA2, CHEK2, AR, BLM, EGFR, PTCH1, RET, RUNX1, TP53BP1</i>	9
GO:0006281~ <i>DNA repair</i>	<i>BRCA2, ANKLE1, BLM, FANCI, FANCM, MUTYH, WRN</i>	7
GO:0045944~ <i>positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter</i>	<i>ATM, AR, EGFR, RB1, RUNX1, TP53BP1, VDR</i>	7

GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	AR, NOTCH2, PCGF2, PTCH1, RB1, RUNX1, VDR	7
GO:0006974~cellular response to DNA damage stimulus	ATM, CHEK2, ANKLE1, BLM, TP53BP1, WRN	6
GO:0007165~signal transduction	ATM, AR, EGFR, IGFBP5, IRAK4, RET	6
GO:0000724~double-strand break repair via homologous recombination	BRCA2, ATM, ANKLE1, BLM, WRN	5
GO:0006468~protein phosphorylation	ATM, CHEK2, IRAK4, RET, TGFBR2	5
GO:0030154~cell differentiation	RB1, EGFR, TGFBR2, VDR, TGFBR2	5
GO:0009410~response to xenobiotic stimulus	PMS2, PTCH1, RET, TGFBR2, XRCC1	5
GO:0006302~double-strand break repair	BRCA2, ATM, CHEK2, WRN	4
GO:0006338~chromatin remodeling	BRCA2, ATM, PCGF2, RB1	4
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-templated	BRCA2, CHEK2, NOTCH2, RB1	4
GO:0010628~positive regulation of gene expression	ATM, AR, RET, VDR	4
GO:0001666~response to hypoxia	ATM, CYP1A1, TGFBR2, XRCC1	4
GO:0007155~cell adhesion	ADAMTSL1, CYP1B1, MUC16, PTPRF	4
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	AR, EGFR, S1PR3, TGFBR2	4
GO:0030198~extracellular matrix organization	ADAMTSL1, COL10A1, COL11A1, MMP3	4
GO:0008202~steroid metabolic process	CYP17A1, CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6	4
GO:0071407~cellular response to organic cyclic compound	CYP1A1, CYP1B1, IGFBP5, MSR1	4
GO:0035556~intracellular signal transduction	IGFBP5, IRAK4, NOTCH2, TNS1	4
GO:0006310~DNA recombination	BRCA2, BLM, WRN	3
GO:0090398~cellular senescence	BRCA2, ATM, WRN	3
GO:0030335~positive regulation of cell migration	ATM, EGFR, RET	3
GO:0043065~positive regulation of apoptotic process	ATM, CYP1B1, NOTCH2	3
GO:0000723~telomere maintenance	ATM, BLM, WRN	3
GO:0046777~protein autophosphorylation	ATM, CHEK2, EGFR	3
GO:0090399~replicative senescence	ATM, CHEK2, WRN	3
GO:0006303~double-strand break repair via nonhomologous end joining	ATM, TP53BP1, XRCC1	3
GO:0071480~cellular response to gamma radiation	ATM, CHEK2, WRN	3
GO:0035264~multicellular organism growth	ATM, AR, NOTCH2	3
GO:0042981~regulation of apoptotic process	ATM, CASP10, WRN	3
GO:0000077~DNA damage checkpoint	ATM, CHEK2, TP53BP1	3
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	AR, RB1, RUNX1	3

GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	AR, CYP1B1, VDR	3
GO:0000165~MAPK cascade	AR, EGFR, RET	3
GO:0050680~negative regulation of epithelial cell proliferation	AR, PTCH1, RB1	3
GO:0050673~epithelial cell proliferation	AR, EGFR, RB1	3
GO:0032508~DNA duplex unwinding	BLM, FANCM, WRN	3
GO:0031297~replication fork processing	BLM, FANCM, WRN	3
GO:0006915~apoptotic process	CASP10, NOTCH2, TGFBR2	3
GO:0006805~xenobiotic metabolic process	CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6	3
GO:0008210~estrogen metabolic process	CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6	3
GO:0042572~retinol metabolic process	CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6	3
GO:0045766~positive regulation of angiogenesis	CYP1B1, RUNX1, TGFBR2	3
GO:0007275~multicellular organism development	EGFR, RET, VDR	3
GO:0051897~positive regulation of protein kinase B signaling	EGFR, IGFBP5, RET	3
GO:0010629~negative regulation of gene expression	MSR1, NOTCH2, RB1	3
GO:0006898~receptor-mediated endocytosis	EGFR, MSR1, TGFBR2	3
GO:0006284~base-excision repair	WRN, XRCC1, MUTYH	3
GO:0007219~Notch signaling pathway	NOTCH2, S1PR3, TGFBR2	3
GO:0007224~smoothened signaling pathway	RB1, PTCH1, TGFBR2	3

Tabla 16. Procesos biológicos anotados para genes con variantes germinales P/LP en el cáncer de seno Luminal B HER-2 negativo.

<b>Término GO_BP</b>	<b>Genes</b>	<b>Número de genes</b>
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	ATM, AR, CDKN2A, EGFR, EOMES, EP300, IRF6, NCOA3, PHIP, PRKDC, RUNX1, SSBP4, TCF7L2, TET2, TGFB1, VDR, WNT7A	17
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-templated	BRCA2, AR, CDKN2A, EGFR, EOMES, EP300, IRF6, PHIP, RET, RUNX1, TGFB1, WNT7A	12
GO:0006281~DNA repair	BRCA2, RAD51D, ANKLE1, ATR, FANCM, MSH2, MSH6, MUTYH, RAD50, WRN	10
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	AR, EOMES, EP300, MDM4, RUNX1, SEMA4D, TCF7L2, TGFB1, VDR	9
GO:0007165~signal transduction	ATM, AR, CXCL12, EGFR, ERBB2, ITGAL, RET, TIE1	8

GO:0010628~positive regulation of gene expression	ATM, AR, CDKN2A, ERBB2, RET, TGFB1, VDR, WNT7A	8
GO:0030335~positive regulation of cell migration	ATM, CXCL12, EGFR, LGR6, MMP2, RET, SEMA4D, TGFB1	8
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	ADAMTS1, AR, CDKN2A, CYP1B1, IRF6, MDM4, TGFB1, VDR	8
GO:0006468~protein phosphorylation	ATM, ATR, ERBB2, PRKDC, RET, TGFB1, TIE1	7
GO:0000723~telomere maintenance	ATM, RAD51D, ATR, PRKDC, RAD50, TERT, WRN	7
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	AR, EOMES, IRF6, MDM4, PHIP, RUNX1, TCF7L2	7
GO:0009410~response to xenobiotic stimulus	ATR, MMP2, PMS1, PMS2, RET, TGFB1, XRCC1	7
GO:0043066~negative regulation of apoptotic process	EGFR, ERBB2, MDM4, PHIP, PRKDC, SEMA4D, WNT7A	7
GO:0000724~double-strand break repair via homologous recombination	BRCA2, ATM, RAD51D, ANKLE1, HELQ, WRN	6
GO:0006302~double-strand break repair	BRCA2, ATM, MSH2, PRKDC, RAD50, WRN	6
GO:0006974~cellular response to DNA damage stimulus	ATM, ANKLE1, ATR, PRKDC, RAD50, WRN	6
GO:0001666~response to hypoxia	ATM, CXCL12, EP300, MMP2, TGFB1, XRCC1	6
GO:0043065~positive regulation of apoptotic process	ATM, CDKN2A, CYP1B1, MMP2, PRKDC, TGFB1	6
GO:0030198~extracellular matrix organization	ADAMTS1, ADAMTSL1, COL10A1, COL11A1, ITGAL, MMP2	6
GO:0007155~cell adhesion	ADAMTSL1, CXCL12, CYP1B1, ITGAL, MUC16, SEMA4D	6
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	AR, EGFR, ERBB2, PHIP, S1PR3, TGFB1	6
GO:0007275~multicellular organism development	ATR, EGFR, ERBB2, RET, TIE1, VDR	6
GO:0090399~replicative senescence	ATM, ATR, CDKN2A, TERT, WRN	5
GO:0006915~apoptotic process	CASP10, CDKN2A, EP300, MRPS30, WNT7A	5
GO:0033674~positive regulation of kinase activity	EGFR, ERBB2, RAD50, RET, TIE1	5
GO:0006298~mismatch repair	MSH2, MSH6, MUTYH, PMS1, PMS2	5
GO:0006338~chromatin remodeling	BRCA2, ATM, EOMES, NCOA3	4
GO:0006310~DNA recombination	BRCA2, MSH2, RAD50, WRN	4
GO:0090398~cellular senescence	BRCA2, ATM, CDKN2A, WRN	4
GO:0046777~protein autophosphorylation	ATM, ATR, EGFR, ERBB2	4
GO:0051726~regulation of cell cycle	ATM, RAD51D, CDKN2A, MDM4	4
GO:0008340~determination of adult lifespan	ATM, MSH2, MSH6, WRN	4

GO:0036297~interstrand cross-link repair	ATR, RAD51D, FANCM, MSH6	4
GO:0000165~MAPK cascade	AR, EGFR, RET, TGFB1	4
GO:0007186~G-protein coupled receptor signaling pathway	AR, CXCL12, LGR6, S1PR3	4
GO:1902895~positive regulation of pri-miRNA transcription from RNA polymerase II promoter	AR, EGFR, TERT, TGFB1	4
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-templated	CDKN2A, MDM4, TCF7L2, TGFB1	4
GO:0045766~positive regulation of angiogenesis	CYP1B1, RUNX1, TERT, TIE1	4
GO:0001525~angiogenesis	CYP1B1, MMP2, TIE1, WNT7A	4
GO:0051897~positive regulation of protein kinase B signaling	EGFR, RET, TCF7L2, TGFB1	4
GO:0007169~transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	EGFR, ERBB2, RET, TIE1	4
GO:0050679~positive regulation of epithelial cell proliferation	EGFR, ERBB2, TCF7L2, TGFB1	4
GO:0001934~positive regulation of protein phosphorylation	EGFR, ERBB2, SEMA4D, TGFB1	4
GO:0032508~DNA duplex unwinding	FANCM, HELQ, RAD50, WRN	4
GO:0042771~intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator	BRCA2, EP300, MSH2	3
GO:0000722~telomere maintenance via recombination	BRCA2, RAD51D, RAD50	3
GO:0006303~double-strand break repair via nonhomologous end joining	ATM, PRKDC, XRCC1	3
GO:0071480~cellular response to gamma radiation	ATM, ATR, WRN	3
GO:0035264~multicellular organism growth	ATM, AR, EP300	3
GO:0042981~regulation of apoptotic process	ATM, CASP10, WRN	3
GO:0008630~intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	ATM, MSH6, PRKDC	3
GO:0018105~peptidyl-serine phosphorylation	ATM, ATR, PRKDC	3
GO:0034614~cellular response to reactive oxygen species	ATM, EGFR, MMP2	3
GO:0045785~positive regulation of cell adhesion	ATM, CXCL12, ERBB2	3
GO:0007131~reciprocal meiotic recombination	ATM, RAD50, RAD51D	3
GO:0006508~proteolysis	ADAMTS1, CASP10, MMP2	3
GO:1904707~positive regulation of vascular smooth muscle cell proliferation	ADAMTS1, MMP2, TERT	3
GO:1900087~positive regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle	ADAMTS1, EGFR, TERT	3
GO:0043410~positive regulation of MAPK cascade	AR, ERBB2, RET	3

GO:2001237~negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	AR, PHIP, TCF7L2	3
GO:1900034~regulation of cellular response to heat	ATM, ATR, EP300	3
GO:0043517~positive regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	ATM, ATR, CDKN2A	3
GO:0006919~activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	CASP10, CDKN2A, RET	3
GO:0007049~cell cycle	CDKN2A, EP300, TET2	3
GO:0050821~protein stabilization	EP300, MDM4, CDKN2A	3
GO:0031648~protein destabilization	EP300, CDKN2A, PRKDC	3
GO:1900182~positive regulation of protein localization to nucleus	CDKN2A, TCF7L2, TGFB1	3
GO:0006874~cellular calcium ion homeostasis	CXCL12, TGFB1, VDR	3
GO:0006805~xenobiotic metabolic process	CYP1B1, CYP2D6, NAT2	3
GO:0032355~response to estradiol	CYP1B1, TGFB1, WNT7A	3
GO:0045727~positive regulation of translation	CYP1B1, ERBB2, PRKDC	3
GO:0043406~positive regulation of MAP kinase activity	EGFR, ERBB2, TGFB1	3
GO:0071392~cellular response to estradiol stimulus	EGFR, MMP2, NCOA3	3
GO:0090263~positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	EGFR, LGR6, TGFB1	3
GO:0000902~cell morphogenesis	TGFB1, VDR, EGFR	3
GO:0043627~response to estrogen	EP300, MMP2, WNT7A	3
GO:0032092~positive regulation of protein binding	EP300, TCF7L2, TERT	3
GO:0006954~inflammatory response	ITGAL, S1PR3, TGFB1	3
GO:0071456~cellular response to hypoxia	MDM4, TERT, TGFB1	3
GO:0006284~base-excision repair	WRN, XRCC1, MUTYH	3
GO:0051092~positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	AR, EP300, TGFB1	3

Tabla 17. Procesos biológicos anotados para genes con variantes germinales P/LP en el cáncer de seno Luminal B HER-2 positivo.

<b>Término GO_BP</b>	<b>Genes</b>	<b>Número de genes</b>
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	BRCA1, AR, ITGA6, TCF7L2, TGFB1, TOP2A, ZNF226	7

GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-templated	BRCA1, BRCA2, CHEK2, APOE, AR, PTCH1, TGFB1	7
GO:0006281~DNA repair	BRCA1, BRCA2, ANKLE1, MDC1, MSH6, MUTYH, SMC1A	7
GO:0010628~positive regulation of gene expression	BRCA1, AR, ERBB2, FGFR4, TGFB1	5
GO:0000724~double-strand break repair via homologous recombination	BRCA1, BRCA2, PALB2, ANKLE1, HELQ	5
GO:0007155~cell adhesion	ADAMTSL1, CXCL12, CYP1B1, ITGA6, MUC16	5
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	AR, ERBB2, FGFR4, S1PR3, TGFB1	5
GO:0006974~cellular response to DNA damage stimulus	BRCA1, CHEK2, ANKLE1, TOP2A	4
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	BRCA1, AR, TCF7L2, ZNF226	4
GO:0007186~G-protein coupled receptor signaling pathway	APOE, AR, CXCL12, S1PR3	4
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	AR, PTCH1, TCF7L2, TGFB1	4
GO:0008202~steroid metabolic process	UGT1A1, CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6	4
GO:0006805~xenobiotic metabolic process	UGT1A1, CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6	4
GO:0071407~cellular response to organic cyclic compound	CYP1A1, CYP1B1, MSR1, TGFB1	4
GO:0008210~estrogen metabolic process	UGT1A1, CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6	4
GO:0043065~positive regulation of apoptotic process	CYP1B1, ITGA6, TGFB1, TOP2A	4
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-templated	BRCA1, TCF7L2, TGFB1	3
GO:0006302~double-strand break repair	BRCA1, BRCA2, CHEK2	3
GO:0008630~intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	BRCA1, CHEK2, MSH6	3
GO:0071479~cellular response to ionizing radiation	BRCA1, BRCA2, TGFB1	3
GO:0010575~positive regulation of vascular endothelial growth factor production	BRCA1, CYP1B1, TGFB1	3
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-templated	BRCA2, CHEK2, ZNF226	3
GO:0006468~protein phosphorylation	CHEK2, ERBB2, TGFB1	3
GO:0046777~protein autophosphorylation	CHEK2, ERBB2, FGFR4	3
GO:0010629~negative regulation of gene expression	APOE, MSR1, TGFB1	3
GO:0070374~positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	APOE, FGFR4, TGFB1	3

GO:0006874~cellular calcium ion homeostasis	APOE, CXCL12, TGFB1	3
GO:0007165~signal transduction	AR, CXCL12, ERBB2	3
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	AR, CYP1B1, TGFB1	3
GO:0050680~negative regulation of epithelial cell proliferation	AR, PTCH1, TGFB1	3
GO:2001237~negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	AR, ITGA6, TCF7L2	3
GO:0030335~positive regulation of cell migration	CXCL12, ITGA6, TGFB1	3
GO:0001666~response to hypoxia	CXCL12, CYP1A1, TGFB1	3
GO:0042572~retinol metabolic process	CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6	3
GO:0032355~response to estradiol	CYP1B1, PTCH1, TGFB1	3
GO:0050679~positive regulation of epithelial cell proliferation	ERBB2, TCF7L2, TGFB1	3
GO:0042593~glucose homeostasis	FGFR4, PTCH1, TCF7L2	3
GO:0006298~mismatch repair	PMS2, MSH6, MUTYH	3
GO:0009410~response to xenobiotic stimulus	PMS2, PTCH1, TGFB1	3

Tabla 18. Procesos biológicos anotados para genes con variantes germinales P/LP en el cáncer de seno HER-2 enriquecido.

<b>Término GO_BP</b>	<b>Genes</b>	<b>Número de genes</b>
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-templated	APOE, AR, PTCH1, XRCC6	4
GO:0007186~G-protein coupled receptor signaling pathway	APOE, AR, S1PR3	3
GO:0006979~response to oxidative stress	APOE, MMP14, WRN	3
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	AR, TOP2A, XRCC6	3
GO:0030198~extracellular matrix organization	COL11A1, MMP14, MMP3	3
GO:0006281~DNA repair	MUTYH, POLD1, WRN	3
GO:0010629~negative regulation of gene expression	APOE, MSR1	2
GO:0006898~receptor-mediated endocytosis	APOE, MSR1	2
GO:0042981~regulation of apoptotic process	APOE, WRN	2
GO:0055089~fatty acid homeostasis	APOE, POLD1	2
GO:0006869~lipid transport	APOE, VPS13B	2
GO:0010875~positive regulation of cholesterol efflux	APOE, PTCH1	2
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	AR, PTCH1	2

GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	AR, S1PR3	2
GO:0050680~negative regulation of epithelial cell proliferation	AR, PTCH1	2
GO:0006508~proteolysis	MMP14, MMP3	2
GO:0022617~extracellular matrix disassembly	MMP14, MMP3	2
GO:0030574~collagen catabolic process	MMP14, MMP3	2
GO:0016485~protein processing	MMP14, PTCH1	2
GO:0045087~innate immune response	MMP3, XRCC6	2
GO:0006298~mismatch repair	MUTYH, PMS2	2
GO:0006284~base-excision repair	WRN, MUTYH	2
GO:0009410~response to xenobiotic stimulus	PMS2, PTCH1	2
GO:0006260~DNA replication	POLD1, WRN	2
GO:0000731~DNA synthesis involved in DNA repair	POLD1, WRN	2
GO:0006974~cellular response to DNA damage stimulus	TOP2A, WRN	2
GO:0006266~DNA ligation	TOP2A, XRCC6	2
GO:0000723~telomere maintenance	WRN, XRCC6	2
GO:0006310~DNA recombination	WRN, XRCC6	2
GO:0032508~DNA duplex unwinding	WRN, XRCC6	2
GO:0071480~cellular response to gamma radiation	WRN, XRCC6	2

Tabla 19. Procesos biológicos anotados para genes con variantes germinales P/LP en el TNBC.

<b>Término GO_BP</b>	<b>Genes</b>	<b>Número de genes</b>
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-templated	BRCA1, BRCA2, AR, CDKN2A, IRF6, PTCH1, RET, TGFB1	8
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	BRCA1, AR, BACH1, CDKN2A, IRF6, PPP2R5B, TGFB1	7
GO:0010628~positive regulation of gene expression	BRCA1, AR, CDKN2A, ITGAX, RET, TGFB1	6
GO:0007155~cell adhesion	ADAMTSL1, APC, CYP1B1, ITGAX, MUC16, PTPRF	6
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	APC, AR, CDKN2A, CYP1B1, IRF6, TGFB1	6
GO:0009410~response to xenobiotic stimulus	PMS2, XRCC1, PTCH1, RET, TGFB1, TGFB2	6
GO:0043065~positive regulation of apoptotic process	BARD1, APC, CDKN2A, CYP1B1, TGFB1	5

GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	AR, ITGAX, S1PR3, TGFB1, TGFBR2	5
GO:0006281~DNA repair	BRCA1, BRCA2, BARD1, BACH1	4
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	BRCA1, AR, BACH1, IRF6	4
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-templated	BRCA1, CDKN2A, L3MBTL3, TGFB1	4
GO:0000724~double-strand break repair via homologous recombination	BRCA1, BRCA2, PALB2, HELQ	4
GO:0051726~regulation of cell cycle	BRCA1, BARD1, APC, CDKN2A	4
GO:0045766~positive regulation of angiogenesis	BRCA1, CYP1B1, ITGAX, TGFBR2	4
GO:0071479~cellular response to ionizing radiation	BRCA1, BRCA2, BARD1, TGFB1	4
GO:0030198~extracellular matrix organization	ADAMTSL1, COL10A1, COL11A1, ITGAX	4
GO:0030335~positive regulation of cell migration	APC, ITGAX, RET, TGFB1	4
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	AR, BACH1, PTCH1, TGFB1	4
GO:0007165~signal transduction	AR, IRAK4, PPP2R5B, RET	4
GO:0006468~protein phosphorylation	IRAK4, RET, TGFB1, TGFBR2	4
GO:0006974~cellular response to DNA damage stimulus	BRCA1, BARD1, APC	3
GO:0030308~negative regulation of cell growth	BRCA1, CDKN2A, TGFB1	3
GO:0045786~negative regulation of cell cycle	BRCA1, BARD1, TGFB1	3
GO:0010575~positive regulation of vascular endothelial growth factor production	BRCA1, CYP1B1, TGFB1	3
GO:2000001~regulation of DNA damage checkpoint	BRCA1, BRCA2, BARD1	3
GO:0006915~apoptotic process	PALB2, CDKN2A, TGFBR2	3
GO:0009887~animal organ morphogenesis	PALB2, ITGAX, PTCH1	3
GO:0016477~cell migration	APC, PTPRF, TGFB1	3
GO:0000165~MAPK cascade	AR, RET, TGFB1	3
GO:0050680~negative regulation of epithelial cell proliferation	AR, PTCH1, TGFB1	3
GO:0071407~cellular response to organic cyclic compound	CYP1B1, MSR1, TGFB1	3
GO:0032355~response to estradiol	CYP1B1, PTCH1, TGFB1	3
GO:0048661~positive regulation of smooth muscle cell proliferation	IRAK4, TGFB1, TGFBR2	3
GO:0007219~Notch signaling pathway	S1PR3, TGFB1, TGFBR2	3
GO:0001666~response to hypoxia	XRCC1, TGFB1, TGFBR2	3

En la anotación de vías de señalización KEGG en los genes con variantes germinales P/LP, se identificaron varias de ellas relacionadas con el cáncer y con diversos tipos

de cáncer. Por ejemplo, en primer lugar, se encuentra la vía de señalización hsa05200-*Pathways in cancer* con 26 genes, seguido por hsa05206-*MicroRNAs in cancer*, hsa05224-*Breast cancer* y hsa04110-*Cell cycle* con 11 genes para cada una; también se identificaron vías de señalización de carcinogénesis química, de reparación como la vía de la Anemia de Fanconi, recombinación homóloga y de reparación *mismatch*, así como las relacionadas con procesos metabólicos. Además de los procesos biológicos asociados con la respuesta a virus identificados en los subtipos moleculares LBH2Pos y TNBC, en el análisis de vías de señalización, se realizó la anotación de la vía hsa05203-*Viral carcinogenesis* para los genes *RB1*, *EP300*, y *CDKN2A*; de los cuales los dos primeros son exclusivos para los subtipos Luminal A y LBH2Neg, respectivamente, y el último gen se identificó en pacientes con cáncer de seno LBH2Neg y TNBC.

En la Tabla 20 se listan las vías de señalización junto con los genes anotados para cada una de ellas.

Tabla 20. Vías de señalización KEGG anotadas para los genes con variantes P/LP.

ID	KEGG Pathway	Genes	Número de genes
hsa05200	<i>Pathways in cancer</i>	<i>APC, EGFR, MSH2, MSH6, RB1, RET, EP300, FGFR1, AR, CDKN2A, CXCL12, ERBB2, FGFR4, GSTT1, ITGA6, MMP2, NCOA3, NOTCH2, PTCH1, RUNX1, TCF7L2, TERT, TGFB1, TGFB2, WNT7A, BRCA2</i>	26
hsa05206	<i>MicroRNAs in cancer</i>	<i>ATM, APC, EGFR, EP300, CDKN2A, CYP1B1, ERBB2, MDM4, NOTCH2, TIMP3, BRCA1</i>	11
hsa05224	<i>Breast cancer</i>	<i>APC, EGFR, RB1, FGFR1, ERBB2, NCOA3, NOTCH2, TCF7L2, WNT7A, BRCA1, BRCA2</i>	11
hsa04110	<i>Cell cycle</i>	<i>ATM, RB1, EP300, ATR, CDKN2A, PPP2R1B, PPP2R5B, PRKDC, SMC1A, TGFB1, CHEK2</i>	11
hsa05225	<i>Hepatocellular carcinoma</i>	<i>APC, EGFR, RB1, CDKN2A, GSTT1, TCF7L2, TERT, TGFB1, TGFB2, WNT7A</i>	10
hsa05226	<i>Gastric cancer</i>	<i>APC, EGFR, RB1, ERBB2, TCF7L2, TERT, TGFB1, TGFB2, WNT7A</i>	9
hsa05207	<i>Chemical carcinogenesis - receptor activation</i>	<i>EGFR, RB1, AR, CYP1A1, CYP1B1, GSTT1, NOTCH2, UGT1A1, VDR</i>	9
hsa04218	<i>Cellular senescence</i>	<i>ATM, RB1, RAD50, ATR, CDKN2A, TGFB1, TGFB2, CHEK2</i>	9
hsa04810	<i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	<i>APC, EGFR, FGFR1, CXCL12, FGFR4, ITGA6, ITGAL, ITGAX</i>	8
hsa04010	<i>MAPK signaling pathway</i>	<i>EGFR, RET, FGFR1, IRAK4, ERBB2, FGFR4, TGFB1, TGFB2</i>	8

hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	EGFR, FGFR1, ERBB2, FGFR4, ITGA6, PPP2R1B, PPP2R5B, BRCA1	8
hsa05205	Proteoglycans in cancer	EGFR, FGFR1, ERBB2, MMP2, PTCH1, TGFB1, TIMP3, WNT7A	8
hsa05215	Prostate cancer	EGFR, RB1, EP300, FGFR1, AR, ERBB2, MMP3, TCF7L2	8
hsa01524	Platinum drug resistance	ATM, MSH2, MSH6, CDKN2A, ERBB2, GSTT1, TOP2A, BRCA1	8
hsa03440	Homologous recombination	ATM, POLD1, RAD50, BLM, BRCA1, BARD1, BRCA2, RAD51D, PALB2	8
hsa03460	Fanconi anemia pathway	FANCM, PMS2, ATR, BLM, FANCI, BRCA1, BRCA2, PALB2	8
hsa05210	Colorectal cancer	APC, EGFR, MSH2, MSH6, TCF7L2, TGFB1, TGFB2	7
hsa01522	Endocrine resistance	EGFR, CDKN2A, CYP2D6, ERBB2, MMP2, NCOA3, NOTCH2	7
hsa05212	Pancreatic cancer	EGFR, RB1, CDKN2A, ERBB2, TGFB1, TGFB2, BRCA2	7
hsa04390	Hippo signaling pathway	APC, PPP2R1B, TCF7L2, TGFB1, TGFB2, WNT7A	6
hsa04310	Wnt signaling pathway	APC, EP300, LGR6, TCF7L2, WNT7A	5
hsa04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	APC, FGFR1, PCGF2, FGFR4, WNT7A	5
hsa05208	Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	EGFR, SDHD, CYP1A1, CYP1B1, GSTT1	5
hsa05219	Bladder cancer	EGFR, RB1, CDKN2A, ERBB2, MMP2	5
hsa05223	Non-small cell lung cancer	EGFR, RB1, RET, CDKN2A, ERBB2	5
hsa05220	Chronic myeloid leukemia	RB1, CDKN2A, RUNX1, TGFB1, TGFB2	5
hsa00140	Steroid hormone biosynthesis	COMT, CYP17A1, CYP1A1, CYP1B1, UGT1A1	5
hsa05204	Chemical carcinogenesis - DNA adducts	CYP1A1, CYP1B1, GSTT1, NAT2, UGT1A1	5
hsa04020	Calcium signaling pathway	EGFR, RET, FGFR1, ERBB2, FGFR4	5
hsa00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6, GSTT1, UGT1A1	5

hsa04068	<i>FoxO signaling pathway</i>	ATM, EGFR, EP300, TGFB1, TGFB2	5
hsa04115	<i>p53 signaling pathway</i>	ATM, ATR, CDKN2A, MDM4, CHEK2	5
hsa05213	<i>Endometrial cancer</i>	APC, EGFR, ERBB2, TCF7L2	4
hsa05217	<i>Basal cell carcinoma</i>	APC, PTCH1, TCF7L2, WNT7A	4
hsa04014	<i>Ras signaling pathway</i>	EGFR, EXOC2, FGFR1, FGFR4	4
hsa04015	<i>Rap1 signaling pathway</i>	EGFR, FGFR1, FGFR4, ITGAL	4
hsa05218	<i>Melanoma</i>	EGFR, RB1, FGFR1, CDKN2A	4
hsa03430	<i>Mismatch repair</i>	MSH2, MSH6, PMS2, POLD1	4
hsa05230	<i>Central carbon metabolism in cancer</i>	EGFR, RET, FGFR1, ERBB2	4
hsa04350	<i>TGF-beta signaling pathway</i>	EP300, PPP2R1B, TGFB1, TGFB2	4
hsa05202	<i>Transcriptional misregulation in cancer</i>	ATM, MMP3, RUNX1, TGFB2	4
hsa04066	<i>HIF-1 signaling pathway</i>	EGFR, EP300, ERBB2	3
hsa04915	<i>Estrogen signaling pathway</i>	EGFR, MMP2, NCOA3	3
hsa05214	<i>Glioma</i>	EGFR, RB1, CDKN2A	3
hsa03410	<i>Base excision repair</i>	MUTYH, POLD1, XRCC1	3
hsa05203	<i>Viral carcinogenesis</i>	RB1, EP300, CDKN2A	3
hsa03450	<i>Non-homologous end-joining</i>	RAD50, PRKDC, XRCC6	3
hsa04668	<i>TNF signaling pathway</i>	CASP10, MMP14, MMP3	3
hsa04514	<i>Cell adhesion molecules</i>	ITGA6, ITGAL, PTPRF	3
hsa04912	<i>GnRH signaling pathway</i>	EGFR, MMP14, MMP2	3
hsa04152	<i>AMPK signaling pathway</i>	PPP2R1B, PPP2R5B	3
hsa04064	<i>NF-kappa B signaling pathway</i>	ATM, IRAK4, CXCL12	3
hsa01521	<i>EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance</i>	EGFR, ERBB2	2

hsa04012	<i>ErbB signaling pathway</i>	EGFR, ERBB2	2
hsa04630	<i>JAK-STAT signaling pathway</i>	EGFR, EP300	2
hsa05222	<i>Small cell lung cancer</i>	RB1, ITGA6	2
hsa04024	<i>cAMP signaling pathway</i>	EP300, PTCH1	2
hsa04330	<i>Notch signaling pathway</i>	EP300, NOTCH2	2
hsa05211	<i>Renal cell carcinoma</i>	EP300, TGFB1	2
hsa04974	<i>Protein digestion and absorption</i>	COL10A1, COL11A1	2
hsa05221	<i>Acute myeloid leukemia</i>	RUNX1, TCF7L2	2
hsa04210	<i>Apoptosis</i>	ATM, CASP10	2
hsa04910	<i>Insulin signaling pathway</i>	PTPRF	1
hsa04150	<i>mTOR signaling pathway</i>	WNT7A	1
hsa04072	<i>Phospholipase D signaling pathway</i>	EGFR	1
hsa04912	<i>GnRH signaling pathway</i>	EGFR	1
hsa05120	<i>Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection</i>	EGFR	1
hsa05235	<i>PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer</i>	EGFR	1
hsa03030	<i>DNA replication</i>	POLD1	1
hsa03420	<i>Nucleotide excision repair</i>	POLD1	1
hsa05216	<i>Thyroid cancer</i>	RET	1
hsa00020	<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>	SDHD	1
hsa00190	<i>Oxidative phosphorylation</i>	SDHD	1
hsa04979	<i>Cholesterol metabolism</i>	APOE	1
hsa04622	<i>RIG-I-like receptor</i>	CASP10	1

	<i>signaling pathway</i>		
hsa04062	<i>Chemokine signaling pathway</i>	<i>CXCL12</i>	1
hsa00480	<i>Glutathione metabolism</i>	<i>GSTT1</i>	1
hsa04512	<i>ECM-receptor interaction</i>	<i>ITGA6</i>	1
hsa04650	<i>Natural killer cell mediated cytotoxicity</i>	<i>ITGAL</i>	1
hsa04145	<i>Phagosome</i>	<i>MSR1</i>	1
hsa04340	<i>Hedgehog signaling pathway</i>	<i>PTCH1</i>	1
hsa04071	<i>Sphingolipid signaling pathway</i>	<i>S1PR3</i>	1
hsa04960	<i>Aldosterone-regulated sodium reabsorption</i>	<i>SCNN1A</i>	1
hsa05216	<i>Thyroid cancer</i>	<i>TCF7L2</i>	1
hsa04621	<i>NOD-like receptor signaling pathway</i>	<i>TP53BP1</i>	1
hsa04120	<i>Ubiquitin mediated proteolysis</i>	<i>BRCA1</i>	1

### 2.3.5 Ensayo de minigenes para la determinación del efecto en el proceso de *splicing* de las variantes intrónicas candidatas

- La determinación del efecto en el proceso de *splicing* de las variantes intrónicas identificadas en el gen *BRCA1* fue realizado en las líneas celulares HEK-293 y MDA-MB-231, siguiendo el protocolo de transfección y RT-PCR descrito en la metodología de este capítulo. Los resultados se muestran en la Figura 12.

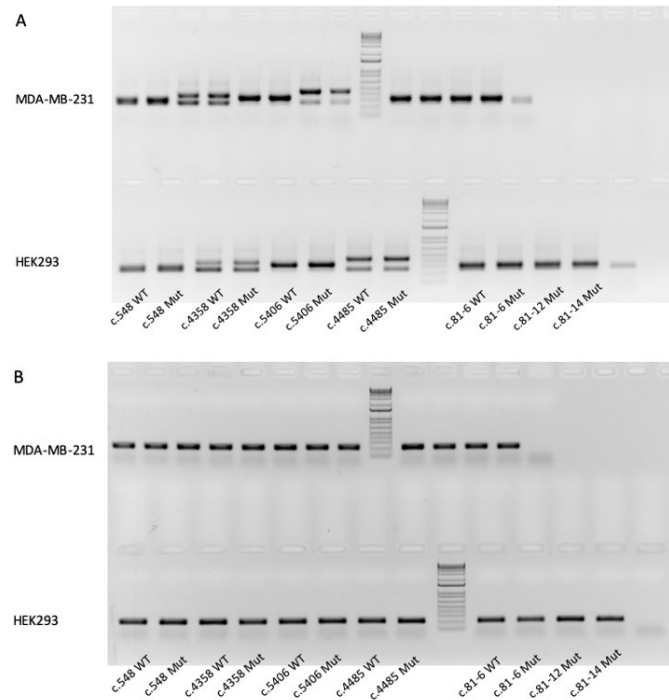


Figura 12. PCR de las variantes intrónicas identificadas en el gen *BRCA1*. (A) PCR realizada con los primers localizados en los exones de insulina de rata. (B) PCR realizada con los primers del gen constitutivo *GAPDH*

Como se observa en la Figura 12, aparentemente ninguna de las variantes intrónicas del gen *BRCA1* alteran el proceso de *splicing*.

- La determinación del efecto en el proceso de *splicing* de las variantes intrónicas identificadas en los genes *BRCA2* (c.68-7T>A) y *ATM* (c.5496+2\_5496+5delTAAG) fue realizado en las líneas celulares HEK-293, MDA-MB-231, MCF-7 y BT-474, siguiendo el protocolo de transfección y RT-PCR descrito anteriormente. En la Figura 13 se muestran los resultados de la PCR en los diferentes modelos celulares.

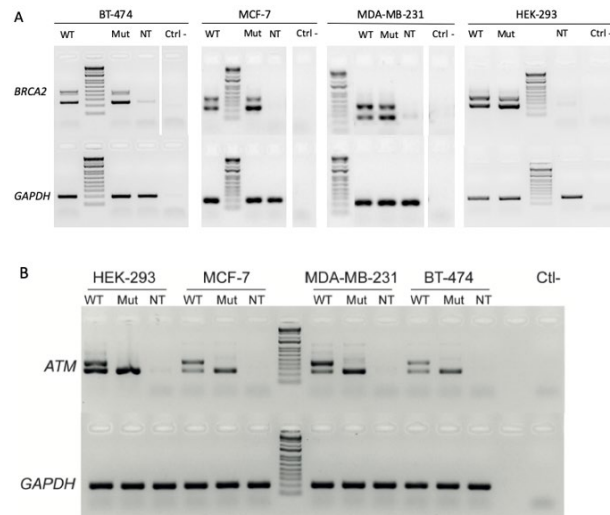


Figura 13. PCR de las variantes intrónicas identificadas en el gen *BRCA2*: c.68-7T>A y *ATM*: c.5496+2\_5496+5delTAAG, en los diferentes modelos celulares. (A) *BRCA2*: PCR realizada con los primers localizados en los exones de insulina de rata. *GAPDH*: PCR realizada con los primers del gen constitutivo *GAPDH*. NT: no transfectadas, Ctrl-: control negativo

En el panel (A) de la Figura 13 se observan diferencias entre las versiones WT y mutante, específicamente se evidencia disminución en la intensidad de la banda en la versión mutante y una leve disminución en el peso, de manera notoria en las líneas celulares HEK-293. Mientras que en el panel (B) se observa que la variante intrónica identificada en el gen *ATM* genera un *exon skipping* en todos los modelos celulares, ya que en la versión mutante solamente se observa una banda que corresponde al peso de los exones de insulina de rata (244pb), en comparación con la versión WT donde se observan dos bandas, una correspondiente a los exones de insulina de rata (244pb) y una banda más alta (entre 400 – 500pb) que corresponde al peso de los exones de insulina de rata y el exón del gen *ATM* (~421pb).

- De acuerdo con los resultados observados en los ensayos minigenes de las variantes intrónicas identificadas en los genes *ATM* y *BRCA2* se realizó extracción de ADN a partir de banda de gel de agarosa con el kit de *Qiagen* (*QIAquick Gel Extracción Kit*). Posteriormente, se realizó clonaje en el vector de almacenamiento pCR4-TOPO (Invitrogen). Los productos de clonaje (pCR4-*ATM* WT, pCR4-*ATM* Mut, pCR4-*BRCA2* WT y pCR4-*BRCA2* Mut) fueron transformados en las bacterias *E.coli* quimiocompetentes *One Shot Top 10* (Invitrogen). Luego se realizaron minicultivos, extracción de ADN plasmídico

mediante minipreps (kit de Qiagen) y secuenciación de Sanger con los primers RatIns\_Ex2\_pSpliceExpress\_For y RatIns\_Ex3\_pSpliceExpress\_Rev. La secuenciación de Sanger de los productos de extracción de banda clonados en el vector de almacenamiento pCR4-TOPO, confirmó que la variante intrónica del gen *ATM*: c.5496+2\_5495+5delTAAG produce un *exon skipping*, mientras que la variante intrónica del gen *BRCA2* no genera cambios en la secuencia exónica del mismo. En la Figura 14 se muestran los resultados descritos para la variante del gen *ATM*.

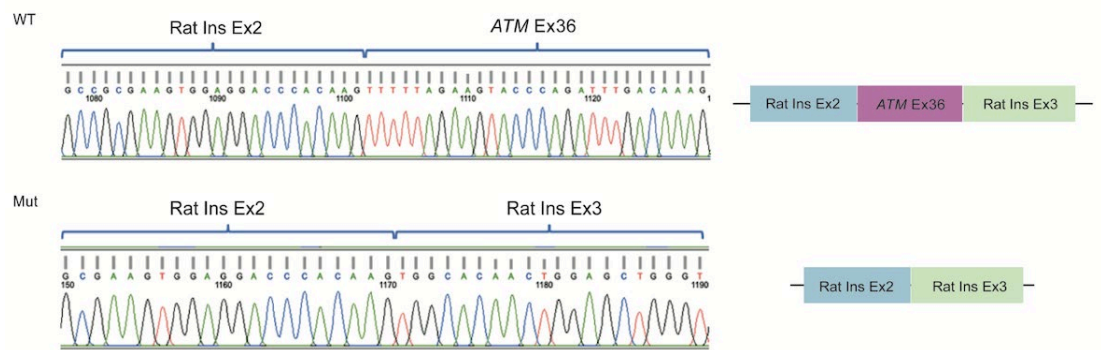


Figura 14. Secuenciación de Sanger de las construcciones WT (pCR4-ATM WT) y Mut ( pCR4-ATM Mut).

### 2.3.6 Validación funcional de variantes germinales localizadas en la región 3'UTR (*untranslated region-UTR*) del gen *BRCA1*

Los resultados correspondientes al título de este apartado se encuentran descritos y discutidos en detalle en la publicación titulada "*Functional Analysis of BRCA1 3'UTR Variants Predisposing to Breast Cancer*" (Anexo 4).

Se identificaron dos variantes localizadas en la región 3'UTR del gen *BRCA1*: c.\*36C>G y c.\*369\_373del. La primera se identificó en tres pacientes y la segunda en una paciente, ambas variantes germinales estaban en estado heterocigoto. La variante c.\*36C>G se encuentra en un sitio de interacción con el microARN miR-99a-3p y la variante c.\*369\_373del en una región de interacción con miR-26a-2-3p.

El ensayo *in vitro* del gen reportero de Luciferasa, utilizando el vector pMIR-Report, fue realizado en los modelos celulares MDA-MB-231 y MCF-7. Se observaron mayores niveles de RLU en la construcción que tenía la variante c.\*36C>G en comparación con la versión WT en el modelo celular MDA-MB-231 (valor  $p= 0.0286$ ),

mientras que no se observaron diferencias con significancia estadística entre la variante y la versión WT en la línea celular MCF-7. Para la variante c.\*369\_373del, no se identificaron diferencias entre esta y la versión WT en los dos modelos celulares evaluados.

Los resultados obtenidos evidencian que la variante c.\*36C>G altera, de manera indirecta, la interacción de la región 3'UTR con miR-99a-3p evitando la degradación de la región genómica estudiada para el gen *BRCA1*, en el modelo celular MDA-MB-231 (línea celular de TNBC).

### 2.3.7 Mutagénesis dirigida de variantes germinales, identificadas en el gen *BRCA2*, candidatas a validación funcional

Se realizó la verificación de las mutagénesis realizadas, descritas en la Tabla 5, mediante secuenciación de Sanger, utilizando *primers* que flanquean las regiones de interés (los *primers* fueron diseñados con la herramienta bioinformática Primer 3, <https://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Todas las mutagénesis fueron exitosas.

## 2.4 Discusión

El análisis de la selección comprensiva de genes relacionados con el cáncer de seno, y los estudios funcionales, de árboles de decisión, y de procesos biológicos y de vías de señalización, realizados en las 400 mujeres colombianas con cáncer de seno no seleccionado, permitieron evidenciar los perfiles genómicos mutacionales de esta población particular, encontrando que tanto a nivel mundial como a nivel Latinoamérica estos perfiles presentan amplias variaciones.

En particular, de estos análisis genómicos se realizó la publicación de los resultados obtenidos a partir de las variantes germinales P/LP identificadas en los diez genes considerados de impacto clínico en el cáncer de seno. En esta publicación además de incluir la descripción molecular de las variantes, se determinó la correlación genotipo-fenotipo mediante un análisis bivariado. Además, se realizó análisis de segregación familiar identificando personas en riesgo de desarrollar no solo cáncer de seno, sino los otros tipos de cáncer asociado a las mutaciones germinales identificadas en los genes de interés, seguidas de actividades de asesoramiento genético, retornando conocimiento accionable a quienes donaron sus datos clínicos, familiares y muestras para la presente investigación. En esta publicación también se

reportaron los resultados de la validación funcional de una variante intrónica recurrente identificada en el gen *ATM* (Anexo 2).

Otro resultado interesante obtenido a partir del análisis de los diez genes con impacto clínico fue la identificación de una variante germinal localizada en la región 3'UTR del gen *BRCA1*, que inhibe la degradación de *BRCA1* regulada por microARNs. Los ensayos *In vitro* evidenciaron el efecto protector de esta variante a desarrollar TNBC, resultados soportados también por el fenotipo de las pacientes en las que se identificó la variante (cáncer de seno receptores hormonales positivos) (Anexo 4)

Los resultados de las anotaciones de los procesos biológicos y de las vías de señalización realizados en los genes con variantes germinales P/LP, pueden agruparse en algunas de las características del cáncer (*hallmarks of cancer*), las cuales son habilidades funcionales que adquiere la célula cancerosa para la formación tumoral. Dentro de las características del cáncer existen dos habilidades que son catalogadas como habilitantes (*enabling characteristics*), que reflejan los mecanismos moleculares y celulares a través de los que se adquieren los rasgos funcionales de la célula cancerosa; estas habilidades o características habilitantes son la inestabilidad genómica y mutaciones génicas, y la inflamación promotora de tumores. Las habilidades funcionales de las características del cáncer son: la resistencia a la muerte celular (apoptosis), la desregulación del metabolismo celular, la plasticidad fenotípica, la señalización proliferativa sostenida, la evasión de los supresores de crecimiento, la reprogramación epigenética no-mutacional, la evasión a la destrucción inmune, permitir la inmortalidad replicativa, los microbiomas polimórficos, la activación de la invasión y metástasis, la inducción o el acceso a la vasculatura (angiogénesis) y las células senescentes (125).

Como resultado del análisis de procesos biológicos y de vías de señalización anotados para los genes con variantes germinales P/LP, se evidenciaron procesos que han sido descritos ampliamente en la carcinogénesis y su correlación con los *hallmarks* del cáncer, estos procesos biológicos y vías de señalización son: adhesión celular, proliferación celular, organización de la matriz extracelular, migración celular, regulación de la apoptosis y angiogénesis, entre otros. Teniendo esto en consideración, la discusión de los resultados de las anotaciones de procesos biológicos y de vías de señalización se centrará en los procesos cuya correlación con la carcinogénesis, específicamente del cáncer de seno, no ha sido descrita de manera tan amplia, o son procesos que hacen parte de las recientes características añadidas

a los hallmarks de cáncer (plasticidad fenotípica, reprogramación epigenética no-mutacional, microbiomas polimórficos y senescencia celular), en caso de aplicar para alguno de ellos.

El ADN de las células está sometidos a diferentes factores que pueden generar daños en él; estos factores pueden ser endógenos, como las especies reactivas de oxígeno, y exógenos o ambientales como el humo del cigarrillo o la radiación ultravioleta (126). La célula, para mantener la estabilidad genómica, cuenta con diversos mecanismos de reparación del daño inducido al ADN, así como con diferentes puntos de control del ciclo celular. Como se mencionó previamente, Uno de los *hallmark* del cáncer es la inestabilidad genómica, la cual permite el desarrollo tumoral mediante la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores (127). Los diferentes mecanismos de reparación del ADN se encargan de mantener la estabilidad genómica celular. En las Figuras 15 y 16 se describen los mecanismos de reparación del ADN identificado en los genes con variantes germinales P/LP y la distribución de las pacientes en los subtipos moleculares.

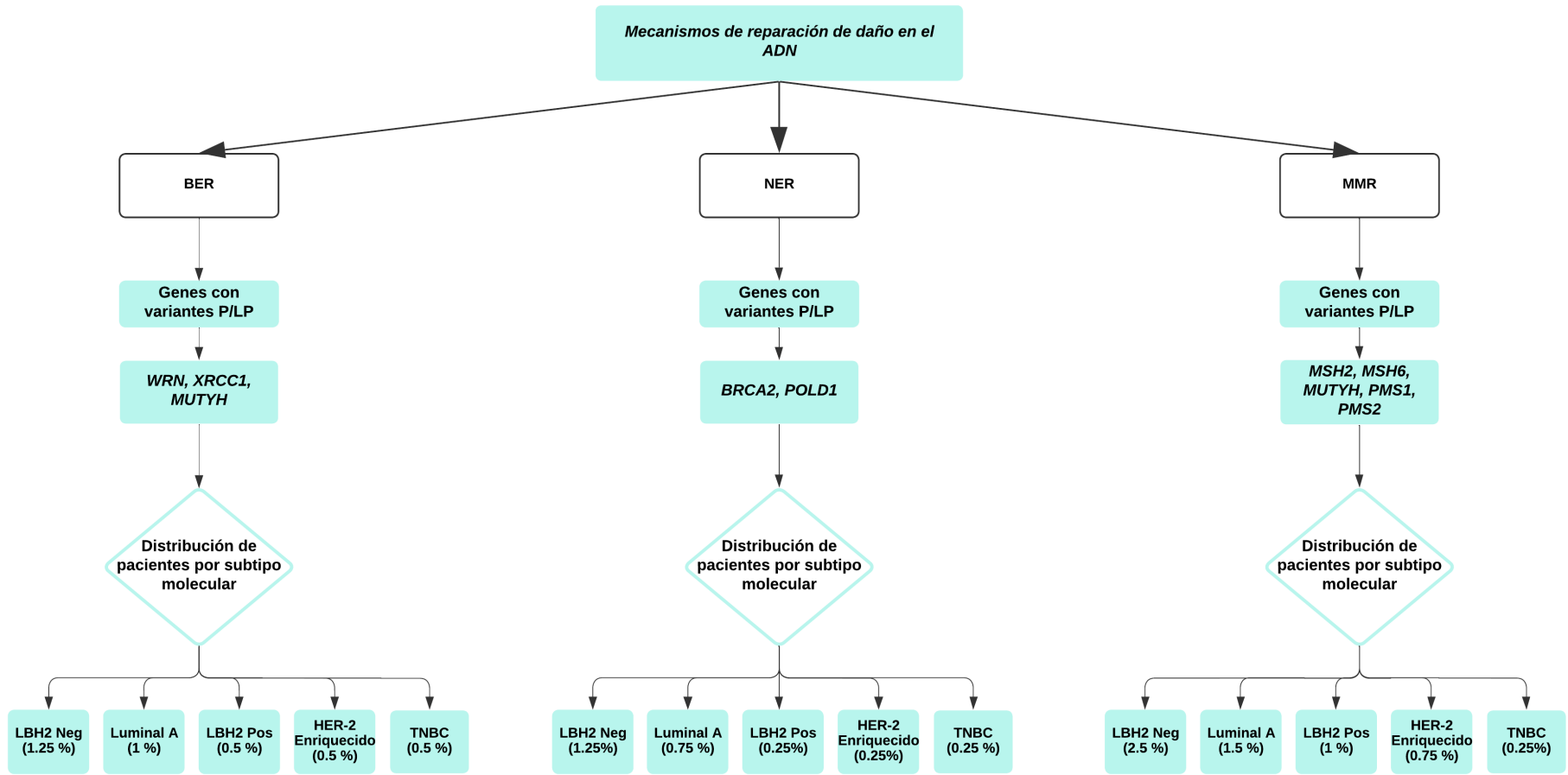


Figura 15. Mecanismos de reparación del daño al ADN: BER, NER y MMR. BER (*base excision repair*-BER). NER (*nucleotide excision repair*-NER). MMR (*mismatch repair*-MMR).

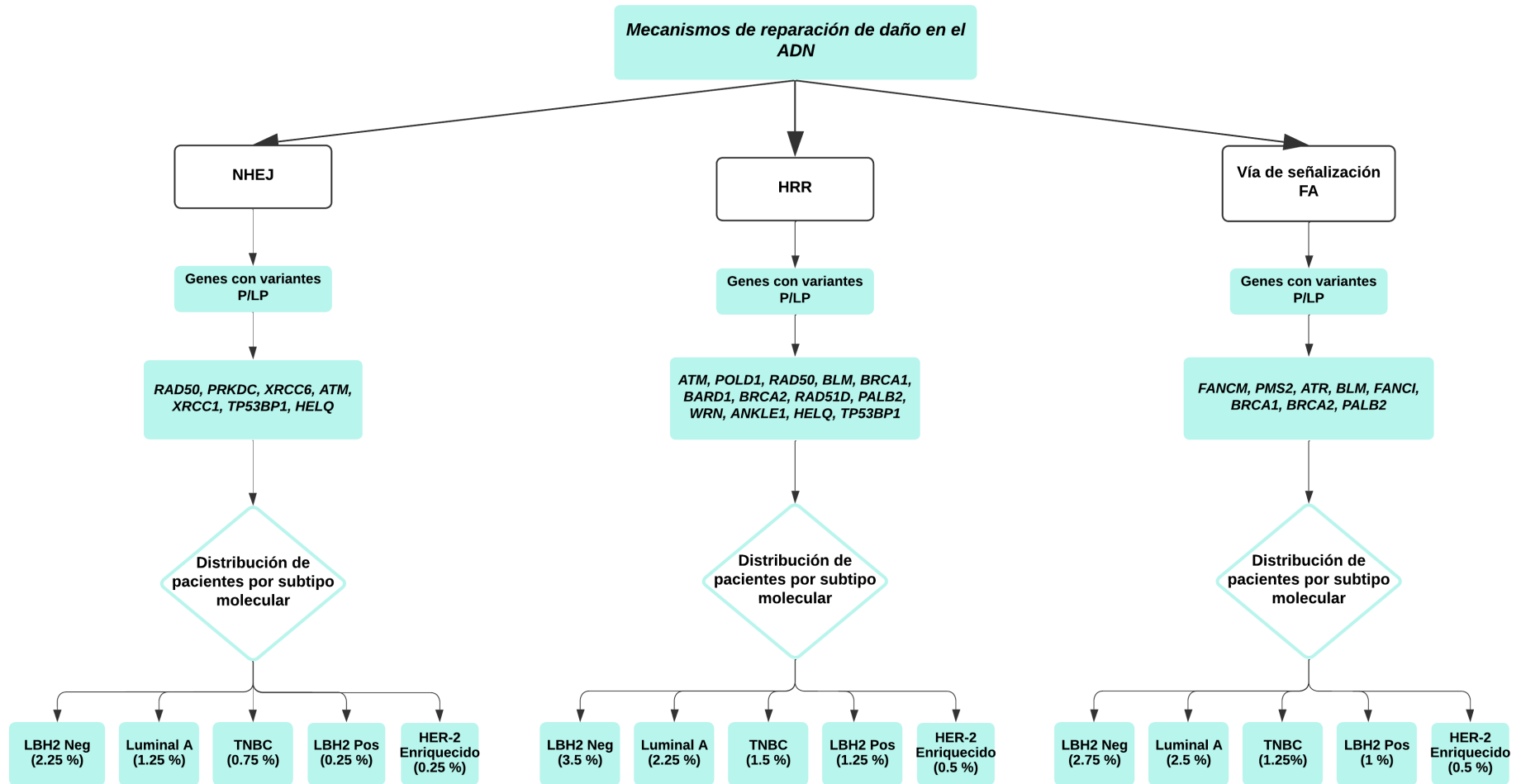


Figura 16. Mecanismos de reparación al daño en el ADN: NHEJ, HRR y vía de señalización FA. NHEJ (*non-homologous end joining*-NHEJ). HRR (*homologous recombination repair*-HRR). Vía de señalización FA (*Fanconi Anemia*-FA).

Los daños en el ADN pueden clasificarse de la siguiente manera: rupturas de hebra sencilla, rupturas de doble hebra, daños en las bases nitrogenadas, daños en los azúcares que conforman el esqueleto del ADN (desoxirribosas), entrecruzamiento de ADN y sitios dañados agrupados (múltiples lesiones como daño en las bases nitrogenadas, sitios abásicos y rupturas de hebra sencilla, con una distancia de separación de al menos 20 pares de bases) (127). De manera particular, se ha descrito que la reparación inadecuada o la generación de errores a partir del proceso de reparación de las rupturas de doble hebra, puede conllevar a la carcinogénesis o a la muerte celular (127).

Cuando se producen rupturas de hebra sencilla del ADN se activa el mecanismo de reparación denominado BER (126). A nivel mundial múltiples estudios han realizado el análisis de paneles extendidos de genes relacionados con el cáncer de seno. Sin embargo, la frecuencia de variantes germinales P/LP en genes relacionados con la reparación BER en cáncer de seno no se encuentra definida de manera clara en la literatura.

Alteraciones estructurales en la doble hebra de ADN ocasionadas por lesiones en hebra sencilla son reparadas por el mecanismo NER (126). La anotación de este proceso biológico se realizó para los genes *BRCA2* y *POLD1*. Defectos en este mecanismo de reparación han sido identificados en pacientes con cáncer de seno de inicio temprano y con antecedente de tabaquismo (126,128).

Un error que puede suceder durante la replicación es el mal apareamiento de bases, denominado *mismatch*, llevando a alteraciones en la estructura helicoidal de la molécula de ADN. Este tipo de alteraciones son reparadas por la maquinaria MMR (*mismatch repair*-MMR). La frecuencia de mutaciones germinales en genes involucrados en el proceso MMR en pacientes con cáncer de seno es variable, algunos estudios han reportado frecuencias del 0.2% para población con ancestría caucásica o europea (129) y en grandes consorcios como BCAC, se han identificado variantes germinales en genes relacionados con este tipo de reparación en el 7.6% (4,595/60,466) de los casos analizados (60). Para el caso particular de Colombia, un estudio previo reportó una frecuencia del 2.3% para variantes germinales identificadas en los genes *MSH2* y *PMS2*, en mujeres que cumplían criterios para cribado molecular de cáncer de seno y ovario hereditario (130). En nuestra población de estudio, el cáncer de seno LBH2Neg tuvo el mayor número de genes con variantes germinales P/LP asociados con el mecanismo MMR, identificándose este tipo de

mutaciones en los genes *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *PMS1* y *PMS2*. A nivel tumoral, la deficiencia en el MMR se asocia con la inestabilidad de microsatélites y con una alta carga mutacional, favoreciendo la respuesta de estos tumores a inhibidores de los puntos de chequeo inmunes. En el caso de cáncer de seno con deficiencia MMR, está aprobado el tratamiento con Pembrolizumab (anti-PD-1) (131,132). Estos hallazgos corroboran la necesidad de realizar estudios poblacionales, ya que los perfiles y las frecuencias de variantes germinales son diversos.

Cuando se generan rupturas de doble hebra, la célula puede reparar este daño mediante dos mecanismos de reparación. Por un lado, la célula repara las rupturas de doble hebra ligando los extremos donde se produjo la ruptura mediante el proceso denominado NHEJ; sin embargo, esto favorece la generación de deleciones (126). Diversos estudios en cáncer de seno han intentado evaluar el efecto de las alteraciones en la vía de reparación NHEJ, sin embargo los resultados son inconsistentes, ya que no se han encontrado alteraciones mayores de esta vía de reparación en el cáncer de seno, y este proceso no es defectuoso en la mayoría de estos casos; adicionalmente, se ha evidenciado que las reparaciones de las rupturas de doble hebra se restauran de manera más eficiente mediante la reparación por recombinación homóloga en comparación con NHEJ (133–135).

Por otro lado, la célula también repara las rupturas de doble hebra con el mecanismo HRR (*homologous recombination repair*-HRR), en el cual la secuencia de ADN donde se produjo la ruptura es restaurada utilizando la cromátide hermana como molde. Se ha descrito que entre el 25% a 40% de los cánceres de seno tienen mutaciones germinales y somáticas en genes que participan en la reparación por recombinación homóloga (126). El 9% (36/400) de las mujeres con cáncer de seno no seleccionado tenían variantes germinales P/LP en genes relacionados con HRR. En todos los subtipos moleculares de cáncer de seno analizados se identificaron variantes germinales P/LP en genes relacionados con esta vía de reparación, encontrando entre cuatro a seis genes en todos los subtipos excepto en HER-2 enriquecido, donde solo se identificaron mutaciones germinales en dos genes relacionado con este proceso biológico (*WRN* y *POLD1*).

Adicional a los mecanismos de reparación mencionados previamente, existe una vía de señalización asociada a reparación de daños en el ADN denominada la vía de la Anemia de Fanconi (*Fanconi anemia*-FA). Esta vía de señalización es un proceso que restaura la replicación del ADN, luego de la reparación del daño generado en el mismo

mediante los mecanismos de reparación NER, síntesis translesional y HRR. Adicionalmente, esta vía de señalización también se encarga de reparar entrecruzamientos inter-hebra del ADN. El 25% de los cánceres de seno tienen alteraciones en esta vía de señalización (126,136). Considerando que las alteraciones en la vía de señalización de la FA hacen que las células cancerosas sean más sensibles a los agentes que producen entrecruzamientos inter-hebra, como el cisplatino y la mitomicina C, tener variantes germinales en genes involucrados en esta vía de señalización podrían beneficiarse del tratamiento con estos agentes (137,138).

Como se mencionó con anterioridad, la inestabilidad genómica puede generarse a partir de factores exógenos y endógenos. Dentro de los factores exógenos se encuentran los ambientales, como por ejemplo los agentes químicos que forman aductos con el ADN o la exposición a diversos tipos de radiación. Los factores endógenos hacen referencia a compuestos producidos a partir del metabolismo celular como los radicales libres o las especies reactivas de oxígeno (127). En la Figura 17 se describen los procesos biológicos y vías de señalización asociados con la generación de aductos de ADN, así como los genes donde se identificaron mutaciones germinales y la distribución de las pacientes en los subtipos moleculares.

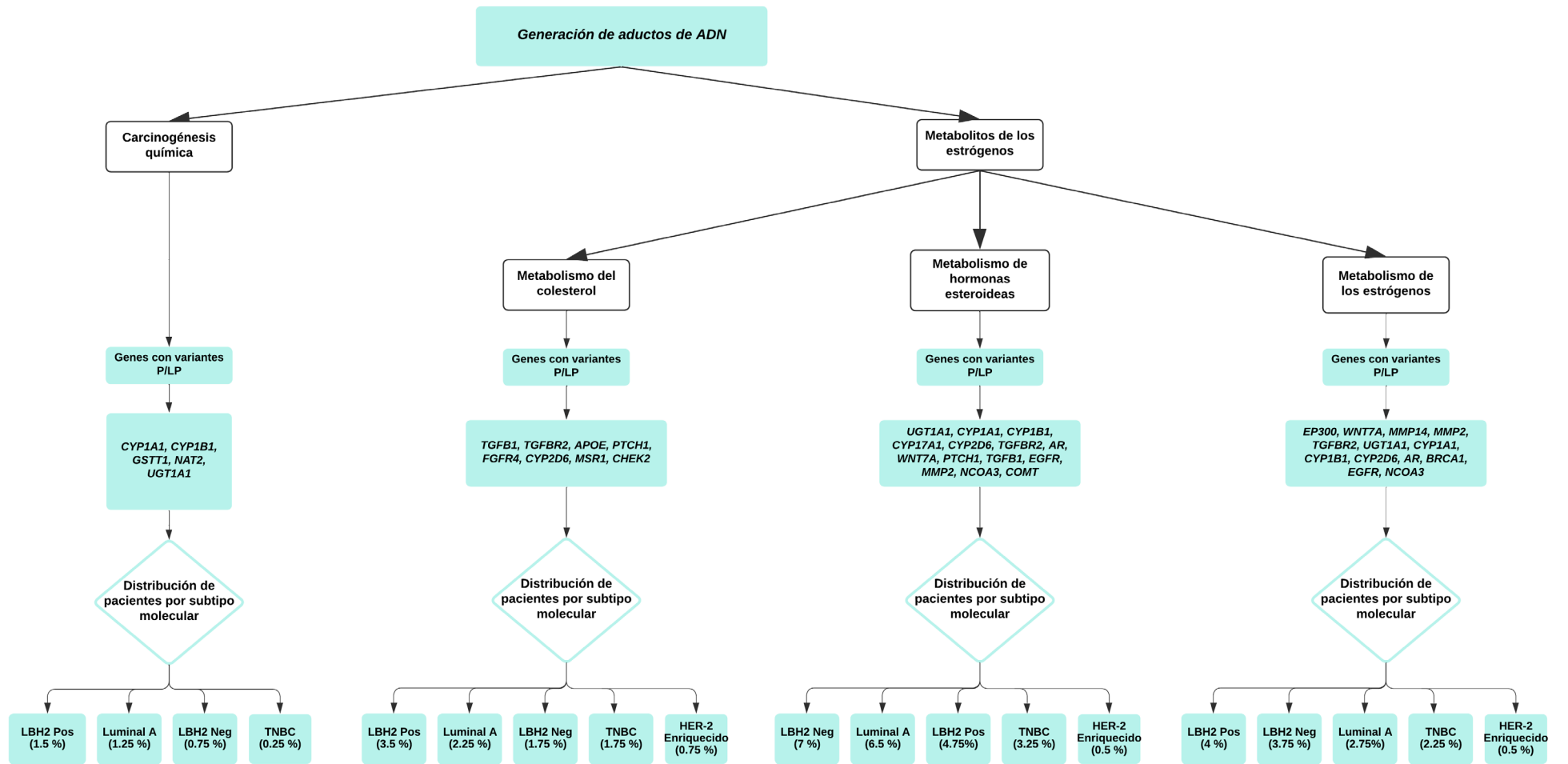


Figura 17. Generación de aductos de ADN.

Diferentes estudios han evaluado la asociación entre la formación de aductos de compuestos aromáticos exógenos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons-PAHs*), así como la formación de aductos a partir de compuestos endógenos como los metabolitos de los estrógenos (139–142). Particularmente, en el caso de los aductos de PAH-ADN, White y colaboradores identificaron que éstos son más frecuentes en los tumores hormonales positivos (143), lo cual es similar a lo evidenciado en nuestra población de estudio, identificándose variantes germinales P/LP en dos a tres genes asociados con la vía de señalización en cuestión en los subtipos hormonales positivos (Luminal A, LBH2Neg y LBH2Pos). Previamente en la literatura se había reportado la presencia de polimorfismos en los genes *CYP1A1*, *NAT2* y *GSTM1*, y la asociación con la formación de aductos de ADN en tejido sano de mujeres con cáncer de seno, especialmente en pacientes fumadoras (144).

Como se mencionó previamente, la generación de la interacción de aductos-ADN, no solo depende de compuestos exógenos sino de metabolitos endógenos, para el caso del cáncer de seno, los metabolitos de los estrógenos han sido identificados como fuente de esta interacción. Dentro de los procesos biológicos y las vías de señalización anotadas para los genes con variantes germinales P/LP, se identificaron términos que se entrelazan entre sí (Figura 17), como son el metabolismo del colesterol, el metabolismo de las hormonas esteroideas y el metabolismo de los estrógenos. El colesterol es el precursor de las hormonas esteroideas (estrógenos, progesterona y testosterona) y en algunos casos se ha determinado que regula la actividad del receptor de estrógenos mediante la formación de 27-hidroxicolesterol, cuando se encuentra en niveles elevados en patologías como la dislipidemia, favoreciendo la proliferación de células cancerosas en el seno que expresan el receptor de estrógenos (145). Durante el metabolismo, los estrógenos sufren procesos de hidroxilación formando catecol-estrógenos, los cuales posteriormente son convertidos en quinonas catecol-estrógenos mediante oxidación. Los aductos de ADN se forman a partir de las quinonas, generando sitiosapurínicos en el ADN, permitiendo procesos mutagénicos que posteriormente van a favorecer la carcinogénesis si no se reparan adecuadamente.

Alteraciones en las enzimas encargadas del metabolismo de los estrógenos determinan la frecuencia con la que se forman los aductos de ADN (141,146–149). Una enzima primordial en el metabolismo de los estrógenos es la Catecol-O-Metil

Transferasa (COMT). Como su nombre lo indica, COMT se encarga de metilar los catecol-estrógenos, evitando que éstos sean oxidados y convertidos en quinonas catecol-estrógenos, transformándolos en metoxi-estrógenos. La inhibición de la COMT ha sido asociada con el incremento en la formación de aductos de ADN-estrógenos (150–152). Polimorfismos que afectan la actividad catalítica de COMT han sido asociados con alteraciones en los niveles de catecol-estrógenos y de metoxi-estrógenos. Además, algunos estudios han evaluado la presencia de estos polimorfismos en el gen *COMT* y el riesgo de desarrollar cáncer de seno; sin embargo, los resultados han sido inconsistentes (153,154).

Otra vía de señalización y procesos biológicos en las que se identificaron múltiples genes con variantes germinales P/LP fue la generación de ROS (*reactive oxygen species*-ROS). En la Figura 18 se describen los genes con mutaciones germinales asociados con la generación de ROS y la distribución de las pacientes en los subtipos moleculares de cáncer de seno.

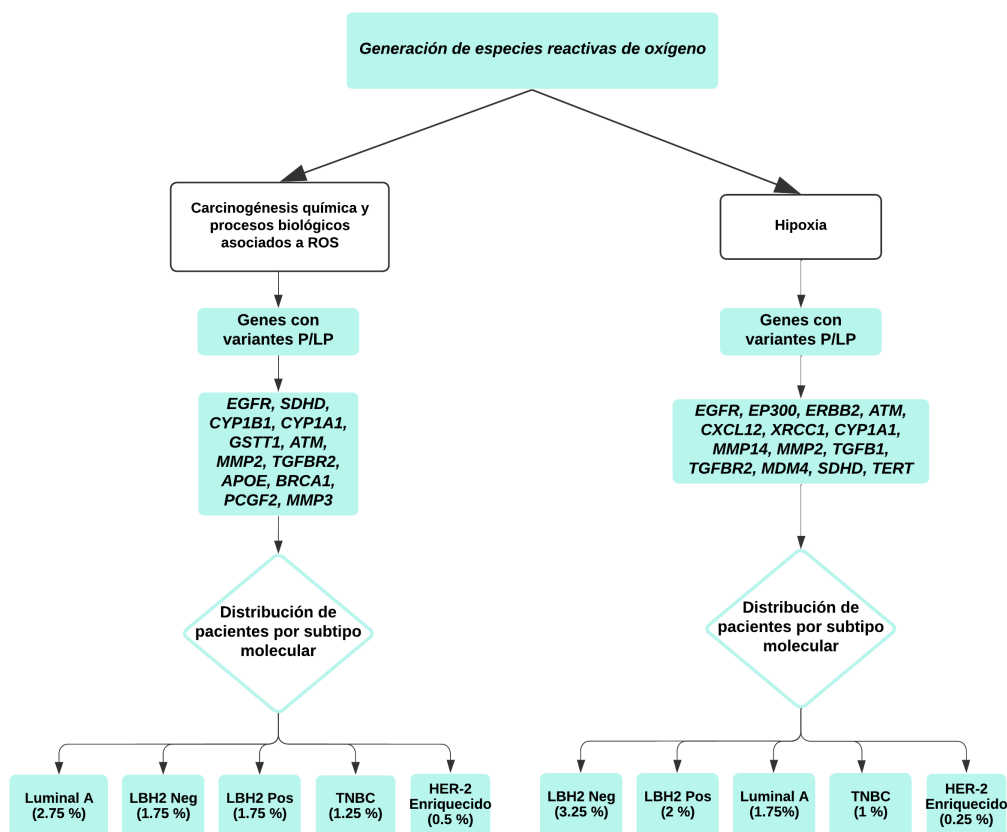


Figura 18. Generación de especies reactivas de oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno pueden favorecer el desarrollo del cáncer de seno mediante la generación de daños en el ADN, la activación de protooncogenes o la supresión de genes tumorales; adicionalmente, las especies reactivas de oxígeno pueden alterar vías de señalización como MAPK y PI3K/AKT, las cuales regulan la proliferación y supervivencia celular y la metástasis (155,156). También se ha descrito que las especies reactivas de oxígeno ejercen funciones en el microambiente tumoral del cáncer de seno, permitiendo la comunicación entre las células cancerosas y el componente estromal del mismo, ayudando a la progresión tumoral y la metástasis. En cuanto al componente estromal del microambiente tumoral, las especies reactivas de oxígeno llevan a estrés oxidativo crónico convirtiendo los fibroblastos en CAFs (*carcinoma-associated fibroblasts*-CAFs), los cuales favorecen el crecimiento tumoral y la metástasis. Además de los CAFs, en el microambiente tumoral se encuentran células inflamatorias como los macrófagos y neutrófilos, que producen especies reactivas de oxígeno como parte de la respuesta inflamatoria, llevando a inflamación crónica, daño en el ADN e impulsando la metástasis tumoral (157–160).

Se han descrito diferentes fuentes de especies reactivas de oxígeno en el cáncer de seno, las cuales favorecen el inicio y la progresión tumoral. Una de estas fuentes es el metabolismo de los estrógenos, los cuales mediante procesos de oxidación de los catecol-estrógenos, además de generar quinonas, producen peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (tipos de especies reactivas de oxígeno) en las células epiteliales del seno, activando vías de señalización pro-proliferativas e inactivando vías anti-apoptóticas, contribuyendo al crecimiento y supervivencia de la célula cancerosa (161,162). La disfunción mitocondrial también favorece la producción de especies reactivas de oxígeno, de manera particular en el TNBC (163). La disfunción mitocondrial puede afectar tanto a las células cancerosas como a las células estromales del microambiente tumoral, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno. Esto se asocia con reprogramación metabólica, ayudando a la supervivencia y proliferación de las células tumorales bajo condiciones de estrés oxidativo (155,159,164).

Las condiciones que llevan a hipoxia en el microambiente tumoral también se han asociado con la producción de especies reactivas de oxígeno, principalmente a través de la cadena transportadora de electrones, ya que los niveles elevados de especies reactivas de oxígeno pueden producir daño en el ADN mitocondrial, activando

oncogenes e inhibiendo supresores tumorales contribuyendo al inicio y progresión del cáncer (155,165). En el análisis de procesos biológicos y de vías de señalización se identificaron genes con mutaciones germinales en procesos relacionados con la hipoxia (Figura 18).

En el cáncer de seno la hipoxia sucede principalmente por alteraciones en el balance entre suplencia y demanda de oxígeno en el microambiente tumoral. Las causas de este desbalance se mencionan a continuación. Las anomalías estructurales y funcionales de la vasculatura de la microvasculatura tumoral: la angiogénesis tumoral usualmente produce vasos anormales, con fugas y poco eficientes, los cuales no son capaces de suplir la demanda de oxígeno de las células tumorales que proliferan rápidamente, llevando a la generación de hipoxia en algunas regiones del tumor (166–169). El incremento en las distancias de difusión de oxígeno: el aumento de tamaño tumoral aumenta la distancia entre éste y los vasos sanguíneos, haciendo que la difusión del oxígeno por el tumor sea desigual, resultando en hipoxia en las regiones con poca difusión de este gas (166–170). La anemia (inducida por el tumor o por el tratamiento del cáncer): este evento reduce la capacidad de transportar oxígeno, exacerbando la hipoxia en el tejido tumoral, especialmente en áreas con baja perfusión (166,170). La rápida proliferación de las células tumorales: esta característica de algunas células tumorales supera la suplencia de oxígeno contribuyendo a la hipoxia (169,171). La hipoxia intermitente: en los tumores se pueden presentar fluctuaciones en el flujo sanguíneo generando fluctuaciones en la suplencia de oxígeno; se ha observado que la hipoxia intermitente puede inducir la expresión de fenotipos más agresivos y metastásicos en el cáncer de seno (172). El tejido adiposo y la obesidad: en el cáncer de seno, la obesidad puede exacerbar la hipoxia. En el microambiente tumoral, los adipocitos pueden incrementar la expresión de HIF-1 (factor de transcripción del cual se hablará más adelante) favoreciendo a la generación de un ambiente hipóxico y pro-tumorigénico (173).

Adicional a las causas mencionadas previamente, en condiciones de hipoxia, se activa el factor de transcripción HIF-1 regulando la expresión de genes relacionados con el metabolismo, la angiogénesis y la supervivencia celular. Este factor de transcripción permite que las células cancerosas se adapten a la hipoxia, mediante la reducción de especies reactivas de oxígeno producidas en la mitocondria e incrementando las defensas antioxidantes (165,174). En adición, el factor de transcripción HIF-1 participa en la reprogramación metabólica que sufren las células

cancerosas en condiciones de hipoxia, incrementando la glicólisis y alterando la actividad del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (175,176). Concretamente, cada vez hay más evidencia que soporta la correlación entre las alteraciones del ciclo de los ácidos tricarbóxicos con el desarrollo y la progresión del cáncer de seno. Las alteraciones en este proceso metabólico pueden tener diferentes orígenes. Por ejemplo, las mutaciones en genes que codifican para enzimas como isocitrato deshidrogenasa (IDH), succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarato hidratasa (FH) pueden favorecer la acumulación de 2-hidroxioglutarato, un oncometabolito, el cual estabiliza el factor de transcripción HIF-1 y tiene efectos epigenéticos promoviendo la proliferación y supervivencia de las células cancerosas (177,178).

Como se mencionó previamente, la hipoxia genera, a nivel tumoral, la reprogramación metabólica disminuyendo la utilización del ciclo de los ácidos tricarbóxicos como fuente de energía, llevando a la acumulación de intermediarios como el fumarato. La acumulación de este intermediario es consecuencia de la disminución de la expresión de la enzima mitocondrial PCK2 (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*-PCK2) (175). En el cáncer de seno se produce un efecto denominado Warburg, el cual consiste en un cambio de fosforilación oxidativa a glicólisis aún en presencia de oxígeno. Este efecto es respaldado por la disminución de la actividad de las enzimas piruvato deshidrogenasa y citrato sintasa, llevando a una disminución en el flujo de carbono al ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Además, el tejido adiposo asociado con el cáncer de seno, a nivel mitocondrial, puede incrementar la síntesis y oxidación de los ácidos grasos (179). Así mismo, las MICs (*metastasis-initiating cells*-MICs) del cáncer de seno dependen del acetil-CoA proveniente del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (exportación del citrato de la mitocondria al citoplasma, mediante la lanzadera de citrato, para la producción de acetil-CoA) y del metabolismo de los ácidos grasos, para mantener modificaciones epigenéticas que favorecen la metástasis (180). A pesar del efecto Warburg observado en el cáncer de seno, estudios recientes han demostrado que la fosforilación oxidativa sigue siendo una vía metabólica importante en algunos subtipos de cáncer de seno, y en los casos de progresión de la enfermedad y de resistencia al tratamiento (181–184).

La alteración en la fosforilación oxidativa se asocia con el cáncer de seno de varias maneras, como en los siguientes casos: cuando las células del cáncer de seno sufren diferenciación osteogénica, activan la fosforilación oxidativa, lo cual promueve la EMT

y la metástasis (185); las mutaciones mitocondriales pueden generar alteraciones en la cadena respiratoria, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno, los efectos asociados con la carcinogénesis mencionados con anterioridad (186,187); la inhibición de la fosforilación oxidativa, en TNBC resistente a quimioterapia y en cáncer de seno metastásico resistente a terapia endocrina, ha demostrado eficacia en modelos preclínicos, mediante la estabilización del crecimiento tumoral y aumentando la efectividad de otras terapias dirigidas (183,184). En una de las mujeres con cáncer de seno no seleccionado se identificó una variante germinal P/LP en el gen *SDHD* para el cual se anotaron vías de señalización y procesos biológicos relacionados con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y con la fosforilación oxidativa.

Por último, el metabolismo de las células cancerosas también ha sido descrito como una fuente importante de especies reactivas de oxígeno, asociándose con agresividad tumoral, modulación de la respuesta inmune y peores resultados de supervivencia (158).

En cuanto a la regulación del estado redox, la célula cuenta con agentes antioxidantes como el glutatión, el cual es crítico para la neutralización de las especies reactivas de oxígeno. En pacientes con cáncer de seno se han observado alteraciones en el metabolismo del glutatión, demostrando alteraciones en la defensa antioxidante, generando incrementos en el estrés oxidativo y contribuyendo a la progresión de la enfermedad (188,189).

Además de las consecuencias pro-tumorales asociadas con las especies reactivas de oxígeno, un estrés oxidativo crónico se ha asociado con la generación de quimioresistencia (190). Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno no solo tienen efectos pro-tumorales, sino también anti-tumorales, lo que ha llevado al desarrollo de estrategias terapéuticas basándose en los efectos anti-tumorales de estos agentes. Una de estas estrategias ha explorado el uso de agentes antioxidantes como adyuvantes en el tratamiento del cáncer de seno, con probables efectos en el mejoramiento de la eficacia terapéutica y en la reducción de efectos no deseados de los tratamientos estándar.

El uso de antioxidantes depende del subtipo tumoral y del estado redox (191,192). Otro tipo de tratamiento basado en especies reactivas de oxígeno es la terapia fotodinámica, en la que estimula la producción de especies reactivas de oxígeno mediante la activación de fotosensibilizadores por luz, llevando a la muerte celular

tumoral. La terapia fotodinámica es capaz de inducir estrés oxidativo y necrosis celular localizada, características que han llevado a un incremento de su uso en el tratamiento del cáncer de seno (193,194). Por último, existen las terapias pro-oxidativas, en las que se induce la producción de especies reactivas de oxígeno, generando citotoxicidad en las células tumorales. Algunos agentes quimioterapéuticos son pro-oxidativos, como la doxorubicina (195).

La alteración en la expresión génica mediante la presencia de mutaciones germinales en genes relacionados con la regulación de la transcripción, y la estructura y función de la cromatina fueron identificados en la población de estudio (descritos en las Tablas 15-19 y en el Anexo 5). En cuanto a la correlación de estas alteraciones con los Hallmarks del cáncer, se pueden asociar con varios de ellos; por ejemplo, mutaciones que alteran la función de factores de transcripción podrían resultar en la expresión a la alta de oncogenes o en la expresión a la baja de genes supresores tumorales, favoreciendo que la célula cancerosa adquiera habilidades como proliferación, metástasis, plasticidad fenotípica y evasión de la apoptosis, entre otras características (196). Por ejemplo, en nuestra cohorte se identificaron variantes germinales P/LP en el gen *TCF7L2*, el cual es un efector de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, regulando positivamente la transcripción de genes blanco mediante la formación de complejos con la  $\beta$ -catenina, favoreciendo la proliferación y diferenciación celular (197); específicamente, la expresión aberrante de *TCF7L2* altera la vía de señalización Wnt y favorece la expresión de c-MYC y ciclina D, permitiendo la oncogénesis (198). Diferentes estudios han evaluado la asociación entre la presencia de polimorfismos en el gen *TCF7L2* y el riesgo de desarrollar cáncer de seno, sin embargo, los resultados son inconsistentes (198–202). Otro gen que tiene función de factor de transcripción y en el que se identificaron variantes germinales P/LP es el *AR* (*androgen receptor-AR*), en el 2.75% (11/400) de las pacientes distribuidas en dos pacientes Luminal A, tres pacientes LBH2neg, cuatro pacientes LBH2Pos, un paciente HER-2 enriquecido y un paciente TNBC. Se ha descrito que dependiendo del subtipo molecular de cáncer de seno, el receptor de andrógenos puede actuar como un oncogén o como un gen supresor tumoral. En el cáncer de seno positivo para receptor de estrógenos, AR inhibe la actividad del ER $\alpha$ , disminuyendo el crecimiento tumoral (203,204). Mientras que en los subtipos HER-2

enriquecido y TNBC, el AR favorece la progresión tumoral (205,206). Considerando la función dual del AR como supresor tumoral y oncogén dependiendo del subtipo molecular, nuestros hallazgos confirman que alteraciones en el funcionamiento del AR (supresor tumoral) favorece el desarrollo de cáncer de seno con receptores hormonales positivos, ya que en estos subtipos se identificaron la mayoría de pacientes con variantes germinales P/LP en este gen (2.25%, 9/400); mientras que en los subtipos HER-2 y TNBC, la función de oncogén se encuentra conservada, identificándose variantes germinales en solo un paciente para cada subtipo (0.5%, 2/400).

En la Figura 19, se describen otros procesos/vías de señalización relacionadas con la carcinogénesis (alteración de la expresión génica-modificación de la cromatina, senescencia celular, células madre y proteoglicanos) anotados para genes con variantes germinales P/LP, los cuales se describirán en los párrafos siguientes.

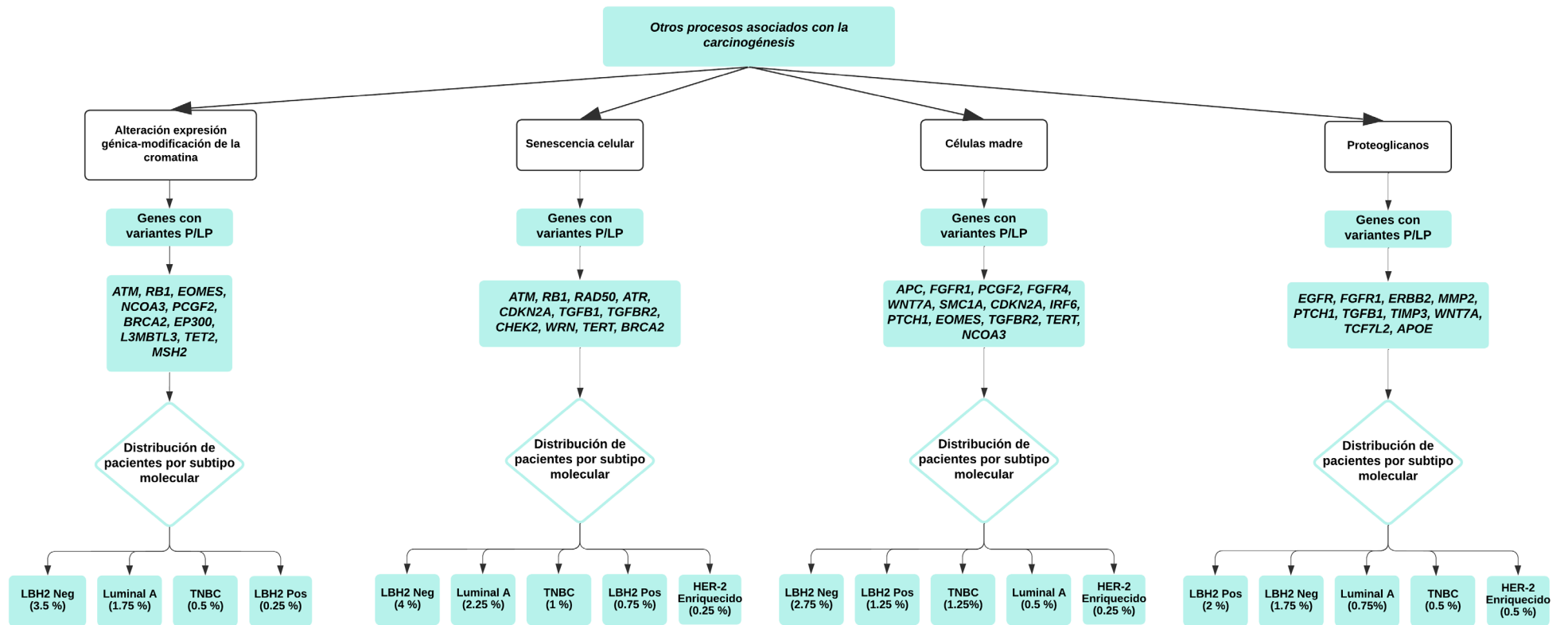


Figura 19. Otros procesos/vías de señalización relacionados con la carcinogénesis.

Otro factor que altera la expresión génica es la modificación en la función y estructura de la cromatina. El 6% (24/400) de la población de estudio tenían variantes germinales P/LP en los genes relacionados con la modificación de la cromatina. Como se observa en la Figura 19 no se identificaron mutaciones germinales, para este proceso biológico, en el subtipo HER-2 enriquecido.

De manera particular, se ha descrito que alteraciones en el plegamiento de la cromatina puede activar o reprimir genes relacionados con la carcinogénesis, y se han identificado diferencias en la estructura de la cromatina, entre los subtipos TNBC y Luminal A, encontrándose en el primero una disrupción severa de la estructura tridimensional (207,208). En los cánceres de seno hormonales positivos, las alteraciones en la estructura de la cromatina han sido asociadas con la generación de resistencia endocrina (209). Comparando lo reportado en la literatura en relación con las alteraciones en la estructura y funcionamiento de la cromatina *versus* el subtipo molecular del cáncer de seno; en nuestra población de estudio la frecuencia de mujeres con variantes germinales P/LP en genes relacionados con este tipo de alteraciones fue mayor en los subtipos hormonales positivos, particularmente LBH2Neg, en comparación con TNBC. Estos hallazgos podrían explicarse por dos razones principales; la primera es la población de estudio, la mayoría de estudios evalúan población de ascendencia europea o caucásica, y la segunda el tipo de variantes, nosotros estamos reportando variantes germinales y en las referencias se estudiaron variantes somáticas.

Uno de los *hallmark* del cáncer que se encontró en las pacientes con cáncer de seno no seleccionado fue la senescencia celular (Figura 19). Esta característica celular tiene una función dual en el cáncer, ya que puede tener efectos anti-tumorales mediante la detención de la proliferación de las células con potencial cancerígeno, y puede favorecer la carcinogénesis mediante la promoción de la proliferación celular a través del SASP (*senescence-associated secretory phenotype-SASP*), secretando citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y proteasas que favorecen el crecimiento tumoral y la metástasis (210,211). En el microambiente tumoral, las células senescentes pueden activar la vía de señalización JNK, en las células cancerosas del seno, mediante la secreción de factores de crecimiento como GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor-GM-CSF*) y bFGF (*basic fibroblast growth factor-bFGF*), y de esta manera permitiendo la motilidad celular y la metástasis (210). Actualmente, el desarrollo de terapias dirigidas contra las células

senescentes es un campo de investigación activa, principalmente para el TNBC. Algunas terapias pueden inducir la senescencia celular llevando a una detención temporal de la progresión tumoral. Sin embargo, la senescencia celular también se asocia con el desarrollo de resistencia a los tratamientos y con la recurrencia tumoral (212). Dentro de las aproximaciones terapéuticas basadas en senescencia celular, una de ellas combina la senescencia inducida por quimioterapia con agentes senolíticos, los cuales eliminan de manera selectiva las células senescentes (213). Además, se están investigando nanovesículas genéticamente diseñadas dirigidas contra las células senescentes para superar la quimioresistencia y la evasión inmune en el cáncer de seno (214).

Además de la senescencia celular, se identificaron variantes germinales P/LP en genes relacionados con las vías de señalización que involucran las células madre (Figura 19). Las alteraciones en la regulación de las vías de señalización que mantienen la pluripotencia de las células madre, se reconocen cada vez más como factores de riesgo y de progresión del cáncer de seno. Por ejemplo, las células del cáncer de seno pueden adquirir propiedades asociadas con células madre mediante la desregulación de vías de señalización del desarrollo como Wnt, Notch y Sonic-Hedgehog; las propiedades de célula madre incluyen el inicio tumoral, supervivencia y diferenciación a tumores heterogéneos, haciendo que sea difícil realizar una terapia dirigida en los tumores con estas características (215,216). Otra vía de señalización que se asocia positivamente con las células madre en cáncer de seno es la vía PI3K/AKT/mTOR, favoreciendo el desarrollo de fenotipos relacionados con la desdiferenciación, caracterizados por un comportamiento agresivo (217).

Considerando las características tumorales conferidas por las células madre y sus propiedades al cáncer de seno, en los casos analizados se encontraron el mayor número de pacientes con mutaciones germinales en genes relacionados con estas células en los subtipos LBH2Neg, LBH2Pos y TNBC, los cuales tienen un comportamiento más agresivo y peor pronóstico en comparación con el cáncer del tipo Luminal A.

Por último, se identificaron mutaciones germinales en genes para los que se anotaron procesos biológicos y una vía de señalización relacionada con los proteoglicanos (Figura 19). Estas moléculas se han implicado en el riesgo y progresión del cáncer de seno a través de varios mecanismos. Los proteoglicanos pueden influenciar la densidad mamaria; la composición alterada de los mismos puede afectar las

propiedades físicas del tejido mamario, contribuyendo de manera potencial al desarrollo del cáncer de seno (218). Un proteoglicano en particular identificado en la anotación de procesos biológicos fue el heparán sulfato, el cual es uno de los componentes de la matriz extracelular y de las superficies celulares, lo que le brinda la capacidad de influir en diferentes procesos como señalización, proliferación e invasión celular mediante la interacción con factores de crecimiento y vías de señalización. El proteoglicano heparán sulfato interactúa con la vía de señalización Wnt, a través del incremento de la expresión de AXIN1, WNT4A y MYC, y de esta manera puede alterar la proliferación e invasión celular, sugiriendo una implicación del heparán sulfato en la progresión del cáncer de seno (219). La interacción del heparán sulfato con proteínas de la matriz extracelular puede tener efectos que favorecen la formación tumoral, mediante las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK (220).

Una de las vías de señalización y procesos biológicos que se identificaron en genes con variantes germinales P/LP, en los subtipos moleculares Luminal A, LBH2Neg, LBH2Pos y TNBC se relaciona con las infecciones virales, la respuesta a estas y la carcinogénesis inducida por estos agentes. Este es un tema de investigación que se encuentra en crecimiento en la actualidad, ya que se ha observado que algunos virus tienen efecto potencial en la etiología del cáncer de seno. Dentro de los virus asociados con el cáncer de seno se encuentran, el virus HMTV (*human mammary tumor virus*-HMTV) el cual se ha detectado en tejido de cáncer de seno (221,222); el virus del papiloma humano (virus del papiloma humano-VPH), en particular los tipos 16 y 18, se han identificado en tejidos tumorales del seno, la literatura ha evidenciado que la infección por el VPH se asocia con un incremento en la producción de citoquinas inflamatorias y una disminución de la expresión de genes supresores tumorales como TP53 y RB, contribuyendo a la progresión tumoral (221,223,224); y el HCMV (*human citomegalovirus*-HCMV), este virus se ha identificado en tejido tumoral del seno y en tejido metastásico, los productos génicos de este virus se han correlacionado con fenotipos más severos y con cortos periodos de supervivencia, se ha demostrado que el HCMV tiene efectos inmunosupresores los cuales favorecen la progresión tumoral mediante la evasión de la vigilancia inmunológica (221,225,226). En nuestra población de estudio no es posible determinar si tuvieron o han tenido

infecciones por alguno de los virus con potencial asociación con el cáncer de seno, ya que esto no fue evaluado.

En el análisis de árbol de decisión de los subtipos moleculares del cáncer de seno, se identificó la correlación genotipo-fenotipo entre el gen *IRF6* y el subtipo molecular de cáncer de seno LBH2Neg, evidenciando que la presencia de variantes germinales P/LP en este gen incrementa el riesgo de predicción del desarrollo de este subtipo particular en un 88%. En la literatura solamente se encuentra un artículo en el que se estudió la asociación de SNPs localizados en varios genes, entre ellos *IRF6*, que representan regiones asociadas con hendiduras orales, y el riesgo de desarrollar cáncer oral y de seno en población brasilera. Los investigadores encontraron interacciones SNP-SNP entre los genes *IRF6*, *WNT3A*, *GSK3 $\beta$* , 8q24 y *WNT11* dan una asociación positiva con el riesgo de desarrollar cáncer oral y de seno en la población estudiada (227). El gen *IRF6* ha sido implicado en el cáncer de seno a través de los efectos a nivel del microambiente tumoral, en la regulación de la proliferación y del ciclo celular. En el microambiente tumoral, el gen *IRF6* favorece el mantenimiento del nicho tumoral mediante la estimulación de la formación de estroma, cuando se encuentra sobreexpresado en los fibroblastos estromales, apoyando de esta manera el crecimiento tumoral (228). El gen *IRF6* regula la proliferación y transformación celular corriente debajo de la vía de señalización Notch (229). En el control del ciclo celular, *IRF6* favorece la detención del ciclo, siendo regulado por el proteasoma, en este contexto se ha sugerido que *IRF6* podría cumplir un papel en la diferenciación de las células epiteliales mamarias y la entrada en la fase G0 del ciclo celular, cuando interactúa con el supresor tumoral maspin (230).

En conclusión, se identificaron variantes germinales P/LP en genes relacionados con múltiples procesos asociados con los diferentes *hallmarks* del cáncer como angiogénesis, proliferación y apoptosis celular entre otros. Sin embargo, llamó la atención identificar mutaciones germinales en genes involucrados en procesos como los mecanismos de reparación del ADN: BER, NER, MMR, NHEJ, HRR y la vía de señalización de la anemia de Fanconi, siendo los dos últimos los más frecuentemente analizados en el cáncer de seno; los procesos metabólicos relacionados con la formación de aductos de ADN y la generación de especies reactivas de oxígeno; la expresión génica; la senescencia celular y el papel que cumplen los proteoglicanos

en la carcinogénesis. De manera interesante, se identificaron mutaciones germinales en genes asociados con la respuesta a infecciones virales, un campo que es poco explorado en el cáncer de seno.

### 3. Capítulo 2: Determinación del efecto de las variantes germinales sinónimas en el proceso de *splicing*

#### 3.1 Introducción

Las variantes sinónimas se definen como sustituciones que alteran la tercera base del codón alterando la secuencia nucleotídica, sin modificar el aminoácido para el que este codifica. Esta ausencia de efecto de las variantes sinónimas en la secuencia aminoacídica se explica por la degeneración del código genético.

No obstante, a pesar de la aparente ausencia de efecto, diversos estudios han mostrado que las variantes sinónimas pueden tener consecuencias que afectan la transcripción y la traducción. A continuación, se describen los efectos de las variantes sinónimas más ampliamente descritos.

##### 3.1.1.1 Variantes sinónimas y el proceso de *splicing*:

Múltiples estudios han determinado el efecto de las variantes sinónimas en el proceso de *splicing* mediante la generación de segmentos aberrantes de corte y empalme, la creación de sitios críticos, la generación de ESE (*exonic splicing enhancer*-ESE) y de ESS (*exonic splicing silencers*-ESS) (231). Como resultado final, las alteraciones en el proceso de *splicing* pueden generar *exon skipping*, exonización de un intrón, activación de sitios críticos o modificar las concentraciones de transcritos alternativos. En general, las alteraciones del proceso de *splicing* pueden ocasionar transcritos inestables y proteínas defectuosas. De manera específica, cuando se alteran los ESE o ESS se puede modificar la cantidad de las isoformas de ARNm, mediante la generación de estructuras inestables que son degradadas fácilmente por la vía *deadenylation-dependent decapping* y, en consecuencia, a una menor cantidad de proteína lo cual tendría potencial patogénico (232,233). La asociación de variantes sinónimas y alteraciones en el proceso del *splicing* se ha documentado en varias enfermedades como fibrosis quística (234), atrofia óptica (235) y la deficiencia en el factor VII (enfermedad de von Willebrand) (236), entre otras.

##### 3.1.1.2 Variantes sinónimas y la estructura del ARN mensajero (ARNm):

Las variantes sinónimas pueden alterar la estructura secundaria del ARNm, afectando la fidelidad de la traducción y los niveles de expresión (237). Gaither y cols. identificaron variantes sinónimas que alteran la estructura del ARNm (con tasas bajas de incidencia en humanos) y sustentaron la hipótesis en la que se sugiere que este

tipo de alteración podría tener implicaciones como causa de enfermedades (238). La molécula de ARN, al ser de cadena sencilla, tiene la capacidad de formar estructuras secundarias y terciarias a partir de las cuales regula el proceso de traducción (239). La estabilidad de la estructura del ARNm se define por la capacidad de la molécula para mantener la integridad estructural, dependiendo ésta, en mayor medida, del contenido GC del ARNm. Una molécula de ARNm que contiene G o C en la tercera posición de los codones se comporta de manera estable, con una vida media funcional mayor y tolera un mayor número de rondas de traducción (generando mayor cantidad de proteína) (232,238). Teniendo en consideración que la estructura del ARNm depende del contenido GC del mismo, Gaither y colaboradores identificaron que las transiciones CpG están restringidas para evitar alteraciones en la estructura del ARNm (238).

Sin embargo, no siempre un ARNm estable es lo deseado; en algunas situaciones, es beneficioso un ARNm más débil, especialmente en regiones como el extremo 5'UTR (*untranslated región*-UTR) y en los sitios cercanos al codón de inicio que permite que empezar la traducción. La estabilidad del ARNm también puede regular la velocidad en la que se realiza el proceso de traducción y la interacción con otras moléculas como microARNs o proteínas de unión al ARN (*RNA binding proteins*-RBPs) (238) y para ello se han desarrollado herramientas bioinformáticas que permiten predecir alteraciones en el plegamiento de la molécula que son secundarias a SNVs (entre ellas, las variantes sinónimas) como RNAsnp (240), SNPfold (241) y MutaRNA (242).

Un ejemplo de cómo las alteraciones en la estructura secundaria del ARNm pueden asociarse con patologías humanas está representado por un haplotipo identificado en el gen *COMT*, compuesto por variantes sinónimas y no sinónimas. Nackley y colaboradores, demostraron que los SNPs sinónimos de dicho haplotipo generan una estructura secundaria del ARNm más estable, con menor cantidad de proteína y menor actividad enzimática (243). Otro ejemplo, es el brindado por Duan y colaboradores, quienes evaluaron el efecto de variantes sinónimas en el receptor D2 de dopamina (*DRD2*). En particular, la variante sinónima c.957C>T generó un ARNm con una estructura secundaria débil que favorece la degradación del ARN mensajero y, en consecuencia, traduce una menor cantidad de proteína (244).

### 3.1.1.3 Variantes sinónimas y el proceso de transcripción y traducción:

En general, se ha propuesto que entre el 25-30% de los niveles proteicos dependen de la abundancia del ARNm, mientras que otro 30-40% se asocia con una combinación de características inherentes a procesos como la traducción y la composición proteica (245,246).

Diversos estudios han mostrado los efectos potenciales de las variantes sinónimas en el proceso de transcripción y traducción, específicamente en la cinética de ambos. Dentro de los factores asociados con las variantes sinónimas y la regulación de dichos procesos, se resaltan funciones relacionadas con el uso de los codones y la biodisponibilidad de ARNt (ARN de transferencia).

Para entender las alteraciones en la cinética de la transcripción y la traducción es necesario conocer el concepto de sesgo de codón (también denominado sesgo de uso de codón), el cual se define como las diferentes frecuencias en las que se utiliza un codón. Se ha evidenciado que el sesgo de codón está sometido a procesos de selección y de mutación; específicamente, para el proceso de mutación, los modelos de genética de poblaciones proponen que el uso de codones sesgados ha evolucionado a partir de sesgos por mutaciones que fomentan cambios en codones ricos en GC o en AT (247). Los factores que determinan la frecuencia de oligonucleótidos de las regiones intergénicas e intrónicas también influyen en el nucleótido localizado en la tercera base del codón (248). Adicionalmente, se ha sugerido que el sesgo de codón, en algunos genes, es más fuerte en residuos evolutivamente conservados, favoreciendo la frecuencia de codones que son reconocidos por abundantes ARNt (247,249). Se ha observado sesgo de codón en genes con inanición de aminoácidos, con genes que tienen una expresión cíclica o aquellos con expresión tejido-específica; o bien, con genes que responden al estrés oxidativo, genes de encargados de la diferenciación celular y en oncogenes (248). El sesgo de codón también ha sido asociado con fuertes procesos de selección purificadora (selección negativa), ya que el sesgo de codón es más fuerte en genes que codifican proteínas altamente expresadas (247).

El sesgo de codón también se observa en las diferentes etapas de la traducción. Los codones raros son complementarios a anticodones en ARNt que no son abundantes, llevando a reducción en la velocidad o pausa de la traducción, porque los ribosomas deben esperar al ARNt que se halla en baja cantidad para continuar la elongación de

la cadena polipeptídica (237,247). Aunque se han observado casos en los que codones raros son traducidos a una mayor velocidad en comparación con codones frecuentes, esto es el resultado a una elevada concentración de ARNt isoaceptores. La biodisponibilidad de ARNt es regulada por el ambiente y las necesidades celulares regulando el proceso de traducción (237).

En los casos de disminución de la velocidad de la traducción en las regiones 5' de los transcritos, se ha observado un efecto rampa, generado por codones raros o subóptimos (primeros 30-50 codones), que permite iniciar la traducción a una velocidad adecuada, evitando la colisión o el secuestro de los ribosomas durante la elongación (248).

Las pausas ribosomales causadas por codones raros pueden tener dos efectos sobre la síntesis proteica: 1. Por un lado, se ha observado que son necesarias para llevar a cabo el adecuado plegamiento proteico co-traducciona l cuyo efecto resulta beneficioso para la síntesis proteica. Estudios previos sugieren que el plegamiento de dominios y motivos proteicos (como las hélices beta), suceden en regiones donde se encuentran codones subóptimos. También, se ha observado que la frecuencia de este tipo de codones subóptimos o raros es mayor en proteínas largas y complejas, localizándose estratégicamente entre los dominios (248,250); además, otros estudios evidencian que el uso en la traducción de solo codones frecuentes no siempre ayuda a una mayor producción de proteína (247). 2. Por otra parte, se ha sugerido que esta detención ribosomal conduce a varios eventos que afectan de manera negativa el proceso de traducción, como son: la degradación del ARNm, el secuestro de ribosomas y plegamientos proteicos inadecuados que afectan la actividad fisiológica (237,247). Específicamente, cuando los ribosomas se mueven de manera lenta o se detienen durante la elongación de la cadena polipeptídica, se produce la colisión de estos y la formación de disomas (dos ribosomas contiguos) y se activa un proceso de degradación del ARNm denominado NGD (*No-go mRNA Decay*-NGD). Dentro de los factores desencadenantes de la detención ribosomal se han descrito la presencia de bucles estables, pseudonudos, secuencias ricas en GC y bases dañadas de ARN (251).

En adición, el contexto que se genera a partir de la ubicación de codones frecuentes y raros en una secuencia de ARNm tiene un papel importante en la traducción, ya que alteraciones de este contexto podrían crear nuevos sitios de unión para los ribosomas,

favoreciendo la pausa de estos en dichos procesos y, por consiguiente, disminuyendo la producción proteica (247).

Las variantes sinónimas también han sido asociadas con modificaciones post-traduccionales, secundarias a alteraciones en la velocidad de la traducción y en el plegamiento co-traduccional, dejando descubiertos residuos que pueden ser ubiquitinados para la posterior degradación de la proteína (231).

Las alteraciones en la cinética traduccional se asocian con la producción de proteínas mal plegadas que pueden alterar la homeostasis proteica (proteostasis), generan estrés celular y de diferentes organelos como el retículo endoplásmico (252), que llevan a la activación de diferentes mecanismos de estrés celular como la respuesta a las proteínas de choque térmico (*heat shock response*-HSR) y la respuesta al estrés integrado (*integrated stress response*-ISR) (246,253). El estrés prolongado que es ocasionado por proteínas mal plegadas, puede llevar a la inducción de la muerte celular (252).

#### 3.1.1.4 Variantes sinónimas y la interacción ARNm-microARNs:

Los microARNs son un tipo de ARN no codificantes pequeños encargados de regular negativamente la expresión génica al nivel post-traduccional. De manera predominante se han identificado las secuencias diana de los microARNs en las regiones 3'UTR de los ARN mensajeros (254,255). Sin embargo, evidencia relativamente reciente ha demostrado que las secuencias complementarias que favorecen la interacción microARN-ARNm también se encuentran localizadas en regiones codificantes (246,256). Brest y colaboradores identificaron que un SNP sinónimo en el gen *IRGM*: c.313C>T, modifica el sitio de unión del microRNA miR-196, el cual se sobreexpresa en pacientes con enfermedad de Crohn y regulan la expresión del *IRGM*. Al impedir la interacción microARN-ARNm por efecto de la variante sinónima bajo estudio *IRGM*: c.313C>T, se observó la sobreexpresión sostenida del gen *IRGM* la cual fue asociada por los investigadores con la pérdida en la regulación de la autofagia dependiente de inflamación que incrementa el riesgo de enfermedad de Crohn (257).

En resumen, las variantes sinónimas ejercen efectos cinéticos en los procesos de transcripción y traducción, comparadas con las variantes no sinónimas que se caracterizan por generar de manera predominante efectos estructurales proteicos. Las plataformas computacionales son una herramienta valiosa para la predicción de

las variantes sinónimas en los diferentes procesos biológicos relacionados con su función. En la Figura 20, se muestra un esquema del flujo de trabajo a realizar cuando se analizan variantes sinónimas con herramientas computacionales.

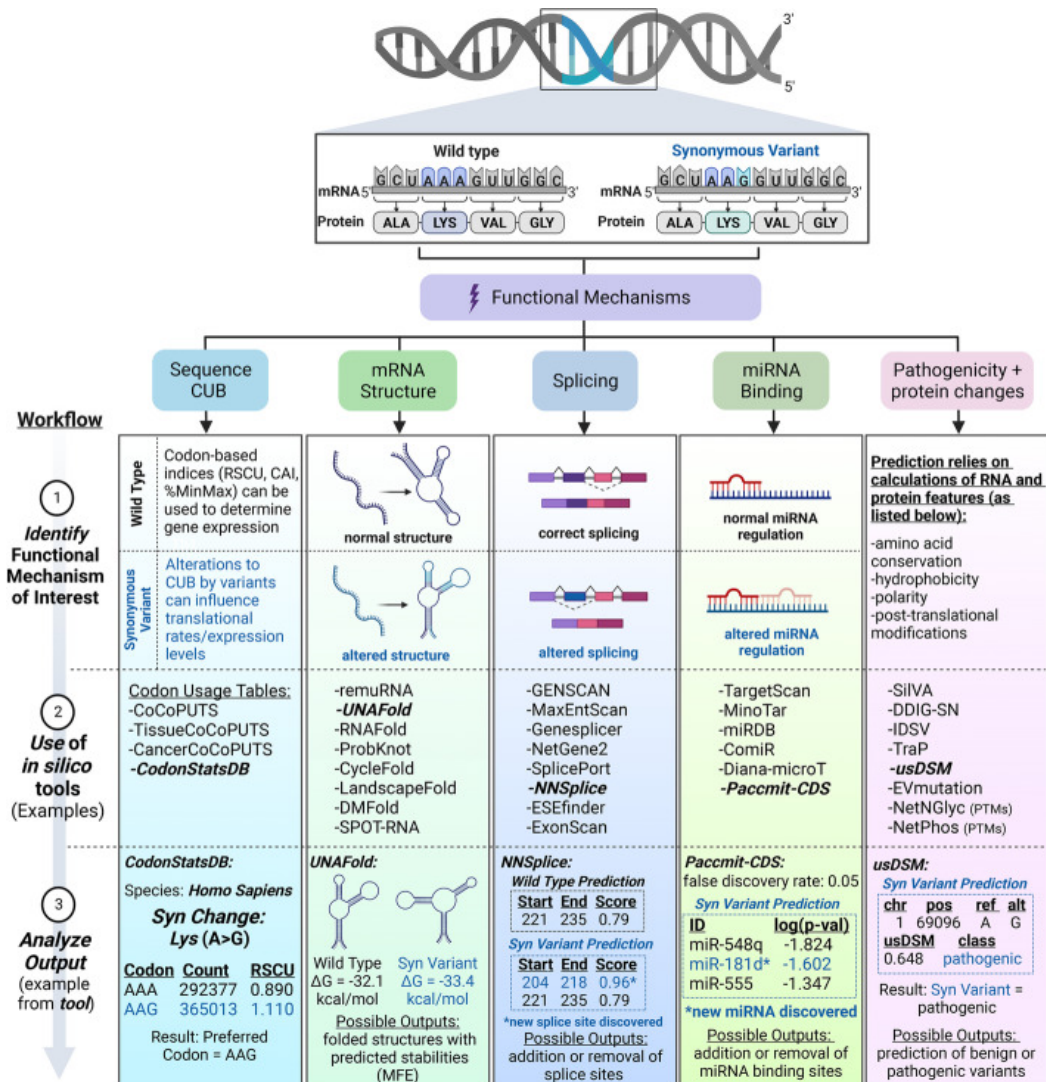


Figura 20. Esquema del flujo de trabajo para el análisis de las variantes sinónimas con herramientas *in silico*. Tomada de la referencia (258).

### 3.1.2 Variantes sinónimas asociadas a enfermedades

Múltiples estudios han centrado esfuerzos en determinar la asociación o efecto de las variantes sinónimas en el desarrollo de enfermedades (246). En la tabla suplementaria 1 (246), se resumen 44 estudios que analizaron esta asociación. Además del efecto causal de algunas variantes sinónimas, también se ha determinado que, dependiendo del gen donde se localice este tipo de variante, puede

predecir la susceptibilidad, el pronóstico y la respuesta a tratamiento de algunas enfermedades (246).

Un estudio realizado por Chen y colaboradores demostró que tanto los SNPs no sinónimos como aquellos SNPs sinónimos presentan asociaciones y magnitudes de efectos similares en las enfermedades humanas (259). La frecuencia de las variantes sinónimas con probable efecto deletéreo en genes humanos fue determinada por Chamary y Hurst, quienes indicaron que el 5-10% de los genes contienen al menos una región en la que se localizan variantes sinónimas dañinas (260).

### 3.2 Metodología

Teniendo en cuenta lo mencionado en la introducción de este capítulo, lo cual resalta la importancia de las variantes sinónimas en la regulación de la expresión génica y los potenciales efectos en el desarrollo de enfermedades; se decidió determinar la frecuencia y el potencial efecto en el proceso de *splicing* de las variantes sinónimas, a través del ensayo de minigenes, en los diez genes con impacto clínico descritos con anterioridad en este documento.

#### 3.2.1 Análisis bioinformático terciario

Se realizó el análisis bioinformático terciario utilizando el programa Golden Helix (VarSeq 2.3.0) usando los archivos vcf de las 400 mujeres con cáncer de seno no seleccionado. Los criterios de filtrado fueron: variantes sinónimas con una frecuencia alélica  $\leq 0.05$  en el set de exomas de la base de datos poblacional gnomAD v2.1.1 (<https://gnomad.broadinstitute.org>). Adicional a los filtros mencionados, se evaluó la calidad de las variantes considerando como falsos positivos las variantes con una profundidad  $< 10X$  y con una VAF (*variant allele frequency*-VAF)  $< 0.25$ .

#### 3.2.2 Análisis *in silico* del potencial efecto de las variantes sinónimas en el proceso de *splicing*

Se determinó el posible efecto de las variantes sinónimas en el proceso de *splicing* utilizando tres predictores *in silico* (SpliceAI, Human Splicing Finder y NNSplice).

#### 3.2.3 Análisis de asociación caso-control

Utilizando los conteos alélicos del set no-cancer *American Admixed* de la base de datos poblacional gnomAD v2.1.1 (<https://gnomad.broadinstitute.org>), se realizó un análisis de asociación caso-control para determinar la presencia de diferencias con

significancia estadística entre los conteos alélicos de los dos grupos (mujeres colombianas con cáncer de seno no seleccionado y población no-cancer de gnomAD), mediante la prueba de *Chi*-cuadrado con corrección de *Yates* (valor  $p < 0.05$ ) utilizando el programa GraphPad Prims v10.

#### 3.2.4 Ensayo de mingenos y RT-PCR

Se realizó el ensayo de mingenos utilizando el vector *pSpliceExpress*, el kit *Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme mix* (Anexo 3) y el ADN genómico de las pacientes portadoras de las variantes para obtener las versiones WT y mutante de cada variante germinal; luego de 48 horas post-transfección se realizó la síntesis del cDNA utilizando el kit *SuperScript III First–Strand Synthesis System for RT-PCR* y finalmente se realizó PCR utilizando primers localizados en los exones de insulina de rata flanqueantes, ubicados en el esqueleto del vector y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 3%; en caso de observarse diferencias entre las bandas silvestre y mutante en el gel de agarosa se realizó densitometría con el programa *Image Lab* (BIO-RAD). El protocolo general se encuentra descrito de manera detallada en la metodología del capítulo 1 de esta tesis doctoral. Para la evaluación de las variantes sinónimas, la línea celular utilizada fue HEK293. En todos los ensayos *in vitro* se realizaron al menos tres réplicas para cada variante evaluada. Las variantes evaluadas mediante ensayo *in vitro* debían tener al menos 2/3 predictores de *splicing* positivos y/o la prueba de *Chi*-cuadrado con significancia estadística.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Identificación de variantes sinónimas en los diez genes con impacto clínico

En las 400 pacientes con cáncer de seno no seleccionado estudiadas, se identificaron 73 variantes sinónimas, con  $MAF \leq 0.05$  en la base de datos gnomAD v2.1 y distribuidas en los 10 genes con impacto clínico en el cáncer de seno (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CDH1*, *BARD1*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D* y *TP53*). El gen donde se identificaron variantes sinónimas con mayor frecuencia fue *BRCA2*, con 16 variantes, y los genes con menor número de variantes sinónimas fueron *CHEK2* y *RAD51D*, con dos variantes cada uno.

### 3.3.2 Predicción *In silico* del efecto en el proceso de *splicing* de las variantes sinónimas y determinación de asociación de entre casos y controles

De las 73 variantes sinónimas identificadas en la población de estudio, en cuatro de ellas los tres predictores dieron resultados positivos y además en una de esas variantes la prueba de *Chi*-cuadrado tuvo significancia estadística (*ATM*: c.1176C>G, p.Gly392=, *valor p*= 0.0023). 34 de las variantes sinónimas fueron positivas para dos predictores *in silico* (NNSplice y HSF). En diez de las 34 variantes germinales sinónimas con dos predictores positivos se obtuvo significancia estadística en el análisis de asociación caso-control. En total 23 de las 73 variantes sinónimas solo tenían un predictor *in silico* positivo y ocho de ellas evidenciaron diferencias con significancia estadística en la prueba *Chi*-cuadrado. Por último, los tres predictores *in silico* fueron negativos en 12 de las 73 variantes; sin embargo, en cuatro de estas variantes la prueba de asociación caso-control mostró diferencias con significancia estadística. Todos los resultados descritos se encuentran detallados en la Tabla 21.

Tabla 21. Descripción molecular, predictores *in silico* y análisis de asociación de las variantes sinónimas identificadas en los diez genes con impacto clínico en cáncer de seno.

Gen	SNP ID	Variante ADNc (nomenclatura HGVS)	Variante proteína (nomenclatura HGVS)	SpliceAI (SAI)	NNSplice (NNS)	Human Splicing Finder (HSF)	Predictores positivos	Conteo alélico casos cáncer de seno (alelo alternativo/alelo referencia)	Conteo alélico no-cancer American Admixed gnomAD v2.1.1 (alelo alternativo/alelo referencia)	Chi-cuadrado valor p
ATM	<a href="#">rs2235003</a>	NM_000051.4:c.657T>C	NP_000042.3:p.Cys219=	0.02 (Acceptor gain)	No effect	No significant impact on splicing signals.	No	4/796	159/34049	0.9425
ATM	<a href="#">rs3218674</a>	NM_000051.4:c.735C>T	NP_000042.3:p.Val245=	0.07 (Acceptor loss)	Acc increased (gDNA: 22385 mut:0.35), Acc increased (gDNA: 22386 mut: 0.68)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-9)	NNS+HSF	7/793	97/34131	0.0064
ATM	<a href="#">rs145301478</a>	NM_000051.4:c.858A>G	NP_000042.3:p.Gln286=	0.21 (Acceptor gain)	Acc increased (gDNA: 22510 mut: 0.52)	New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (MaxEnt) New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF)	SAI+NNS+HSF	1/799	0	NA
ATM	<a href="#">rs1800727</a>	NM_000051.4:c.1176C>G	NP_000042.3:p.Gly392=	0.45 (Donor loss)	Donor gained (gDNA: 26554 mut: 0.42)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-8) New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF)	SAI+NNS+HSF	7/793	85/34157	0.0023

ATM	<a href="#">rs4987943</a>	NM_000051.4:c.1254A>G	NP_000042.3:p.Gln418=	0.03 (Donor gain)	Donor increased (gDNA:28235 mut: 0.94)	New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF) New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	12/788	219/33885	0.0063
ATM	<a href="#">rs763361384</a>	NM_000051.4:c.1332C>A	NP_000042.3:p.Pro444=	0.05 (Donor gain)	Acc increased (gDNA:28317 mut: 0.77)	No significant impact on splicing signals.	NNS	1/799	1/34223	0.0283
ATM	<a href="#">rs764790965</a>	NM_000051.4:c.1911A>G	NP_000042.3:p.Gln637=	0.16 (Acceptor gain)	Donor increased (gDNA:31342 mut: 0.93)	New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	3/797	1/34221	<0.0001
ATM	<a href="#">rs2229019</a>	NM_000051.4:c.2193C>T	NP_000042.3:p.Tyr731=	0.02 (Donor loss)	Donor increased (gDNA:33804 mut: 0.48)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-9)	NNS+HSF	6/794	72/34158	0.0048
ATM	<a href="#">rs3218687</a>	NM_000051.4:c.2685A>G	NP_000042.3:p.Leu895=	0.02 (Acceptor gain)	Donor gained (gDNA:45967 0.38)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-5)	NNS+HSF	6/794	70/34184	0.0039
ATM	<a href="#">rs876660913</a>	NM_000051.4:c.3030C>T	NP_000042.3:p.Asn1010=	0	Donor gained (gDNA:48872 0.31)	No significant impact on splicing signals.	NNS	1/799	1/34249	0.0315
ATM	<a href="#">rs56355831</a>	NM_000051.4:c.4042T>C	NP_000042.3:p.Leu1348=	0	Donor gained (gDNA:65160 0.32), Donor gained (gDNA:65164 0.47)	No significant impact on splicing signals.	NNS	3/797	43/34201	0.1510
ATM	<a href="#">rs183214437</a>	NM_000051.4:c.4167A>G	NP_000042.3:p.Thr1389=	0	No effect	New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF)	HSF	1/799	8/34232	0.4990

ATM	<a href="#">rs4988008</a>	NM_000051.4:c.4473C>T	NP_000042.3:p.Phe1491=	0.16 (Acceptor loss)	Acc increased (gDNA:70178 mut: 0.61), Acc increased (gDNA:70180 mut: 0.76), Acc increased (gDNA:70177 mut: 0.37), Acc increased (gDNA:70182 mut: 0.58), Acc gained (gDNA:70176 mut:0.43)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-4)	NNS+HSF	2/798	19/34237	0.1446
ATM	-	NM_000051.4:c.8118T>G	NP_000042.3:p.Gly2706=	0	Donor increased (gDNA:112585 mut: 0.57), Donor gained (gDNA:112587 0.81)	New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	9/791	0	NA
BARD1	<a href="#">rs1472159</a> <u>25</u>	NM_000465.4:c.1977A>G	NP_000456.2:p.Arg659=	0.01 (Acceptor gain)	Donor gained (gDNA:79269 0.44), Donor gained (gDNA:79264 0.63)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-13)	NNS+HSF	1/799	29/34231	0.8349
BARD1	<a href="#">rs3732577</a> <u>76</u>	NM_000465.4:c.1347A>G	NP_000456.2:p.Gln449=	0	Acc increased (gDNA:40423 mut: 0.62), Donor gained (gDNA:40424 mut: 0.73)	New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF) New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (MaxEnt)	NNS+HSF	1/799	9/34207	0.6031
CHEK2	<a href="#">rs1805129</a>	NM_007194.4:c.252A>G	NP_009125.1:p.Glu84=	0	Donor gained (gDNA:7947 0.60)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-11)	NNS+HSF	11/789	416/34244	0.8559

<i>BARD1</i>	<a href="#">rs3682913</a> <u>18</u>	NM_000465.4:c.1152C>T	NP_000456.2:p.Ser384=	0.03 (Donor gain)	No effect	No significant impact on splicing signals.	No	2/798	9/34217	0.0104
<i>BARD1</i>	<a href="#">rs2899757</a> <u>4</u>	NM_000465.4:c.609A>C	NP_000456.2:p.Gly203=	0	No effect	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-9)	HSF	15/785	403/29351	0.2666
<i>BARD1</i>	<a href="#">rs7707538</a> <u>03</u>	NM_000465.4:c.48C>T	NP_000456.2:p.Ser16=	0	No effect	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-5)	HFS	1/799	1/32053	0.0384
<i>PALB2</i>	<a href="#">rs4554223</a> <u>4</u>	NM_024675.4:c.2607C>T	NP_078951.2:p.Ser869=	0.14 (Acceptor loss)	Acc increased (gDNA:14942 mut: 0.58), Acc increased (gDNA:14933 mut: 0.37)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-2)	NNS+HSF	1/799	6/34252	0.3783
<i>PALB2</i>	<a href="#">rs1440153</a> <u>19</u>	NM_024675.4:c.1810C>T	NP_078951.2:p.Leu604=	0.24 (Acceptor gain)	Donor gained (gDNA:10963 0.59)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-6)	SAI+NNS+HSF	1/799	4/34254	0.239
<i>BRCA1</i>	<a href="#">rs1480388</a> <u>77</u>	NM_007294.4:c.3636A>G	NP_009225.1:p.Ser1212=	0.05 (Donor gain)	No effect	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-9)	HSF	1/799	0	NA
<i>BRCA1</i>	<a href="#">rs8646220</a> <u>80</u>	NM_007294.4:c.3573C>T	NP_009225.1:p.Ser1191=	0	Acc increased (gDNA:78327 mut: 0.39), Donor gained (gDNA:78309 0.72)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-3)	NNS+HSF	1/799	0	NA
<i>BRCA1</i>	<a href="#">rs2889767</a> <u>9</u>	NM_007294.4:c.1971A>G	NP_009225.1:p.Gln657=	0	Donor gained (gDNA:76713 0.78)	New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	1/799	25/34219	0.6035

<i>BRCA1</i>	<a href="#">rs2006169</a> <u>37</u>	NM_007294.4:c.1524T>C	NP_009225.1:p.Pro508=	0	Donor increased (gDNA:76269 mut: 0.28), Donor increased (gDNA:76264 mut: 0.61), Donor increased (gDNA:76259 mut: 0.59)	No significant impact on splicing signals.	NNS	1/799	3/34189	0.1717
<i>RAD51D</i>	<a href="#">rs1462124</a> <u>90</u>	NM_002878.4:c.771C>T	NP_002869.3:p.Ser257=	0	Donor increased (gDNA:20183 mut: 0.80)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-2) New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	2/798	6/34252	0.0015
<i>BRCA1</i>	<a href="#">rs1800062</a>	NM_007294.4:c.114G>A	NP_009225.1:p.Lys38=	0	Donor increased (gDNA:54524 mut: 0.81), Donor increased (gDNA:54529 mut: 0.65), Donor gained (gDNA:54523 0.38)	No significant impact on splicing signals.	NNS	14/786	363/33815	0.0854
<i>ATM</i>	<a href="#">rs1800889</a>	NM_000051.4:c.4578C>T	NP_000042.3:p.Pro1526=	0.04 (Acceptor gain)	Acc increased (gDNA:70275 mut: 0.48), Acc increased (gDNA:70280 mut: 0.74)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-2)	NNS+HSF	38/762	1058/33192	0.0101
<i>BRCA1</i>	<a href="#">rs1913733</a> <u>74</u>	NM_007294.4:c.5175A>G	NP_009225.1:p.Glu1725=	0	Donor increased (gDNA:106922 mut: 0.98)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-9) New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	1/799	13/34239	0.7467

BRCA2	<a href="#">rs2889771</a> 1	NM_000059.4:c.1938C>T	NP_000050.3:p.Ser646=	0.02 (Acceptor gain)	Acc increased (gDNA:20810 mut: 0.74)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-7) New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	2/798	33/31885	0.5050
BRCA2	<a href="#">rs1157165</a> 4	NM_000059.4:c.2538A>C	NP_000050.3:p.Ser846=	0	No effect	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-8)	HSF	2/798	4/33146	0.0002
BRCA2	<a href="#">rs3679211</a> 07	NM_000059.4:c.2817C>T	NP_000050.3:p.Thr939=	0	Donor gained (gDNA:21692 0.44)	No significant impact on splicing signals.	NNS	1/799	9/34129	0.5542
BRCA2	<a href="#">rs4552504</a> 1	NM_000059.4:c.2919G>A	NP_000050.3:p.Ser973=	0	Donor increased (gDNA:21801 sitio de la variante mut: 0.97)	New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	1/799	7/33773	0.4473
BRCA2	<a href="#">rs4986856</a>	NM_000059.4:c.3462C>T	NP_000050.3:p.Thr1154=	0	No effect	No significant impact on splicing signals.	No	1/799	0	NA
BRCA2	<a href="#">rs2889772</a> 4	NM_000059.4:c.4068G>A	NP_000050.3:p.Leu1356=	0	Donor gained (gDNA:22942 mut: 0.31)	No significant impact on splicing signals.	NNS	7/793	112/33004	0.0304
BRCA2	<a href="#">rs7862013</a> 77	NM_000059.4:c.4269T>C	NP_000050.3:p.Thr1423=	0	No effect	No significant impact on splicing signals	No	2/798	3/33209	0.0002
BRCA2	<a href="#">rs2889773</a> 0	NM_000059.4:c.4686A>G	NP_000050.3:p.Gln1562=	0	Acc increased (gDNA:23567 mut: 0.91)	New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF) New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	2/798	13/34223	0.0415

BRCA2	<a href="#">rs2889773</a> 4	NM_000059.4:c.5199C>T	NP_000050.3:p.Ser1733=	0	No effect	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-3)	HSF	3/797	104/33380	0.9908
BRCA2	<a href="#">rs8035878</a> 4	NM_000059.4:c.5634C>T	NP_000050.3:p.Asn1878=	0	No effect	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-4)	HSF	1/799	1/33791	0.0328
BRCA2	<a href="#">rs6175413</a> 8	NM_000059.4:c.7626G>A	NP_000050.3:p.Thr2542=	0.02 (Acceptor gain)	Donor increased (gDNA:42275 mut: 0.41), Donor gained (gDNA:42278 mut: 0.37)	No significant impact on splicing signals.	NNS	1/799	19/34181	0.9630
BRCA2	<a href="#">rs9590940</a>	NM_000059.4:c.8460A>C	NP_000050.3:p.Val2820=	0.05 (Acceptor gain)	Acc increased (gDNA:55066 mut: 0.64), Acc gained (gDNA:55064 mut: 0.61)	No significant impact on splicing signals.	NNS	2/798	56/34202	0.9499
BRCA1	<a href="#">rs1424591</a> 58	NM_007294.4:c.4992C>T	NP_009225.1:p.Leu1664=	0.16 (Acceptor loss), 0.27 (-82pb, Donor loss)	Acc increased (gDNA:102590 mut: 0.3), Acc increased (gDNA:102592 mut: 0.82)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-6)	SA+NNS+HSF	1/799	0	NA
BRCA2	<a href="#">rs7774883</a> 49	NM_000059.4:c.9949C>T	NP_000050.3:p.Leu3317=	0.01 (Acceptor gain)	Donor increased (gDNA:82985 mut: 0.93)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-4)	NNS+HSF	1/799	0	NA

<i>BRCA1</i>	<a href="#">rs1799965</a>	NM_007294.4:c.591C>T	NP_009225.1:p.Cys197=	0.13 (Donor loss)	Donor lost (gDNA:73030 sequence motif lost)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-11) New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF) New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (MaxEnt)	NNS+HSF	1/799	30/34190	0.7821
<i>CDH1</i>	<a href="#">rs1801023</a>	NM_004360.5:c.345G>A	NP_004351.1:p.Thr115=	0	No effect	No significant impact on splicing signals.	No	4/796	70/34182	0.1521
<i>CDH1</i>	<a href="#">rs3553971_1</a>	NM_004360.5:c.933C>G	NP_004351.1:p.Leu311=	0.03 (Donor gain)	No effect	No significant impact on splicing signals.	No	2/798	42/34218	0.6151
<i>CDH1</i>	<a href="#">rs1480805_50</a>	NM_004360.5:c.1173C>T	NP_004351.1:p.Val391=	0.01 (Acceptor gain)	No effect	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-4)	HSF	1/799	0	NA
<i>BRCA2</i>	<a href="#">rs3435530_6</a>	NM_000059.4:c.1275A>G	NP_000050.3:p.Glu425=	0	Donor gained (gDNA:17279 mut: 0.67)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-5) New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	1/799	9/32625	0.7179
<i>CDH1</i>	<a href="#">rs3574124_0</a>	NM_004360.5:c.1680G>C	NP_004351.1:p.Thr560=	0	No effect	No significant impact on splicing signals.	No	1/799	45/34215	0.9628

<i>BRCA2</i>	<a href="#">rs1157164</a> <u>2</u>	NM_000059.4:c.1788T>C	NP_000050.3:p.Asp596=	0	Acc increased (gDNA:17788 mut: 0.68), Donor increased (gDNA:17790 mut: 0.52), Donor increased (gDNA:17788 mut: 0.62), Donor gained (gDNA:17785 mut: 0.32), Donor gained (gDNA:17792 mut: 0.56)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-4)	NNS+HSF	3/797	63/33167	0.4314
<i>BRCA2</i>	<a href="#">rs5588197</a> <u>88</u>	NM_000059.4:c.8499G>A	NP_000050.3:p.Lys2833=	0.02 (Acceptor loss)	Donor gained (gDNA:55490 mut: 0.71)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-6)	NNS+HSF	2/798	6/34250	0.0018
<i>CDH1</i>	<a href="#">rs1403286</a> <u>01</u>	NM_004360.5:c.2520C>T	NP_004351.1:p.Ser840=	0	No effect	No significant impact on splicing signals.	No	1/799	37/34221	0.8869
<i>CDH1</i>	<a href="#">rs2229044</a>	NM_004360.5:c.2634C>T	NP_004351.1:p.Gly878=	0	Donor increased (gDNA:96253 mut: 0.57)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-14) New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	10/790	441/33819	0.9149
<i>CHEK2</i>	<a href="#">rs1426929</a> <u>07</u>	NM_007194.4:c.1176G>A	NP_009125.1:p.Ala392=	0	No effect	No significant impact on splicing signals.	No	1/799	4/34246	0.2391
<i>CDH1</i>	<a href="#">rs1165420</a> <u>18</u>	NM_004360.5:c.324A>G	NP_004351.1:p.Arg108=	0	Acc increased (gDNA:64605 mut: 0.47)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-3)	NNS+HSF	1/799	33/34225	0.7646

<i>PALB2</i>	<a href="#">rs4551610</a> <u>0</u>	NM_024675.4:c. 3300T>G	NP_078951.2:p. Thr1100=	0.13 (Acceptor gain)	Acc increased (gDNA:33390 mut: 0.70), Donor gained (gDNA:33391 0.88), Donor gained (gDNA:33396 0.38)	No significant impact on splicing signals.	NNS	18/782	563/33697	0.2639
<i>CDH1</i>	<a href="#">rs6175628</a> <u>4</u>	NM_004360.5:c. 1272C>T	NP_004351.1:p. Val424=	0	Acc increased (gDNA:76231 mut: 0.53)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-8)	NNS+HSF	1/799	29/34231	0.7814
<i>CDH1</i>	<a href="#">rs3396411</a> <u>9</u>	NM_004360.5:c. 2253C>T	NP_004351.1:p. Asn751=	0.03 (Acceptor loss)	Acc increased (gDNA:91049 mut: 0.57), Donor increased (gDNA:91032 mut: 0.57)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-7)	NNS+HSF	55/745	3442/30816	0.004
<i>PALB2</i>	<a href="#">rs7456659</a> <u>68</u>	NM_024675.4:c. 1623G>A	NP_078951.2:p. Arg541=	0	Acc increased (gDNA:6379 mut: 0.26), Donor increased (gDNA:6388 variante de interés mut: 0.97)	No significant impact on splicing signals.	NNS	1/799	0	NA

PALB2	<a href="#">rs1511622</a> <u>55</u>	NM_024675.4:c.1606C>T	NP_078951.2:p.Leu536=	0.01 (Donor loss, acceptor gain)	Acc increased (gDNA:6361 mut: 0.48), Acc increased (gDNA:6380 mut: 0.75), Acc increased (gDNA:6369 mut: 0.71), Acc increased (gDNA:6379 mut: 0.30), Acc increased (gDNA:6377 mut: 0.77), Acc increased (gDNA:6376 mut: 0.89)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-8)	NNS+HSF	1/799	9/34249	0.5525
PALB2	<a href="#">rs4547240</a> <u>0</u>	NM_024675.4:c.1572A>G	NP_078951.2:p.Ser524=	0	Donor gained (gDNA:6331 0.96)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-2)	NNS+HSF	5/795	87/34173	0.1020
PALB2	<a href="#">rs1386977</a> <u>96</u>	NM_024675.4:c.1281T>C	NP_078951.2:p.Ala427=	0	No effect	No significant impact on splicing signals	No	1/799	0	NA
PALB2	<a href="#">rs6175517</a> <u>3</u>	NM_024675.4:c.1194G>A	NP_078951.2:p.Val398=	0	No effect	New Donor splice site: Activation of a cryptic Donor site. Potential alteration of splicing (HSF)	HFS	3/797	19/34237	0.0037
PALB2	<a href="#">rs5717621</a> <u>92</u>	NM_024675.4:c.660T>C	NP_078951.2:p.Ser220=	0.02 (Donor gain)	Donor increased (gDNA:5427 mut: 0.47), Donor increased (gDNA:5420 mut: 0.80)	No significant impact on splicing signals.	NNS	2/798	4/34254	0.0002
RAD51C	<a href="#">rs2836330</a> <u>3</u>	NM_058216.3:c.186A>G	NP_478123.1:p.Gln62=	0.05 (acceptor gain)	No effect	New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF)	HSF	2/798	18/34234	0.1269

<i>RAD51C</i>	<a href="#">rs1154148</a> <u>95</u>	NM_058216.3:c.90G>A	NP_478123.1:p.Ala30=	0.01 (Donor gain)	No effect	No significant impact on splicing signals.	No	6/794	33/34227	0.0001
<i>RAD51C</i>	<a href="#">rs5507578</a> <u>49</u>	NM_058216.3:c.102T>G	NP_478123.1:p.Thr34=	0	No effect	No significant impact on splicing signals.	No	2/798	3/34257	0.0001
<i>CDH1</i>	<a href="#">rs6174763</a> <u>6</u>	NM_004360.5:c.2292C>T	NP_004351.1:p.Asp764=	0	Donor lost (gDNA:91079 sequence motif lost)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-5)	NNS+HSF	1/799	57/34201	0.87
<i>RAD51D</i>	<a href="#">rs1464486</a> <u>57</u>	NM_002878.4:c.39C>T	NP_002869.3:p.Thr13=	0.03 (Donor gain)	Acc increased (gDNA:1950 mut: 0.42)	No significant impact on splicing signals.	NNS	1/799	0	NA
<i>TP53</i>	<a href="#">rs1800372</a>	NM_000546.6:c.639A>G	NP_000537.3:p.Arg213=	0.01 (Donor gain)	Donor increased (gDNA:12646 mut: 0.98)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-3)	NNS+HSF	14/786	444/33812	0.3698
<i>TP53</i>	<a href="#">rs5575490</a> <u>7</u>	NM_000546.6:c.249G>A	NP_000537.3:p.Ala83=	0	Donor gained (gDNA:11415 0.67)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-3) New Acceptor splice site: Activation of a cryptic Acceptor site. Potential alteration of splicing (HSF)	NNS+HSF	1/799	3/34247	0.1712
<i>TP53</i>	<a href="#">rs1800370</a>	NM_000546.6:c.108G>A	NP_000537.3:p.Pro36=	0.04 (acceptor gain)	Acc increased (gDNA:11281 mut: 0.73)	Alteration of auxiliary sequences: Significant alteration of ESE / ESS motifs ratio (-3)	NNS+HSF	9/791	1045/33195	0.0024

### 3.3.3 Determinación del efecto de las variantes sinónimas en el proceso de *splicing* mediante ensayo de minigenes y RT-PCR pos-transfección

Teniendo en cuenta los criterios de selección para evaluación *in vitro* de las variantes sinónimas mencionados en la metodología, cuatro cumplían dichos criterios; *ATM*: c.858A>G (p.Gln286=), c.1176C>G (p.Gly392=); *BRCA1*: c.591C>T (p.Cys197=) y *BRCA2*: c.8499G>A (p.Lys2833=).

De las variantes evaluadas mediante ensayo de minigenes y RT-PCR, todas dieron resultados negativos excepto la variante *ATM*: c.1176C>G (p.Gly392=), en la cual se observó disminución en la intensidad de la banda mutante en comparación de la versión WT, la cual fue analizada mediante densitometría, evidenciándose una disminución de la intensidad en el 60% de la banda mutante (Figura 21). Las demás variantes sinónimas evaluadas dieron resultados negativos en el ensayo *in vitro*.

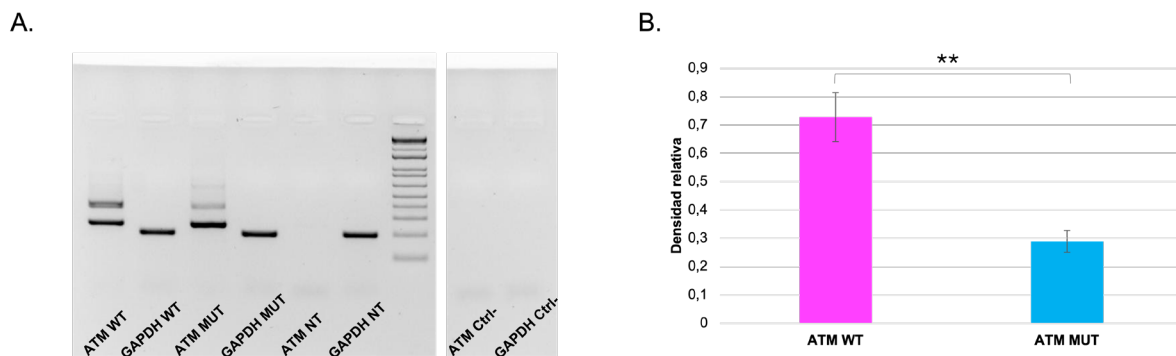


Figura 21. RT-PCR y densitometría variante sinónima *ATM*: c.1176C>G, p.Gly392=. A. RT-PCR pos-transfección de la variante sinónima en las células HEK293. *ATM*: PCR realizada con los primers localizados en los exones de insulina de rata. *GAPDH*: PCR realizada con los primers específicos para el gen constitutivo *GAPDH*. NT: células HEK293 no transfectadas. Ctrl-: control negativo. B. Gráfica de barras del promedio de la densidad relativa (normalización con la densidad del gen constitutivo *GAPDH*) promedio de las versiones WT y mutante de la variante sinónima analizada. El valor de *p* fue calculado con la prueba de Mann-Whitney, valor *p*=0.0079 (significancia estadística con un valor *p*<0.05). El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism v10.

Es importante resaltar que esta variante se identificó en varias pacientes con cáncer de seno no seleccionado, en la Tabla 22 se describen las características histopatológicas y de variantes germinales no-sinónimas en las pacientes con la variante de interés.

Tabla 22. Características histopatológicas y genéticas de las pacientes con la variante sinónima *ATM*: c.1176C>G (p.Gly392=)

Paciente	Subtipo molecular	Genes con variantes P/LP no-sinónimas
<i>Bg002</i>	TNBC	No
<i>Bt008</i>	TNBC	<i>CYP1B1</i>
<i>Bt040</i>	HER-2 enriquecido	<i>WRN</i>
<i>Md026</i>	LBH2Pos	<i>CST2, ITGA6</i>
<i>Md063</i>	TNBC	No
<i>Md072</i>	HER-2 enriquecido	<i>APOE</i>
<i>Mz002</i>	LBH2Pos	<i>TOP2A</i>

### 3.4 Discusión

Las variantes sinónimas, además de asociarse con diferentes tipos de enfermedades, se han asociado con el cáncer. Supek y colaboradores determinaron que las variantes sinónimas somáticas representan entre el 6-8% de las mutaciones tipo *driver*, debidas a SNV y observadas en oncogenes (enriquecimiento que no se observó en genes supresores tumorales). Más o menos la mitad de estas variantes sinónimas del tipo *driver* afectan el proceso de *splicing* y, en menor medida, el plegamiento proteico. En cuanto a la alteración en el proceso de *splicing*, estos investigadores encontraron que en los oncogenes las variantes sinónimas generan ganancia de motivos ESE y pérdida de motivos ESS; en tanto que, en los genes supresores tumorales como *TP53* (hasta el momento el único gen supresor tumoral con enriquecimiento de variantes sinónimas), estas variantes se localizan de manera predominante contiguas a los sitios canónicos del *splicing*, produciendo usualmente inactivación de los mismos (258).

Teng y colaboradores evaluaron el efecto de las variantes sinónimas somáticas en la regulación post-transcripcional mediante en análisis de datos de WES de 8.320 pacientes con 22 tipos diferentes de cáncer. Utilizaron un algoritmo propio llamado PIVar, en el que identificaron 22.948 variantes pisSNVs (*posttranscriptionally impaired synonymous SNVs*-pisSNVs), alterando la interacción del ARNm-RBP en 2.042 genes. Los investigadores encontraron que una tasa elevada de pisSNVs se asociaba con peor supervivencia, específicamente para los pacientes con carcinoma urotelial

de la vejiga, el adenocarcinoma del pulmón, el cistadenocarcinoma seroso del ovario, el melanoma y el adenocarcinoma gástrico (261).

Li y colaboradores evaluaron el efecto de una variante sinónima localizada en el gen *BRCA1*: c.132C>T (p.Cys44=), identificada en dos mujeres aparentemente no relacionadas con cáncer de seno de inicio temprano, cáncer de ovario e historia familiar de cáncer. Los investigadores realizaron un ensayo de minigenes y RT-PCR para determinar el efecto de la variante en el proceso de *splicing*, encontrando que ocasionaba la pérdida de cuatro nucleótidos localizados en el extremo 3' del exón, que resultaron en una variante de tipo *frameshift* (p.Cys44Tyrfs\*5). Luego del hallazgo observado en el ensayo de minigenes, la variante fue reclasificada como patogénica (262).

El análisis de variantes sinónimas en los diez genes con impacto clínico en cáncer de seno permitió identificar variantes germinales con potencial efecto en el proceso de *splicing* en todos los genes analizados. Aunque en algunas de las variantes ninguno de los predictores *in silico* fue positivo, se debe recordar que las variantes sinónimas afectan otros procesos de regulación de la expresión génica, como la interacción microARN-ARNm y la estructura secundaria del ARNm; por lo tanto, es necesario ampliar el análisis de este tipo de variantes con predictores específicos para cada efecto probable.

De manera particular, se observaron hallazgos positivos en una variante sinónima. La variante identificada en el gen *ATM*: c.1176C>G (p.Gly392=), se caracterizaba por tener los tres predictores *in silico* positivos; el  $\Delta$ score de SpliceAI de 0.45 predecía una pérdida del sitio donador, el score de NNSplice de 0.42 predecía la ganancia de un sitio donador y el predictor HSF sugería dos probables efectos: uno, la alteración significativa de los motivos ESE/ESS con un score de -8 y el otro efecto predicho, era la activación de un sitio críptico donador. El *valor p* del test *Chi-cuadrado* para esta variante fue 0.0023. La evaluación *in vitro* de esta variante evidenció una disminución del 60% del transcrito con la variante sinónima en comparación con la versión WT. Los resultados obtenidos permitieron concluir que, como se ha descrito previamente en la literatura (263), se deben utilizar varias herramientas para predecir el efecto de las variantes sinónimas, considerando que cada una de ellas analiza el efecto basándose en distintas metodologías. En el caso de la variante sinónima identificada en el gen *ATM*, solamente el predictor HSF coincidió con el resultado observado en el ensayo de minigenes, ya que la variante sinónima activó un sitio ESS que llevaba

a la reducción en la cantidad del transcrito. Con respecto a la localización de la variante en la región codificante y el efecto observado, no coincide con lo descrito por Supek y colaboradores para los genes supresores tumorales (258). El gen *ATM* es considerado un gen supresor tumoral y la pérdida de la función favorece el desarrollo de cáncer. La variante germinal c.1176C>G no se localiza en regiones adyacentes a los sitios canónicos de *splicing* y, por consiguiente, no los inactiva; el 98.6% (72/73) de las variantes germinales sinónimas, identificadas en las mujeres con cáncer de seno no seleccionado, no se localizaban en regiones adyacentes a los sitios de *splicing*. Es importante resaltar que los resultados de Supek (258) y los de esta tesis doctoral no son comparables, ya que se están analizando diferentes tipos de variantes, somáticas y germinales, respectivamente. En la literatura, la mayoría de los estudios realizados a gran escala (con un gran número de muestras), se han centrado en analizar el efecto de las variantes sinónimas somáticas. Sin embargo, como muestran los resultados de esta tesis doctoral, las variantes sinónimas germinales pueden comportarse de manera diferente a lo descrito para las somáticas.

Adicional a la localización de las variantes sinónimas en las regiones genómicas. Llama la atención la distribución por subtipos moleculares de cáncer de seno de la variante *ATM*: c.1176C>G (p.Gly392=), ya que de las siete pacientes que la tienen, tres de ellas tienen cáncer de seno TNBC y HER-2 enriquecido, en el análisis realizado en el capítulo 1 de variantes germinales P/LP no-sinónimas, no se identificaron ese tipo de variantes en el gen *ATM*, sugiriendo el probable efecto de la variante sinónima en estos subtipos moleculares de cáncer de seno. En la literatura se ha reportado que la frecuencia de variantes germinales P/LP no-sinónimas en el gen *ATM* en cáncer de seno HER-2 positivo y TNBC es baja (264–266); la frecuencia de variantes germinales no-sinónimas en este gen en el subtipo molecular HER-2 enriquecido no se encuentra de manera explícita en la literatura.

Los hallazgos obtenidos en este capítulo resaltan la importancia del análisis de las variantes sinónimas y sus efectos potenciales, y de los estudios poblacionales específicos; ya que como se ha mencionado a lo largo de esta tesis doctoral, los perfiles genéticos de cada población varían de manera significativa.

#### 4. Capítulo 3: Descripción de variantes de múltiple nucleótido identificadas de manera incidental en los genes *POLD1* y *BLM*

##### 4.1 Introducción

Las variantes de nucleótido múltiple o MNVs (*multiple nucleotide variants* -MNVs) se han definido como el hallazgo de combinaciones de dos o más cambios nucleotídicos (*single nucleotide variants* -SNVs), o bien un SNV con una pequeña delección o duplicación, los cuales se hallan ligados en *cis* (haplotipo) y cuya frecuencia no podría ser explicada por la acumulación aleatoria de estas unidades de variación como si fueran generadas de manera independiente. Diferentes publicaciones anteriores han denominado a las MNVs con los sinónimos de “mutaciones en *cluster*”, o “sustituciones de múltiples nucleótidos” (*multiple nucleotide substitutions* –MNS) y “mutaciones múltiples con espaciamiento cercano” (*closely spaced multiple mutations* –CSMM) (267–270), aunque es más adecuado el término MNVs, como se explicará más adelante.

En términos de nomenclatura, las MNVs deben ser interpretadas como eventos mutacionales únicos de delección-inserción; sin embargo, erróneamente son anotados por algunos de los algoritmos bioinformáticos como variantes independientes, lo que conduce a errores y potenciales resultados falsos positivos o negativos en el análisis diagnóstico (270). Una característica adicional de las MNVs es su baja frecuencia (<1%), mientras que otras combinaciones de variantes en *cis* comunes (>1%) se denominan como MNPs (*multinucleotide polymorphisms* –MNP) (271).

Algunas de las metodologías para determinar la fase *cis* (fase haplotípica) de las variantes que componen una MNV son: la fase basada en lecturas que evalúa si las variantes co-segregan reiteradamente a partir de secuenciación de ADN (*next generation sequencing* –NGS); la fase basada en segregación familiar (tríos), método que determina si las MNVs fueron co-heredadas y la fase basada en el análisis de población, que utiliza la frecuencia del haplotipo compartido por múltiples individuos (272).

#### 4.1.1 Clasificación de las MNVs

Las MNVs se agrupan en tres tipos: 1. MNVs con variaciones de sustitución de bases en tándem o contiguas (*tandem bases substitutions-TBS*); 2. MNVs con variaciones no contiguas y, por último, 3. MNVs con variaciones complejas (Figura 22) (267).

**A**

<b>TBS variations</b>		
CAG <b>CT</b> GCA <b>TG</b>	AGT <b>GGA</b> TGTG	TT <b>GTGTCAGC</b>
CAG <b>GGG</b> CA <b>TG</b>	AGT <b>TTT</b> TGTG	TT <b>TCTGGTGC</b>
<b>Non-contiguous MNS variations</b>		
GAT <b>GAGTGGT</b>	<b>CTGGAGGAGC</b>	<b>CATCATTGGT</b>
GAT <b>AAGCGGT</b>	<b>CAGAAGGATC</b>	<b>CTTCGTAGCT</b>
<b>Complex MNS variations</b>		
AAT <b>GACAACA</b>	<b>GGGGGGCC</b> TG	TT <b>ACTCATCT</b>
AAT <b>TACACA</b>	<b>GAGGGCGT</b> TG	TT <b>CATACCT</b>

Figura 22 Tipos de MNVs. Figura tomada de la referencia (267).

Las TBS son variaciones de dos o más nucleótidos contiguos (múltiples), sin la pérdida o ganancia neta de material genético. Se denominaron como CSMM del tipo B (268). La variación afecta dos, tres, incluso de 4 a 8 nucleótidos contiguos, siendo el más frecuente el TBS de dos nucleótidos (93.9% de las TBS analizadas por Chen y colaboradores), siendo las menos frecuentes aquellas con tramos más largos (2.6% de las TBS analizadas por Chen y colaboradores) (268).

Las MNVs no contiguas hacen referencia a variaciones en las que dos SNVs están separadas por al menos un nucleótido (268).

Las MNVs denominadas como complejas son aquellas que no pueden ser clasificadas como TBS ni como MNVs no contiguas, o que son una combinatoria de los dos grupos mencionados (268).

Además, las MNVs pueden ser concurrentes, cuando el proceso que generó las variantes sucedió de manera simultánea en un mismo ciclo celular, mediante mecanismos como la hipermutabilidad transitoria, cromotripsis y otros mecanismos mutacionales basados en replicación (268,269). También se ha hipotetizado que las MNVs surgen a partir de la acumulación secuencial de SNVs generados de manera independiente durante varios ciclos celulares, lo que da como resultado las MNVs no concurrentes (269).

Cuando una de las variantes que componen una TBS tiene una frecuencia alélica individual correspondiente a un polimorfismo (>1%), podría inferirse que es un TBS no concurrente; comparado con un TBS donde todas las variantes que lo componen solo se encuentran presentes en la persona afectada (268). Sin embargo, es importante mencionar que el concepto de concurrente o no concurrente no solo se aplica a las TBS sino también a las MNVs en general.

Las MNVs complejas también han sido denominadas como CSMM tipo A, haciendo referencia a variantes patológicas heredadas que comprometen, al menos, dos variantes no contiguas (269).

Por otra parte, las MNVs pueden ser clasificadas de acuerdo con la consecuencia funcional a nivel proteico como se observa en la Figura 23 (273).

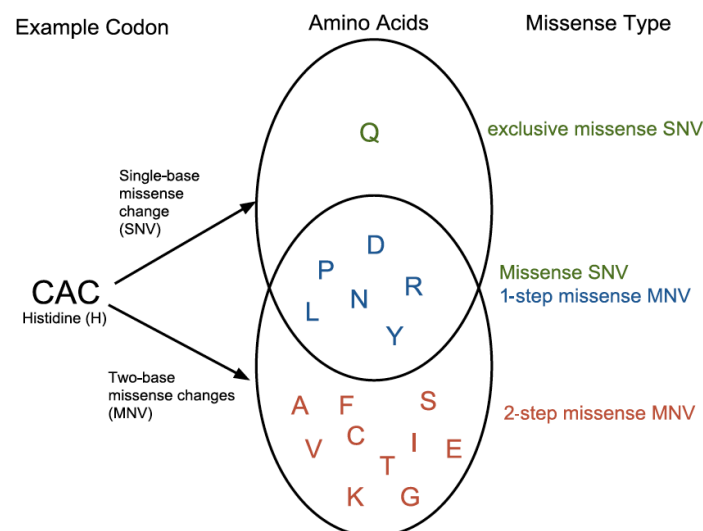


Figura 23. Clasificación de las MNVs intra-codón. Las MNVs que se presentan dentro de un codón (intra-codón) y que generan en la proteína variantes de tipo missense, pueden ser clasificadas como MNVs de un paso o MNVs de dos pasos: las MNVs de un paso, son definidas como aquellas que producen una variante de tipo missense la cual también podría ser resultado de una sola SNV; las MNVs de dos pasos son aquellas que generan variantes missense que no podrían ser causadas por una SNV. Figura tomada de la referencia (273).

Kaplanis y colaboradores determinaron que la distancia fisicoquímica observada en las MNVs de dos pasos es mayor en comparación con las MNVs de un solo paso y los SNVs, lo que sugiere que las variantes *missense* ocasionadas por MNVs de dos pasos tienen un efecto mayor en la proteína; algo similar se ha descrito para las MNVs inter-codón (MNVs que comprometen dos codones cercanos) (273). Adicionalmente, Wang y colaboradores identificaron que en las MNVs de un paso se caracterizan en

su mayoría por presentar las sustituciones características asociadas con la polimerasa translesional zeta como mecanismo causal (que será explicado más adelante), GA>TT en el 90.5% de los casos y GC>AA en el 80.5% de los MNVs de un paso (272).

En adición, MNVs denominadas de ganancia *nonsense*, son aquellas en las que se presenta la detención de la síntesis proteica de tal forma que pasarían desapercibidas en el llamado de variantes si se les considera como SNVs independientes. Otro tipo de MNVs a considerar, son las denominadas de rescate *nonsense*; en estas, al menos uno de los SNVs genera un codón de terminación, pero al analizar el haplotipo no se genera la variante *nonsense* (272).

#### 4.1.2 Frecuencia de los MNVs

Se ha estimado que aproximadamente entre el 2–3% de los SNVs *de novo* conforman MNVs (273–275), siendo el mayor porcentaje el representado por la evaluación de los datos genómicos de 283 tríos de la población islandesa (WGS) (275), por lo que se puede inferir que la frecuencia de las MNVs germinales podría ser dependiente de la población analizada.

Se ha estimado que las MNVs del tipo TBS dobles (que comprometen dos pares de bases) tienen una frecuencia de ~0.4% de las SNVs germinales de *de novo* en el genoma humano (267). Las TBS dobles más frecuentes en el genoma humano y descritas hasta el momento son GC>AA y GC>TT (también denominada GC/GC>AA/TT), seguidas por TC>AA (267,268). La tasa de TBS dobles se estima que sea de  $0.2-1.2 \times 10^{-10}$  por base por generación, la de TBS triples de  $0.8-4.8 \times 10^{-12}$ , y la de TBS con cuatro o más nucleótidos es mucho menor en magnitud (268), en comparación con la tasa de SNVs de *de novo* en el genoma humano y ha sido estimada en  $1.2 \times 10^{-8}$  por base por generación (267).

Wang y colaboradores identificaron 31,575 MNVs, con 2pb de separación entre las variantes, en 125,748 individuos con secuenciación de exoma, pertenecientes a la base de datos poblacional gnomAD v2.1. De estas 31,575 MNVs identificadas, el 60% generaban un efecto diferente en la proteína, en comparación con los efectos generados por las variantes de manera individual (272).

### 4.1.3 Mecanismos causales de las MNVs

Se han determinado varios mecanismos causales de MNVs, los cuales, además de explicar la etiología, brindan firmas mutacionales que permiten considerarlas como un tipo de variante particular.

La primera firma mutacional, relacionada con el mecanismo casual, es la alteración en la relación transición/transversión, siendo las primeras más frecuentes en SNVs y mientras que las transversiones son más comunes en MNVs, de la siguiente manera: las SNVs se caracterizan por tener un incremento en la frecuencia de transiciones, específicamente en los dinucleótidos CpG, los cuales son reconocidos como *hot spot* mutacionales. El mecanismo causal de estas transiciones se explica por el proceso de desaminación mediada por metilación en estos dinucleótidos CpG, produciendo las modificaciones puntuales C>T y G>A (267,268). Las transiciones en los dinucleótidos CpG suman el 17% de las variantes germinales puntuales *de novo* en el genoma humano, y el 20% de las transiciones CpG generan alteraciones del tipo *missense/nonsense* descritas en la base de datos HGMD (*human genome Mutation database*-HGMD) (268). En las MNVs en general y, de manera frecuente en las concurrentes, se ha observado una disminución en la relación transiciones/transversiones, lo cual puede ser explicado por el efecto de las ADN polimerasas translesionales (mecanismo causal que será descrito posteriormente) (267).

En el caso de las TBS dobles, es más probable que las variaciones ocurran en más de un ciclo celular (no-concurrentes), en comparación con las TBS que están compuestas por más nucleótidos (268).

Kaplanis y colaboradores identificaron las alteraciones en los dinucleótidos CpG como el mecanismo causal más frecuente de MNVs no-concurrentes. Específicamente, en MNVs no-concurrentes con una separación de 3-20pb, identificaron que se generaban sustituciones en dos dinucleótidos CpG: CG...CG>TG...TG (273).

Un segundo mecanismo causal de MNV es la conversión génica, favoreciendo la generación de MNVs concurrentes. Sin embargo, este mecanismo se considera una causa menor de MNVs (267). Chen y colaboradores analizaron 477 TBS, de las cuales 5 (dobles TBS) tenían características consistentes con la conversión génica como mecanismo causal (268).

Un tercer mecanismo de generación de MNVs es dependiente de la mutagénesis generada por las ADN polimerasas translesionales. A continuación, se describen los diferentes procesos en las que intervienen este tipo de polimerasas:

En primer lugar, la generación de sitiosapurínicos/apirimidínicos (sitios AP o abásicos) que pueden ser ocasionados por: la hidrólisis de la unión N-glicosídica entre el azúcar (ribosa) y las nucleobases del ADN y la formación de estructuras intermedias en el proceso de reparación por escisión de bases, las cuales sufrieron procesos de oxidación, desaminación o alquilación (267). Las ADN polimerasas translesionales preferentemente insertan el nucleótido adenina en los sitios abásicos (regla-A). Esta particularidad de este tipo de polimerasas podría explicar el aumento en la frecuencia de las transversiones en las MNVs (267).

Cuando se produce estrés de replicación (cualquier evento que impida la replicación del ADN), como por ejemplo la detención y el colapso de las horquillas de replicación, así como las rupturas de la doble cadena del ADN, entre otras alteraciones se presenta inestabilidad genómica (276,277). La célula, para evitar la detención del ciclo celular y preservar la estabilidad genómica, activa dos procesos: las vías de reparación (NHEJ y HRR), más la síntesis de ADN por polimerasas translesionales (siendo este último un proceso mutagénico debido a la baja fidelidad característica de este tipo polimerasas de ADN) (277). Las ADN polimerasas translesionales hacen parte de la vía de tolerancia al daño del ADN (*DNA damage tolerance pathway*–DDT), la cual también se compone por los procesos denominados de represión y cambio de la secuencia molde (*template switching* y *repriming*) (277). El mecanismo de acción de las polimerasas translesionales se compone de dos eventos: realizar un *bypass* seguido de la extensión del ADN corriente abajo de la lesión en la hebra de ADN. Para ejercer su función, las polimerasas translesionales deben realizar acciones secuenciales que comprometen al menos dos polimerasas; la primera realiza la inserción de nucleótidos en la hebra opuesta a la lesión, y la segunda polimerasa realiza la extensión de la hebra (277). Actualmente, el estrés de replicación hace parte de los *hallmarks* del cáncer, que inducen espacios o *gaps* en el ADN de hebra sencilla, disminuyen la velocidad de síntesis de ADN, lo que lleva a la activación de las polimerasas translesionales que favorecen la proliferación de las células cancerosas y evitan que la célula entre en apoptosis (277).

Las ADN polimerasas translesionales se encargan de incorporar nucleótidos en regiones opuestas a la lesión del ADN, evitando que la célula persista en arresto de

la replicación y posteriormente entre en apoptosis. Algunas veces los nucleótidos incorporados por las polimerasas translesionales son complementarios a las bases alteradas, manteniendo de esta manera la integridad genómica sin inducir mutagénesis. Sin embargo, la precisión de este tipo de polimerasas es bajo debido a la alta tolerancia del sitio activo de la enzima, a la ausencia de la actividad 5'-3' exonucleasa y a la viabilidad de interacciones no canónicas durante la incorporación de nucleótidos (278).

Las polimerasas translesionales pueden clasificarse en dos familias, las polimerasas iota, eta, kappa y REV1 hacen parte de la familia-Y, mientras que la polimerasa zeta hace parte de la familia-B (278). De acuerdo con la hipótesis que sugiere que las polimerasas translesionales actúan de manera conjunta, las pertenecientes a la familia-Y se encargan de insertar nucleótidos en la región opuesta a la lesión mientras que la polimerasa zeta continúa con la síntesis de ADN posterior a la lesión (278).

Un cuarto mecanismo, probablemente causal de MNVs, es la hipermutabilidad transitoria, la cual ha sido descrita como una posible causa de múltiples mutaciones sincrónicas (269). A continuación se describen los probables mecanismos que asocian la hipermutabilidad transitoria con la generación de MNVs: la alteración de la fidelidad en el proceso de replicación se debe a desregulación o cambio conformacional de proteínas involucradas en dicho proceso, como las ADN polimerasas y la perturbación del balance del pool nucleotídico y el reclutamiento de ADN polimerasas proclives a error en procesos de replicación o reparación, que son eventos característicos de la hipermutabilidad transitoria (269). MNVs compuestos por, al menos, dos mutaciones espaciadas por 100 pares de bases o menos, pueden ser interpretadas como firmas mutacionales ocasionadas por hipermutabilidad transitoria (269).

Un quinto mecanismo causal de MNVs es la llamada SRS (*serial replication slippage*–SRS, también conocido como *serial template switching* o *template switching mutation*), caracterizado por la presencia de inversiones cortas que pueden estar en sentido 5'-3' o crear una secuencia complementaria a partir de una secuencia cercana. Se ha sugerido que este tipo de variantes es ocasionado por un cambio breve en la replicación hacia la hebra complementaria o por un retroceso en la hebra nascente de ADN. Las variantes producidas por este mecanismo deben cumplir con dos características: tener al menos dos cambios en la secuencia de los cuales uno es una sustitución y tener un fragmento que sea el complemento reverso de la hebra

donde se dio el cambio en el molde con una longitud de, al menos, ocho pares de bases (Figura 24) (268,279).

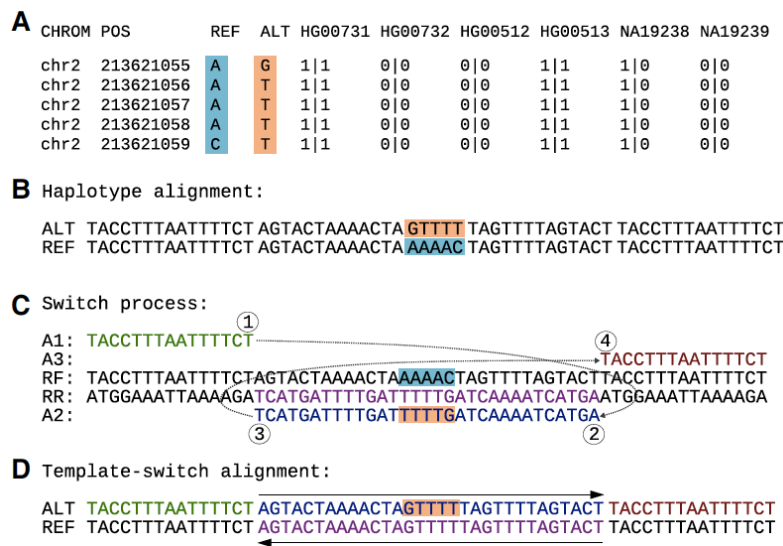


Figura 24. Ejemplo SRS como mecanismo causal de MNVs. Figura tomada de la referencia (268).

Se ha propuesto que el SRS puede actuar de manera conjunta con las ADN polimerasas translesionales generando TBS de cuatro nucleótidos o más. Cuando SRS y las polimerasas translesionales funcionan de manera conjunta, se ha sugerido que podrían explicar la generación de duplicaciones de secuencias vecinas asociadas con regiones de microhomologías (268).

Las MNVs también pueden ser causadas por la familia de desaminasas de citosina llamada APOBEC, constituyendo el sexto mecanismo causal de MNVs. Las firmas mutacionales de APOBEC se han descrito en cáncer (mutaciones somáticas) y en mutaciones germinales (273). Kaplanis y colaboradores encontraron que las firmas mutacionales germinales APOBEC estaban representadas de manera frecuente en MNVs concurrentes que tenían distancias de 3-20pb entre las variantes, en comparación con MNVs no-concurrentes (273).

La tasa de mutación a nivel germinal puede estar influenciada por diferentes factores como: la secuencia flanqueante, el estado de metilación, el tiempo en el proceso de replicación (se ha observado que la mayoría de las mutaciones se generan en regiones que se replican de manera tardía o al final de este proceso) y algunas hipótesis también sugieren que el mismo proceso de recombinación podría ser mutagénico (275). El tiempo de replicación sería un séptimo mecanismo causal de

MNVs; estudios previos han demostrado que las regiones del genoma que se replican de manera tardía tienen mayor densidad de SNVs y mayor cantidad de SNVs *de novo* en comparación con las regiones que se replican de manera temprana (280,281). Besenbacher y colaboradores confirmaron que la tasa de mutación es mayor en las regiones que se replican de manera tardía, siendo las mutaciones generadas tanto en sitios CpG como en sitios no-CpG. Estas observaciones, se evidenciaron con una alta frecuencia para las MNVs, especialmente las que contienen regiones espaciadoras entre 1-10pb (275). En el mismo sentido, otro probable mecanismo causal de MNVs se asocia con la edad paterna; la edad paterna tiene efecto en la tasa de generación de SNVs *de novo* asociado al número de divisiones celulares que requiere la espermatogénesis (275,282). Estas alteraciones dependientes de la replicación celular podrían favorecer la generación de MNVs concurrentes.

Aunque la mayoría de estudios se han enfocado en estudiar las MNVs localizadas en la región codificante, Wang y colaboradores analizaron la distribución de MNVs a lo largo de las diferentes regiones genómicas (por ejemplo: regiones codificantes, promotoras, *enhancer*, sitios de inicio de transcripción y regiones no traducidas, entre otras), encontrando que la densidad de MNVs depende del estado de metilación de los dinucleótidos CpG, siendo los mecanismos causales más frecuentes las transiciones CpG y las mutagénesis ocasionadas por la polimerasa zeta; mientras que los mecanismos menos comunes serían transversiones no-CpG (TA>GC) y el *slippage* de la polimerasa (AA>TT, AT>TA y TA>AT) en regiones repetitivas. Las MNVs ocasionadas por la polimerasa zeta son más frecuentes que las transiciones CpG en las regiones cercanas a los sitios de inicio de transcripción, esto explicado por los bajos niveles de metilación y, en consecuencia, menor frecuencia de transiciones CpG (Figura 25) (272).

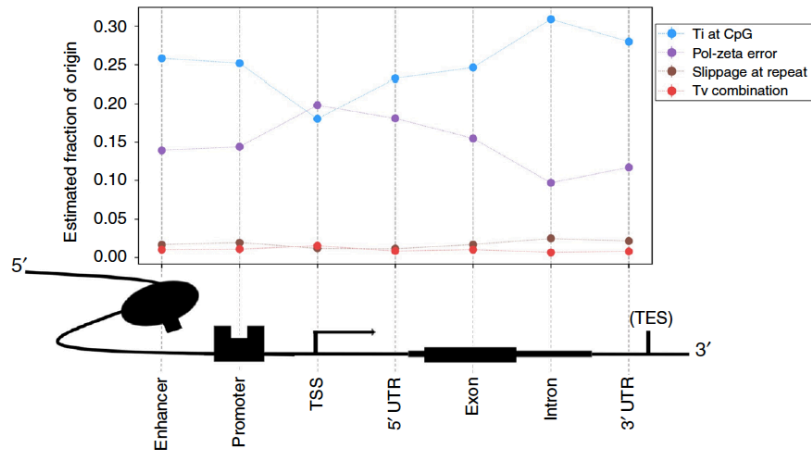


Figura 25. Distribución de MNVs en el genoma y mecanismo causal. Figura tomada de la referencia (272).

Harris y Nielsen realizaron una aproximación basada en desequilibrio de ligamento para identificar firmas de MNVs, tomando como base los datos de la fase I del proyecto de 1.000 genomas. De acuerdo con estudios previos, Harris y Nielsen identificaron patrones en SNPs en desequilibrio de ligamiento de que eran incompatibles con la teoría de la generación independiente de mutaciones, a saber: enriquecimiento de transversiones en comparación con transiciones y una frecuencia elevada de las sustituciones generadas por la polimerasa zeta (GA>TT, GC>AA) (274). Por otro lado, los mismos autores realizaron simulaciones para determinar cuál fracción de los SNPs en desequilibrio de ligamiento perfecto son MNVs. Con este ejercicio determinaron que menos del 0.5% de los MNVs, con distancia entre las variantes de hasta 100pb, serían separados por recombinación; lo que les permitió asumir que los MNVs son un grupo de parejas de SNPs en perfecto desequilibrio de ligamiento. De hecho, el 90% de los SNPs adyacentes en desequilibrio de ligamiento perfecto son MNVs; cuando los SNPs mostraron una distancia espaciadora de 5pb, el 60% de las transversiones con desequilibrio de ligamiento perfecto se predijo que eran MNVs; mientras que el 40% de las transiciones y los pares mixtos (transición y transversión) en desequilibrio de ligamiento perfecto fueron MNVs. Finalmente, cuando la distancia entre SNPs es 100pb, el 35% de los que mostraron perfecto desequilibrio de ligamiento podrían ser MNVs; cuando la distancia es mayor a 100pb entre SNPs en perfecto desequilibrio de ligamiento, se sugiere que más del 25% son MNVs. Los SNPs adyacentes en desequilibrio de ligamiento más comunes en los datos del proyecto de 1000 Genomas fueron GC>AA (16%) y GA>TT (11%), otros

SNPs adyacentes en desequilibrio de ligamiento perfecto sobrerrepresentados en los datos analizados son los derivados alélicos AA/TT (274).

Teniendo en cuenta los mecanismos causales descritos previamente, es posible determinar cuál de ellos se asocia con la generación de los diferentes tipos de MNVs. Por ejemplo, para el caso de las TBS compuestas por dos y tres nucleótidos concurrentes, el mecanismo causal más común es el efecto mutagénico de la polimerasa translesional zeta, mientras que para este mismo tipo de TBS, pero no-concurrentes, las transiciones CpG son el principal mecanismo causal. Adicionalmente, se ha observado en levaduras, que esta polimerasa también puede producir variantes complejas como TBS acompañadas por INDELS (283,284). Besenbacher y colaboradores, observaron que el 13% de las TBS estaban acompañadas por INDELS de *novo* con una distancia de menos de 10pb (275).

Es importante resaltar el efecto que tienen las secuencias flanqueantes en el desarrollo de los MNVs. En el caso particular de la firma mutacional de la exposición a radiación ultravioleta C y especies reactivas de oxígeno, la TBS CC>TT, se observa de manera frecuente en trectos de homocisteína de al menos cinco nucleótidos. La generación de esta firma mutacional se relaciona de manera conjunta a la exposición descrita con anterioridad, con la alteración en el funcionamiento de las polimerasas translesionales, en particular, la polimerasa eta (285).

Las MNVs diferentes a las TBS compuestas por dos o tres nucleótidos (TBS de cuatro nucleótidos o más, MNVs no-contiguas y MNVs complejas), además de los mecanismos más frecuentes de generación de MNVs (polimerasas translesionales y sustituciones CpG), pueden ser explicados por mecanismos como SRS, desaminasas de citosina APOBEC, el tiempo en el proceso de replicación, la hipermutabilidad transitoria, la conversión génica y el *slippage* de la polimerasa, entre otros.

## 4.2 Metodología

Para determinar la presencia de MNVs en las pacientes con cáncer de seno no seleccionado, donde se identificaron múltiples variantes para un mismo gen se utilizaron dos metodologías: la determinación de la fase de las variantes mediante lecturas y la separación alélica mediante clonaje, en un vector de almacenamiento, a partir del producto de PCR del ADN genómico de las pacientes.

#### 4.2.1 Determinación de la presencia de MNVs mediante lecturas

Para determinar la fase mediante lecturas, de las múltiples variantes identificadas en las dos pacientes con cáncer de seno en los genes *POLD1* y *BLM*, se realizó la visualización de las regiones genómicas en el programa IGV (*integrative genomics viewer*-IGV) a partir de los archivos BAM de cada paciente.

#### 4.2.2 Determinación de la presencia de MNVs mediante separación alélica

Para determinar la presencia de MNVs mediante separación alélica se realizaron los siguientes pasos: Se diseñaron primers de amplificación específicos para las regiones genómicas de interés, utilizando la herramienta bioinformática Primer 3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>); utilizando como molde el ADN genómico de las pacientes se realizaron las PCR con la polimerasa *GoTaq Green Master Mix* (Promega), los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa. Posteriormente se realizó el clonaje de los productos de PCR en el vector de almacenamiento pCR4-TOPO (Invitrogen) y los productos del clonaje fueron transformados en las bacterias quimiocompetentes *E.coli One Shot Top 10* (Invitrogen). Luego se realizaron los minicultivos, la extracción de ADN plasmídico mediante minipreps (kit de Qiagen) y secuenciación de Sanger con *primers* del vector.

### 4.3 Resultados

La presencia de MNVs en los genes *POLD1* y *BLM* fue confirmada por ambas metodologías. En la Figura 26 se observa la fase determinada por lecturas para las MNVs identificadas en los genes *POLD* y *BLM*.

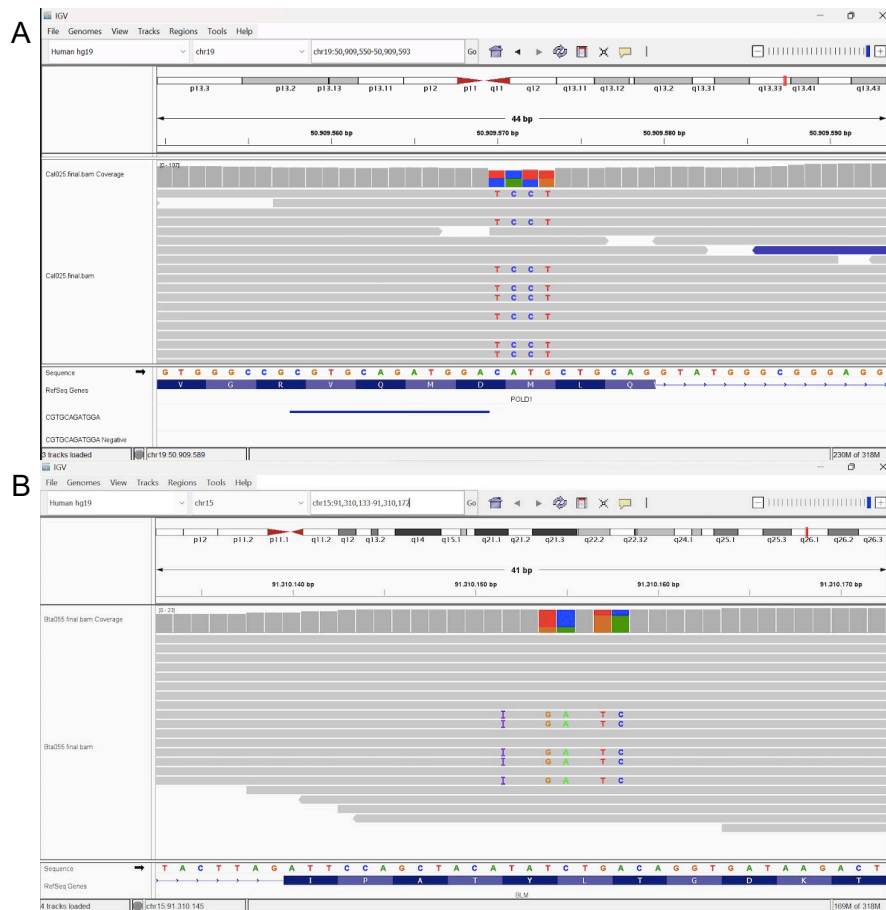


Figura 26. Imágenes tomadas con el programa IGV, de las regiones cromosómicas donde se identifica la presencia de las MNVs. A: MNV identificada en el gen POLD1. B: MNV identificada en el gen BLM.

En la Figura 27 se muestra el alineamiento de las secuencias, WT y MNVs, obtenidas mediante secuenciación de Sanger de los productos de PCR clonados en el vector de almacenamiento pCR4-TOPO.

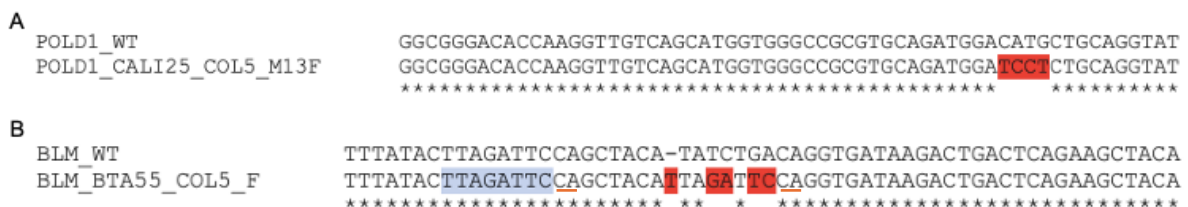


Figura 27. Alineamiento secuenciación de Sanger, MNVs identificados en los genes POLD1 y BLM. A. alineamiento secuenciación de Sanger MNV POLD1 (COL5) resaltado en rojo y secuencia silvestre (WT). B. alineamiento secuenciación de Sanger MNV BLM (COL5) resaltado en rojo y secuencia silvestre (WT), resaltado en gris probable secuencia insertada, como mecanismo causal de la MNV y subrayado en naranja secuencia de microhomología.

En la Tabla 23 se describen las variantes llamadas de manera errónea en los archivos vcf y el cambio a nivel de ADN y de proteína luego de la confirmación de las MNVs:

Tabla 23. Anotación inicial y anotación correcta de las MNVs identificados en los genes *POLD1* y *BLM*.

Paciente	Gen	Anotación inicial	Anotación correcta
Cl025	<i>POLD1</i>	c.1373_1374insT (p.Met459Hisfs*176)	c.1374_1377delinsTCCT (p.Met459Pro)
		c.1377delG (p.Met459Ilefs*19)	
Bt055	<i>BLM</i>	c.2207_2209delATC (p.Tyr736del)	c.2205_2212delinsATTAGATTC (p.Tyr736Leufs*3)
		c.2210_2211insA (p.Thr738Aspfs*3)	
		c.2212_2213insTTC(p.Thr738delinsIlePro)	

## 4.4 Discusión

### 4.4.1 Patologías asociadas con la presencia de MNVs

Las MNVs han sido asociados con múltiples patologías como desórdenes del desarrollo. Kaplanis y colaboradores identificaron, en 6,688 exomas de tríos provenientes del estudio *Deciphering Developmental Disorders*, 69,940 MNVs y 91 MNVs de *novo* (definición de MNV utilizada por Kaplanis y colaboradores: dos variantes distanciadas a menos de 20pb en fase *cis* con el mismo haplotipo, a lo largo de más del 99% de todos los individuos del estudio donde fuera observada la MNV). Los investigadores estimaron una tasa mutacional germinal de MNVs concurrentes de  $1.78 \times 10^{-10}$  por base por generación (~1.6% de la tasa mutacional de SNVs *de novo*) (273).

Srinivasan y colaboradores analizaron 10,383 archivos VCF del Atlas Genómico del Cáncer (*The Cancer Genome Atlas* –TCGA), identificando 12.141 MNVs somáticas, que inicialmente estaban reportados como SNVs independientes y 6,357 de ellos tenían un efecto proteico diferente al generado por los SNVs individuales. El melanoma y el cáncer de pulmón (adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas), tenían la mayor frecuencia de MNVs. En adición, la mayoría de los genes tenían entre 1 y 2 MNVs, a diferencia de los genes en los que se han descrito *hot-spot* mutacionales; en estos últimos, se identificaron 10 o más MNVs. En particular, para el gen *BRAF*, de las 46 MNVs identificadas, 43 se localizaban en el locus V600. Se debe resaltar, que la variante V600M nunca se presentaba de manera individual, sino que siempre ocurría en fase con otras variantes como V600G o

V600E, generando las variantes V600R y V600K, respectivamente. Este hallazgo de MNVs relacionado con el gen *BRAF* tiene implicaciones para el paciente, ya que dependiendo de la variante *missense* identificada le brinda la opción terapéutica para ser tratado con inhibidores de BRAF (V600E y V600E/K) (286).

Koire y colaboradores evaluaron la co-ocurrencia de variantes germinales y somáticas en el mismo codón, en *cis*, en cuatro cohortes de cáncer (seno, piel, colon y cabeza y cuello). Los investigadores resaltaron que cuando se genera esta interacción, las variantes germinales usualmente no son detectadas (pasadas por alto) ya que los algoritmos que realizan el llamado de variantes somáticas ignoran las germinales, lo que puede llevar a un error en la anotación del efecto a nivel proteico. En el estudio se determinó, que a pesar de que la co-ocurrencia de variantes germinales y somáticas se halla en el mismo codón, aparentemente éste no se encuentra sometido a selección positiva en el proceso de tumorigénesis; en este sentido, los cambios a nivel de aminoácido y el efecto predicho se modifican de manera considerable. En total el 17% mostraron co-ocurrencia germinal-somática; específicamente en las cohortes de cáncer, la menor frecuencia se observó en la cohorte de seno (2.8%) y la mayor en cáncer de piel (34.7%). La frecuencia de la co-ocurrencia de variantes somáticas y germinales a nivel de codón fue de 0.07% del total de las variantes somáticas. Las variantes germinales que acompañaban a las variantes somáticas usualmente tenían una MAF de 0.49; lo anterior sugiere que este evento de co-ocurrencia probablemente sea ocasionado por un proceso aleatorio. A pesar de lo mencionado previamente, Koire y colaboradores determinaron que la co-ocurrencia de variantes germinales y somáticas en el mismo codón se relaciona con un mayor impacto en el funcionamiento proteico, en el contexto de que crean una variante *missense* diferente (287). Aunque el estudio de Koire y colaboradores no demostró una presión de selección positiva a la co-ocurrencia de variantes germinales y somáticas en *cis* en el mismo codón, es de importancia resaltar que las variantes germinales eran polimorfismos. Sería interesante evaluar la co-ocurrencia de variantes germinales raras con variantes somáticas, el efecto a nivel proteico y si existe alguna presión de selección, así como evaluar en pacientes donde se haya identificado un MNV germinal, éste cómo se comporta a nivel tumoral y su interacción con variantes somáticas cercanas en *cis*.

Chen y colaboradores evaluaron la frecuencia de TBS dobles somáticos en ocho estudios de cáncer. Teniendo en cuenta la frecuencia de las TBS observadas, los

cánceres fueron clasificados en tres grupos. El primer grupo solamente estaba compuesto por melanoma, donde la TBS predominante fue CC/GG>TT/AA (firma mutacional previamente asociada con exposición a luz ultravioleta). En el segundo grupo, compuesto por adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, carcinoma de ovario y cáncer colorrectal, se observó un incremento en la frecuencia de la TBS CC/GG>AA/TT. En este caso, la firma mutacional predominante es el exceso de transversiones G>T asociadas con el daño en el ADN ocasionado por el tabaquismo, principalmente en el cáncer de pulmón. Por su parte, en cáncer de seno, neuroblastoma de alto riesgo y adenocarcinoma de próstata, que hacían parte del tercer grupo evaluado por Chen y colaboradores, se observó que la TBS con mayor frecuencia fue GC/GC>AA/TT, la cual es una TBS que también se observa de manera recurrente en las bases de datos de mutaciones de enfermedades hereditarias. Es importante resaltar que para la TBS identificada de manera predominante en el grupo tres no ha sido descrita como una firma mutacional de exposición a mutágenos exógenos (268). Teniendo en cuenta la comparación de los TBS presentes, tanto a nivel germinal como somático, realizada por Chen y colaboradores, se puede concluir que las TBS germinales son ocasionadas principalmente por factores endógenos generadores de daño en el material genético como, por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno y los derivados de la peroxidación de lípidos, en comparación con las firmas mutacionales asociadas al tabaquismo y luz ultravioleta (268).

Las MNVs identificadas en nuestras pacientes, para los genes *POLD1* y *BLM*, podrían ser clasificados como TBS de cuatro nucleótidos y MNV compleja, respectivamente. Para el caso de la TBS cuádruple identificado en el gen *POLD1*, el mecanismo causal probable es SRS, generando un MNV de rescate de variante *nonsense*; este MNV fue reportado previamente en la base de datos ClinVar, asociado al síndrome de predisposición a cáncer hereditario (Variation ID: 819039); es un MNV concurrente ya que los SNVs que lo componen no cuentan con frecuencias alélicas reportadas con anterioridad. En ClinVar se han informado 32 MNVs en el gen *POLD1*, 21 de ellos se localizan en región codificante y 11 en región no codificante del gen; 27 se han identificado en cáncer colorrectal, tres en síndrome de predisposición a cáncer hereditario y dos no especifican la condición del paciente donde fue identificada la variante. La MNV compleja identificada en el gen *BLM* se compone de la inserción de un nucleótido separada por dos pares de bases, seguida por una TBS doble, a su vez

separada por un nucleótido de otra TBS doble. En la proteína BLM, genera una variante de tipo *frameshift*. En este caso, todos los componentes de la MNV compleja no tienen frecuencia alélica reportada previamente, lo que permite asumir que es concurrente. De acuerdo con lo descrito en la literatura en este tipo de MNVs, el mecanismo causal más frecuente es el efecto de la polimerasa translesional zeta; sin embargo, ninguna de las TBS dobles (TC>GA, complementario AG>CT y GA>TC, complementario CT>AG) presenta los cambios característicos de este tipo de polimerasa, lo que podría explicarse por el mecanismo que involucra transversiones que generan dinucleótidos CpG, los cuales permiten, posteriormente, que se dé la segunda transversión aunque es poco probable que se ocasionen cinco cambios *de novo* en un solo ciclo celular en cada posición afectada, lo que hace que estos eventos sean poco probables. Llama la atención que la secuencia insertada en la MNV compleja se encuentra duplicada 8 pares de bases corriente arriba, y cuenta con una región de microhomología de dos nucleótidos corriente abajo (Figura 27B); las características mencionadas hacen pensar que el mecanismo causal más probable de esta MNV concurrente es la SRS. En la base de datos ClinVar se han registrado 28 MNVs para el gen *BLM*, 24 de ellos se encuentran en región codificante y cuatro en regiones no codificantes; 22 se describieron en pacientes con el síndrome Bloom, cinco fueron detectadas en pacientes con síndrome de predisposición a cáncer hereditario y una no especificó el fenotipo del paciente. La MNV identificada en nuestra paciente no ha sido reportada en ClinVar y, aunque en regiones cercanas y que comprometen posiciones similares a la presente se han registrado tres MNVs, todos ellos fueron clasificados como patogénicos/probablemente patogénicos y asociados al síndrome Bloom. Lo anterior permite suponer que la secuencia nucleotídica hallada en esa región favorece la generación de MNVs, funcionando como un probable *hot-spot* para este tipo de variantes.

#### 4.4.2 Soluciones para detectar los MNVs

La mayoría de los algoritmos bioinformáticos utilizados para realizar el llamado de variantes en NGS (incluyendo el algoritmo GATK), no realizan la identificación correcta de las MNVs, sino que muestran las SNVs de manera individual (270). Para evitar este error de anotación, algunos laboratorios realizan re-procesamiento de los datos mediante programas que pueden identificar variantes en haplotipo como: MAC (*multi-nucleotide variant annotation corrector*) (288), *ReadBackedPhasing* de GATK,

Platypus y VarDict (289), entre otros (270). Aunque existen programas que permiten la identificación de MNVs, como los mencionados previamente, éstos no generan métricas de calidad adecuadas, lo que hace que sea difícil su integración en los algoritmos de NGS (270). FreeBayes y VarDict son capaces de reportar MNVs cercanos, ya que ambos tienen *haplotype-aware callers*, característica necesaria para detectar MNVs (273).

Wang y colaboradores sugieren que aumentar el número de individuos secuenciados, tanto enfermos como “sanos”, permitirá el descubrimiento y la determinación del impacto en la enfermedad de diferentes tipos de variantes, como por ejemplo las MNVs; así como el análisis haplotípico para caracterizar e interpretar de manera adecuada las diferentes variantes genómicas (272).

## 5. Conclusiones

Analizar casos no seleccionados por historia familiar permite que los resultados obtenidos sean extrapolables a la población general. Además, es importante realizar estudios en las diferentes poblaciones ya que los perfiles genéticos varían incluso entre países.

Analizar una selección comprensiva de genes relacionados con el cáncer de seno permite identificar genes, que a pesar de no tener riesgos establecidos para el cáncer de seno, pueden asociarse con el fenotipo de estudio, por ejemplo alterando procesos biológicos y/o vías de señalización relacionadas con la carcinogénesis. Lo anterior permite candidatizar estos genes, los cuales con estudios posteriores podrían ayudar a un mejor entendimiento y el estudio de la herencia perdida del cáncer de seno.

Se identificaron variantes germinales P/LP en el 56.7% de los casos en 105 de los 253 genes analizados. El 6% de las mujeres con cáncer de seno no seleccionado tenían mutaciones germinales en siete de los diez genes con impacto clínico (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* y *RAD51D*).

En nuestra población de estudio no se identificaron variantes germinales P/LP en los genes *CDH1*, *RAD51C* y *TP53*; y tampoco se identificaron CNVs en los genes *BRCA1/2*.

La validación funcional de tres variantes identificadas en los genes *ATM* (c.5496+2\_5496+5delTAAG y c.1176C>G, p.Gly392=) y *BRCA1* (c.\*36C>G), dos de ellas localizadas en regiones no codificantes y una de ellas catalogada como sinónima, permite resaltar el potencial efecto deletéreo de este tipo de variantes en el cáncer de seno y la necesidad analizarlas para, de esta manera, disminuir la heredabilidad perdida de esta enfermedad.

Determinar los procesos biológicos y las vías de señalización que involucran genes con variantes germinales P/LP permite ampliar el espectro etiológico e identificar procesos poco estudiados en el cáncer de seno.

El análisis de árboles de decisión permitió candidatizar al gen *IRF6* como factor de riesgo para desarrollar cáncer de seno Luminal B HER-2 negativo.

El análisis genómico permitió identificar un tipo particular de variantes denominadas MNVs, las cuales pueden llevar a resultados falsos positivos o falsos negativos, y requieren de algoritmos bioinformáticos específicos para su detección.

## 6. Perspectivas

Los genes con variantes germinales P/LP en los que no se han descrito riesgos específicos para el cáncer de seno, son candidatos para realizar estudios posteriores, sean de asociación y de validación funcional; lo cual permitiría aumentar la evidencia de la probable patogenicidad y asociación con el cáncer de seno.

Se está realizando la predicción *in silico* del efecto de las variantes sinónimas en las interacciones ARNm-microARN y en la estructura secundaria del ARNm. A partir de estos resultados y de los descritos en el capítulo 2 de este documento se realizará la escritura de un artículo original.

Teniendo en cuenta el aporte de esta tesis doctoral en la obtención de las construcciones plasmídicas (WT y mutantes) en el vector de expresión pCIN-*BRCA2*, se sugiere continuar con el algoritmo de ensayos *in vitro* (Figura 5).

El análisis de árbol de decisión, realizado para los subtipos moleculares de cáncer de seno, arrojó resultados interesantes y sugerimos ampliar la exploración de este tipo de análisis en otras cohortes para confirmar nuestros hallazgos.

La identificación de variantes moleculares como MNVs, poco conocidas es de impacto para el diagnóstico. Por esta razón, estamos realizando un *scoping review* sobre este tema, revisión que es la base de los conceptos descritos en la introducción del capítulo 3.

Derivado de los resultados del presente trabajo, está en ejecución una colaboración con investigadores del Instituto Nacional de Cancerología, para determinar la relación entre la ancestría y el perfil genómico identificado en las mujeres analizadas.

## 7. Referencias

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May 4;74(3):229–63.
2. Arnold M, Morgan E, Rumgay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, et al. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*. 2022 Dec;66:15–23.
3. Sha R, Kong X meng, Li X yu, Wang Y bing. Global burden of breast cancer and attributable risk factors in 204 countries and territories, from 1990 to 2021: results from the Global Burden of Disease Study 2021. *Biomark Res*. 2024 Aug 26;12(1):87.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May 4;71(3):209–49.
5. Wojtyla C, Bertuccio P, Wojtyla A, La Vecchia C. European trends in breast cancer mortality, 1980–2017 and predictions to 2025. *Eur J Cancer*. 2021 Jul;152:4–17.
6. Joko-Fru WY, Jedy-Agba E, Korir A, Ogunbiyi O, Dzamalala CP, Chokunonga E, et al. The evolving epidemic of breast cancer in sub-Saharan Africa: Results from the African Cancer Registry Network. *Int J Cancer*. 2020 Oct 15;147(8):2131–41.
7. Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Research*. 2004 Dec 26;6(6):229.
8. Ghasemi-Kebria F, Fazel A, Semnani S, Etemadi A, Naeimi-Tabiei M, Hasanpour-Heidari S, et al. Breast cancer incidence trends in Golestan, Iran: An age-period-cohort analysis by ethnic region, 2004-2018. *Cancer Epidemiol*. 2024 Apr;89:102525.
9. Sathishkumar K, N V, Badwe RA, Deo SVS, Manoharan N, Malik R, et al. Trends in breast and cervical cancer in India under National Cancer Registry Programme: An Age-Period-Cohort analysis. *Cancer Epidemiol*. 2021 Oct;74:101982.

10. Duggan C, Trapani D, Ilbawi AM, Fidarova E, Laversanne M, Curigliano G, et al. National health system characteristics, breast cancer stage at diagnosis, and breast cancer mortality: a population-based analysis. *Lancet Oncol*. 2021 Nov;22(11):1632–42.
11. Hernández Vargas JA, Ramírez Barbosa PX, Gil Quijano AM, Valbuena AM, Acuña L, González JA. Patterns of breast, prostate and cervical cancer incidence and mortality in Colombia: an administrative registry data analysis. *BMC Cancer*. 2020 Nov 11;20(1):1097.
12. Sharma R. Temporal patterns of breast cancer incidence, mortality, disability-adjusted life years and risk factors in 12 South American Countries, 1990–2019: an examination using estimates from the global burden of disease 2019 study. *Breast Cancer Res Treat*. 2023 Dec 17;202(3):529–40.
13. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014 Jul;64(4):252–71.
14. ROJAS K, STUCKEY A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2016 Dec;59(4):651–72.
15. Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA*. 2016 Jan 5;315(1):68.
16. Honrado E, Benítez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Modern Pathology*. 2005 Oct;18(10):1305–20.
17. Taeubner J, Wieczorek D, Yasin L, Brozou T, Borkhardt A, Kuhlen M. Penetrance and Expressivity in Inherited Cancer Predisposing Syndromes. *Trends Cancer*. 2018 Nov;4(11):718–28.
18. Cao A, Huang L, Shao Z. The Preventive Intervention of Hereditary Breast Cancer. In 2017. p. 41–57.
19. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020 Aug 29;77(2):181–5.
20. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and

- Progesterone Receptors in Breast Cancer (Unabridged Version). Arch Pathol Lab Med. 2010 Jul 1;134(7):e48–72.
21. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/ *neu* Oncogene. Science (1979). 1987 Jan 9;235(4785):177–82.
  22. Yam C, Mani SA, Moulder SL. Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field. Oncologist. 2017 Sep 1;22(9):1086–93.
  23. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. Adv Anat Pathol. 2020 Jan;27(1):27–35.
  24. Ali HR, Rueda OM, Chin SF, Curtis C, Dunning MJ, Aparicio SA, et al. Genome-driven integrated classification of breast cancer validated in over 7,500 samples. Genome Biol. 2014 Aug 28;15(8):431.
  25. Kalimutho M, Nones K, Srihari S, Duijf PHG, Waddell N, Khanna KK. Patterns of Genomic Instability in Breast Cancer. Trends Pharmacol Sci. 2019 Mar;40(3):198–211.
  26. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. Genes Dis. 2018 Jun;5(2):77–106.
  27. Cenciarini ME, Proietti CJ. Molecular mechanisms underlying progesterone receptor action in breast cancer: Insights into cell proliferation and stem cell regulation. Steroids. 2019 Dec;152:108503.
  28. Dey N, De P, Leyland-Jones B. PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: From tumor cell signaling to clinical trials. Pharmacol Ther. 2017 Jul;175:91–106.
  29. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene. 2007 Oct 4;26(45):6469–87.
  30. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovskaya A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. J Cancer. 2019;10(9):2109–27.
  31. O’Kane GM, Connor AA, Gallinger S. Characterization, Detection, and Treatment Approaches for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. Trends Mol Med. 2017 Dec;23(12):1121–37.

32. Patterson AD, Gonzalez FJ, Perdew GH, Peters JM. Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. *Toxicological Sciences*. 2018 Oct 1;165(2):277–83.
33. Pon JR, Marra MA. Driver and Passenger Mutations in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2015 Jan 24;10(1):25–50.
34. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017;7(5):1016–36.
35. Ramroop JR, Gerber MM, Toland AE. Germline Variants Impact Somatic Events during Tumorigenesis. *Trends in Genetics*. 2019 Jul;35(7):515–26.
36. Geenen JJJ, Linn SC, Beijnen JH, Schellens JHM. PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Pharmacokinet*. 2018 Apr 23;57(4):427–37.
37. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1971 Apr;68(4):820–3.
38. El Tannouri R, Albuissou E, Jonveaux P, Luporsi E. Is there a genetic anticipation in breast and/or ovarian cancer families with the germline c.3481\_3491del11 mutation? *Fam Cancer*. 2018 Jan 10;17(1):5–14.
39. Cragun D, Weidner A, Kechik J, Pal T. Genetic Testing Across Young Hispanic and Non-Hispanic White Breast Cancer Survivors: Facilitators, Barriers, and Awareness of the Genetic Information Nondiscrimination Act. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2019 Feb;23(2):75–83.
40. Bordeleau L, Panchal S, Goodwin P. Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jan 30;119(1):13–24.
41. Brekelmans CTM, Tilanus-Linthorst MMA, Seynaeve C, vd Ouweland A, Menke-Pluymers MBE, Bartels CCM, et al. Tumour characteristics, survival and prognostic factors of hereditary breast cancer from BRCA2-, BRCA1- and non-BRCA1/2 families as compared to sporadic breast cancer cases. *Eur J Cancer*. 2007 Mar;43(5):867–76.
42. Chen S, Parmigiani G. Meta-Analysis of BRCA1 and BRCA2 Penetrance. *Journal of Clinical Oncology*. 2007 Apr 10;25(11):1329–33.
43. Goodwin PJ, Phillips KA, West DW, Ennis M, Hopper JL, John EM, et al. Breast Cancer Prognosis in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: An International

- Prospective Breast Cancer Family Registry Population-Based Cohort Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2012 Jan 1;30(1):19–26.
44. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 2017 Jun 20;317(23):2402.
  45. Rebbeck TR, Mitra N, Wan F, Sinilnikova OM, Healey S, McGuffog L, et al. Association of Type and Location of BRCA1 and BRCA2 Mutations With Risk of Breast and Ovarian Cancer. *JAMA*. 2015 Apr 7;313(13):1347.
  46. Rennert G, Bisland-Naggan S, Barnett-Griness O, Bar-Joseph N, Zhang S, Rennert HS, et al. Clinical Outcomes of Breast Cancer in Carriers of BRCA1 and BRCA2 Mutations. *New England Journal of Medicine*. 2007 Jul 12;357(2):115–23.
  47. Hatano Y, Tamada M, Matsuo M, Hara A. Molecular Trajectory of BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Front Oncol*. 2020 Mar 25;10.
  48. Villarreal-Garza C, Alvarez-Gómez RM, Pérez-Plasencia C, Herrera LA, Herzog J, Castillo D, et al. Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. *Cancer*. 2015 Feb 18;121(3):372–8.
  49. Fernandes GC, Michelli RAD, Galvão HCR, Paula AE, Pereira R, Andrade CE, et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget*. 2016 Dec 6;7(49):80465–81.
  50. de Souza Timoteo AR, Gonçalves AÉMM, Sales LAP, Albuquerque BM, de Souza JES, de Moura PCP, et al. A portrait of germline mutation in Brazilian at-risk for hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Dec 29;172(3):637–46.
  51. Alvarez C, Tapia T, Perez-Moreno E, Gajardo-Meneses P, Ruiz C, Rios M, et al. BRCA1 and BRCA2 founder mutations account for 78% of germline carriers among hereditary breast cancer families in Chile. *Oncotarget*. 2017 Sep 26;8(43):74233–43.
  52. Jara L, Ampuero S, Santibáñez E, Seccia L, Rodríguez J, Bustamante M, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in a South American population. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006 Apr;166(1):36–45.
  53. Quezada Urban R, Díaz Velásquez C, Gitler R, Rojo Castillo M, Sirota Toporek M, Figueroa Morales A, et al. Comprehensive Analysis of Germline Variants in

- Mexican Patients with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Susceptibility. *Cancers* (Basel). 2018 Sep 27;10(10):361.
54. Solano AR, Liria NC, Jalil FS, Faggionato DM, Mele PG, Mampel A, et al. BRCA1 and BRCA2 Mutations Other Than the Founder Alleles Among Ashkenazi Jewish in the Population of Argentina. *Front Oncol*. 2018 Aug 21;8.
  55. Vargas E, de Deugd R, Villegas VE, Gil F, Mora L, Viaña LF, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Germline Mutations in Patients of African Descent with Early-Onset and Familial Colombian Breast Cancer. *Oncologist* [Internet]. 2022 Mar 4;27(2):e151–7. Available from: <https://academic.oup.com/oncolo/article/27/2/e151/6528886>
  56. Torres D, Bermejo JL, Rashid MU, Briceño I, Gil F, Beltran A, et al. Prevalence and Penetrance of BRCA1 and BRCA2 Germline Mutations in Colombian Breast Cancer Patients. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Jul 5;7(1):4713. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-05056-y>
  57. Cifuentes-C L, Rivera-Herrera AL, Barreto G. BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and ovarian cancer families from south west Colombia. *Colomb Med* [Internet]. 2020 Jan 29;163–75. Available from: <https://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/2385>
  58. Torres D, Rashid MU, Gil F, Umana A, Ramelli G, Robledo JF, et al. High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2007 Jun 2;103(2):225–32. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10549-006-9370-1>
  59. Hernández JEL, Llacuachaqui M, Palacio GV, Figueroa JD, Madrid J, Lema M, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from Medellín, Colombia. *Hered Cancer Clin Pract* [Internet]. 2014 Dec 17;12(1):11. Available from: <https://hccpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1897-4287-12-11>
  60. Dorling L, Carvalho S, Allen J, González-Neira A, Luccarini C, Wahlström C, et al. Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2021 Feb 4;384(5):428–39. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1913948>
  61. Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, et al. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of

- Patients With Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2016 May 1;34(13):1460–8.
62. Wang YA, Jian JW, Hung CF, Peng HP, Yang CF, Cheng HCS, et al. Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes. *BMC Cancer*. 2018 Dec 22;18(1):315.
  63. Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R, Vogel Postula KJ, Weissman SM, Yackowski L, et al. Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genetics in Medicine*. 2016 Aug;18(8):823–32.
  64. Womack JE, Jang H, Lee MO. Genomics of complex traits. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Oct 10;1271(1):33–6.
  65. Rowe SJ, Tenesa A. Human complex trait genetics: lifting the lid of the genomics toolbox - from pathways to prediction. *Curr Genomics*. 2012 May;13(3):213–24.
  66. Lander ES, Schork NJ. Genetic Dissection of Complex Traits. *Science* (1979). 1994 Sep 30;265(5181):2037–48.
  67. Pulst SM. Genetic Linkage Analysis. *Arch Neurol*. 1999 Jun 1;56(6):667.
  68. Eby N, Chang-Claude J, Timothy Bishop D. Familial risk and genetic susceptibility for breast cancer. *Cancer Causes & Control*. 1994 Sep;5(5):458–70.
  69. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. *The American Journal of Human Genetics*. 1998 Mar;62(3):676–89.
  70. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science* (1979). 2008/11/08. 2008;322(5903):881–8.
  71. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. 2005/02/18. 2005;6(2):95–108.
  72. Kraft P, Cox DG. Study designs for genome-wide association studies. *Adv Genet*. 2008/03/25. 2008;60:465–504.
  73. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet*. 2005/02/18. 2005;6(2):109–18.
  74. Low S, Zembutsu H, Nakamura Y. Breast cancer: The translation of big genomic data to cancer precision medicine. *Cancer Sci*. 2018 Mar 30;109(3):497–506.

75. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2012 Mar 8;13(3):3245–76.
76. Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*. 2008 Dec 3;29(23):4627–36.
77. Concolino P, Capoluongo E. Detection of BRCA1/2 large genomic rearrangements in breast and ovarian cancer patients: an overview of the current methods. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019 Sep 2;19(9):795–802.
78. Kamps R, Brandão R, Bosch B, Paulussen A, Xanthoulea S, Blok M, et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 31;18(2):308.
79. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet*. 2011/07/07. 2011;48(9):580–9.
80. Nguyen-Dumont T, MacInnis RJ, Steen JA, Theys D, Tsimiklis H, Hammet F, et al. Rare germline genetic variants and risk of aggressive prostate cancer. *Int J Cancer*. 2020 Oct 15;147(8):2142–9.
81. Muskens IS, de Smith AJ, Zhang C, Hansen HM, Morimoto L, Metayer C, et al. Germline cancer predisposition variants and pediatric glioma: a population-based study in California. *Neuro Oncol*. 2020 Jun 9;22(6):864–74.
82. Shahi RB, De Brakeleer S, Caljon B, Pauwels I, Bonduelle M, Joris S, et al. Identification of candidate cancer predisposing variants by performing whole-exome sequencing on index patients from BRCA1 and BRCA2-negative breast cancer families. *BMC Cancer*. 2019 Dec 4;19(1):313.
83. Mijuskovic M, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Wakerell S, Whitmore I, Dadaev T, et al. Rare germline variants in DNA repair genes and the angiogenesis pathway predispose prostate cancer patients to develop metastatic disease. *Br J Cancer*. 2018 Jul 19;119(1):96–104.
84. Li X, Liu J, Wang K, Zhou J, Zhang H, Zhang M, et al. Polymorphisms and rare variants identified by next-generation sequencing confer risk for lung cancer in han Chinese population. *Pathol Res Pract*. 2020 Apr;216(4):152873.
85. Liu Y, Xia J, McKay J, Tsavachidis S, Xiao X, Spitz MR, et al. Rare deleterious germline variants and risk of lung cancer. *NPJ Precis Oncol*. 2021 Feb 16;5(1):12.

86. Esai Selvan M, Klein RJ, Gümüş ZH. Rare, Pathogenic Germline Variants in Fanconi Anemia Genes Increase Risk for Squamous Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2019 Mar 1;25(5):1517–25.
87. Wang Y, Liyanarachchi S, Miller KE, Nieminen TT, Comiskey DF, Li W, et al. Identification of Rare Variants Predisposing to Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2019 Jul;29(7):946–55.
88. Beebe-Dimmer JL, Zuhlke KA, Johnson AM, Liesman D, Cooney KA. Rare germline mutations in African American men diagnosed with early-onset prostate cancer. *Prostate*. 2018 Apr 21;78(5):321–6.
89. Pavanello M, Chan IH, Ariff A, Pharoah PD, Gayther SA, Ramus SJ. Rare Germline Genetic Variants and the Risks of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Oct 19;12(10):3046.
90. Esai Selvan M, Zauderer MG, Rudin CM, Jones S, Mukherjee S, Offit K, et al. Inherited Rare, Deleterious Variants in ATM Increase Lung Adenocarcinoma Risk. *Journal of Thoracic Oncology*. 2020 Dec;15(12):1871–9.
91. Gentiluomo M, Canzian F, Nicolini A, Gemignani F, Landi S, Campa D. Germline genetic variability in pancreatic cancer risk and prognosis. *Semin Cancer Biol*. 2022 Feb;79:105–31.
92. Liu Y, Lusk CM, Cho MH, Silverman EK, Qiao D, Zhang R, et al. Rare Variants in Known Susceptibility Loci and Their Contribution to Risk of Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2018 Oct;13(10):1483–95.
93. Goldstein AM, Xiao Y, Sampson J, Zhu B, Rotunno M, Bennett H, et al. Rare germline variants in known melanoma susceptibility genes in familial melanoma. *Hum Mol Genet*. 2017 Dec 15;26(24):4886–95.
94. Koivuluoma S, Tervasmäki A, Kauppila S, Winqvist R, Kumpula T, Kuismin O, et al. Exome sequencing identifies a recurrent variant in SERPINA3 associating with hereditary susceptibility to breast cancer. *Eur J Cancer*. 2021 Jan;143:46–51.
95. McDuff SGR, Bellon JR, Shannon KM, Gadd MA, Dunn S, Rosenstein BS, et al. ATM Variants in Breast Cancer: Implications for Breast Radiation Therapy Treatment Recommendations. *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics*. 2021 Aug;110(5):1373–82.

96. Toma C, Díaz-Gay M, Franch-Expósito S, Arnau-Collell C, Overs B, Muñoz J, et al. Using linkage studies combined with whole-exome sequencing to identify novel candidate genes for familial colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2020 Mar 15;146(6):1568–77.
97. Toma C, Díaz-Gay M, Soares de Lima Y, Arnau-Collell C, Franch-Expósito S, Muñoz J, et al. Identification of a Novel Candidate Gene for Serrated Polyposis Syndrome Germline Predisposition by Performing Linkage Analysis Combined With Whole-Exome Sequencing. *Clin Transl Gastroenterol*. 2019 Oct 28;10(10):e00100.
98. Lynch HT, Marcus JN, Lynch J ane., Snyder CL, Rubinstein WS. Breast Cancer Genetics. In: Kirby I. Bland EMC, editor. *The Breast* [Internet]. Elsevier; 2009. p. 371–415. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416052210000218>
99. Daly MB, Pal T, Maxwell KN, Churpek J, Kohlmann W, AlHilli Z, et al. NCCN Guidelines® Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2024. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2023 Oct;21(10):1000–10.
100. R Core Team. No Title [Internet]. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2023. Available from: <https://www.r-project.org/>
101. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, 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. *Genetics in Medicine* [Internet]. 2015 May;17(5):405–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021030318>
102. Ghosh R, Harrison SM, Rehm HL, Plon SE, Biesecker LG. Updated recommendation for the benign stand-alone ACMG/AMP criterion. *Hum Mutat*. 2018 Nov 11;39(11):1525–30.
103. Walsh MF, Ritter DI, Kesserwan C, Sonkin D, Chakravarty D, Chao E, et al. Integrating somatic variant data and biomarkers for germline variant classification in cancer predisposition genes. *Hum Mutat*. 2018 Nov 11;39(11):1542–52.

104. Jarvik GP, Browning BL. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *The American Journal of Human Genetics* [Internet]. 2016 Jun;98(6):1077–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929716300982>
105. Brnich SE, Abou Tayoun AN, Couch FJ, Cutting GR, Greenblatt MS, Heinen CD, et al. Recommendations for application of the functional evidence PS3/BS3 criterion using the ACMG/AMP sequence variant interpretation framework. *Genome Med* [Internet]. 2020 Dec 31;12(1):3. Available from: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-019-0690-2>
106. Abou Tayoun AN, Pesaran T, DiStefano MT, Oza A, Rehm HL, Biesecker LG, et al. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion. *Hum Mutat* [Internet]. 2018 Nov 7;39(11):1517–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.23626>
107. Harrison SM, Biesecker LG, Rehm HL. Overview of Specifications to the ACMG/AMP Variant Interpretation Guidelines. *Curr Protoc Hum Genet* [Internet]. 2019 Sep 8;103(1). Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphg.93>
108. Vargas-Parra G, Valle J, Rofes P, Gausachs M, Stradella A, Moreno-Cabrera JM, et al. Comprehensive analysis and ACMG-based classification of CHEK2 variants in hereditary cancer patients. *Hum Mutat* [Internet]. 2020 Dec 14;41(12):2128–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.24110>
109. Spurdle AB, Healey S, Devereau A, Hogervorst FBL, Monteiro ANA, Nathanson KL, 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* [Internet]. 2012 Jan;33(1):2–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.21628>
110. Hu C, Hart SN, Gnanaolivu R, Huang H, Lee KY, Na J, et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2021 Feb 4;384(5):440–51.

111. Firth H V, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009 Apr;84(4):524–33.
112. Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Ahmad S, Alpi E, et al. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D523–31.
113. Paysan-Lafosse T, Blum M, Chuguransky S, Grego T, Pinto BL, Salazar GA, et al. InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D418–27.
114. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *The American Journal of Human Genetics.* 2016 Oct;99(4):877–85.
115. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. Subtypes of Breast Cancer. In: *Breast Cancer.* Exon Publications; 2022. p. 31–42.
116. Vasconcelos I, Hussainzada A, Berger S, Fietze E, Linke J, Siedentopf F, et al. The St. Gallen surrogate classification for breast cancer subtypes successfully predicts tumor presenting features, nodal involvement, recurrence patterns and disease free survival. *The Breast.* 2016 Oct;29:181–5.
117. Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ. *Classification And Regression Trees.* Routledge; 2017.
118. Hastie T, Tibshirani R, Friedman J. *The Elements of Statistical Learning.* New York, NY: Springer New York; 2009.
119. Quinlan JR. Induction of decision trees. *Mach Learn.* 1986 Mar;1(1):81–106.
120. Dietterich TG. Ensemble Methods in Machine Learning. In 2000. p. 1–15.
121. Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.* 2022 Jul 5;50(W1):W216–21.
122. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009 Jan 18;4(1):44–57.
123. Steffensen AY, Dandanell M, Jønson L, Ejlertsen B, Gerdes AM, Nielsen FC, et al. Functional characterization of BRCA1 gene variants by mini-gene splicing assay. *European Journal of Human Genetics.* 2014 Dec 26;22(12):1362–8.

124. Montalban G, Bonache S, Moles-Fernández A, Gadea N, Tenés A, Torres-Esquius S, et al. Incorporation of semi-quantitative analysis of splicing alterations for the clinical interpretation of variants in *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Hum Mutat.* 2019 Dec 26;40(12):2296–317.
125. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan 1;12(1):31–46.
126. Gilmore E, McCabe N, Kennedy RD, Parkes EE. DNA Repair Deficiency in Breast Cancer: Opportunities for Immunotherapy. *J Oncol.* 2019 Jun 19;2019:1–14.
127. Huang R, Zhou PK. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Jul 9;6(1):254.
128. Mechanic LE, Millikan RC, Player J, de Cotret AR, Winkel S, Worley K, et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, smoking and breast cancer in African Americans and whites: a population-based case–control study. *Carcinogenesis.* 2006 Jul 1;27(7):1377–85.
129. Roberts ME, Jackson SA, Susswein LR, Zeinomar N, Ma X, Marshall ML, et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genetics in Medicine.* 2018 Oct;20(10):1167–74.
130. Cock-Rada AM, Ossa CA, Garcia HI, Gomez LR. A multi-gene panel study in hereditary breast and ovarian cancer in Colombia. *Fam Cancer [Internet].* 2018 Jan 20;17(1):23–30. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10689-017-0004-z>
131. Patel SA, Longacre TA, Ladabaum U, Lebensohn A, Lin AY, Haraldsdottir S. Tumor Molecular Testing Guides Anti-PD-1 Therapy and Provides Evidence for Pathogenicity of Mismatch Repair Variants. *Oncologist.* 2018 Dec 1;23(12):1395–400.
132. Davies H, Morganella S, Purdie CA, Jang SJ, Borgen E, Russnes H, et al. Whole-Genome Sequencing Reveals Breast Cancers with Mismatch Repair Deficiency. *Cancer Res.* 2017 Sep 15;77(18):4755–62.
133. Bau DT, Mau YC, Ding S ling, Wu PE, Shen CY. DNA double-strand break repair capacity and risk of breast cancer. *Carcinogenesis.* 2007 Aug;28(8):1726–30.

134. Mérel P, Prieur A, Pfeiffer P, Delattre O. Absence of major defects in non-homologous DNA end joining in human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 2002 Aug 15;21(36):5654–9.
135. Mao Z, Jiang Y, Liu X, Seluanov A, Gorbunova V. DNA Repair by Homologous Recombination, But Not by Nonhomologous End Joining, Is Elevated in Breast Cancer Cells. *Neoplasia*. 2009 Jul;11(7):683-IN3.
136. Shen Y, Lee YH, Panneerselvam J, Zhang J, Loo LWM, Fei P. Mutated Fanconi anemia pathway in non-Fanconi anemia cancers. *Oncotarget*. 2015 Aug 21;6(24):20396–403.
137. Stecklein SR, Jensen RA. Identifying and exploiting defects in the Fanconi anemia/BRCA pathway in oncology. *Translational Research*. 2012 Sep;160(3):178–97.
138. Gallmeier E, Kern SE. Targeting Fanconi Anemia/BRCA2 Pathway Defects in Cancer: The Significance of Preclinical Pharmacogenomic Models. *Clinical Cancer Research*. 2007 Jan 1;13(1):4–10.
139. Agudo A, Peluso M, Munnia A, Luján-Barroso L, Barricarte A, Amiano P, et al. Aromatic DNA adducts and breast cancer risk: a case-cohort study within the EPIC-Spain. *Carcinogenesis*. 2017 Jul;38(7):691–8.
140. Li D, Wang M, Dhingra K, Hittelman WN. Aromatic DNA adducts in adjacent tissues of breast cancer patients: clues to breast cancer etiology. *Cancer Res*. 1996 Jan 15;56(2):287–93.
141. Cavalieri EL, Rogan EG, Zahid M. Critical depurinating DNA adducts: Estrogen adducts in the etiology and prevention of cancer and dopamine adducts in the etiology and prevention of Parkinson's disease. *Int J Cancer*. 2017 Sep 15;141(6):1078–90.
142. Reding KW, Han CJ, Whittington D, Zahid M, Rogan EG, Langford D, et al. Risk of Breast Cancer Associated with Estrogen DNA Adduct Biomarker. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2020 Oct 1;29(10):2096–9.
143. White AJ, Chen J, McCullough LE, Xu X, Cho YH, Teitelbaum SL, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)–DNA adducts and breast cancer: modification by gene promoter methylation in a population-based study. *Cancer Causes & Control*. 2015 Dec 25;26(12):1791–802.

144. Firozi PF, Bondy ML, Sahin AA, Chang P, Lukmanji F, Singletary ES, et al. Aromatic DNA adducts and polymorphisms of CYP1A1, NAT2, and GSTM1 in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2002 Feb;23(2):301–6.
145. Nelson ER, Chang C yi, McDonnell DP. Cholesterol and breast cancer pathophysiology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2014 Dec;25(12):649–55.
146. Cavalieri EL, Rogan EG. Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Jul;125(3–5):169–80.
147. Cavalieri E, Rogan E. The molecular etiology and prevention of estrogen-initiated cancers. *Mol Aspects Med*. 2014 Apr;36:1–55.
148. CAVALIERI E, ROGAN E. Catechol Quinones of Estrogens in the Initiation of Breast, Prostate, and Other Human Cancers. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Nov 11;1089(1):286–301.
149. Zahid M, Saeed M, Lu F, Gaikwad N, Rogan E, Cavalieri E. Inhibition of catechol-O-methyltransferase increases estrogen–DNA adduct formation. *Free Radic Biol Med*. 2007 Dec;43(11):1534–40.
150. Lu F, Zahid M, Saeed M, Cavalieri EL, Rogan EG. Estrogen metabolism and formation of estrogen-DNA adducts in estradiol-treated MCF-10F cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Jun;105(1–5):150–8.
151. Lavigne JA, Goodman JE, Fonong T, Odwin S, He P, Roberts DW, et al. The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer Res*. 2001 Oct 15;61(20):7488–94.
152. van Duursen MBM. Phytochemicals Inhibit Catechol-O-Methyltransferase Activity in Cytosolic Fractions from Healthy Human Mammary Tissues: Implications for Catechol Estrogen-Induced DNA Damage. *Toxicological Sciences*. 2004 Jul 14;81(2):316–24.
153. Yager JD. Catechol-O-methyltransferase: characteristics, polymorphisms and role in breast cancer. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2012 Jun;9(1–2):e41–6.
154. Dawling S, Roodi N, Mernaugh RL, Wang X, Parl FF. Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res*. 2001 Sep 15;61(18):6716–22.

155. Zhong J, Tang Y. Research progress on the role of reactive oxygen species in the initiation, development and treatment of breast cancer. *Prog Biophys Mol Biol.* 2024 May;188:1–18.
156. Hecht F, Pessoa CF, Gentile LB, Rosenthal D, Carvalho DP, Fortunato RS. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biology.* 2016 Apr 27;37(4):4281–91.
157. Malla R, Surepalli N, Farran B, Malhotra S V., Nagaraju GP. Reactive oxygen species (ROS): Critical roles in breast tumor microenvironment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021 Apr;160:103285.
158. Oshi M, Gandhi S, Yan L, Tokumaru Y, Wu R, Yamada A, et al. Abundance of reactive oxygen species (ROS) is associated with tumor aggressiveness, immune response, and worse survival in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2022 Jul 31;194(2):231–41.
159. Costa A, Scholer-Dahirel A, Mechta-Grigoriou F. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 2014 Apr;25:23–32.
160. Chen A, Huang H, Fang S, Hang Q. ROS: A “booster” for chronic inflammation and tumor metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 2024 Nov;1879(6):189175.
161. Fussell KC, Udasin RG, Smith PJS, Gallo MA, Laskin JD. Catechol metabolites of endogenous estrogens induce redox cycling and generate reactive oxygen species in breast epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2011 Aug;32(8):1285–93.
162. Johar R, Sharma R, Kaur A, K. Mukherjee T. Role of Reactive Oxygen Species in Estrogen Dependant Breast Cancer Complication. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015 Nov 17;16(2):190–9.
163. Sarmiento-Salinas FL, Delgado-Magallón A, Montes-Alvarado JB, Ramírez-Ramírez D, Flores-Alonso JC, Cortés-Hernández P, et al. Breast Cancer Subtypes Present a Differential Production of Reactive Oxygen Species (ROS) and Susceptibility to Antioxidant Treatment. *Front Oncol.* 2019 Jun 7;9.
164. Ray SK, Jayashankar E, Kotnis A, Mukherjee S. Oxidative versus Reductive Stress in Breast Cancer Development and Cellular Mechanism of Alleviation: A Current Perspective with Anti-breast Cancer Drug Resistance. *Curr Mol Med.* 2024 Feb;24(2):205–16.

165. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *EMBO J*. 2017 Feb 22;36(3):252–9.
166. Vaupel P, Mayer A, Briest S, Höckel M. Hypoxia in Breast Cancer. In: *Oxygen Transport to Tissue XXVI*. New York: Springer-Verlag; p. 333–42.
167. Rundqvist H, Johnson RS. Tumour oxygenation: implications for breast cancer prognosis. *J Intern Med*. 2013 Aug 12;274(2):105–12.
168. Milani M, Harris AL. Targeting tumour hypoxia in breast cancer. *Eur J Cancer*. 2008 Dec;44(18):2766–73.
169. Zhang Y, Zhang H, Wang M, Schmid T, Xin Z, Kozhuharova L, et al. Hypoxia in Breast Cancer—Scientific Translation to Therapeutic and Diagnostic Clinical Applications. *Front Oncol*. 2021 Mar 11;11.
170. McAleese CE, Choudhury C, Butcher NJ, Minchin RF. Hypoxia-mediated drug resistance in breast cancers. *Cancer Lett*. 2021 Apr;502:189–99.
171. Cheng W, Xiao X, Liao Y, Cao Q, Wang C, Li X, et al. Conducive target range of breast cancer: Hypoxic tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2022 Sep 26;12.
172. Chen A, Sceneay J, Gödde N, Kinwel T, Ham S, Thompson EW, et al. Intermittent hypoxia induces a metastatic phenotype in breast cancer. *Oncogene*. 2018 Aug 1;37(31):4214–25.
173. Rausch LK, Netzer NC, Hoegel J, Pramsöhler S. The Linkage between Breast Cancer, Hypoxia, and Adipose Tissue. *Front Oncol*. 2017 Sep 25;7.
174. Galanis A, Pappa A, Giannakakis A, Lanitis E, Dangaj D, Sandaltzopoulos R. Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer. *Cancer Lett*. 2008 Jul;266(1):12–20.
175. Tang K, Yu Y, Zhu L, Xu P, Chen J, Ma J, et al. Hypoxia-reprogrammed tricarboxylic acid cycle promotes the growth of human breast tumorigenic cells. *Oncogene*. 2019 Oct 31;38(44):6970–84.
176. Tang K, Zhu L, Chen J, Wang D, Zeng L, Chen C, et al. Hypoxia Promotes Breast Cancer Cell Growth by Activating a Glycogen Metabolic Program. *Cancer Res*. 2021 Oct 1;81(19):4949–63.
177. Sajnani K, Islam F, Smith RA, Gopalan V, Lam AKY. Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis. *Biochimie*. 2017 Apr;135:164–72.

178. Ciccarone F, Vegliante R, Di Leo L, Ciriolo MR. The TCA cycle as a bridge between oncometabolism and DNA transactions in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2017 Dec;47:50–6.
179. Zakic T, Kalezic A, Drvendzija Z, Udicki M, Ivkovic Kapicl T, Srdic Galic B, et al. Breast Cancer: Mitochondria-Centered Metabolic Alterations in Tumor and Associated Adipose Tissue. *Cells.* 2024 Jan 15;13(2):155.
180. Young CM, Beziaud L, Dessen P, Madurga Alonso A, Santamaria-Martínez A, Huelsken J. Metabolic dependencies of metastasis-initiating cells in female breast cancer. *Nat Commun.* 2023 Nov 4;14(1):7076.
181. Shaw PG, Chaerkady R, Wang T, Vasilatos S, Huang Y, Van Houten B, et al. Integrated Proteomic and Metabolic Analysis of Breast Cancer Progression. *PLoS One.* 2013 Sep 27;8(9):e76220.
182. Kamada S, Takeiwa T, Ikeda K, Horie K, Inoue S. Emerging Roles of COX7RP and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Breast Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 1;10.
183. Evans KW, Yuca E, Scott SS, Zhao M, Paez Arango N, Cruz Pico CX, et al. Oxidative Phosphorylation Is a Metabolic Vulnerability in Chemotherapy-Resistant Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 2021 Nov 1;81(21):5572–81.
184. El-Botty R, Morriset L, Montaudon E, Tariq Z, Schnitzler A, Bacci M, et al. Oxidative phosphorylation is a metabolic vulnerability of endocrine therapy and palbociclib resistant metastatic breast cancers. *Nat Commun.* 2023 Jul 14;14(1):4221.
185. Hu Y, Xu W, Zeng H, He Z, Lu X, Zuo D, et al. OXPHOS-dependent metabolic reprogramming prompts metastatic potential of breast cancer cells under osteogenic differentiation. *Br J Cancer.* 2020 Nov 24;123(11):1644–55.
186. Chen K, Lu P, Beeraka NM, Sukocheva OA, Madhunapantula S V., Liu J, et al. Mitochondrial mutations and mitoepigenetics: Focus on regulation of oxidative stress-induced responses in breast cancers. *Semin Cancer Biol.* 2022 Aug;83:556–69.
187. Lone MUD, Baghel KS, Kanchan RK, Shrivastava R, Malik SA, Tewari BN, et al. Physical interaction of estrogen receptor with MnSOD: implication in mitochondrial O<sub>2</sub>.- upregulation and mTORC2 potentiation in estrogen-responsive breast cancer cells. *Oncogene.* 2017 Mar 30;36(13):1829–39.

188. Mehdi M, Menon MKC, Seyoum N, Bekele M, Tigeneh W, Seifu D. Blood and Tissue Enzymatic Activities of GDH and LDH, Index of Glutathione, and Oxidative Stress among Breast Cancer Patients Attending Referral Hospitals of Addis Ababa, Ethiopia: Hospital-Based Comparative Cross-Sectional Study. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Jan 26;2018(1).
189. Yeh C, Hou M, Wu S, Tsai S, Lin S, Hou LA, et al. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. *Cell Biochem Funct*. 2006 Nov 2;24(6):555–9.
190. Mahalingaiah PKS, Singh KP. Chronic Oxidative Stress Increases Growth and Tumorigenic Potential of MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2014 Jan 28;9(1):e87371.
191. Griñan-Lison C, Blaya-Cánovas JL, López-Tejada A, Ávalos-Moreno M, Navarro-Ocón A, Cara FE, et al. Antioxidants for the Treatment of Breast Cancer: Are We There Yet? *Antioxidants*. 2021 Jan 31;10(2):205.
192. Mdkhana B, Goel S, Saleh MA, Siddiqui R, Khan NA, Elmoselhi AB. Role of oxidative stress in angiogenesis and the therapeutic potential of antioxidants in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2022 Jul;26(13):4677–92.
193. Gustalik J, Aebisher D, Bartusik-Aebisher D. Photodynamic therapy in breast cancer treatment. *J Appl Biomed*. 2022 Oct 5;20(3):98–105.
194. Bai W, Xue Y, Guo Y, Zhang D, Ma K, Chen Z, et al. Reactive oxygen species produced by photodynamic therapy enhance docosahexaenoic acid lipid peroxidation and induce the death of breast cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2024 Sep;241:114012.
195. Nizami ZN, Aburawi HE, Semlali A, Muhammad K, Iratni R. Oxidative Stress Inducers in Cancer Therapy: Preclinical and Clinical Evidence. *Antioxidants*. 2023 May 26;12(6):1159.
196. Morgan MP, Finnegan E, Das S. The role of transcription factors in the acquisition of the four latest proposed hallmarks of cancer and corresponding enabling characteristics. *Semin Cancer Biol*. 2022 Nov;86:1203–15.
197. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Jan 3;7(1):3.

198. Burwinkel B, Shanmugam KS, Hemminki K, Meindl A, Schmutzler RK, Sutter C, et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variant is associated with familial breast cancer risk: a case-control study. *BMC Cancer*. 2006 Dec 17;6(1):268.
199. Naidu R, Yip CH, Taib NAM. Genetic variations in transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene: association of TCF7L2 rs12255372(G/T) or rs7903146(C/T) with breast cancer risk and clinico-pathological parameters. *Medical Oncology*. 2012 Jun 8;29(2):411–7.
200. Wang Z, Zhang Q, Chen F, Wang Y, Nie W, Yang B, et al. TCF7L2 rs12255372 (G>T) Polymorphism Contributes to Breast Carcinogenesis: Evidence from a Meta-Analysis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2013;23(4):309–16.
201. Connor AE, Baumgartner RN, Baumgartner KB, Kerber RA, Pinkston C, John EM, et al. Associations between TCF7L2 polymorphisms and risk of breast cancer among Hispanic and non-Hispanic White women: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Nov 21;136(2):593–602.
202. Goode EL, Szabo C, Prokunina-Olsson L, Vierkant RA, Fredericksen ZS, Collins FS, et al. No association between a candidate TCF7L2 variant and risk of breast or ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2009 Dec 4;9(1):312.
203. Peters AA, Buchanan G, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T, Centenera MM, Harris JM, et al. Androgen Receptor Inhibits Estrogen Receptor- $\alpha$  Activity and Is Prognostic in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2009 Aug 1;69(15):6131–40.
204. Hickey TE, Selth LA, Chia KM, Laven-Law G, Milioli HH, Roden D, et al. The androgen receptor is a tumor suppressor in estrogen receptor–positive breast cancer. *Nat Med*. 2021 Feb 18;27(2):310–20.
205. Pietri E, Conteduca V, Andreis D, Massa I, Melegari E, Sarti S, et al. Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. *Endocr Relat Cancer*. 2016 Oct;23(10):R485–98.
206. Liu D. AR pathway activity correlates with AR expression in a HER2-dependent manner and serves as a better prognostic factor in breast cancer. *Cellular Oncology*. 2020 Apr 13;43(2):321–33.
207. Bobbitt JR, Seachrist DD, Keri RA. Chromatin Organization and Transcriptional Programming of Breast Cancer Cell Identity. *Endocrinology*. 2023 Jun 26;164(8).

208. Kim T, Han S, Chun Y, Yang H, Min H, Jeon SY, et al. Comparative characterization of 3D chromatin organization in triple-negative breast cancers. *Exp Mol Med*. 2022 May 5;54(5):585–600.
209. Zhou Y, Gerrard DL, Wang J, Li T, Yang Y, Fritz AJ, et al. Temporal dynamic reorganization of 3D chromatin architecture in hormone-induced breast cancer and endocrine resistance. *Nat Commun*. 2019 Apr 3;10(1):1522.
210. Wang N, Fang Y, Hou Y, Cheng D, Dressler E V., Wang H, et al. Senescent cells promote breast cancer cells motility by secreting GM-CSF and bFGF that activate the JNK signaling pathway. *Cell Communication and Signaling*. 2024 Oct 7;22(1):478.
211. Cotarelo CL, Schad A, Schmidt M, Hönig A, Sleeman JP, Thaler S. Detection of Cellular Senescence Reveals the Existence of Senescent Tumor Cells within Invasive Breast Carcinomas and Related Metastases. *Cancers (Basel)*. 2023 Mar 20;15(6):1860.
212. de Paula B, Kieran R, Koh SSY, Crocamo S, Abdelhay E, Muñoz-Espín D. Targeting Senescence as a Therapeutic Opportunity for Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2023 May 4;22(5):583–98.
213. Galiana I, Lozano-Torres B, Sancho M, Alfonso M, Bernardos A, Bisbal V, et al. Preclinical antitumor efficacy of senescence-inducing chemotherapy combined with a nanoSenolytic. *Journal of Controlled Release*. 2020 Jul;323:624–34.
214. Liu B, Lv M, Duan Y, Lin J, Dai L, Yu J, et al. Genetically engineered CD276-anchoring biomimetic nanovesicles target senescent escaped tumor cells to overcome chemoresistant and immunosuppressive breast cancer. *Biomaterials*. 2025 Feb;313:122796.
215. Oliphant MUJ, Kong D, Zhou H, Lewis MT, Ford HL. Two Sides of the Same Coin: The Role of Developmental pathways and pluripotency factors in normal mammary stem cells and breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2020 Jun 22;25(2):85–102.
216. Angeloni V, Tiberio P, Appierto V, Daidone MG. Implications of stemness-related signaling pathways in breast cancer response to therapy. *Semin Cancer Biol*. 2015 Apr;31:43–51.
217. Madsen RR, Erickson EC, Rueda OM, Robin X, Caldas C, Toker A, et al. Positive correlation between transcriptomic stemness and PI3K/AKT/mTOR

- signaling scores in breast cancer, and a counterintuitive relationship with PIK3CA genotype. *PLoS Genet.* 2021 Nov 11;17(11):e1009876.
218. Shawky MS, Ricciardelli C, Lord M, Whitelock J, Ferro V, Britt K, et al. Proteoglycans: Potential Agents in Mammographic Density and the Associated Breast Cancer Risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2015 Dec 26;20(3–4):121–31.
  219. Okolicsanyi RK, van Wijnen AJ, Cool SM, Stein GS, Griffiths LR, Haupt LM. Heparan Sulfate Proteoglycans and Human Breast Cancer Epithelial Cell Tumorigenicity. *J Cell Biochem.* 2014 May 4;115(5):967–76.
  220. Chen Y, Scully M, Dawson G, Goodwin C, Xia M, Lu X, et al. Perturbation of the heparin/heparin-sulfate interactome of human breast cancer cells modulates pro-tumourigenic effects associated with PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling. *Thromb Haemost.* 2013 Nov 22;109(06):1148–57.
  221. Brantley KD, Tamimi RM. The association between infectious agents and breast cancer: a review of the epidemiologic evidence. *Breast Cancer Res Treat.* 2024 Sep 6;207(2):235–52.
  222. Bevilacqua G. The Viral Origin of Human Breast Cancer: From the Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) to the Human Betaretrovirus (HBRV). *Viruses.* 2022 Aug 1;14(8):1704.
  223. Khodabandehlou N, Mostafaei S, Etemadi A, Ghasemi A, Payandeh M, Hadifar S, et al. Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins. *BMC Cancer.* 2019 Dec 14;19(1):61.
  224. Nascimento KCG, São Marcos B de F, Fontes PHB, Isídio BE de O, Leão SL, da Silva GRP, et al. HPV Detection in Breast Tumors and Associated Risk Factors in Northeastern Brazil. *Cells.* 2024 Jun 29;13(13):1132.
  225. Geisler J, Touma J, Rahbar A, Söderberg-Nauclér C, Vetvik K. A Review of the Potential Role of Human Cytomegalovirus (HCMV) Infections in Breast Cancer Carcinogenesis and Abnormal Immunity. *Cancers (Basel).* 2019 Nov 22;11(12):1842.
  226. Touma J, Pantalone MR, Rahbar A, Liu Y, Vetvik K, Sauer T, et al. Human Cytomegalovirus Protein Expression Is Correlated with Shorter Overall Survival in Breast Cancer Patients: A Cohort Study. *Viruses.* 2023 Mar 11;15(3):732.
  227. de Freitas EM, Machado RA, de Moura Santos E, de Matos FR, Galvão HC, Miranda Soares PB, et al. Polymorphisms associated with oral clefts as potential

- susceptibility markers for oral and breast cancer. *Arch Oral Biol.* 2019 Mar;99:9–14.
228. Muralidharan H, Hansen T, Steinle A, Schumacher D, Stickeler E, Maurer J. Breast Cancer Stem Cells Upregulate IRF6 in Stromal Fibroblasts to Induce Stromagenesis. *Cells.* 2024 Aug 31;13(17):1466.
229. Zengin T, Ekinçi B, Kucukkose C, Yalcin-Ozuyosal O. IRF6 Is Involved in the Regulation of Cell Proliferation and Transformation in MCF10A Cells Downstream of Notch Signaling. *PLoS One.* 2015 Jul 10;10(7):e0132757.
230. Bailey CM, Abbott DE, Margaryan N V., Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJC. Interferon Regulatory Factor 6 Promotes Cell Cycle Arrest and Is Regulated by the Proteasome in a Cell Cycle-Dependent Manner. *Mol Cell Biol.* 2008 Apr 1;28(7):2235–43.
231. Venetianer P. Are synonymous codons indeed synonymous? *Biomol Concepts.* 2012 Feb 1;3(1):21–8.
232. Hunt RC, Simhadri VL, Iandoli M, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Exposing synonymous mutations. *Trends in Genetics.* 2014 Jul;30(7):308–21.
233. Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, Martin S, Morris N, Kline N, et al. Codon Optimality Is a Major Determinant of mRNA Stability. *Cell.* 2015 Mar;160(6):1111–24.
234. Scott A, Petrykowska HM, Hefferon T, Gotea V, Elnitski L. Functional analysis of synonymous substitutions predicted to affect splicing of the CFTR gene. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2012 Dec;11(6):511–7.
235. Sporadic optic atrophy due to synonymous codon change altering mRNA splicing of *OPA1*. *Clin Genet.* 2005 Jan 22;67(1):102–3.
236. Wang L, Zeng W, Qian Y, Sun Y, Chen M, Liu B, et al. Synonymous variant at the terminal nucleotide in exon 3 of F7 causes abnormal splicing: A case report. *Mol Genet Genomic Med.* 2024 Jul 15;12(7).
237. Czech A, Fedyunin I, Zhang G, Ignatova Z. Silent mutations in sight: co-variations in tRNA abundance as a key to unravel consequences of silent mutations. *Mol Biosyst.* 2010;6(10):1767.
238. Gaither JBS, Lammi GE, Li JL, Gordon DM, Kuck HC, Kelly BJ, et al. Synonymous variants that disrupt messenger RNA structure are significantly constrained in the human population. *Gigascience.* 2021 Apr 5;10(4).

239. Silverman SK. A Forced March across an RNA Folding Landscape. *Chem Biol*. 2008 Mar;15(3):211–3.
240. Sabarinathan R, Tafer H, Seemann SE, Hofacker IL, Stadler PF, Gorodkin J. The RNAsnp web server: predicting SNP effects on local RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res*. 2013 Jul 1;41(W1):W475–9.
241. Halvorsen M, Martin JS, Broadaway S, Laederach A. Disease-Associated Mutations That Alter the RNA Structural Ensemble. *PLoS Genet*. 2010 Aug 19;6(8):e1001074.
242. Miladi M, Raden M, Diederichs S, Backofen R. MutaRNA: analysis and visualization of mutation-induced changes in RNA structure. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jul 2;48(W1):W287–91.
243. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskiy O, Makarov SS, et al. Human Catechol-O-Methyltransferase Haplotypes Modulate Protein Expression by Altering mRNA Secondary Structure. *Science (1979)*. 2006 Dec 22;314(5807):1930–3.
244. Duan J. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet*. 2003 Feb 1;12(3):205–16.
245. Vogel C, de Sousa Abreu R, Ko D, Le S, Shapiro BA, Burns SC, et al. Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol Syst Biol*. 2010 Jan 24;6(1).
246. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*. 2011 Oct 31;12(10):683–91.
247. Agashe D, Martinez-Gomez NC, Drummond DA, Marx CJ. Good Codons, Bad Transcript: Large Reductions in Gene Expression and Fitness Arising from Synonymous Mutations in a Key Enzyme. *Mol Biol Evol*. 2013 Mar;30(3):549–60.
248. Supek F. The Code of Silence: Widespread Associations Between Synonymous Codon Biases and Gene Function. *J Mol Evol*. 2016 Jan 4;82(1):65–73.
249. Hershberg R, Petrov DA. Selection on Codon Bias. *Annu Rev Genet*. 2008 Dec 1;42(1):287–99.
250. Tsai CJ, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar S V., Gottesman MM, Nussinov R. Synonymous Mutations and Ribosome Stalling Can Lead to Altered Folding Pathways and Distinct Minima. *J Mol Biol*. 2008 Nov;383(2):281–91.

251. Monaghan L, Longman D, Cáceres JF. Translation-coupled mRNA quality control mechanisms. *EMBO J*. 2023 Oct 4;42(19).
252. Rao R V, Bredesen DE. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Dec;16(6):653–62.
253. Almeida LM, Oliveira Â, Oliveira JMA, Pinho BR. Stress response mechanisms in protein misfolding diseases: Profiling a cellular model of Huntington’s disease. *Arch Biochem Biophys*. 2023 Sep;745:109711.
254. Fang Z, Du R, Edwards A, Flemington EK, Zhang K. The Sequence Structures of Human MicroRNA Molecules and Their Implications. *PLoS One*. 2013 Jan 18;8(1):e54215.
255. Bartel DP. MicroRNAs. *Cell*. 2004 Jan;116(2):281–97.
256. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005 Feb 30;433(7027):769–73.
257. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn’s disease. *Nat Genet*. 2011 Mar 30;43(3):242–5.
258. Supek F, Miñana B, Valcárcel J, Gabaldón T, Lehner B. Synonymous Mutations Frequently Act as Driver Mutations in Human Cancers. *Cell*. 2014 Mar;156(6):1324–35.
259. Chen R, Davydov E V., Sirota M, Butte AJ. Non-Synonymous and Synonymous Coding SNPs Show Similar Likelihood and Effect Size of Human Disease Association. *PLoS One*. 2010 Oct 22;5(10):e13574.
260. Chamary J V., Hurst LD. The Price of Silent Mutations. *Sci Am*. 2009 Jun;300(6):46–53.
261. Teng H, Wei W, Li Q, Xue M, Shi X, Li X, et al. Prevalence and architecture of posttranscriptionally impaired synonymous mutations in 8,320 genomes across 22 cancer types. *Nucleic Acids Res*. 2020 Feb 20;48(3):1192–205.
262. Li J, Wang P, Zhang C, Han S, Xiao H, Liu Z, et al. Characterization of Synonymous BRCA1:c.132C>T as a Pathogenic Variant. *Front Oncol*. 2022 Jan 11;11.

263. Lin BC, Katneni U, Jankowska KI, Meyer D, Kimchi-Sarfaty C. In silico methods for predicting functional synonymous variants. *Genome Biol.* 2023 May 22;24(1):126.
264. Woodward ER, Laloo F, Forde C, Pugh S, Burghel GJ, Schlecht H, et al. Germline testing of BRCA1, BRCA2, PALB2 and CHEK2 c.1100delC in 1514 triple negative familial and isolated breast cancers from a single centre, with extended testing of *ATM*, *RAD51C* and *RAD51D* in over 400. *J Med Genet.* 2024 Apr;61(4):385–91.
265. de Baumont AC, Cadore NA, Pedrotti LG, Curzel GD, Schuch JB, Bessel M, et al. Germline rare variants in HER2-positive breast cancer predisposition: a systematic review and meta-analysis. *Front Oncol.* 2024 Jun 24;14.
266. Bedrosian I, Somerfield MR, Achatz MI, Boughey JC, Curigliano G, Friedman S, et al. Germline Testing in Patients With Breast Cancer: ASCO–Society of Surgical Oncology Guideline. *Journal of Clinical Oncology.* 2024 Feb 10;42(5):584–604.
267. Zhu W, Cooper DN, Zhao Q, Wang Y, Liu R, Li Q, et al. Concurrent Nucleotide Substitution Mutations in the Human Genome Are Characterized by a Significantly Decreased Transition/Transversion Ratio. *Hum Mutat.* 2015 Mar;36(3):333–41.
268. Chen JM, Férec C, Cooper DN. Patterns and Mutational Signatures of Tandem Base Substitutions Causing Human Inherited Disease. *Hum Mutat.* 2013 Aug;34(8):1119–30.
269. Chen JM, Férec C, Cooper DN. Closely spaced multiple mutations as potential signatures of transient hypermutability in human genes. *Hum Mutat.* 2009 Oct;30(10):1435–48.
270. Wakeling MN, Laver TW, Colclough K, Parish A, Ellard S, Baple EL. Misannotation of multiple-nucleotide variants risks misdiagnosis. *Wellcome Open Res.* 2020 Jan 9;4:145.
271. Haraksingh RR, Snyder MP. Impacts of Variation in the Human Genome on Gene Regulation. *J Mol Biol.* 2013 Nov;425(21):3970–7.
272. Wang Q, Pierce-Hoffman E, Cummings BB, Alföldi J, Francioli LC, Gauthier LD, et al. Landscape of multi-nucleotide variants in 125,748 human exomes and 15,708 genomes. *Nat Commun.* 2020 May 27;11(1):2539.

273. Kaplanis J, Akawi N, Gallone G, McRae JF, Prigmore E, Wright CF, et al. Exome-wide assessment of the functional impact and pathogenicity of multinucleotide mutations. *Genome Res.* 2019 Jul;29(7):1047–56.
274. Harris K, Nielsen R. Error-prone polymerase activity causes multinucleotide mutations in humans. *Genome Res.* 2014 Sep;24(9):1445–54.
275. Besenbacher S, Sulem P, Helgason A, Helgason H, Kristjansson H, Jonasdottir A, et al. Multi-nucleotide de novo Mutations in Humans. *PLoS Genet.* 2016 Nov 15;12(11):e1006315.
276. Macheret M, Halazonetis TD. DNA Replication Stress as a Hallmark of Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2015 Jan 24;10(1):425–48.
277. Maiorano D, El Etri J, Franchet C, Hoffmann JS. Translesion Synthesis or Repair by Specialized DNA Polymerases Limits Excessive Genomic Instability upon Replication Stress. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 10;22(8):3924.
278. Shilkin ES, Boldinova EO, Stolyarenko AD, Goncharova RI, Chuprov-Netochin RN, Khairullin RF, et al. Translesion DNA Synthesis and Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow).* 2020 Apr 27;85(4):425–35.
279. Löytynoja A. Thousands of human mutation clusters are explained by short-range template switching. *Genome Res.* 2022 Aug;32(8):1437–47.
280. Stamatoyannopoulos JA, Adzhubei I, Thurman RE, Kryukov G V, Mirkin SM, Sunyaev SR. Human mutation rate associated with DNA replication timing. *Nat Genet.* 2009 Apr 15;41(4):393–5.
281. Francioli LC, Polak PP, Koren A, Menelaou A, Chun S, Renkens I, et al. Genome-wide patterns and properties of de novo mutations in humans. *Nat Genet.* 2015 Jul 18;47(7):822–6.
282. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature.* 2012 Aug 22;488(7412):471–5.
283. Stone JE, Lujan SA, Kunkel TA. DNA polymerase zeta generates clustered mutations during bypass of endogenous DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen.* 2012 Dec 11;53(9):777–86.
284. Zhong X, Garg P, Stith CM, McElhinny SAN, Kissling GE, Burgers PMJ, et al. The fidelity of DNA synthesis by yeast DNA polymerase zeta alone and with accessory proteins. *Nucleic Acids Res.* 2006 Oct;34(17):4731–42.

285. Skinner AM, Dan C, Turker MS. The frequency of CC to TT tandem mutations in mismatch repair-deficient cells is increased in a cytosine run. *Mutagenesis*. 2008 Jan 8;23(2):87–91.
286. Srinivasan S, Kalinava N, Aldana R, Li Z, van Hagen S, Rodenburg SYA, et al. Misannotated Multi-Nucleotide Variants in Public Cancer Genomics Datasets Lead to Inaccurate Mutation Calls with Significant Implications. *Cancer Res*. 2021 Jan 15;81(2):282–8.
287. Koire A, Kim YW, Wang J, Katsonis P, Jin H, Lichtarge O. Codon-level co-occurrences of germline variants and somatic mutations in cancer are rare but often lead to incorrect variant annotation and underestimated impact prediction. *PLoS One*. 2017 Mar 28;12(3):e0174766.
288. Wei L, Liu LT, Conroy JR, Hu Q, Conroy JM, Morrison CD, et al. MAC: identifying and correcting annotation for multi-nucleotide variations. *BMC Genomics*. 2015 Dec 1;16(1):569.
289. Lai Z, Markovets A, Ahdesmaki M, Chapman B, Hofmann O, McEwen R, et al. VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jun 20;44(11):e108–e108.
290. Johnstone CN, Pattison AD, Gorringer KL, Harrison PF, Powell DR, Lock P, et al. Functional and genomic characterization of a xenograft model system for the study of metastasis in triple-negative breast cancer. *Dis Model Mech*. 2018 Jan 1;
291. Hu X, Wang J, He W, Zhao P, Ye C. MicroRNA-433 targets AKT3 and inhibits cell proliferation and viability in breast cancer. *Oncol Lett*. 2018 Jan 16;
292. Liu X, Feng C, Liu J, Cao L, Xiang G, Liu F, et al. Androgen receptor and heat shock protein 27 co-regulate the malignant potential of molecular apocrine breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2018 Dec 27;37(1):90.
293. Rajkumar T, Meenakumari B, Mani S, Sridevi V, Sundersingh S. Targeted Resequencing of 30 Genes Improves the Detection of Deleterious Mutations in South Indian Women with Breast and/or Ovarian Cancers. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015 Aug 3;16(13):5211–7.
294. Jin J, Fang H, Yang F, Ji W, Guan N, Sun Z, et al. Combined Inhibition of ATR and WEE1 as a Novel Therapeutic Strategy in Triple-Negative Breast Cancer. *Neoplasia*. 2018 May;20(5):478–88.

295. Kim H, Min A, Im S, Jang H, Lee KH, Lau A, et al. Anti-tumor activity of the ATR inhibitor AZD6738 in HER2 positive breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2017 Jan 21;140(1):109–19.
296. Chimge NO, Ahmed-Alnassar S, Frenkel B. Relationship between RUNX1 and AXIN1 in ER-negative versus ER-positive Breast Cancer. *Cell Cycle*. 2017 Feb 16;16(4):312–8.
297. Mohammadzadeh R, Saeid Harouyan M, Ale Taha SM. Silencing of bach1 gene by small interfering RNA–mediation regulates invasive and expression level of miR-203, miR-145, matrix metalloproteinase-9, and CXCR4 receptor in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Tumor Biology*. 2017 Mar 28;39(3):101042831769592.
298. Aletaha M, Mansoori B, Mohammadi A, Fazeli M, Baradaran B. Therapeutic effects of bach1 siRNA on human breast adenocarcinoma cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 Apr;88:34–42.
299. Xi J, Feng J, Li Q, Li X, Zeng S. The long non-coding RNA IncFOXO1 suppresses growth of human breast cancer cells through association with BAP1. *Int J Oncol*. 2017 May;50(5):1663–70.
300. Fukuda T, Tsuruga T, Kuroda T, Nishikawa H, Ohta T. Functional Link between BRCA1 and BAP1 through Histone H2A, Heterochromatin and DNA Damage Response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2016 Jan 5;16(2):101–9.
301. Birkbak NJ, Li Y, Pathania S, Greene-Colozzi A, Dreze M, Bowman-Colin C, et al. Overexpression of BLM promotes DNA damage and increased sensitivity to platinum salts in triple-negative breast and serous ovarian cancers. *Annals of Oncology*. 2018 Apr;29(4):903–9.
302. Arora A, Abdel-Fatah TMA, Agarwal D, Doherty R, Moseley PM, Aleskandarany MA, et al. Transcriptomic and Protein Expression Analysis Reveals Clinicopathological Significance of Bloom Syndrome Helicase (BLM) in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2015 Apr 1;14(4):1057–65.
303. Cano-González A, Mauro-Lizcano M, Iglesias-Serret D, Gil J, López-Rivas A. Involvement of both caspase-8 and Noxa-activated pathways in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in triple-negative breast tumor cells. *Cell Death Dis*. 2018 Jan 26;9(2):134.

304. Aghababazadeh M, Dorraki N, Javan FA, Fattahi AS, Gharib M, Pasdar A. Downregulation of Caspase 8 in a group of Iranian breast cancer patients – A pilot study. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2017 Dec;29(4):191–5.
305. Patani N, Martin L, Dowsett M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *Int J Cancer.* 2013 Jul 8;133(1):1–13.
306. Carroll BL, Bonica J, Shamseddine AA, Hannun YA, Obeid LM. A role for caspase-2 in sphingosine kinase 1 proteolysis in response to doxorubicin in breast cancer cells – implications for the <sc>CHK</sc> 1-suppressed pathway. *FEBS Open Bio.* 2018 Jan 8;8(1):27–40.
307. Zhou Z rui, Yang Z zhi, Wang S jia, Zhang L, Luo J rui, Feng Y, et al. The Chk1 inhibitor MK-8776 increases the radiosensitivity of human triple-negative breast cancer by inhibiting autophagy. *Acta Pharmacol Sin.* 2017 Apr 2;38(4):513–23.
308. Bardia A, Gucalp A, DaCosta N, Gabrail N, Danso M, Ali H, et al. Phase 1 study of seviteronel, a selective CYP17 lyase and androgen receptor inhibitor, in women with estrogen receptor-positive or triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Aug 9;171(1):111–20.
309. Surichan S, Arroo RR, Tsatsakis AM, Androutsopoulos VP. Tangeretin inhibits the proliferation of human breast cancer cells via CYP1A1/CYP1B1 enzyme induction and CYP1A1/CYP1B1-mediated metabolism to the product 4' hydroxy tangeretin. *Toxicology in Vitro.* 2018 Aug;50:274–84.
310. Thota K, Prasad K, Basaveswara Rao M V. Detection of Cytochrome P450 Polymorphisms in Breast Cancer Patients May Impact on Tamoxifen Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 Feb 26;19(2):343–50.
311. Abraham JE, Maranian MJ, Driver KE, Platte R, Kalmyrzaev B, Baynes C, et al. CYP2D6 gene variants: association with breast cancer specific survival in a cohort of breast cancer patients from the United Kingdom treated with adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Research.* 2010 Aug 23;12(4):R64.
312. De Mattos-Arruda L, Ng CKY, Piscuoglio S, Gonzalez-Cao M, Lim RS, De Filippo MR, et al. Genetic heterogeneity and actionable mutations in HER2-positive primary breast cancers and their brain metastases. *Oncotarget.* 2018 Apr 17;9(29):20617–30.
313. Vijai J, Topka S, Villano D, Ravichandran V, Maxwell KN, Maria A, et al. A Recurrent ERCC3 Truncating Mutation Confers Moderate Risk for Breast Cancer. *Cancer Discov.* 2016 Nov 1;6(11):1267–75.

314. Lettlova S, Brynychova V, Blecha J, Vrana D, Vondrusova M, Soucek P, et al. MiR-301a-3p Suppresses Estrogen Signaling by Directly Inhibiting ESR1 in ER $\alpha$  Positive Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;46(6):2601–15.
315. Pejerrey SM, Dustin D, Kim JA, Gu G, Rechoum Y, Fuqua SAW. The Impact of ESR1 Mutations on the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Horm Cancer*. 2018 Aug 7;9(4):215–28.
316. Lipphardt MF, Deryal M, Ong MF, Schmidt W, Mahlkecht U. ESR1 single nucleotide polymorphisms predict breast cancer susceptibility in the central European Caucasian population. *Int J Clin Exp Med*. 2013;6(4):282–8.
317. Yuan ZY, Dai T, Wang SS, Peng RJ, Li XH, Qin T, et al. Overexpression of ETV4 protein in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *Onco Targets Ther*. 2014 Sep;1733.
318. Wang S, Beeghly-Fadiel A, Cai Q, Cai H, Guo X, Shi L, et al. Gene expression in triple-negative breast cancer in relation to survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Aug 10;171(1):199–207.
319. Lewis AG, Flanagan J, Marsh A, Pupo GM, Mann G, Spurdle AB, et al. Mutation analysis of FANCD2, BRIP1/BACH1, LMO4 and SFN in familial breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2005 Oct 21;7(6):R1005.
320. Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet*. 2007 Oct;8(10):735–48.
321. Ellingson MS, Hart SN, Kalari KR, Suman V, Schahl KA, Dockter TJ, et al. Exome sequencing reveals frequent deleterious germline variants in cancer susceptibility genes in women with invasive breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Sep 22;153(2):435–43.
322. Sung PL, Wen KC, Chen YJ, Chao TC, Tsai YF, Tseng LM, et al. The frequency of cancer predisposition gene mutations in hereditary breast and ovarian cancer patients in Taiwan: From BRCA1/2 to multi-gene panels. *PLoS One*. 2017 Sep 29;12(9):e0185615.
323. Campbell TM, Castro MAA, de Oliveira KG, Ponder BAJ, Meyer KB. ER $\alpha$  Binding by Transcription Factors NFIB and YBX1 Enables FGFR2 Signaling to Modulate Estrogen Responsiveness in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2018 Jan 15;78(2):410–21.

324. Lei H, Deng CX. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Signaling in Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13(9):1163–71.
325. Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M, Hankinson SE, et al. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet*. 2007 Jul 27;39(7):870–4.
326. Liang J, Chen P, Hu Z, Zhou X, Chen L, Li M, et al. Genetic variants in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) contribute to susceptibility of breast cancer in Chinese women. *Carcinogenesis*. 2008 Aug 19;29(12):2341–6.
327. Salehi Z, Afzali S, Shabanipour S, Rahimi A. Evaluation of FGFR2 gene polymorphism in women with breast cancer. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2015 May 28;61(2):94–7.
328. Scannell Bryan M, Argos M, Andrulis IL, Hopper JL, Chang-Claude J, Malone KE, et al. Germline Variation and Breast Cancer Incidence: A Gene-Based Association Study and Whole-Genome Prediction of Early-Onset Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2018 Sep 1;27(9):1057–64.
329. Xu M, Chen S, Yang W, Cheng X, Ye Y, Mao J, et al. FGFR4 Links Glucose Metabolism and Chemotherapy Resistance in Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;47(1):151–60.
330. Mansoor Q, Fayyaz S, Farooqi AA, Bhatti S, Ismail M. Re-evaluating the FGFR4 (G388R) germline mutation in different cancers in Pakistani population. *J Exp Ther Oncol*. 2013;10(3):215–7.
331. Miri M, Hemati S, Safari F, Tavassoli M. GGCn polymorphism of eRF3a/GSPT1 gene and breast cancer susceptibility. *Medical Oncology*. 2012 Sep 19;29(3):1581–5.
332. Zhang J, Wu Y, Hu X, Wang B, Wang L, Zhang S, et al. GSTT1, GSTP1, and GSTM1 genetic variants are associated with survival in previously untreated metastatic breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Dec 1;8(62):105905–14.
333. Syamala VS, Sreeja L, Syamala V, Raveendran PB, Balakrishnan R, Kuttan R, et al. Influence of germline polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and GSTP1 in familial versus sporadic breast cancer susceptibility and survival. *Fam Cancer*. 2008 Sep 14;7(3):213–20.

334. Marques O, Rosa A, Leite L, Faustino P, Rêma A, Martins da Silva B, et al. HFE Variants and the Expression of Iron-Related Proteins in Breast Cancer-Associated Lymphocytes and Macrophages. *Cancer Microenvironment*. 2016 Dec 27;9(2–3):85–91.
335. Zhang C, Lv GQ, Yu XM, Gu YL, Li JP, Du LF, et al. Current evidence on the relationship between HRAS1 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jul 9;128(2):467–72.
336. Li F, Zhao Y, Wei L, Li S, Liu J. Tumor-infiltrating Treg, MDSC, and IDO expression associated with outcomes of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 2018 Aug 3;19(8):695–705.
337. De Francesco EM, Sims AH, Maggiolini M, Sotgia F, Lisanti MP, Clarke RB. GPER mediates the angiocrine actions induced by IGF1 through the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway in the breast tumor microenvironment. *Breast Cancer Research*. 2017 Dec 6;19(1):129.
338. Puzone R, Pfeiffer U. SNP variants at the MAP3K1/SETD9 locus 5q11.2 associate with somatic PIK3CA variants in breast cancers. *European Journal of Human Genetics*. 2017 Mar 28;25(3):384–7.
339. Kuo SH, Yang SY, You SL, Lien HC, Lin CH, Lin PH, et al. Polymorphisms of ESR1, UGT1A1, HCN1, MAP3K1 and CYP2B6 are associated with the prognosis of hormone receptor-positive early breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Mar 28;8(13):20925–38.
340. Wu J, Mamidi TKK, Zhang L, Hicks C. Integrating Germline and Somatic Mutation Information for the Discovery of Biomarkers in Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Mar 23;16(6):1055.
341. Haupt S, Vijayakumaran R, Miranda PJ, Burgess A, Lim E, Haupt Y. The role of MDM2 and MDM4 in breast cancer development and prevention. *J Mol Cell Biol*. 2017 Feb 1;9(1):53–61.
342. Yang X, Wu J, Lu J, Liu G, Di G, Chen C, et al. Identification of a Comprehensive Spectrum of Genetic Factors for Hereditary Breast Cancer in a Chinese Population by Next-Generation Sequencing. *PLoS One*. 2015 Apr 30;10(4):e0125571.
343. Rose AM, Krishan A, Chakarova CF, Moya L, Chambers SK, Hollands M, et al. MSR1 repeats modulate gene expression and affect risk of breast and prostate cancer. *Annals of Oncology*. 2018 May;29(5):1292–303.

344. Cheng CC, Shi LH, Wang XJ, Wang SX, Wan XQ, Liu SR, et al. Stat3/Oct-4/c-Myc signal circuit for regulating stemness-mediated doxorubicin resistance of triple-negative breast cancer cells and inhibitory effects of WP1066. *Int J Oncol*. 2018 May 8;
345. Khan F, Ricks-Santi LJ, Zafar R, Kanaan Y, Naab T. Expression of p27 and c-Myc by immunohistochemistry in breast ductal cancers in African American women. *Ann Diagn Pathol*. 2018 Jun;34:170–4.
346. Wirtenberger M, Hemminki K, Försti A, Klaes R, Schmutzler RK, Grzybowska E, et al. c-MYC Asn11Ser is associated with increased risk for familial breast cancer. *Int J Cancer*. 2005 Nov 20;117(4):638–42.
347. Kim SH, Hahm ER, Arlotti JA, Samanta SK, Moura MB, Thorne SH, et al. Withaferin A inhibits in vivo growth of breast cancer cells accelerated by Notch2 knockdown. *Breast Cancer Res Treat*. 2016 May 21;157(1):41–54.
348. Yen WC, Fischer MM, Axelrod F, Bond C, Cain J, Cancilla B, et al. Targeting Notch Signaling with a Notch2/Notch3 Antagonist (Tarextumab) Inhibits Tumor Growth and Decreases Tumor-Initiating Cell Frequency. *Clinical Cancer Research*. 2015 May 1;21(9):2084–95.
349. Jamieson D, Cresti N, Bray J, Sludden J, Griffin MJ, Hawsawi NM, et al. Two minor NQO1 and NQO2 alleles predict poor response of breast cancer patients to adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide therapy. *Pharmacogenet Genomics*. 2011 Dec;21(12):808–19.
350. Menzel HJ, Sarmanova J, Soucek P, Berberich R, Grünwald K, Haun M, et al. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer*. 2004 May 27;90(10):1989–94.
351. Ruark E, Snape K, Humburg P, Loveday C, Bajrami I, Brough R, et al. Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature*. 2013 Jan 17;493(7432):406–10.
352. Lambros MB, Natrajan R, Geyer FC, Lopez-Garcia MA, Dedes KJ, Savage K, et al. PPM1D gene amplification and overexpression in breast cancer: a qRT-PCR and chromogenic in situ hybridization study. *Modern Pathology*. 2010 Oct;23(10):1334–45.
353. Bonache S, Esteban I, Moles-Fernández A, Tenés A, Duran-Lozano L, Montalban G, et al. Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian

- cancer Spanish families and clinical actionability of findings. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Dec 10;144(12):2495–513.
354. Zhou LP, Luan H, Dong XH, Jin GJ, Man DL, Shang H. Association Between XRCC5, 6 and 7 Gene Polymorphisms and the Risk of Breast Cancer: A HuGE Review and Meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012 Aug 31;13(8):3637–43.
355. Wang CY, Chang YC, Kuo YL, Lee KT, Chen PS, Cheung CHA, et al. Mutation of the PTCH1 gene predicts recurrence of breast cancer. *Sci Rep*. 2019 Nov 8;9(1):16359.
356. Reifenberger J, Arnold N, Kiechle M, Reifenberger G, Hauschild A. Coincident PTCH and BRCA1 Germline Mutations in a Patient with Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome and Familial Breast Cancer. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001 Mar;116(3):472–4.
357. Golmard L, Castéra L, Krieger S, Moncoutier V, Abidallah K, Tenreiro H, et al. Contribution of germline deleterious variants in the RAD51 paralogs to breast and ovarian cancers. *European Journal of Human Genetics*. 2017 Dec 8;25(12):1345–53.
358. Ding S ling, Yu JC, Chen ST, Hsu GC, Kuo SJ, Lin YH, et al. Genetic variants of BLM interact with RAD51 to increase breast cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 2009 Jan;30(1):43–9.
359. Kato M, Yano K, Matsuo F, Saito H, Katagiri T, Kurumizaka H, et al. Identification of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer. *J Hum Genet*. 2000 May 1;45(3):133–7.
360. Vachon CM, Scott CG, Fasching PA, Hall P, Tamimi RM, Li J, et al. Common Breast Cancer Susceptibility Variants in LSP1 and RAD51L1 Are Associated with Mammographic Density Measures that Predict Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2012 Jul 1;21(7):1156–66.
361. Johnson J, Healey S, Khanna KK, Chenevix-Trench G. Mutation analysis of RAD51L1 (RAD51B/REC2) in multiple-case, non-BRCA1/2 breast cancer families. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Aug 28;129(1):255–63.
362. Gaudet MM, Gammon MD, Santella RM, Britton JA, Teitelbaum SL, Eng SM, et al. MnSOD Val-9Ala Genotype, Pro- and Anti-oxidant Environmental Modifiers, and Breast Cancer Among Women on Long Island, New York. *Cancer Causes & Control*. 2005 Dec;16(10):1225–34.

363. Räsänen K, Itkonen O, Koistinen H, Stenman UH. Emerging Roles of SPINK1 in Cancer. *Clin Chem*. 2016 Mar 1;62(3):449–57.
364. Abe K, Kitago M, Kitagawa Y, Hirasawa A. Hereditary pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol*. 2021 Oct 2;26(10):1784–92.
365. Yu P, Shen X, Yang W, Zhang Y, Liu C, Huang T. ZEB1 stimulates breast cancer growth by up-regulating hTERT expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan;495(4):2505–11.
366. Ceja-Rangel HA, Sánchez-Suárez P, Castellanos-Juárez E, Peñaroja-Flores R, Arenas-Aranda DJ, Gariglio P, et al. Shorter telomeres and high telomerase activity correlate with a highly aggressive phenotype in breast cancer cell lines. *Tumor Biology*. 2016 Sep 12;37(9):11917–26.
367. Bagherpour M, Gharibzad K, Rassi H. Association of CDH1 and TERT Single-Nucleotide Polymorphisms with Susceptibility to Familial Breast Cancer Risk. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2018 Dec;37(6):239–44.
368. Aydin M, Sümbül AT, Camuz Hilaloğullari G, Bayram S. Genetic polymorphisms in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene polymorphisms do not associated with breast cancer in patients in a turkish population: hospital-based case-control study. *Cell Mol Biol*. 2018 Feb 28;64(3):108–15.
369. Oztas E, Kara H, Kara ZP, Aydogan MU, Uras C, Ozhan G. Association Between Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene Variations and Risk of Developing Breast Cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2016 Aug;20(8):459–64.
370. Inoue S, Lemonnier F, Mak TW. Roles of IDH1/2 and TET2 mutations in myeloid disorders. *Int J Hematol*. 2016 Jun 15;103(6):627–33.
371. Flores-Pérez A, Marchat LA, Rodríguez-Cuevas S, Bautista-Piña V, Hidalgo-Miranda A, Ocampo EA, et al. Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer. *Sci Rep*. 2016 Oct 5;6(1):34504.
372. Wei CY, Tan QX, Zhu X, Qin QH, Zhu FB, Mo QG, et al. Expression of CDKN1A/p21 and TGFBR2 in breast cancer and their prognostic significance. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):14619–29.
373. ZHANG M, GUO LL, CHENG Z, LIU RY, LU Y, QIAN Q, et al. A functional polymorphism of TGFBR2 is associated with risk of breast cancer with ER+,

- PR+, ER+PR+ and HER2- expression in women. *Oncol Lett.* 2011 Jul;2(4):653–8.
374. Ma X, Beeghly-Fadiel A, Lu W, Shi J, Xiang YB, Cai Q, et al. Pathway Analyses Identify TGFBR2 as Potential Breast Cancer Susceptibility Gene: Results from a Consortium Study among Asians. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2012 Jul 1;21(7):1176–84.
375. Lei J, Rudolph A, Moysich KB, Rafiq S, Behrens S, Goode EL, et al. Assessment of variation in immunosuppressive pathway genes reveals TGFBR2 to be associated with prognosis of estrogen receptor-negative breast cancer after chemotherapy. *Breast Cancer Research.* 2015 Feb 10;17(1):18.
376. Ji X, Peng Z, Li X, Yan Z, Yang Y, Qiao Z, et al. Neutralization of TNF $\alpha$  in tumor with a novel nanobody potentiates paclitaxel-therapy and inhibits metastasis in breast cancer. *Cancer Lett.* 2017 Feb;386:24–34.
377. An X, Xu F, Luo R, Zheng Q, Lu J, Yang Y, et al. The prognostic significance of topoisomerase II alpha protein in early stage luminal breast cancer. *BMC Cancer.* 2018 Dec 27;18(1):331.
378. Qin Z, Li S, Yao Z, Hong X, Wu B, Krausz KW, et al. Chemical inhibition and stable knock-down of efflux transporters leads to reduced glucuronidation of wushanicaritin in UGT1A1-overexpressing HeLa cells: the role of breast cancer resistance protein (BCRP) and multidrug resistance-associated proteins (MRPs) in the excretion of glucuronides. *Food Funct.* 2018;9(3):1410–23.
379. Romanowicz H, Pyziak Ł, Jabłoński F, Bryś M, Forma E, Smolarz B. Analysis of DNA Repair Genes Polymorphisms in Breast Cancer. *Pathology & Oncology Research.* 2017 Jan 29;23(1):117–23.
380. Sokolenko AP, Preobrazhenskaya E V., Aleksakhina SN, Iyevleva AG, Mitiushkina N V., Zaitseva OA, et al. Candidate gene analysis of BRCA1/2 mutation-negative high-risk Russian breast cancer patients. *Cancer Lett.* 2015 Apr;359(2):259–61.
381. Isakova J, Talaibekova E, Aldasheva N, Vinnikov D, Aldashev A. The association of polymorphic markers Arg399Gln of XRCC1 gene, Arg72Pro of TP53 gene and T309G of MDM2 gene with breast cancer in Kyrgyz females. *BMC Cancer.* 2017 Dec 13;17(1):758.
382. Krivokuca AM, Cavic MR, Malisic EJ, Rakobradovic JD, Kolarevic-Ivankovic D, Tomasevic ZI, et al. Polymorphisms in Cancer Susceptibility Genes XRCC1,

- RAD51 and TP53 and the Risk of Breast Cancer in Serbian Women. *Int J Biol Markers*. 2016 Jul 30;31(3):258–63.
383. Zhao M, Jia W, Jiang WG, Wang P, DU G, Cheng S, et al. ADAM29 Expression in Human Breast Cancer and its Effects on Breast Cancer Cells In Vitro. *Anticancer Res*. 2016 Mar;36(3):1251–8.
384. Zhang B, Li Y, Li L, Chen M, Zhang C, Zuo X bo, et al. Association study of susceptibility loci with specific breast cancer subtypes in Chinese women. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Aug 10;146(3):503–14.
385. Kadalayil L, Khan S, Nevanlinna H, Fasching PA, Couch FJ, Hopper JL, et al. Germline variation in ADAMTSL1 is associated with prognosis following breast cancer treatment in young women. *Nat Commun*. 2017 Nov 21;8(1):1632.
386. Bakshi D, Katoch A, Chakraborty S, Shah R, Sharma B, Bhat A, et al. ANKLE1 as New Hotspot Mutation for Breast Cancer in Indian Population and Has a Role in DNA Damage and Repair in Mammalian Cells. *Front Genet*. 2021 Jan 27;11.
387. Gansmo LB, Romundstad P, Hveem K, Vatten L, Nik-Zainal S, Lønning PE, et al. APOBEC3A/B deletion polymorphism and cancer risk. *Carcinogenesis*. 2018 Feb 9;39(2):118–24.
388. Marouf C, Göhler S, Filho MIDS, Hajji O, Hemminki K, Nadifi S, et al. Analysis of functional germline variants in APOBEC3 and driver genes on breast cancer risk in Moroccan study population. *BMC Cancer*. 2016 Dec 26;16(1):165.
389. Nik-Zainal S, Wedge DC, Alexandrov LB, Petljak M, Butler AP, Bolli N, et al. Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer. *Nat Genet*. 2014 May 13;46(5):487–91.
390. Cescon DW, Haibe-Kains B. DNA replication stress: a source of APOBEC3B expression in breast cancer. *Genome Biol*. 2016 Dec 30;17(1):202.
391. Wen WX, Soo JSS, Kwan PY, Hong E, Khang TF, Mariapun S, et al. Germline APOBEC3B deletion is associated with breast cancer risk in an Asian multi-ethnic cohort and with immune cell presentation. *Breast Cancer Research*. 2016 Dec 27;18(1):56.
392. Saadat M. Apolipoprotein E (APOE) Polymorphisms and Susceptibility to Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Cancer Res Treat*. 2012 Jun 30;44(2):121–6.

393. Moysich KB, Freudenheim JL, Baker JA, Ambrosone CB, Bowman ED, Schisterman EF, et al. Apolipoprotein E genetic polymorphism, serum lipoproteins, and breast cancer risk. *Mol Carcinog*. 2000 Jan;27(1):2–9.
394. Qin Z, Xue J, He Y, Ma H, Jin G, Chen J, et al. Potentially functional polymorphisms in ATG10 are associated with risk of breast cancer in a Chinese population. *Gene*. 2013 Sep;527(2):491–5.
395. Engel C, Versmold B, Wappenschmidt B, Simard J, Easton DF, Peock S, et al. Association of the Variants CASP8 D302H and CASP10 V410I with Breast and Ovarian Cancer Risk in *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2010 Nov 1;19(11):2859–68.
396. Oh JE, Kim MS, Ahn CH, Kim SS, Han JY, Lee SH, et al. Mutational analysis of CASP10 gene in colon, breast, lung and hepatocellular carcinomas. *Pathology*. 2010 Jan;42(1):73–6.
397. Wang H, Xie YT, Han JY, Ruan Y, Song AP, Zheng LY, et al. Genetic polymorphisms in centrobilin and Nek2 are associated with breast cancer susceptibility in a Chinese Han population. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Nov 23;136(1):241–51.
398. Tang L, Xu J, Wei F, Wang L, Nie WW, Chen LB, et al. Association of STXBP4/COX11 rs6504950 (G>A) Polymorphism with Breast Cancer Risk: Evidence from 17,960 Cases and 22,713 Controls. *Arch Med Res*. 2012 Jul;43(5):383–8.
399. Hein A, Rack B, Li L, Ekici A, Reis A, Lux M, et al. Genetic Breast Cancer Susceptibility Variants and Prognosis in the Prospectively Randomized SUCCESS A Study. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2017 Jun 28;77(06):651–9.
400. García-Martínez A, Gamboa-Loira B, Tejero ME, Sierra-Santoyo A, Cebrián ME, López-Carrillo L. CYP1A1, CYP1B1, GSTM1 and GSTT1 genetic variants and breast cancer risk in Mexican women. *Salud Publica Mex*. 2017 Aug 25;59(5, sep-oct):540.
401. Li J, Jing R, Wei H, Wang M, Xiaowei Q, Liu H, et al. Germline mutations in 40 cancer susceptibility genes among Chinese patients with high hereditary risk breast cancer. *Int J Cancer*. 2019 Jan 15;144(2):281–9.
402. Lu Y, Zhu X, Zhang C, Jiang K, Huang C, Qin X. Role of CYP2E1 polymorphisms in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cell Int*. 2017 Dec 7;17(1):11.

403. Chong ETJ, Goh LPW, See EUH, Chuah JA, Chua KH, Lee PC. Association of CYP2E1, STK15 and XRCC1 Polymorphisms with Risk of Breast Cancer in Malaysian Women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016 Mar 7;17(2):647–53.
404. Stone J, Thompson DJ, dos Santos Silva I, Scott C, Tamimi RM, Lindstrom S, et al. Novel Associations between Common Breast Cancer Susceptibility Variants and Risk-Predicting Mammographic Density Measures. *Cancer Res*. 2015 Jun 15;75(12):2457–67.
405. Purrington KS, Slager S, Eccles D, Yannoukakos D, Fasching PA, Miron P, et al. Genome-wide association study identifies 25 known breast cancer susceptibility loci as risk factors for triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis*. 2014 May;35(5):1012–9.
406. Pelttari LM, Kinnunen L, Kiiski JI, Khan S, Blomqvist C, Aittomäki K, et al. Screening of HELQ in breast and ovarian cancer families. *Fam Cancer*. 2016 Jan 8;15(1):19–23.
407. Garner CP, Ding YC, John EM, Ingles SA, Olopade OI, Huo D, et al. Genetic variation in IGFBP2 and IGFBP5 is associated with breast cancer in populations of African descent. *Hum Genet*. 2008 Apr 22;123(3):247–55.
408. Catsburg C, Gunter MJ, Tinker L, Chlebowski RT, Pollak M, Strickler HD, et al. Serum IGFBP-2 and Risk of Atypical Hyperplasia of the Breast. *J Cancer Epidemiol*. 2015;2015:1–7.
409. Dean SJR, Perks CM, Holly JMP, Bhoo-Pathy N, Looi LM, Mohammed NAT, et al. Loss of PTEN Expression Is Associated With IGFBP2 Expression, Younger Age, and Late Stage in Triple-Negative Breast Cancer. *Am J Clin Pathol*. 2014 Mar 1;141(3):323–33.
410. Neuhausen SL, Brummel S, Ding YC, Singer CF, Pfeiler G, Lynch HT, et al. Genetic variation in insulin-like growth factor signaling genes and breast cancer risk among BRCA1 and BRCA2 carriers. *Breast Cancer Research*. 2009 Oct 20;11(5):R76.
411. Wyszynski A, Hong CC, Lam K, Michailidou K, Lytle C, Yao S, et al. An intergenic risk locus containing an enhancer deletion in 2q35 modulates breast cancer risk by deregulating IGFBP5 expression. *Hum Mol Genet*. 2016 Sep 1;25(17):3863–76.

412. Sureshbabu A, Okajima H, Yamanaka D, Tonner E, Shastri S, Maycock J, et al. IGFBP-5 induces cell adhesion, increases cell survival and inhibits cell migration in MCF-7 human breast cancer cells. *J Cell Sci.* 2012 Jan 1;
413. Karakus N, Kara N, Ulusoy AN, Ozaslan C, Tural S, Okan I. Evaluation of CYP17A1 and LEP Gene Polymorphisms in Breast Cancer. *Oncol Res Treat.* 2015;38(9):418–22.
414. Sawyer E, Roylance R, Petridis C, Brook MN, Nowinski S, Papouli E, et al. Genetic Predisposition to In Situ and Invasive Lobular Carcinoma of the Breast. *PLoS Genet.* 2014 Apr 17;10(4):e1004285.
415. Tang J, Li H, Luo J, Mei H, Peng L, Li X. The LSP1 rs3817198 T > C polymorphism contributes to increased breast cancer risk: a meta-analysis of twelve studies. *Oncotarget.* 2016 Sep 27;7(39):63960–7.
416. Têtu B, Brisson J, Wang CS, Lapointe H, Beaudry G, Blanchette C, et al. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast Cancer Research.* 2006 Jun 15;8(3):R28.
417. Vos MC, van Tilborg A, Brands WJ, Boll D, van Hamont D, van der Putten H, et al. Polymorphisms in MMP-14 and MMP-2 genes and ovarian cancer survival. *Cancer Biomarkers.* 2019 Jul 23;25(3):233–41.
418. Chu C, Liu X, Bai X, Zhao T, Wang M, Xu R, et al. MiR-519d suppresses breast cancer tumorigenesis and metastasis via targeting MMP3. *Int J Biol Sci.* 2018;14(2):228–36.
419. Mehner C, Miller E, Nassar A, Bamlet WR, Radisky ES, Radisky DC. Tumor cell expression of MMP3 as a prognostic factor for poor survival in pancreatic, pulmonary, and mammary carcinoma. *Genes Cancer.* 2015 Dec 16;6(11–12):480–9.
420. Slattery ML, John E, Torres-Mejia G, Stern M, Lundgreen A, Hines L, et al. Matrix Metalloproteinase Genes Are Associated with Breast Cancer Risk and Survival: The Breast Cancer Health Disparities Study. *PLoS One.* 2013 May 16;8(5):e63165.
421. Guo X, Lin W, Bao J, Cai Q, Pan X, Bai M, et al. A Comprehensive cis-eQTL Analysis Revealed Target Genes in Breast Cancer Susceptibility Loci Identified in Genome-wide Association Studies. *The American Journal of Human Genetics.* 2018 May;102(5):890–903.

422. Quigley DA, Fiorito E, Nord S, Van Loo P, Alnæs GG, Fleischer T, et al. The 5p12 breast cancer susceptibility locus affects MRPS30 expression in estrogen-receptor positive tumors. *Mol Oncol*. 2014 Mar 3;8(2):273–84.
423. Stepp MW, Doll MA, Carlisle SM, States JC, Hein DW. Genetic and small molecule inhibition of arylamine N-acetyltransferase 1 reduces anchorage-independent growth in human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Mol Carcinog*. 2018 Apr 3;57(4):549–58.
424. You D, Zhao H, Wang Y, Jiao Y, Lu M, Yan S. Acetylation Enhances the Promoting Role of AIB1 in Breast Cancer Cell Proliferation. *Mol Cells*. 2016 Sep;39(9):663–8.
425. Alkner S, Bendahl PO, Ehinger A, Lövgren K, Rydén L, Fernö M. Prior Adjuvant Tamoxifen Treatment in Breast Cancer Is Linked to Increased AIB1 and HER2 Expression in Metachronous Contralateral Breast Cancer. *PLoS One*. 2016 Mar 9;11(3):e0150977.
426. Hughes DJ, Ginolhac SM, Coupier I, Barjhoux L, Gaborieau V, Bressac-de-Paillerets B, et al. Breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and polyglutamine repeat length in the *AIB1* gene. *Int J Cancer*. 2005 Nov 16;117(2):230–3.
427. Moniz LS, Stambolic V. Nek10 mediates G2/M cell cycle arrest and MEK autoactivation in response to UV irradiation. *Mol Cell Biol*. 2011 Jan 1;31(1):30–42.
428. Milne RL, Burwinkel B, Michailidou K, Arias-Perez JI, Zamora MP, Menéndez-Rodríguez P, et al. Common non-synonymous SNPs associated with breast cancer susceptibility: findings from the Breast Cancer Association Consortium. *Hum Mol Genet*. 2014 Nov 15;23(22):6096–111.
429. Jiao X, Aravidis C, Marikkannu R, Rantala J, Picelli S, Adamovic T, et al. PHIP - a novel candidate breast cancer susceptibility locus on 6q14.1. *Oncotarget*. 2017 Nov 28;8(61):102769–82.
430. Marsh A, Healey S, Lewis A, Spurdle AB, Kedda MA, Khanna KK, et al. Mutation analysis of five candidate genes in familial breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Sep 27;105(3):377–89.

431. Araki K, Miyoshi Y. Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2018 Jul 31;25(4):392–401.
432. Riahi A, Radmanesh H, Schürmann P, Bogdanova N, Geffers R, Meddeb R, et al. Exome sequencing and case–control analyses identify *RCC1* as a candidate breast cancer susceptibility gene. *Int J Cancer*. 2018 Jun 15;142(12):2512–7.
433. Haggag YA, Matchett KB, Dakir EH, Buchanan P, Osman MA, Elgizawy SA, et al. Nano-encapsulation of a novel anti-Ran-GTPase peptide for blockade of regulator of chromosome condensation 1 (*RCC1*) function in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Pharm*. 2017 Apr;521(1–2):40–53.
434. Lee S, Axelsen T V, Andersen AP, Vahl P, Pedersen SF, Boedtkjer E. Disrupting  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ –cotransporter NBCn1 (*Slc4a7*) delays murine breast cancer development. *Oncogene*. 2016 Apr 21;35(16):2112–22.
435. Lee S, Mele M, Vahl P, Christiansen PM, Jensen VED, Boedtkjer E.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ –cotransport is functionally upregulated during human breast carcinogenesis and required for the inverted pH gradient across the plasma membrane. *Pflugers Arch*. 2015 Feb 2;467(2):367–77.
436. Han W, Woo JH, Yu JH, Lee MJ, Moon HG, Kang D, et al. Common Genetic Variants Associated with Breast Cancer in Korean Women and Differential Susceptibility According to Intrinsic Subtype. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2011 May 1;20(5):793–8.
437. Long J, Shu XO, Cai Q, Gao YT, Zheng Y, Li G, et al. Evaluation of Breast Cancer Susceptibility Loci in Chinese Women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2010 Sep 1;19(9):2357–65.
438. Lu XP, Hu GN, Du JQ, Li HQ. *TCF7L2* gene polymorphisms and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(1):2860–7.
439. Min W, Liu X, Lu Y, Gong Z, Wang M, Lin S, et al. Association of transcription factor 7-like 2 gene polymorphisms with breast cancer risk in northwest Chinese women. *Oncotarget*. 2016 Nov 22;7(47):77175–82.
440. Zheng T, Wang A, Hu D, Wang Y. Molecular mechanisms of breast cancer metastasis by gene expression profile analysis. *Mol Med Rep*. 2017 Oct;16(4):4671–7.

441. Wang Y, Wang R, Jin VX. Inference of hierarchical regulatory network of TCF7L2 binding sites in MCF7 cell line. *Int J Comput Biol Drug Des.* 2016;9(1/2):25.
442. Zhang C, Gao H, Li C, Tu J, Chen Z, Su W, et al. TGF $\beta$ 1 Promotes Breast Cancer Local Invasion and Liver Metastasis by Increasing the CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>-</sup> Subpopulation. *Technol Cancer Res Treat.* 2018 Jan 1;17.
443. Zhao M, Wang Y, Du C, Liu Y, Zhang N, Luo F. Aspirin and metformin exhibit antitumor activity in murine breast cancer. *Oncol Rep.* 2018 Jan 4;
444. Vitiello GAF, Guembarovski RL, Hirata BKB, Amarante MK, de Oliveira CEC, de Oliveira KB, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1) polymorphisms and haplotype structures have dual roles in breast cancer pathogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018 Apr 23;144(4):645–55.
445. Joshi NN, Kale MD, Hake SS, Kannan S. Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling Pathway Associated Gene Polymorphisms May Explain Lower Breast Cancer Risk in Western Indian Women. *PLoS One.* 2011 Aug 4;6(8):e21866.
446. Scollen S, Luccarini C, Baynes C, Driver K, Humphreys MK, Garcia-Closas M, et al. TGF- $\beta$  Signaling Pathway and Breast Cancer Susceptibility. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2011 Jun 1;20(6):1112–9.
447. Chen XH, Li XQ, Chen Y, Feng YM. Risk of aggressive breast cancer in women of Han nationality carrying TGFB1 rs1982073 C allele and FGFR2 rs1219648 G allele in North China. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jan 17;125(2):575–82.
448. Ma X, Chen C, Xiong H, Li Y. Transforming growth factor $\beta$ 1 L10P variant plays an active role on the breast cancer susceptibility in Caucasian: evidence from 10,392 cases and 11,697 controls. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Nov 27;124(2):453–7.
449. Zhou Y. Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes. *Carcinogenesis.* 2003 Dec 4;25(3):399–404.
450. Li L, Guo G, Wang F, Lv P, Zhu M, Gu Y, et al. TOX high mobility group box family member 3 rs3803662 and breast cancer risk. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(Suppl 1):S208–12.

451. HAN CC, YUE LL, YANG Y, JIAN BY, MA LW, LIU JC. TOX3 protein expression is correlated with pathological characteristics in breast cancer. *Oncol Lett*. 2016 Mar;11(3):1762–8.
452. Liao J, Chen Y, Zhu J, Wang Q, Mo Z. Polymorphisms in the TOX3/LOC643714 and risk of breast cancer in south China. *Int J Biol Markers*. 2018 Nov 23;33(4):492–9.
453. Tajbakhsh A, Javan FA, Rivandi M, Moezzi A, Abedini S, Asghari M, et al. Significant association of TOX3/LOC643714 locus-rs3803662 and breast cancer risk in a cohort of Iranian population. *Mol Biol Rep*. 2019 Feb 4;46(1):805–11.
454. Hsieh YC, Tu SH, Su CT, Cho EC, Wu CH, Hsieh MC, et al. A polygenic risk score for breast cancer risk in a Taiwanese population. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 May 15;163(1):131–8.
455. Lin Y, Fu F, Chen M, Huang M, Wang C. Associations of Two Common Genetic Variants with Breast Cancer Risk in a Chinese Population: A Stratified Interaction Analysis. *PLoS One*. 2014 Dec 22;9(12):e115707.
456. Elematore I, Gonzalez-Hormazabal P, Reyes JM, Blanco R, Bravo T, Peralta O, et al. Association of genetic variants at TOX3, 2q35 and 8q24 with the risk of familial and early-onset breast cancer in a South-American population. *Mol Biol Rep*. 2014 Jun 16;41(6):3715–22.
457. Cui J, Luo J, Kim YC, Snyder C, Becirovic D, Downs B, et al. Differences of Variable Number Tandem Repeats in XRCC5 Promoter Are Associated with Increased or Decreased Risk of Breast Cancer in BRCA Gene Mutation Carriers. *Front Oncol*. 2016 Apr 13;6.
458. Zhou JX, Yang X, Ning S, Wang L, Wang K, Zhang Y, et al. Identification of KANSARL as the first cancer predisposition fusion gene specific to the population of European ancestry origin. *Oncotarget*. 2017 Aug 1;8(31):50594–607.
459. Maris P, Blomme A, Palacios AP, Costanza B, Bellahcène A, Bianchi E, et al. Asporin Is a Fibroblast-Derived TGF- $\beta$ 1 Inhibitor and a Tumor Suppressor Associated with Good Prognosis in Breast Cancer. *PLoS Med*. 2015 Sep 1;12(9):e1001871.

460. Ojo D, Lin X, Wu Y, Cockburn J, Bane A, Tang D. Polycomb complex protein BMI1 confers resistance to tamoxifen in estrogen receptor positive breast cancer. *Cancer Lett.* 2018 Jul;426:4–13.
461. Han J, Choi YL, Kim H, Choi JY, Lee SK, Lee JE, et al. MMP11 and CD2 as novel prognostic factors in hormone receptor-negative, HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Jul 13;164(1):41–56.
462. Weber G, Chamorro CI, Granath F, Liljegren A, Zreika S, Saidak Z, et al. Human antimicrobial protein hCAP18/LL-37 promotes a metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Research.* 2009 Jan 30;11(1):R6.
463. Tutunea-Fatan E, Majumder M, Xin X, Lala PK. The role of CCL21/CCR7 chemokine axis in breast cancer-induced lymphangiogenesis. *Mol Cancer.* 2015 Dec 10;14(1):35.
464. Li X, Sun S, Li N, Gao J, Yu J, Zhao J, et al. High Expression of CCR7 Predicts Lymph Node Metastasis and Good Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2017;43(2):531–9.
465. Zhang Y, Yang C, Zhang M, Liu H, Gong C, Zhang J, et al. Interleukin enhancer-binding factor 3 and HOXC8 co-activate cadherin 11 transcription to promote breast cancer cells proliferation and migration. *Oncotarget.* 2017 Dec 8;8(64):107477–91.
466. Cyr-Depauw C, Northey JJ, Tabariès S, Annis MG, Dong Z, Cory S, et al. Chordin-Like 1 Suppresses Bone Morphogenetic Protein 4-Induced Breast Cancer Cell Migration and Invasion. *Mol Cell Biol.* 2016 May 1;36(10):1509–25.
467. Jiang YZ, Liu YR, Xu XE, Jin X, Hu X, Yu KD, et al. Transcriptome Analysis of Triple-Negative Breast Cancer Reveals an Integrated mRNA-lncRNA Signature with Predictive and Prognostic Value. *Cancer Res.* 2016 Apr 15;76(8):2105–14.
468. Bao Y, Wang L, Shi L, Yun F, Liu X, Chen Y, et al. Transcriptome profiling revealed multiple genes and ECM-receptor interaction pathways that may be associated with breast cancer. *Cell Mol Biol Lett.* 2019 Dec 6;24(1):38.
469. Ozkaya AB, Ak H, Aydin HH. High concentration calcitriol induces endoplasmic reticulum stress related gene profile in breast cancer cells. *Biochemistry and Cell Biology.* 2017 Apr;95(2):289–94.
470. Malvia S, Bagadi SAR, Pradhan D, Chintamani C, Bhatnagar A, Arora D, et al. Study of Gene Expression Profiles of Breast Cancers in Indian Women. *Sci Rep.* 2019 Jul 10;9(1):10018.

471. Cheng H, Li W, Gan C, Zhang B, Jia Q, Wang K. The COMT (rs165599) gene polymorphism contributes to chemotherapy-induced cognitive impairment in breast cancer patients. *Am J Transl Res.* 2016;8(11):5087–97.
472. Bühling F, Fengler A, Brandt W, Welte T, Ansorge S, Nagler DK. Review: Novel Cysteine Proteases of the Papain Family. In: *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*. Boston: Kluwer Academic Publishers; p. 241–54.
473. Park SB, Hwang KT, Chung CK, Roy D, Yoo C. Causal Bayesian gene networks associated with bone, brain and lung metastasis of breast cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2020 Dec 20;37(6):657–74.
474. Ahirwar DK, Nasser MW, Ouseph MM, Elbaz M, Cuitiño MC, Kladney RD, et al. Fibroblast-derived CXCL12 promotes breast cancer metastasis by facilitating tumor cell intravasation. *Oncogene.* 2018 Aug 3;37(32):4428–42.
475. Karami S, Han Y, Pande M, Cheng I, Rudd J, Pierce BL, et al. Telomere structure and maintenance gene variants and risk of five cancer types. *Int J Cancer.* 2016 Dec 15;139(12):2655–70.
476. Lou Y, Fallah Y, Yamane K, Berg PE. BP1, a Potential Biomarker for Breast Cancer Prognosis. *Biomark Med.* 2018 May 26;12(5):535–45.
477. Kim YJ, Sung M, Oh E, Vrancken M Van, Song JY, Jung K, et al. Engrailed 1 overexpression as a potential prognostic marker in quintuple-negative breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2018 Apr 3;19(4):335–45.
478. Horne HN, Sherman ME, Garcia-Closas M, Pharoah PD, Blows FM, Yang XR, et al. Breast cancer susceptibility risk associations and heterogeneity by E-cadherin tumor tissue expression. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Jan 30;143(1):181–7.
479. Bayraktar R, Ivan C, Bayraktar E, Kanlikilicer P, Kabil NN, Kahraman N, et al. Dual Suppressive Effect of miR-34a on the FOXM1/eEF2-Kinase Axis Regulates Triple-Negative Breast Cancer Growth and Invasion. *Clinical Cancer Research.* 2018 Sep 1;24(17):4225–41.
480. Cui P, Zhao Y, Chu X, He N, Zheng H, Han J, et al. SNP rs2071095 in LincRNA H19 is associated with breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2018 Aug 8;171(1):161–71.
481. Zhu QN, Wang G, Guo Y, Peng Y, Zhang R, Deng JL, et al. LncRNA H19 is a major mediator of doxorubicin chemoresistance in breast cancer cells through a cullin4A-MDR1 pathway. *Oncotarget.* 2017 Nov 3;8(54):91990–2003.

482. huang Y, Jian W, Zhao J, Wang G. Overexpression of HDAC9 is associated with poor prognosis and tumor progression of breast cancer in Chinese females. *Onco Targets Ther.* 2018 Apr;Volume 11:2177–84.
483. Su YA, Yang J, Tao L, Nguyen H, He P. Undetectable and Decreased Expression of KIAA1949 (Phostensin) Encoded on Chromosome 6p21.33 in Human Breast Cancers Revealed by Transcriptome Analysis. *J Cancer.* 2010;38–50.
484. Zhang Y, Zhang Q, Cao Z, Huang Y, Cheng S, Pang D. HOXD3 Plays a Critical Role in Breast Cancer Stemness and Drug Resistance. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2018;46(4):1737–47.
485. Kopparapu PK, Tinzi M, Anagnostaki L, Persson JL, Dizayi N. Expression and localization of serotonin receptors in human breast cancer. *Anticancer Res.* 2013 Feb;33(2):363–70.
486. Xu HF, Huang TJ, Yang Q, Xu L, Lin F, Lang YH, et al. Candidate tumor suppressor gene IRF6 is involved in human breast cancer pathogenesis via modulating PI3K-regulatory subunit PIK3R2 expression. *Cancer Manag Res.* 2019 Jun;Volume 11:5557–72.
487. Brooks DLP, Schwab LP, Krutilina R, Parke DN, Sethuraman A, Hoogewijs D, et al. ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models. *Mol Cancer.* 2016 Dec 22;15(1):26.
488. Klahan S, Wu MS, Hsi E, Huang CC, Hou MF, Chang WC. Computational analysis of mRNA expression profiles identifies the ITG family and PIK3R3 as crucial genes for regulating triple negative breast cancer cell migration. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–8.
489. Li WX, Sha RL, Bao JQ, Luan W, Su RL, Sun SR. Expression of long non-coding RNA linc-ITGB1 in breast cancer and its influence on prognosis and survival. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Aug;21(15):3397–401.
490. Lu H, Hu L, Yu L, Wang X, Urvalek AM, Li T, et al. KLF8 and FAK cooperatively enrich the active MMP14 on the cell surface required for the metastatic progression of breast cancer. *Oncogene.* 2014 May 29;33(22):2909–17.
491. Kar SP, Beesley J, Amin AI, Olama A, Michailidou K, Tyrer J, Kote-Jarai Zs, et al. Genome-Wide Meta-Analyses of Breast, Ovarian, and Prostate Cancer

- Association Studies Identify Multiple New Susceptibility Loci Shared by at Least Two Cancer Types. *Cancer Discov.* 2016 Sep 1;6(9):1052–67.
492. Ghossaini M, Song H, Koessler T, Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Driver KE, et al. Multiple Loci With Different Cancer Specificities Within the 8q24 Gene Desert. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 2008 Jul 2;100(13):962–6.
493. Wang D, Wu P, Wang H, Zhu L, Zhao W, Lu Y. SIN1 promotes the proliferation and migration of breast cancer cells by Akt activation. *Biosci Rep.* 2016 Dec 1;36(6).
494. Kpetemey M, Chaudhary P, Van Treuren T, Vishwanatha JK. MIEN1 drives breast tumor cell migration by regulating cytoskeletal-focal adhesion dynamics. *Oncotarget.* 2016 Aug 23;7(34):54913–24.
495. Zhao HB, Zhang XF, Wang HB, Zhang MZ. Migration and invasion enhancer 1 (MIEN1) is overexpressed in breast cancer and is a potential new therapeutic molecular target. *Genetics and Molecular Research.* 2017;16(1).
496. Wang T, Marei HE. Landscape of NAT2 polymorphisms among breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2016 Feb;77:191–6.
497. Darabi H, McCue K, Beesley J, Michailidou K, Nord S, Kar S, et al. Polymorphisms in a Putative Enhancer at the 10q21.2 Breast Cancer Risk Locus Regulate NRBF2 Expression. *The American Journal of Human Genetics.* 2015 Jul;97(1):22–34.
498. Kumar RV, Panwar D, Amirtham U, Premalata CS, Gopal C, Narayana SM, et al. Estrogen receptor, Progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor-2 status in breast cancer: A retrospective study of 5436 women from a regional cancer center in South India. *South Asian J Cancer.* 2018 Jan 22;07(01):07–10.
499. Naderi A. Prolactin-Induced Protein in Breast Cancer. In 2015. p. 189–200.
500. Absmaier M, Napieralski R, Schuster T, Aubele M, Walch A, Magdolen V, et al. PITX2 DNA-methylation predicts response to anthracycline-based adjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer patients. *Int J Oncol.* 2018 Jan 8;
501. Li Y, Chu J, Li J, Feng W, Yang F, Wang Y, et al. Cancer/testis antigen-Plac1 promotes invasion and metastasis of breast cancer through Furin/  
<sc>NICD</sc> / <sc>PTEN</sc> signaling pathway. *Mol Oncol.* 2018 Aug 14;12(8):1233–48.

502. Xu B, Zhang X, Wang S, Shi B. MiR-449a suppresses cell migration and invasion by targeting PLAGL2 in breast cancer. *Pathol Res Pract*. 2018 May;214(5):790–5.
503. Du WW, Fang L, Li M, Yang X, Liang Y, Peng C, et al. MicroRNA miR-24 Enhances Tumor Invasion and Metastasis by Targeting PTPN9 and PTPRF to Promote EGF Signaling. *J Cell Sci*. 2013 Jan 1;
504. Sun L, Xu X, Chen Y, Zhou Y, Tan R, Qiu H, et al. Rab34 regulates adhesion, migration, and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 2018 Jul 6;37(27):3698–714.
505. Bjarnadottir O, Kimbung S, Johansson I, Veerla S, Jönsson M, Bendahl PO, et al. Global Transcriptional Changes Following Statin Treatment in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015 Aug 1;21(15):3402–11.
506. Wang S, Liang Y, Chang W, Hu B, Zhang Y. Triple Negative Breast Cancer Depends on Sphingosine Kinase 1 (SphK1)/Sphingosine-1-Phosphate (S1P)/Sphingosine 1-Phosphate Receptor 3 (S1PR3)/Notch Signaling for Metastasis. *Medical Science Monitor*. 2018 Apr 1;24:1912–23.
507. Manni A, Richie JP, Schetter SE, Calcagnotto A, Trushin N, Aliaga C, et al. Stearoyl-CoA desaturase-1, a novel target of omega-3 fatty acids for reducing breast cancer risk in obese postmenopausal women. *Eur J Clin Nutr*. 2017 Jun 1;71(6):762–5.
508. Jiang H, Chen C, Sun Q, Wu J, Qiu L, Gao C, et al. The role of semaphorin 4D in tumor development and angiogenesis in human breast cancer. *Onco Targets Ther*. 2016 Sep;Volume 9:5737–50.
509. Zhou H, Lv Q, Guo Z. Transcriptomic signature predicts the distant relapse in patients with ER+ breast cancer treated with tamoxifen for five years. *Mol Med Rep*. 2017 Dec 8;
510. Fan LC, Jeng YM, Lu YT, Lien HC. SPOCK1 Is a Novel Transforming Growth Factor- $\beta$ -Induced Myoepithelial Marker That Enhances Invasion and Correlates with Poor Prognosis in Breast Cancer. *PLoS One*. 2016 Sep 14;11(9):e0162933.
511. Masoodi TA, Banaganapalli B, Vaidyanathan V, Talluri VR, Shaik NA. Computational Analysis of Breast Cancer GWAS Loci Identifies the Putative Deleterious Effect of *STXBP4* and *ZNF404* Gene Variants. *J Cell Biochem*. 2017 Dec 25;118(12):4296–307.

512. Shimada H, Nakashima K, Ochiai T, Nabeya Y, Takiguchi M, Nomura F, et al. Serological identification of tumor antigens of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2005 Jan;26(1):77–86.
513. Liu J, Ye L, Li Q, Wu X, Wang B, Ouyang Y, et al. Synaptopodin-2 suppresses metastasis of triple-negative breast cancer via inhibition of YAP/TAZ activity. *J Pathol*. 2018 Jan 14;244(1):71–83.
514. Wang G, Zeng Y, Chen S, Li D, Li W, Zhou Y, et al. Localization of TFPI-2 in the nucleus modulates MMP-2 gene expression in breast cancer cells. *Sci Rep*. 2017 Oct 19;7(1):13575.
515. Gao W, Ye G, Duan X, Yang X, Yang VC. Transferrin receptor-targeted pH-sensitive micellar system for diminution of drug resistance and targetable delivery in multidrug-resistant breast cancer. *Int J Nanomedicine*. 2017 Feb;Volume 12:1047–64.
516. Petrovic N, Davidovic R, Jovanovic-Cupic S, Krajnovic M, Lukic S, Petrovic M, et al. Changes in miR-221/222 Levels in Invasive and In Situ Carcinomas of the Breast: Differences in Association with Estrogen Receptor and TIMP3 Expression Levels. *Mol Diagn Ther*. 2016 Dec 3;20(6):603–15.
517. Tvrdík D, Skálová H, Dundr P, Povýšil C, Velenská Z, Berková A, et al. Apoptosis – associated genes and their role in predicting responses to neoadjuvant breast cancer treatment. *Medical Science Monitor*. 2012;18(1):BR60–7.
518. Long J, Zhang B, Signorello LB, Cai Q, Deming-Halverson S, Shrubsole MJ, et al. Evaluating Genome-Wide Association Study-Identified Breast Cancer Risk Variants in African-American Women. *PLoS One*. 2013 Apr 8;8(4):e58350.
519. Kotepui M, Thawornkuno C, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Punyarit P, Petmitr S. Quantitative Real-Time RT-PCR of ITGA7, SVEP1, TNS1, LPHN3, SEMA3G, KLB and MMP13 mRNA Expression in Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012 Nov 30;13(11):5879–82.
520. Zhu L, Zhang S, Huan X, Mei Y, Yang H. Down-regulation of TRAF4 targeting RSK4 inhibits proliferation, invasion and metastasis in breast cancer xenografts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jun;500(3):810–6.
521. Garcia DA, Baek C, Estrada MV, Tysl T, Bennett EJ, Yang J, et al. USP11 Enhances TGF $\beta$ -Induced Epithelial–Mesenchymal Plasticity and Human Breast Cancer Metastasis. *Molecular Cancer Research*. 2018 Jul 1;16(7):1172–84.

522. Tan Y, Zhou G, Wang X, Chen W, Gao H. USP18 promotes breast cancer growth by upregulating EGFR and activating the AKT/Skp2 pathway. *Int J Oncol.* 2018 Apr 30;
523. Liu X, Bi L, Wang Q, Wen M, Li C, Ren Y, et al. miR-1204 targets VDR to promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Oncogene.* 2018 Jun 20;37(25):3426–39.
524. Parris TZ, Kovács A, Hajizadeh S, Nemes S, Semaan M, Levin M, et al. Frequent MYC coamplification and DNA hypomethylation of multiple genes on 8q in 8p11-p12-amplified breast carcinomas. *Oncogenesis.* 2014 Mar 24;3(3):e95–e95.
525. Kirikoshi H, Katoh M. Expression of WNT7A in human normal tissues and cancer, and regulation of WNT7A and WNT7B in human cancer. *Int J Oncol.* 2002 Oct;21(4):895–900.

## 8. Anexos

### 8.1 Anexo 1: selección comprensiva de genes relacionados con el cáncer de seno.

Gen	Set	ALIAS (HGNC)	Referencias
<i>ABRAXAS1</i>	High	CCDC98, FAM175A, FLJ13614, ABRA1	SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )
<i>ACVR1B</i>	High	ACVRLK4, ALK4, SKR2, ActRIB	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )/Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>AKT1</i>	High	RAC, PKB, PRKBA, AKT	Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>APC</i>	High	DP2, DP3, DP2.5, PPP1R46	SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> ) /Novogene panel/FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>ATM</i>	High	ATA, ATDC, ATC, ATD, TEL1, TELO1	myrisk ( <a href="https://myriadmyrisk.com/genetable/">https://myriadmyrisk.com/genetable/</a> )/BreastNext ( <a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a> )/CancerNext ( <a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a> )/BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a> )/Color Panel ( <a href="https://www.color.com/learn/color-genes#extended">https://www.color.com/learn/color-genes#extended</a> )/Novogene panel/ Centogene Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a> )/ CentoBreast panel ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a> )/ Invitae breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)

<i>BARD1</i>	High	NA	<p>myrisk (<a href="https://myriadmyrisk.com/genetable/">https://myriadmyrisk.com/genetable/</a>)/BreastNext (<a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a>)/CancerNext (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a>)/BreastGyn CancerPanel (<a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a>)/BreastOvarianCancerpanel (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a>)/Color Panel (<a href="https://www.color.com/learn/color-genes#extended/">https://www.color.com/learn/color-genes#extended/</a>)/Novogene panel/ Centogene Breast ovarian cancer panel (<a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a>)/ CentoBreast panel (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a>)/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) (<a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a>)/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a>)/ Invitae Breast cancer panel (<a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a>)/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)</p>
<i>BRCA1</i>	High	RNF53, BRCC1, PPP1R53, FANCS, BROVCA1, BRCAI, PNCA4, IRIS, PSCP	<p>myrisk (<a href="https://myriadmyrisk.com/genetable/">https://myriadmyrisk.com/genetable/</a>)/BRCAplus (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/25/oncology/brcaplus/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/25/oncology/brcaplus/</a>)/BreastNext (<a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a>)/CancerNext (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a>)/BreastGyn CancerPanel (<a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a>)/BreastOvarianCancerpanel (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a>)/Centobreast panel (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a>)/Centogene - Breast ovarian cancer panel (<a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a>)/Invitae breast cancer panel (<a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a>)/Qia gen's Breast cancer panel (<a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a>)/SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) (<a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a>)</p>

<i>BRCA2</i>	High	FANCD1, XRCC11, BRCC2, FACD, FAD1, FAD, BROVCA2, FANCD, PNCA2, GLM2	<p>myrisk (<a href="https://myriadmyrisk.com/genetable/">https://myriadmyrisk.com/genetable/</a>)/BRCAplus  (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/25/oncology/brcaplus/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/25/oncology/brcaplus/</a>)/BreastNext  (<a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a>)/CancerNext  (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a>)/BreastGyn CancerPanel  (<a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a>)/BreastOvarianCancerpanel  (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a>)/Centobreast panel  (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a>)/Centogene - Breast ovarian cancer panel  (<a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a>)/Invitae breast cancer panel  (<a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a>)/Qiagen's Breast cancer panel  (<a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a>)/SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes)  (<a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a>)</p>
<i>BRIP1</i>	High	OF, FANCD1	<p>BreastNext (<a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a>)/CancerNext  (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a>)/BreastGyn CancerPanel  (<a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a>)/BreastOvarianCancerpanel  (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a>)/Color Panel  (<a href="https://www.color.com/learn/color-genes#extended">https://www.color.com/learn/color-genes#extended</a>)/Novogene panel/Centogene Breast ovarian cancer panel  (<a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a>) CentoBreast panel  (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a>)/SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes)  (<a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a>)/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel  (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a>)/ Invitae Breast cancer panel  (<a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a>)/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)</p>
<i>CBFB</i>	High	PEBP2B	<p>Qiagen's Breast cancer panel  (<a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a>)/Novogene panel/  FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)</p>

<i>CDH1</i>	High	CD324, E-Cadherin	<p>myrisk (<a href="https://myriadmyrisk.com/gene-table/">https://myriadmyrisk.com/gene-table/</a>)/BRCAplus  (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/25/oncology/brcaplus/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/25/oncology/brcaplus/</a>)/BreastNext  (<a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a>)/CancerNext  (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a>)/BreastGyn CancerPanel  (<a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a>)/BreastOvarianCancerpanel  (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a>)/Color Panel  (<a href="https://www.color.com/learn/color-genes#extended">https://www.color.com/learn/color-genes#extended</a>)/Novogene panel/Centogene Breast ovarian cancer panel  (<a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a>)/ CentoBreast panel  (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a>)/SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes)  (<a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf</a>)/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel  (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a>)/ Invitae Breast cancer panel  (<a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a>)/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)</p>
<i>CHEK2</i>	High	RAD53, CDS1, CHK2, HuCds1, PP1425, bA444G7	<p>myrisk (<a href="https://myriadmyrisk.com/gene-table/">https://myriadmyrisk.com/gene-table/</a>)/BreastNext (<a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a>)/CancerNext  (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a>)/BreastGyn CancerPanel  (<a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a>)/BreastOvarianCancerpanel  (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a>)/Color Panel  (<a href="https://www.color.com/learn/color-genes#extended">https://www.color.com/learn/color-genes#extended</a>)/Novogene panel/Centogene Breast ovarian cancer panel  (<a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a>)/ CentoBreast panel  (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a>)/SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes)  (<a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf</a>)/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel  (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a>)/ Invitae Breast cancer panel  (<a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a>)/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)</p>
<i>EGFR</i>	High	ERBB, ERBB1	<p>Qiagen's Breast cancer panel  (<a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a>)/Novogene panel/  FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)</p>
<i>EP300</i>	High	p300, KAT3B	<p>Qiagen's Breast cancer panel  (<a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a>)/Novogene panel/  FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)</p>

<i>EPCAM</i>	High	M4S1, MIC18, TACSTD1, Ly74, TROP1, GA733-2, EGP34, EGP40, EGP-2, KSA, CD326, Ep-CAM, HEA125, KS1/4, MK-1, MH99, MOC31, 323/A3, 17-1A, TACST-1, CO-17A, ESA	BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian</a> )/Novogene panel/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )
<i>EXOC2</i>	High	SEC5L1, FLJ11026, Sec5p, SEC5	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>FANCC</i>	High	FACC, FAC, FA3	BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian</a> )/Novogene panel/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>FANCM</i>	High	KIAA1596, FAAP250	Correlation of FANCM expression with clinical factors in luminal B breast cancer. Individuals with FANCM biallelic mutations do not develop Fanconi anemia, but show risk for breast cancer, chemotherapy toxicity and may display chromosome fragility/Novogene panel/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )
<i>FBXO32</i>	High	MAFbx, ATROGIN1, Fbx32	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>FGFR1</i>	High	FLT2, KAL2, H2, H3, H4, H5, CEK, FLG, BFGFR, N-SAM, CD331	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )/Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>GATA3</i>	High	HDR	Qiagen's Breast cancer panel/Novogene panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>IRAK4</i>	High	NY-REN-64	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>ITCH</i>	High	AIP4	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>KMT2C</i>	High	MLL3, KIAA1506, HALR	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )/Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>MDM2</i>	High	HDM2, MGC5370	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )/Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)

<i>MEN1</i>	High	SCG2, MEAI	Centogene - Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a> )/Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>MLH1</i>	High	COCA2, HNPCC, FCC2, HNPCC2	BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian</a> )/Novogene panel/ Centogene - breast ovarian cancer panel / SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>MRE11A</i>	High	ATLD, MRE11	BreastNext ( <a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a> )/CancerNext ( <a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a> )/Centogene - Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a> )/ Novogene panel/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>MSH2</i>	High	COCA1, HNPCC, HNPCC1	BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian</a> )/Novogene panel/Centogene Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)

<i>MSH6</i>	High	GTBP	BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a> )/Novogene panel/ Centogene - breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>MUC16</i>	High	CA125, FLJ14303	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>MUTYH</i>	High	MYH	BreastNext ( <a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a> )/CancerNext ( <a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a> )/BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a> )/Novogene panel/ Centogene - Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>NBN</i>	High	NBS, NBS1, ATV, AT-V2, AT-V1	myrisk ( <a href="https://myriadmyrisk.com/genetable/">https://myriadmyrisk.com/genetable/</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a> )/Color Panel ( <a href="https://www.color.com/learn/color-genes#extended">https://www.color.com/learn/color-genes#extended</a> )/Novogene panel/ Centogene - Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a> )/ CentoBreast panel ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )
<i>NCOR1</i>	High	N-CoR, hCIT529I10, TRAC1, hN-CoR, KIAA1047, MGC104216, PPP1R109	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )/Novogene panel
<i>NEK2</i>	High	NLK1, NEK2A, RP67, PPP1R111	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )

<i>NF1</i>	High	NA	BreastNext ( <a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a> )/BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a> )/Novogene panel/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>PALB2</i>	High	FLJ21816, FANCN	myrisk ( <a href="https://myriadmyrisk.com/genetable/">https://myriadmyrisk.com/genetable/</a> )/BreastNext ( <a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a> )/CancerNext ( <a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a> )/BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a> )/Color Panel ( <a href="https://www.color.com/learn/color-genes#extended/">https://www.color.com/learn/color-genes#extended/</a> )/Novogene panel/ Centogene Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a> )/ CentoBreast panel ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>PBRM1</i>	High	BAF180, PB1	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )/Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>PCGF2</i>	High	ZNF144, RNF110, MEL-18	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>PIK3CA</i>	High	PI3K	CDKN2A loss and PIK3CA mutation in myoepithelial-like metaplastic breast cancer/Novogene panel/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>PMS1</i>	High	PMSL1, MLH2	Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review)/ Centogene - Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a> )

<i>PMS2</i>	High	PMSL2, H_DJ0042M02.9, HNPCC4, MLH4	BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian</a> )/Novogene panel/ Centogene - breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>POLD1</i>	High	POLD, CDC2, p125	BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776</a> )/Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>PPM1L</i>	High	PP2CE	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>PTEN</i>	High	MMAC1, TEP1, PTEN1, BZS, MHAM	myrisk ( <a href="https://myriadmyrisk.com/genetable/">https://myriadmyrisk.com/genetable/</a> )/BRCAplus ( <a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/25/oncology/brcaplus">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/25/oncology/brcaplus</a> )/BreastNext ( <a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a> )/CancerNext ( <a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext</a> )/BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian</a> )/Centobreast panel ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a> )/Centogene - Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a> )/Invitae breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )
<i>PTGFR</i>	High	FP	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>RAD50</i>	High	hRad50, RAD50-2	BreastNext ( <a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a> )/CancerNext ( <a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext</a> )/Novogene panel/ Centogene - Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf</a> )/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)

<i>RAD51C</i>	High	RAD51L2, FANCO	BreastNext ( <a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a> )/CancerNext ( <a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a> )/BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a> )/Novogene panel/ Centogene - Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a> )/ CentoBreast panel ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )
<i>RAD51D</i>	High	RAD51L3, R51H3, Trad, HsTRAD	BreastNext ( <a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a> )/CancerNext ( <a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a> )/BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a> )/BreastOvarianCancerpanel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a> )/Novogene panel/ Centogene - Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html/</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )
<i>RB1</i>	High	OSRC, RB, PPP1R130	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )/Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>RECQL</i>	High	RecQ1, RecQL1	BreastGyn CancerPanel ( <a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a> ) / Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01201/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01201/</a> )
<i>RET</i>	High	HSCR1, MEN2A, MTC1, MEN2B, PTC, CDHF12, RET51, CDHR16	Qiagen's Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )/Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>RINT1</i>	High	FLJ11785, RINT-1	Centogene - Breast cancer, RINT1 related/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )

<i>SDHB</i>	High	SDH1, SDH, SDHIP, CWS2, PGL4, SDH2, IP	Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>SDHD</i>	High	cybS, PGL, PGL, CII-4, QPs3, SDH4, CBT1, CWS3	Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ Novogene panel/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)
<i>SEPTIN9</i>	High	SEPT9, MSF, MSF1, KIAA0991, PNU TL4, AF17q25, SeptD1	Qiagen´s Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>STK11</i>	High	PJS, LKB1	myrisk ( <a href="https://myriadmyrisk.com/genetable/">https://myriadmyrisk.com/genetable/</a> )/CancerNext ( <a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a> )/Color Panel ( <a href="https://www.color.com/learn/color-genes#extended">https://www.color.com/learn/color-genes#extended</a> )/Novogene panel/ Centogene - Breast ovarian cancer panel ( <a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a> )/ CentoBreast panel ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a> )/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) ( <a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folletos/329/HCS.pdf</a> )/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel ( <a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a> )/ Invitae Breast cancer panel ( <a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a> )/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)

<i>TP53</i>	High	p53, LFS1	<p>myrisk (<a href="https://myriadmyrisk.com/gene-table/">https://myriadmyrisk.com/gene-table/</a>)/ BRCAplus (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/25/oncology/brcaplus/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/25/oncology/brcaplus/</a>)/BreastNext (<a href="https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/">https://sema4.com/products/test-catalog/breastnext/</a>)/CancerNext (<a href="https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/">https://www.ambrygen.com/providers/genetic-testing/1/oncology/cancernext/</a>)/BreastGyn CancerPanel (<a href="https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/">https://www.genedx.com/tests/detail/breast-gyn-cancer-panel-776/</a>)/BreastOvarianCancerpanel (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a>)/Color Panel (<a href="https://www.color.com/learn/color-genes#extended">https://www.color.com/learn/color-genes#extended</a>)/Novogene panel/ Centogene - Breast ovarian cancer panel (<a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a>)/ CentoBreast panel (<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/527968/</a>)/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) (<a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf</a>)/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a>)/ Invitae Breast cancer panel (<a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a>)/ FoundationOne (pharmacogenomic cancer panel)</p>
<i>TRAF5</i>	High	RNF84	Qiagen´s Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>WEE1</i>	High	WEE1A	Qiagen´s Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>XRCC2</i>	High	FANCU	<p>BreastOvarianCancerpanel (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast-ovarian/</a>)/Novogene panel/ Centogene - Breast ovarian cancer panel (<a href="https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html">https://www.centogene.com/diagnostics/hereditary-mutations-for-oncogenetics.html</a>)/ SOPHIA GENETICS - Hereditary Cancer Solutions (HCS: Breast and ovarian cancer, HPNCC and intestinal polyposis syndromes) (<a href="http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf">http://www.biosystems.com.ar/archivos/folleto/329/HCS.pdf</a>)/ Fulgent - Breast cancer comprehensive panel (<a href="https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/">https://www.fulgentgenetics.com/comprehensivecancer-breast/</a>)/ Invitae Breast cancer panel (<a href="https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/">https://www.invitae.com/es/physician/tests/01202/</a>)</p>
<i>ZBED4</i>	High	KIAA0637	Qiagen´s Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>ZNF226</i>	High	NA	Qiagen´s Breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )
<i>CDKN2A</i>	High	CDKN2, MLM, CDK4I, p16, INK4a, MTS1, CMM2, ARF, p19, p14, INK4, p16INK4a, p19Arf, p14ARF	Qiagen´s breast cancer panel ( <a href="https://www.qiagen.com/resources/">https://www.qiagen.com/resources/</a> )/Novogene panel/ FoundationOne
<i>XRCC3</i>	High	NA	Breast and ovarian cancer exome panel (Laboratorio de Genetica Clinica SL, LabGenetics, <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/603901/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr/tests/603901/</a> )/Novogene panel

<i>ADAMTS1</i>	Medium/High	C3-C5, METH1, KIAA1346	(290) /Novogene panel
<i>AKT3</i>	Medium/High	PKBG, RAC-gamma, PRKBG,	(291) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>AR</i>	Medium/High	DHTR, SBMA, AIS, NR3C4, SMAX1, HUMARA	(292)/Novogene panel/ FoundationOne
<i>ATR</i>	Medium/High	FRP1, SCKL, SCKL1, MEC1	(293–295) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>AXIN1</i>	Medium/High	PPP1R49	(296) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>BACH1</i>	Medium/High	BACH-1, BTBD24	(297,298) /Novogene panel
<i>BAP1</i>	Medium/High	hucep-6, KIAA0272, UCHL2	(299,300) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>BLM</i>	Medium/High	BS, RECQL3, RECQ2	(301,302) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>BMP2</i>	Medium/High	BMP2A	(290) /Novogene panel
<i>BMP4</i>	Medium/High	BMP2B	(290) /Novogene panel
<i>CASP8</i>	Medium/High	MCH5, MACH, FLICE, Casp-8	(303,304) /Novogene panel
<i>CCND1</i>	Medium/High	BCL1, D11S287E, PRAD1, U21B31	(305) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>CDH2</i>	Medium/High	N-Cadherin, NCAD, CDHN, CD325	(290) /Novogene panel
<i>CHEK1</i>	Medium/High	CHK1	(306,307) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>CST1</i>	Medium/High	NA	(290) /Novogene panel
<i>CST2</i>	Medium/High	NA	(290) /Novogene panel
<i>CST4</i>	Medium/High	NA	(290) /Novogene panel
<i>CST6</i>	Medium/High	NA	(290) /Novogene panel
<i>CYP17A1</i>	Medium/High	CYP17, P450C17, CPT7, S17AH	(308) /Novogene panel
<i>CYP1B1</i>	Medium/High	CP1B	(309) /Novogene panel
<i>CYP2D6</i>	Medium/High	CPD6, P450-DB1, CYP2D, P450C2D	(310,311) /Novogene panel
<i>ENG</i>	Medium/High	ORW1, ORW, END, HHT1, CD105	(290) /Novogene panel
<i>ERBB2</i>	Medium/High	HER-2, NGL, NEU, CD340	(312) /Novogene panel/ FoundationOne

<i>ERCC3</i>	Medium/High	XPB, BTF2, RAD25, TFIIH, GTF2H	(53,313) /Novogene panel
<i>ESR1</i>	Medium/High	ESR, NR3A1, Era, ER-alpha	(314–316) /Novogene panel
<i>ETV4</i>	Medium/High	E1A-F, E1AF, PEA3	(317) /Novogene panel
<i>FA2H</i>	Medium/High	FAXDC1, SPG35, FAAH, FLJ25287	(318) /Novogene panel
<i>FANCD2</i>	Medium/High	FAD, FA-D2	(293,319) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>FANCI</i>	Medium/High	KIAA1794, FLJ10719	(53,320–322) /Novogene panel
<i>FGFR2</i>	Medium/High	KGFR, BEK, CFD1, JWS, CEK3, TK14, TK25, ECT1, K-SAM, CD332	(323–328) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>FGFR4</i>	Medium/High	JTK2, CD334	(329,330) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>GSPT1</i>	Medium/High	GST1, ETF3A, eRF3a	(318,331) /Novogene panel
<i>GSTP1</i>	Medium/High	GSTP	(332,333) Novogene panel
<i>HFE</i>	Medium/High	HLA-H	(334) /Novogene panel
<i>HRAS1</i>	Medium/High	HRAS	(335) /Novogene panel/FoundationOne
<i>IDO1</i>	Medium/High	IDO, INDO	(336) /Novogene panel
<i>IGF1</i>	Medium/High	IGF1A, IGFI, IGF-I, IGF	(337) /Novogene panel
<i>MAP3K1</i>	Medium/High	MEKK1, MEKK, MAPKKK1	(338–340) /Novogene panel/FoundationOne
<i>MDM4</i>	Medium/High	MDMX, HDMX	(340,341) /Novogene panel/FoundationOne
<i>MLH3</i>	Medium/High	NA	(321) /Novogene panel
<i>MSH3</i>	Medium/High	DUP, MRP1	(293,342) / Novogene panel
<i>MSR1</i>	Medium/High	SCARA1, CD204, SR-AI, SR-AII, SR-AIII, SR-A	(53,343) /Novogene panel
<i>MYC</i>	Medium/High	C-MYC, bHLHe39, MYCC	(344–346) /Novogene panel/FoundationOne
<i>NOTCH2</i>	Medium/High	NA	(347,348) /Novogene panel/FoundationOne
<i>NQO1</i>	Medium/High	NMOR1, DIA4, DHQU, QR1, DTD	(349,350) /Novogene panel
<i>PPM1D</i>	Medium/High	Wip1, PP2C-DELTA	(351–353) /Novogene panel

<i>PRKDC</i>	Medium/High	DNPK1, p350, DNAPK, XRCC7, DNA-PKcs, DNAPKc, DNA-PKC, p460	(354) /Novogene panel/FoundationOne
<i>PTCH1</i>	Medium/High	NBCCS, PTCH, BCNS	(355,356) /Novogene panel/FoundationOne
<i>RAD51</i>	Medium/High	HsRad51, HsT16930, BRCC5, FANCR	(293,357–359) /Novogene panel/FoundationOne
<i>RAD51B</i>	Medium/High	RAD51L1, REC2, hREC2, R51H2	(340,360,361) /Novogene panel
<i>RAD52</i>	Medium/High	NA	(293) /Novogene panel
<i>RASGRP1</i>	Medium/High	CalDAG-GEFII, RASGRP	(318) /Novogene panel
<i>RUNX1</i>	Medium/High	AML1, CBFA2, PEBP2A2, AMLCR1	(296) /Novogene panel/FoundationOne
<i>SCNN1A</i>	Medium/High	BES2, SCNEA	(290) /Novogene panel
<i>SOD2</i>	Medium/High	NA	(318,362) /Novogene panel
<i>SPINK1</i>	Medium/High	Spink3, PCTT, PSTI, TATI	(363,364) /Novogene panel
<i>TERT</i>	Medium/High	TRT, TP2, TCS1, hEST2, EST2	(365–369) /Novogene panel/ FoundationOne (promoter only for this gene)
<i>TET2</i>	Medium/High	KIAA1546, FLJ20032	(370) /Novogene panel/FoundationOne
<i>TGFBR2</i>	Medium/High	MFS2, TBR1, TBR-ii	(371–375) /Novogene panel/FoundationOne
<i>TIE1</i>	Medium/High	TIE, JTK14	(290) /Novogene panel
<i>TNF</i>	Medium/High	TNFA, TNFSF2, DIF, TNF	(376) /Novogene panel
<i>TOP2A</i>	Medium/High	TOP2	(377) /Novogene panel/ FoundationOne
<i>TP53BP1</i>	Medium/High	53BP1, p202, TDRD30	(293) /Novogene panel
<i>TSC1</i>	Medium/High	TSC, KIAA0243, LAM, hamartin	(290) /Novogene panel/FoundationOne
<i>UGT1A1</i>	Medium/High	UGT1, GNT1, UGT1A	(378) /Novogene panel
<i>WRN</i>	Medium/High	RECQL2, RECQ3	(321,379,380) /Novogene panel
<i>XRCC1</i>	Medium/High	RCC	(381,382) /Novogene panel
<i>ADAM29</i>	Medium	svph1, CT73	(383,384)
<i>ADAMTSL1</i>	Medium	ADAMTSR1, FLJ35283	(385)
<i>ANKLE1</i>	Medium	FLJ39369, LEMD6	(340,386)
<i>APOBEC3A</i>	Medium	ARP3, PHRBN	(387–389)

<i>APOBEC3B</i>	Medium	PHRBNL, FLJ21201	(390,391)
<i>APOE</i>	Medium	AD2	(392,393)
<i>ATG10</i>	Medium	APG10L, DKFZP586I041 8, FLJ13954	(394)
<i>CASP10</i>	Medium	MCH4	(395,396)
<i>CHFR</i>	Medium	FLJ10796, RNF196	(293)
<i>CNTROB</i>	Medium	LIP8, PP1221	(397)
<i>COX11</i>	Medium	COX11P	(398,399)
<i>CYP1A1</i>	Medium	P450DX, P1- 450, P450-C, CP11	(309,400,401)
<i>CYP2E1</i>	Medium	CYP2E	(402,403)
<i>EBF1</i>	Medium	OLF1, COE1	(340,404,405)
<i>GSTM1</i>	Medium	MU, H-B	(332,333)
<i>GSTT1</i>	Medium	NA	(332,333)
<i>HELQ</i>	Medium	Hel308	(406)
<i>IGFBP2</i>	Medium	IBP2	(407–410)
<i>IGFBP5</i>	Medium	NA	(407,411,412)
<i>LEP</i>	Medium	OBS, OB	(413)
<i>LGR6</i>	Medium	FLJ14471	(340,405,414)
<i>LSP1</i>	Medium	WP34	(340,415)
<i>MAP3K9</i>	Medium	MLK1, PRKE1, MEKK9	(340)
<i>MMP14</i>	Medium	MMP-14, MT1- MMP	(416,417)
<i>MMP2</i>	Medium	MMP-2, TBE-1	(416,417)
<i>MMP3</i>	Medium	STMY1, STMY	(418–420)
<i>MRPS30</i>	Medium	PDCD9, PAP	(421,422)
<i>NAT1</i>	Medium	AAC1	(423)
<i>NCOA3</i>	Medium	AIB1, RAC3, ACTR, p/CIP, TRAM-1, CAGH16, TNRC16, KAT13B, bHLHe42, SRC- 3, SRC3	(424–426)
<i>NEK10</i>	Medium	FLJ32685	(328,427,428)
<i>PEX14</i>	Medium	NA	(340,405)
<i>PHIP</i>	Medium	WDR11	(429)
<i>PPP2R1B</i>	Medium	PR65B, PP2A- Abeta	(430)
<i>PPP2R5B</i>	Medium	FLJ35411, B56B, PR61B, B56beta	(430)
<i>PTHLH</i>	Medium	PTHRP, HHM, PLP, PTHR	(340,431)
<i>RCC1</i>	Medium	CHC1	(432,433)

<i>SLC4A7</i>	Medium	SLC4A6, NBC3, SBC2	(434–437)
<i>SMC1A</i>	Medium	DXS423E, KIAA0178, SB1.8, Smcb	(293)
<i>TCF7L2</i>	Medium	TCF-4	(201,340,438–441)
<i>TGFB1</i>	Medium	TGFB, DPD1, CED, TGFbeta	(340,442–448)
<i>TIMP2</i>	Medium	TIMP-2, CSC-21K	(416,449)
<i>TOX3</i>	Medium	TNRC9, CAGF9	(340,450–456)
<i>XRCC5</i>	Medium	KU80, KARP-1, Ku86, KUB2	(354,457)
<i>XRCC6</i>	Medium	D22S731, D22S671, KU70, ML8	(354)
<i>ARL17A</i>	Low	ARF1P2, ARL17P1	(458)
<i>ASPN</i>	Low	FLJ20129, SLRR1C, PLAP-1	(459)
<i>BMI1</i>	Low	PCGF4, RNF51	(460)
<i>BTN3A2</i>	Low	BTN3.2	(461)
<i>CAMP</i>	Low	CAP18, FALL39, FALL-39, LL37	(462)
<i>CCL21</i>	Low	SCYA21, SLC, exodus-2, TCA4, CKb9, 6Ckine, ECL	(463)
<i>CCR7</i>	Low	CMKBR7, EBI1, BLR2, CDw197, CD197	(464)
<i>CDH11</i>	Low	OB, CAD11	(465)
<i>CHRD1</i>	Low	MGC1, NRLN1, CHL	(466,467)
<i>CLEC5A</i>	Low	MDL-1	(468)
<i>CLGN</i>	Low	NA	(469)
<i>COL10A1</i>	Low	NA	(470)
<i>COL11A1</i>	Low	COLL6	(470)
<i>COMT</i>	Low	NA	(471)
<i>CRACD</i>	Low	KIAA1211, CRAD	(468)
<i>CTSW</i>	Low	NA	(472,473)
<i>CXCL12</i>	Low	SDF1A, SDF1B, SDF1, SCYB12, SDF-1a, SDF-1b, PBSF, TLSF-a, TLSF-b, TPAR1	(474)
<i>DCLRE1B</i>	Low	SNM1B, FLJ12810,	(475)

		FLJ13998, APOLLO	
<i>DLX4</i>	Low	BP1, DLX8	(476)
<i>DRP2</i>	Low	NA	(468)
<i>EN1</i>	Low	NA	(477)
<i>EOMES</i>	Low	TBR2	(318)
<i>FCGR1BP</i>	Low	CD64b	(478)
<i>FOXM1</i>	Low	FKHL16, HFH-11, trident, HNF-3, INS-1, MPP2, MPHOSPH2, TGT3	(479)
<i>GPBR1</i>	Low	CMKRL2, GPR30, GPER, FEG-1, GPCR-Br, LERGU, LERGU2, DRY12, LyGPR, CEPR	(337)
<i>H19</i>	Low	D11S813E, ASM, ASM1, NCRNA00008, LINC00008, MIR675HG	(480,481)
<i>HDAC9</i>	Low	KIAA0744, HDAC, MITR, HD7, HDAC7B	(482)
<i>HMG3</i>	Low	TRIP7	(483)
<i>HOXC8</i>	Low	HOX3, HOX3A	(465)
<i>HOXD3</i>	Low	HOX4A, HOX4, HOX1D	(484)
<i>HTR1B</i>	Low	S12, 5-HT1B, HTR1D2, 5-HT1DB	(485)
<i>ILF3</i>	Low	NF90, MPHOSPH4, MPP4, DRBP76, NFAR-1	(465)
<i>IRF6</i>	Low	NA	(486)
<i>ITGA6</i>	Low	CD49f	(487)
<i>ITGAL</i>	Low	CD11A, LFA-1	(488)
<i>ITGAX</i>	Low	CD11C, CD11c	(488)
<i>ITGB1</i>	Low	FNRB, MSK12, MDF2, CD29, GPIIA	(489)
<i>KLF8</i>	Low	BKLF3, ZNF741	(490)
<i>L3MBTL3</i>	Low	KIAA1798	(491)
<i>LRATD2</i>	Low	FAM84B, BCMP101, NSE2	(492)
<i>MAPKAP1</i>	Low	SIN1, MGC2745, MIP1	(493)

<i>MDC1</i>	Low	NFBD1, KIAA0170, Em:AB023051. 5	(293)
<i>MIEN1</i>	Low	C17orf37, MGC14832, ORB3, XTP4, C35, Rdx12	(494,495)
<i>NAT2</i>	Low	AAC2	(496)
<i>NQO2</i>	Low	NMOR2, QR2, DHQV, DIA6	(349)
<i>NRBF2</i>	Low	DKFZp564C166 4, FLJ30395, COPR1, COPR2	(497)
<i>PGR</i>	Low	PR, NR3C3	(498)
<i>PIK3R3</i>	Low	p55	(488)
<i>PIP</i>	Low	GCDFP-15, GCDFP15, GPIP4	(499)
<i>PITX2</i>	Low	IRID2, IHG2, RIEG, RIEG1, RGS, IGDS, RS, Brx1, Otlx2, ARP1	(500)
<i>PLAC1</i>	Low	CT92, OOSP2L, OOSP2B	(501)
<i>PLAGL2</i>	Low	ZNF900	(502)
<i>PTPRF</i>	Low	LAR	(503)
<i>RAB34</i>	Low	RAB39, RAH, NARR	(504)
<i>RGS1</i>	Low	IER1, 1R20, IR20, BL34	(505)
<i>S1PR3</i>	Low	EDG3, EDG-3	(506)
<i>SCD</i>	Low	FADS5	(468,507)
<i>SEMA4D</i>	Low	SEMAJ, C9orf164, CD100, coll-4, FLJ39737	(508)
<i>SLBP</i>	Low	HBP	(509)
<i>SPOCK1</i>	Low	TIC1, SPOCK, testican-1	(510)
<i>SSBP4</i>	Low	NA	(421)
<i>STXBP4</i>	Low	Synip, MGC50337	(511)
<i>SURF1</i>	Low	NA	(512)
<i>SYNPO2</i>	Low	MYOPODIN	(513)
<i>TFPI2</i>	Low	PP5, TFPI-2, REF1	(514)
<i>TFRC</i>	Low	TFR, CD71, TFR1, p90	(515)
<i>TIMP3</i>	Low	SFD	(516)
<i>TNFSF8</i>	Low	CD30LG, CD153	(517)

<i>TNP1</i>	Low	NA	(518)
<i>TNS1</i>	Low	TNS, MXRA6, DKFZp586K0617, PPP1R155	(519)
<i>TRAF4</i>	Low	CART1, MLN62, RNF83	(520)
<i>USP11</i>	Low	UHX1	(521)
<i>USP18</i>	Low	NA	(522)
<i>VDR</i>	Low	NR111, PPP1R163	(523)
<i>VPS13B</i>	Low	NA	(524)
<i>WNT7A</i>	Low	NA	(525)
<i>ZNF404</i>	Low	NA	(511)

**8.2 Anexo 2: publicación titulada “Germline mutations of breast cancer susceptibility genes through expanded genetic analysis in unselected Colombian patients”.**

**8.3 Anexo 3: protocolo del CIGGUR: Clonaje en el vector pSpliceExpress - Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix.**

**8.4 Anexo 4: publicación titulada “Functional Analysis of BRCA1 3'UTR Variants Predisposing to Breast Cancer”.**

**8.5 Anexo 5: lista de procesos biológicos anotados para los genes con variantes germinales P/LP**

GOTERM_BP_DIRECT	GENES	NUMBER OF GENES
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	BRCA1, ATM, BACH1, TOP2A, EGFR, EP300, RB1, RUNX1, WNT7A, XRCC6, AR, CDKN2A, EOMES, ITGA6, IRF6, NCOA3, PHIP, PRKDC, PPP2R5B, SSBP4, TET2, TCF7L2, TGFB1, TP53BP1, VDR, ZNF226	26
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-templated	BLM, EGFR, EP300, RUNX1, WNT7A, XRCC6, AR, APOE, CDKN2A, EOMES, IRF6, PTCH1, PHIP, RET, TGFB1, TP53BP1, BRCA1, BRCA2, CHEK2	19
GO:0006281~DNA repair	ATR, BLM, BACH1, POLD1, FANCI, FANCM, RAD50, WRN, ANKLE1, MDC1, MSH2, MSH6, MUTYH, SMC1A, BRCA1, BARD1, BRCA2, RAD51D	18
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	BACH1, EP300, MDM4, RB1, RUNX1, AR, EOMES, NOTCH2, PTCH1, PCGF2, SEMA4D, TCF7L2, TGFB1, VDR	14
GO:0006974~cellular response to DNA damage stimulus	ATM, APC, ATR, BLM, TOP2A, RAD50, WRN, ANKLE1, PRKDC, TP53BP1, BRCA1, BARD1, CHEK2	13
GO:0030335~positive regulation of cell migration	ATM, APC, EGFR, CXCL12, ITGA6, ITGAX, LGR6, MMP14, MMP2, RET, SEMA4D, TGFB1	12
GO:0006468~protein phosphorylation	ATM, ATR, NEK10, ERBB2, FGFR1, IRAK4, PRKDC, RET, TGFB1, TGFB2, TIE1, CHEK2	12
GO:0007165~signal transduction	ATM, CXCL12, AR, EGFR, ERBB2, IGFBP5, ITGAL, IRAK4, PPP2R5B, RET, TIE1	11
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	BACH1, MDM4, RB1, RUNX1, AR, EOMES, IRF6, PHIP, TCF7L2, ZNF226, BRCA1	11
GO:0010628~positive regulation of gene expression	ATM, WNT7A, AR, CDKN2A, ERBB2, FGFR4, ITGAX, RET, TGFB1, VDR, BRCA1	11
GO:0043065~positive regulation of apoptotic process	ATM, APC, TOP2A, CDKN2A, CYP1B1, ITGA6, MMP2, NOTCH2, PRKDC, TGFB1, BARD1	11
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	AR, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR4, ITGAX, PHIP, S1PR3, TGFB1, TGFB2	10

GO:0007155~cell adhesion	ADAMTSL1, APC, CXCL12, CYP1B1, ITGA6, ITGAL, ITGAX, MUC16, PTPRF, SEMA4D	10
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	ADAMTS1, APC, MDM4, TSC1, AR, CDKN2A, CYP1B1, IRF6, TGFB1, VDR	10
GO:0030198~extracellular matrix organization	ADAMTS1, ADAMTSL1, COL10A1, COL11A1, ITGA6, ITGAL, ITGAX, MMP14, MMP2, MMP3	10
GO:0043066~negative regulation of apoptotic process	MDM4, WNT7A, EGFR, ERBB2, NOTCH2, PHIP, PRKDC, SEMA4D, BARD1, PALB2	10
GO:0009410~response to xenobiotic stimulus	ATR, PMS1, PMS2, XRCC1, MMP2, PTCH1, RET, TGFB1, TGFB2	9
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-templated	L3MBTL3, MDM4, RB1, XRCC6, CDKN2A, TCF7L2, TGFB1, VDR, BRCA1	9
GO:0001666~response to hypoxia	ATM, CXCL12, EP300, XRCC1, CYP1A1, MMP14, MMP2, TGFB1, TGFB2	9
GO:0000723~telomere maintenance	ATM, ATR, BLM, RAD50, WRN, XRCC6, PRKDC, TERT, RAD51D	9
GO:0000724~double-strand break repair via homologous recombination	ATM, BLM, WRN, ANKLE1, HELQ, BRCA1, BRCA2, RAD51D, PALB2	9
GO:0007275~multicellular organism development	ATR, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR4, RET, TIE1, VDR	8
GO:0006915~apoptotic process	EP300, WNT7A, CASP10, CDKN2A, MRPS30, NOTCH2, TGFB2, PALB2	8
GO:0051726~regulation of cell cycle	ATM, APC, MDM4, RB1, TSC1, CDKN2A, BRCA1, BARD1, RAD51D	8
GO:0006302~double-strand break repair	ATM, RAD50, WRN, MSH2, PRKDC, BRCA1, BRCA2, CHEK2	8
GO:0033674~positive regulation of kinase activity	RAD50, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR4, RET, TIE1	7
GO:0045766~positive regulation of angiogenesis	RUNX1, CYP1B1, ITGAX, TERT, TGFB2, TIE1, BRCA1	7
GO:0007049~cell cycle	EP300, FANCI, RB1, CDKN2A, MDC1, TET2, BRCA1	7
GO:0006310~DNA recombination	BLM, RAD50, WRN, XRCC6, MSH2, BRCA1, BRCA2	7
GO:0046777~protein autophosphorylation	ATM, ATR, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR4, CHEK2	7
GO:0051897~positive regulation of protein kinase B signaling	EGFR, FGFR1, IGFBP5, RET, TCF7L2, TGFB1	6
GO:0007169~transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR4, RET, TIE1	6
GO:0032508~DNA duplex unwinding	BLM, FANCM, RAD50, WRN, XRCC6, HELQ	6
GO:0016477~cell migration	APC, FGFR1, FGFR4, MMP2, PTPRF, TGFB1	6
GO:0006338~chromatin remodeling	ATM, RB1, EOMES, NCOA3, PCGF2, BRCA2	6
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-templated	BACH1, RB1, NOTCH2, ZNF226, BRCA2, CHEK2	6
GO:0090399~replicative senescence	ATM, ATR, WRN, CDKN2A, TERT, CHEK2	6
GO:0010629~negative regulation of gene expression	MSR1, NOTCH2, TERT, TGFB1, RB1, APOE	6
GO:0001525~angiogenesis	WNT7A, CYP1B1, MMP14, MMP2, TIE1	5
GO:0008202~steroid metabolic process	UGT1A1, CYP1A1, CYP1B1, CYP17A1, CYP2D6	5
GO:0045087~innate immune response	PRKDC, XRCC6, APOBEC3B, IRAK4, MMP3	5
GO:0006298~mismatch repair	PMS1, PMS2, MSH2, MSH6, MUTYH	5
GO:0043406~positive regulation of MAP kinase activity	NEK10, EGFR, ERBB2, FGFR1, TGFB1	5
GO:0006805~xenobiotic metabolic process	NAT2, UGT1A1, CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6	5
GO:0035556~intracellular signal transduction	ERBB2, IGFBP5, IRAK4, NOTCH2, TNS1	5
GO:0043627~response to estrogen	EP300, WNT7A, MMP14, MMP2, TGFB2	5
GO:0071407~cellular response to organic cyclic compound	CYP1A1, CYP1B1, IGFBP5, MSR1, TGFB1	5
GO:0007186~G-protein coupled receptor signaling pathway	CXCL12, AR, APOE, LGR6, S1PR3	5
GO:0000165~MAPK cascade	AR, EGFR, FGFR1, RET, TGFB1	5
GO:0070374~positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	APOE, EGFR, FGFR4, NOTCH2, TGFB1	5
GO:0006508~proteolysis	ADAMTS1, CASP10, MMP14, MMP2, MMP3	5
GO:0006303~double-strand break repair via nonhomologous end joining	ATM, XRCC1, XRCC6, PRKDC, TP53BP1	5

GO:0050821~protein stabilization	EP300, MDM4, TSC1, CDKN2A, CHEK2	5
GO:0009887~animal organ morphogenesis	EP300, ITGAX, NOTCH2, PTCH1, PALB2	5
GO:0036297~interstrand cross-link repair	ATR, FANCI, FANCM, MSH6, RAD51D	5
GO:0071480~cellular response to gamma radiation	ATM, ATR, WRN, XRCC6, CHEK2	5
GO:0035264~multicellular organism growth	ATM, AR, EP300, NOTCH2, PALB2	5
GO:0008630~intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	ATM, MSH6, PRKDC, BRCA1, CHEK2	5
GO:0071479~cellular response to ionizing radiation	BLM, TGFB1, BRCA1, BARD1, BRCA2	5
GO:0032355~response to estradiol	WNT7A, CYP1B1, PTCH1, TGFB1	4
GO:0071392~cellular response to estradiol stimulus	UGT1A1, EGFR, MMP2, NCOA3	4
GO:0008210~estrogen metabolic process	UGT1A1, CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6	4
GO:0007160~cell-matrix adhesion	TSC1, ITGA6, ITGAL, ITGAX	4
GO:0043433~negative regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	RB1, EOMES, PTCH1, TCF7L2	4
GO:0030154~cell differentiation	RB1, EGFR, TGFB2, VDR	4
GO:0050680~negative regulation of epithelial cell proliferation	RB1, AR, PTCH1, TGFB1	4
GO:0007219~Notch signaling pathway	NOTCH2, S1PR3, TGFB1, TGFB2	4
GO:0071456~cellular response to hypoxia	MDM4, SDHD, TERT, TGFB1	4
GO:0048661~positive regulation of smooth muscle cell proliferation	IRAK4, MMP2, TGFB1, TGFB2	4
GO:0042593~glucose homeostasis	FGFR4, IGFBP5, PTCH1, TCF7L2	4
GO:0071363~cellular response to growth factor stimulus	ERBB2, PPP2R5B, SLC4A7, TGFB2	4
GO:0006325~chromatin organization	EP300, L3MBTL3, RB1, TET2	4
GO:0098609~cell-cell adhesion	EGFR, ITGA6, ITGAL, ITGAX	4
GO:0050679~positive regulation of epithelial cell proliferation	EGFR, ERBB2, TCF7L2, TGFB1	4
GO:0001934~positive regulation of protein phosphorylation	EGFR, ERBB2, SEMA4D, TGFB1	4
GO:0018108~peptidyl-tyrosine phosphorylation	EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR4	4
GO:0006874~cellular calcium ion homeostasis	CXCL12, APOE, TGFB1, VDR	4
GO:0006260~DNA replication	ATR, BLM, POLD1, WRN	4
GO:0031297~replication fork processing	ATR, BLM, FANCM, WRN	4
GO:2001237~negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	AR, ITGA6, PHIP, TCF7L2	4
GO:0043410~positive regulation of MAPK cascade	AR, ERBB2, FGFR1, RET	4
GO:1902895~positive regulation of pri-miRNA transcription from RNA polymerase II promoter	AR, EGFR, TERT, TGFB1	4
GO:0006898~receptor-mediated endocytosis	APOE, EGFR, MSR1, TGFB2	4
GO:0007229~integrin-mediated signaling pathway	ADAMTS1, ITGA6, ITGAL, ITGAX	4
GO:1904707~positive regulation of vascular smooth muscle cell proliferation	ADAMTS1, IGFBP5, MMP2, TERT	4
GO:1900087~positive regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle	ADAMTS1, CYP1A1, EGFR, TERT	4
GO:0008340~determination of adult lifespan	ATM, WRN, MSH2, MSH6	4
GO:0042981~regulation of apoptotic process	ATM, WRN, APOE, CASP10	4
GO:0030308~negative regulation of cell growth	RB1, CDKN2A, TGFB1, BRCA1	4
GO:0018105~peptidyl-serine phosphorylation	ATM, ATR, PRKDC, TGFB2	4
GO:0090398~cellular senescence	ATM, WRN, CDKN2A, BRCA2	4
GO:0045786~negative regulation of cell cycle	RB1, TGFB1, BRCA1, BARD1	4

GO:0042771~intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator	<i>EP300, MSH2, BRCA2, CHEK2</i>	4
GO:0007095~mitotic G2 DNA damage checkpoint	<i>ATM, BLM, RINT1, BRCA1</i>	4
GO:0000077~DNA damage checkpoint	<i>ATM, ATR, TP53BP1, CHEK2</i>	4
GO:0048660~regulation of smooth muscle cell proliferation	<i>XRCC6, PRKDC, TCF7L2</i>	3
GO:0006284~base-excision repair	<i>WRN, XRCC1, MUTYH</i>	3
GO:0006979~response to oxidative stress	<i>WRN, APOE, MMP14</i>	3
GO:0008283~cell proliferation	<i>TSC1, CYP1A1, LGR6</i>	3
GO:0000712~resolution of meiotic recombination intermediates	<i>TOP2A, FANCM, ANKLE1</i>	3
GO:0001570~vasculogenesis	<i>TGFB1, TGFB2, TIE1</i>	3
GO:0009749~response to glucose	<i>TCF7L2, TGFB1, TGFB2</i>	3
GO:0015031~protein transport	<i>RINT1, EXOC2, VPS13B</i>	3
GO:0007224~smoothed signaling pathway	<i>RB1, PTCH1, TGFB2</i>	3
GO:0050673~epithelial cell proliferation	<i>RB1, AR, EGFR</i>	3
GO:0006470~protein dephosphorylation	<i>PPP2R5B, PPP2R1B, PTPRF</i>	3
GO:0016446~somatic hypermutation of immunoglobulin genes	<i>PMS2, MSH2, MSH6</i>	3
GO:0070372~regulation of ERK1 and ERK2 cascade	<i>NEK10, EGFR, ERBB2</i>	3
GO:0031334~positive regulation of protein complex assembly	<i>MMP3, PPP2R5B, TGFB1</i>	3
GO:0032526~response to retinoic acid	<i>MMP2, PTCH1, TIE1</i>	3
GO:0048771~tissue remodeling	<i>MMP14, MMP2, TIE1</i>	3
GO:0022617~extracellular matrix disassembly	<i>MMP14, MMP2, MMP3</i>	3
GO:0030574~collagen catabolic process	<i>MMP14, MMP2, MMP3</i>	3
GO:0006954~inflammatory response	<i>ITGAL, S1PR3, TGFB1</i>	3
GO:0033627~cell adhesion mediated by integrin	<i>ITGA6, ITGAL, ITGAX</i>	3
GO:0043547~positive regulation of GTPase activity	<i>ERBB2, ITGA6, SEMA4D</i>	3
GO:0032092~positive regulation of protein binding	<i>EP300, TERT, TCF7L2</i>	3
GO:0006366~transcription from RNA polymerase II promoter	<i>EP300, RB1, AR</i>	3
GO:0051091~positive regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	<i>EP300, PPP2R5B, TP53BP1</i>	3
GO:0031648~protein destabilization	<i>EP300, CDKN2A, PRKDC</i>	3
GO:0051092~positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	<i>EP300, AR, TGFB1</i>	3
GO:0090263~positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	<i>EGFR, LGR6, TGFB1</i>	3
GO:0030307~positive regulation of cell growth	<i>EGFR, ERBB2, MMP14</i>	3
GO:0030336~negative regulation of cell migration	<i>CYP1B1, IGFBP5, TIE1</i>	3
GO:0045727~positive regulation of translation	<i>CYP1B1, ERBB2, PRKDC</i>	3
GO:0014070~response to organic cyclic compound	<i>CYP1A1, MMP14, TET2</i>	3
GO:0042572~retinol metabolic process	<i>CYP1A1, CYP1B1, CYP2D6</i>	3
GO:0031100~animal organ regeneration	<i>CXCL12, UGT1A1, TGFB2</i>	3
GO:0009314~response to radiation	<i>CXCL12, MMP2, SMC1A</i>	3
GO:1900182~positive regulation of protein localization to nucleus	<i>CDKN2A, TCF7L2, TGFB1</i>	3
GO:0006919~activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	<i>CASP10, CDKN2A, RET</i>	3
GO:0045910~negative regulation of DNA recombination	<i>BLM, MSH2, MSH6</i>	3

GO:0034644~cellular response to UV	<i>ATR, POLD1, EP300</i>	3
GO:0046685~response to arsenic-containing substance	<i>ATR, CYP1A1, CYP1B1</i>	3
GO:0043568~positive regulation of insulin-like growth factor receptor signaling pathway	<i>AR, IGFBP5, PHIP</i>	3
GO:0042327~positive regulation of phosphorylation	<i>AR, EGFR, ITGA6</i>	3
GO:0010467~gene expression	<i>APOE, EOMES, TGFB1</i>	3
GO:0045595~regulation of cell differentiation	<i>APC, RUNX1, FGFR1</i>	3
GO:0065003~macromolecular complex assembly	<i>APC, MDM4, CLGN</i>	3
GO:0016055~Wnt signaling pathway	<i>APC, LGR6, TCF7L2</i>	3
GO:0090090~negative regulation of canonical Wnt signaling pathway	<i>APC, APOE, TCF7L2</i>	3
GO:1904754~positive regulation of vascular associated smooth muscle cell migration	<i>ADAMTS1, IGFBP5, TERT</i>	3
GO:0000902~cell morphogenesis	<i>TGFB1, VDR, EGFR</i>	3
GO:0071481~cellular response to X-ray	<i>ATM, XRCC6, TP53BP1</i>	3
GO:0051301~cell division	<i>RB1, SMC1A, CHEK2</i>	3
GO:0031573~intra-S DNA damage checkpoint	<i>MDC1, MSH2, CHEK2</i>	3
GO:0034614~cellular response to reactive oxygen species	<i>ATM, EGFR, MMP2</i>	3
GO:0010575~positive regulation of vascular endothelial growth factor production	<i>CYP1B1, TGFB1, BRCA1</i>	3
GO:0045785~positive regulation of cell adhesion	<i>ATM, CXCL12, ERBB2</i>	3
GO:0000729~DNA double-strand break processing	<i>ATM, BLM, RAD50</i>	3
GO:0010165~response to X-ray	<i>BLM, MSH2, BRCA2</i>	3
GO:1900034~regulation of cellular response to heat	<i>ATM, ATR, EP300</i>	3
GO:0043517~positive regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	<i>ATM, ATR, CDKN2A</i>	3
GO:0000722~telomere maintenance via recombination	<i>RAD50, BRCA2, RAD51D</i>	3
GO:0007131~reciprocal meiotic recombination	<i>ATM, RAD50, RAD51D</i>	3
GO:0044818~mitotic G2/M transition checkpoint	<i>RAD50, BRCA1, BARD1</i>	3
GO:0016567~protein ubiquitination	<i>MDM4, BRCA1, BARD1</i>	3
GO:1901796~regulation of signal transduction by p53 class mediator	<i>ATM, EP300, CHEK2</i>	3
GO:2000001~regulation of DNA damage checkpoint	<i>BRCA1, BARD1, BRCA2</i>	3
GO:0035825~reciprocal DNA recombination	<i>RAD50, BRCA1, BARD1</i>	3
GO:0010212 response to ionizing radiation	<i>ATM, BRCA1</i>	2
GO:0042770 signal transduction in response to DNA damage	<i>ATM, CHEK2</i>	2
GO:0002218~activation of innate immune response	<i>XRCC6, PRKDC</i>	2
GO:0032270~positive regulation of cellular protein metabolic process	<i>WNT7A, TGFB1</i>	2
GO:0051247~positive regulation of protein metabolic process	<i>WNT7A, TGFB1</i>	2
GO:0071560~cellular response to transforming growth factor beta stimulus	<i>WNT7A, TGFB1</i>	2
GO:0060070~canonical Wnt signaling pathway	<i>WNT7A, TCF7L2</i>	2
GO:0035019~somatic stem cell population maintenance	<i>WNT7A, SMC1A</i>	2
GO:0048103~somatic stem cell division	<i>WNT7A, CDKN2A</i>	2
GO:0032496~response to lipopolysaccharide	<i>UGT1A1, CYP1A1</i>	2
GO:0017148~negative regulation of translation	<i>TSC1, IGFBP5</i>	2

GO:0002250~adaptive immune response	<i>TSC1, EOMES</i>	2
GO:0006266~DNA ligation	<i>TOP2A, XRCC6</i>	2
GO:0002244~hematopoietic progenitor cell differentiation	<i>TOP2A, TGFB1</i>	2
GO:0010033~response to organic substance	<i>TIMP3, XRCC1</i>	2
GO:0007179~transforming growth factor beta receptor signaling pathway	<i>TGFB1, TGFB2</i>	2
GO:0010718~positive regulation of epithelial to mesenchymal transition	<i>TGFB1, TGFB2</i>	2
GO:0070723~response to cholesterol	<i>TGFB1, TGFB2</i>	2
GO:1903799~negative regulation of production of miRNAs involved in gene silencing by miRNA	<i>TERT, TGFB1</i>	2
GO:0001568~blood vessel development	<i>TCF7L2, TGFB2</i>	2
GO:0050731~positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	<i>SEMA4D, TGFB1</i>	2
GO:0032967~positive regulation of collagen biosynthetic process	<i>RUNX1, TGFB1</i>	2
GO:2000679~positive regulation of transcription regulatory region DNA binding	<i>RB1, TGFB1</i>	2
GO:1903055~positive regulation of extracellular matrix organization	<i>RB1, RUNX1</i>	2
GO:0007346~regulation of mitotic cell cycle	<i>RB1, PTCH1</i>	2
GO:0045879~negative regulation of smoothened signaling pathway	<i>RB1, PTCH1</i>	2
GO:0032869~cellular response to insulin stimulus	<i>RB1, PRKDC</i>	2
GO:0031507~heterochromatin assembly	<i>RB1, PCGF2</i>	2
GO:2001234~negative regulation of apoptotic signaling pathway	<i>RB1, PCGF2</i>	2
GO:0006469~negative regulation of protein kinase activity	<i>RB1, CDKN2A</i>	2
GO:0007265~Ras protein signal transduction	<i>RB1, CDKN2A</i>	2
GO:0050728~negative regulation of inflammatory response	<i>RB1, APOE</i>	2
GO:0007004~telomere maintenance via telomerase	<i>RAD50, TERT</i>	2
GO:0030030~cell projection organization	<i>RAB34, TSC1</i>	2
GO:0072659~protein localization to plasma membrane	<i>RAB34, PTCH1</i>	2
GO:0018107~peptidyl-threonine phosphorylation	<i>PRKDC, TGFB2</i>	2
GO:0001933~negative regulation of protein phosphorylation	<i>PRKDC, TGFB1</i>	2
GO:2001241~positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand	<i>PPP2R1B, RET</i>	2
GO:0000731~DNA synthesis involved in DNA repair	<i>POLD1, WRN</i>	2
GO:0071897~DNA biosynthetic process	<i>POLD1, TERT</i>	2
GO:0009411~response to UV	<i>POLD1, MSH6</i>	2
GO:0055089~fatty acid homeostasis	<i>POLD1, APOE</i>	2
GO:0008360~regulation of cell shape	<i>PHIP, SEMA4D</i>	2
GO:0030509~BMP signaling pathway	<i>NOTCH2, TGFB1</i>	2
GO:0001709~cell fate determination	<i>NOTCH2, PTCH1</i>	2
GO:0031954~positive regulation of protein autophosphorylation	<i>NEK10, RAD50</i>	2
GO:0043570~maintenance of DNA repeat elements	<i>MSH2, TCF7L2</i>	2
GO:0016447~somatic recombination of immunoglobulin gene segments	<i>MSH2, MSH6</i>	2
GO:0051096~positive regulation of helicase activity	<i>MSH2, MSH6</i>	2

GO:0007162~negative regulation of cell adhesion	<i>MMP2, SEMA4D</i>	2
GO:0071492~cellular response to UV-A	<i>MMP2, MMP3</i>	2
GO:0055093~response to hyperoxia	<i>MMP2, CYP1A1</i>	2
GO:0016485~protein processing	<i>MMP14, PTCH1</i>	2
GO:0042177~negative regulation of protein catabolic process	<i>MDM4, EGFR</i>	2
GO:0030177~positive regulation of Wnt signaling pathway	<i>LGR6, TERT</i>	2
GO:0050919~negative chemotaxis	<i>LGR6, SEMA4D</i>	2
GO:0030225~macrophage differentiation	<i>L3MTBL3, CASP10</i>	2
GO:0060644~mammary gland epithelial cell differentiation	<i>IRF6, PTCH1</i>	2
GO:0072089~stem cell proliferation	<i>IRF6, PTCH1</i>	2
GO:2000647~negative regulation of stem cell proliferation	<i>IRF6, PTCH1</i>	2
GO:0097681~double-strand break repair via alternative nonhomologous end joining	<i>HELQ, PRKDC</i>	2
GO:0001837~epithelial to mesenchymal transition	<i>FGFR1, TGFB1</i>	2
GO:0043536~positive regulation of blood vessel endothelial cell migration	<i>FGFR1, TGFB1</i>	2
GO:0008543~fibroblast growth factor receptor signaling pathway	<i>FGFR1, FGFR4</i>	2
GO:0045003~double-strand break repair via synthesis-dependent strand annealing	<i>FANCM, HELQ</i>	2
GO:0010742~macrophage derived foam cell differentiation	<i>EP300, TGFB1</i>	2
GO:0042307~positive regulation of protein import into nucleus	<i>EP300, TGFB1</i>	2
GO:0045444~fat cell differentiation	<i>EP300, TCF7L2</i>	2
GO:0030183~B cell differentiation	<i>EP300, MSH2</i>	2
GO:1901224~positive regulation of NIK/NF-kappaB signaling	<i>EP300, EGFR</i>	2
GO:0046427~positive regulation of JAK-STAT cascade	<i>EP300, CYP1B1</i>	2
GO:0019827~stem cell population maintenance	<i>EOMES, SMC1A</i>	2
GO:0007173~epidermal growth factor receptor signaling pathway	<i>EGFR, TGFB1</i>	2
GO:0033138~positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation	<i>EGFR, TGFB1</i>	2
GO:1903800~positive regulation of production of miRNAs involved in gene silencing by miRNA	<i>EGFR, TGFB1</i>	2
GO:0048146~positive regulation of fibroblast proliferation	<i>EGFR, TGFB1</i>	2
GO:0050730~regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	<i>EGFR, PPP2R5B</i>	2
GO:0071230~cellular response to amino acid stimulus	<i>EGFR, MMP2</i>	2
GO:0007166~cell surface receptor signaling pathway	<i>EGFR, ERBB2</i>	2
GO:0038134~ERBB2-EGFR signaling pathway	<i>EGFR, ERBB2</i>	2
GO:0071364~cellular response to epidermal growth factor stimulus	<i>EGFR, ERBB2</i>	2
GO:0070989~oxidative demethylation	<i>CYP2D6, TET2</i>	2
GO:2000379~positive regulation of reactive oxygen species metabolic process	<i>CYP1B1, TGFB2</i>	2
GO:0070301~cellular response to hydrogen peroxide	<i>CYP1B1, PCGF2</i>	2
GO:0071320~cellular response to cAMP	<i>CYP1B1, IGFBP5</i>	2
GO:2000573~positive regulation of DNA biosynthetic process	<i>CYP1B1, FGFR4</i>	2

GO:0019369~arachidonic acid metabolic process	<i>CYP1B1, CYP2D6</i>	2
GO:0006631~fatty acid metabolic process	<i>CYP1A1, FA2H</i>	2
GO:0042759~long-chain fatty acid biosynthetic process	<i>CYP1A1, CYP2D6</i>	2
GO:0019373~epoxygenase P450 pathway	<i>CYP1A1, CYP1B1</i>	2
GO:0097267~omega-hydroxylase P450 pathway	<i>CYP1A1, CYP1B1</i>	2
GO:0006694~steroid biosynthetic process	<i>CYP1A1, CYP17A1</i>	2
GO:0006955~immune response	<i>CXCL12, SEMA4D</i>	2
GO:0009615~response to virus	<i>CXCL12, CYP1A1</i>	2
GO:2000117~negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity	<i>CST2, CST1</i>	2
GO:0006629~lipid metabolic process	<i>COMT, FA2H</i>	2
GO:0030199~collagen fibril organization	<i>COL11A1, CYP1B1</i>	2
GO:0031647~regulation of protein stability	<i>CDKN2A, TERT</i>	2
GO:0033088~negative regulation of immature T cell proliferation in thymus	<i>CDKN2A, ERBB2</i>	2
GO:0032088~negative regulation of NF-kappaB transcription factor activity	<i>CDKN2A, CYP1B1</i>	2
GO:0043123~positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	<i>CASP10, IRAK4</i>	2
GO:0006268~DNA unwinding involved in DNA replication	<i>BLM, WRN</i>	2
GO:0032201~telomere maintenance via semi-conservative replication	<i>BLM, WRN</i>	2
GO:0044806~G-quadruplex DNA unwinding	<i>BLM, WRN</i>	2
GO:0061820~telomeric D-loop disassembly	<i>BLM, WRN</i>	2
GO:0090656~t-circle formation	<i>BLM, WRN</i>	2
GO:0051260~protein homooligomerization	<i>BLM, TP53BP1</i>	2
GO:0051782~negative regulation of cell division	<i>BLM, PTCH1</i>	2
GO:0000079~regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity	<i>BLM, CDKN2A</i>	2
GO:0019222~regulation of metabolic process	<i>BACH1, S1PR3</i>	2
GO:0048009~insulin-like growth factor receptor signaling pathway	<i>AR, IGFBP5</i>	2
GO:0045597~positive regulation of cell differentiation	<i>AR, FGFR1</i>	2
GO:0006869~lipid transport	<i>APOE, VPS13B</i>	2
GO:0043537~negative regulation of blood vessel endothelial cell migration	<i>APOE, TGFB1</i>	2
GO:0051000~positive regulation of nitric-oxide synthase activity	<i>APOE, TERT</i>	2
GO:0010875~positive regulation of cholesterol efflux	<i>APOE, PTCH1</i>	2
GO:0007010~cytoskeleton organization	<i>APOE, PHIP</i>	2
GO:0048662~negative regulation of smooth muscle cell proliferation	<i>APOE, IGFBP5</i>	2
GO:0098869~cellular oxidant detoxification	<i>APOE, GSTT1</i>	2
GO:0042632~cholesterol homeostasis	<i>APOE, FGFR4</i>	2
GO:0008203~cholesterol metabolic process	<i>APOE, CYP2D6</i>	2
GO:0051607~defense response to virus	<i>APOBEC3B, ITGAX</i>	2
GO:2000134~negative regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle	<i>APC, RB1</i>	2
GO:0008286~insulin receptor signaling pathway	<i>APC, PHIP</i>	2
GO:0000281~mitotic cytokinesis	<i>APC, EXOC2</i>	2

GO:0032886~regulation of microtubule-based process	APC, ERBB2	2
GO:0045736~negative regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity	APC, CDKN2A	2
GO:0006611~protein export from nucleus	ANKLE1, TGFB1	2
GO:0016525~negative regulation of angiogenesis	ADAMTS1, TIE1	2
GO:0048844~artery morphogenesis	APOE, TGFBR2	2
GO:0030097~hemopoiesis	NOTCH2, RUNX1	2
GO:0030099~myeloid cell differentiation	RUNX1, TET2	2
GO:0010225~response to UV-C	WRN, BRCA2	2
GO:0007059~chromosome segregation	BRCA1, TOP2A	2
GO:0070200~establishment of protein localization to telomere	TERT, BRCA2	2
GO:0090307~mitotic spindle assembly	SMC1A, CHEK2	2
GO:0071300~cellular response to retinoic acid	ATM, RET	2
GO:0001894~tissue homeostasis	RB1, BARD1	2
GO:1904354~negative regulation of telomere capping	ATM, RAD50	2
GO:0010332~response to gamma radiation	PRKDC, BRCA2	2
GO:0006301~postreplication repair	BRCA1, MSH2	2
GO:0030163~protein catabolic process	MMP2, CHEK2	2
GO:0006633~fatty acid biosynthetic process	BRCA1, FA2H	2
GO:0010506~regulation of autophagy	ATM, EP300	2
GO:0045739~positive regulation of DNA repair	EGFR, BRCA1	2
GO:0071356~cellular response to tumor necrosis factor	CYP1B1, BRCA1	2
GO:0030889~negative regulation of B cell proliferation	ATM, CDKN2A	2
GO:0032212~positive regulation of telomere maintenance via telomerase	ATM, ATR	2
GO:0097694~establishment of RNA localization to telomere	ATM, ATR	2
GO:0097695~establishment of macromolecular complex localization to telomere	ATM, ATR	2
GO:1904884~positive regulation of telomerase catalytic core complex assembly	ATM, ATR	2
GO:0007094~mitotic spindle assembly checkpoint	ATM, APC	2
GO:0045732~positive regulation of protein catabolic process	APC, BARD1	2
GO:0006977~DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest	ATM, CHEK2	2
GO:2000785~regulation of autophagosome assembly	ATM, CHEK2	2
GO:0006282~regulation of DNA repair	BRCA1, BARD1	2
GO:0110025~DNA strand resection involved in replication fork processing	BRCA1, BARD1	2
GO:0001833~inner cell mass cell proliferation	BRCA2, PALB2	2
GO:0006978~DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in transcription of p21 class mediator	BRCA2, CHEK2	2
GO:0043491~protein kinase B signaling	TGFB1, ERBB2	2
GO:0044773 mitotic DNA damage checkpoint signaling	CHEK2	1
GO:0016310 phosphorylation	CHEK2	1
GO:0042325 regulation of phosphorylation	BARD1	1

GO:0042176 regulation of protein catabolic process	CHEK2	1
GO:0000725~recombinational repair	XRCC6	1
GO:0045860~positive regulation of protein kinase activity	XRCC6	1
GO:0097680~double-strand break repair via classical nonhomologous end joining	XRCC6	1
GO:0000012~single strand break repair	XRCC1	1
GO:0010836~negative regulation of protein ADP-ribosylation	XRCC1	1
GO:0033194~response to hydroperoxide	XRCC1	1
GO:0061819~telomeric DNA-containing double minutes formation	XRCC1	1
GO:1903518~positive regulation of single strand break repair	XRCC1	1
GO:1904877~positive regulation of DNA ligase activity	XRCC1	1
GO:1905765~negative regulation of protection from non-homologous end joining at telomere	XRCC1	1
GO:1990414~replication-born double-strand break repair via sister chromatid exchange	XRCC1	1
GO:0006259~DNA metabolic process	WRN	1
GO:0009267~cellular response to starvation	WRN	1
GO:0040009~regulation of growth rate	WRN	1
GO:0051345~positive regulation of hydrolase activity	WRN	1
GO:0098530~positive regulation of strand invasion	WRN	1
GO:0010595~positive regulation of endothelial cell migration	WNT7A	1
GO:0030010~establishment of cell polarity	WNT7A	1
GO:0045165~cell fate commitment	WNT7A	1
GO:0045167~asymmetric protein localization involved in cell fate determination	WNT7A	1
GO:0046330~positive regulation of JNK cascade	WNT7A	1
GO:0048864~stem cell development	WNT7A	1
GO:0060071~Wnt signaling pathway, planar cell polarity pathway	WNT7A	1
GO:0001675~acrosome assembly	VPS13B	1
GO:0060612~adipose tissue development	VPS13B	1
GO:0006816~calcium ion transport	VDR	1
GO:0007595~lactation	VDR	1
GO:0010980~positive regulation of vitamin D 24-hydroxylase activity	VDR	1
GO:0042789~mRNA transcription from RNA polymerase II promoter	VDR	1
GO:0060057~apoptotic process involved in mammary gland involution	VDR	1
GO:0060058~positive regulation of apoptotic process involved in mammary gland involution	VDR	1
GO:0060558~regulation of calcidiol 1-monoxygenase activity	VDR	1
GO:0060745~mammary gland branching involved in pregnancy	VDR	1
GO:0070561~vitamin D receptor signaling pathway	VDR	1
GO:0070564~positive regulation of vitamin D receptor signaling pathway	VDR	1
GO:0006953~acute-phase response	UGT1A1	1
GO:0042573~retinoic acid metabolic process	UGT1A1	1

GO:0045922~negative regulation of fatty acid metabolic process	UGT1A1	1
GO:0045939~negative regulation of steroid metabolic process	UGT1A1	1
GO:0051552~flavone metabolic process	UGT1A1	1
GO:0052695~cellular glucuronidation	UGT1A1	1
GO:0052696~flavonoid glucuronidation	UGT1A1	1
GO:0052697~xenobiotic glucuronidation	UGT1A1	1
GO:0070980~biphenyl catabolic process	UGT1A1	1
GO:0071361~cellular response to ethanol	UGT1A1	1
GO:0071385~cellular response to glucocorticoid stimulus	UGT1A1	1
GO:1904224~negative regulation of glucuronosyltransferase activity	UGT1A1	1
GO:2001030~negative regulation of cellular glucuronidation	UGT1A1	1
GO:0001952~regulation of cell-matrix adhesion	TSC1	1
GO:0006417~regulation of translation	TSC1	1
GO:0016239~positive regulation of macroautophagy	TSC1	1
GO:0016242~negative regulation of macroautophagy	TSC1	1
GO:0032007~negative regulation of TOR signaling	TSC1	1
GO:0032780~negative regulation of ATPase activity	TSC1	1
GO:0032868~response to insulin	TSC1	1
GO:0034260~negative regulation of GTPase activity	TSC1	1
GO:0043666~regulation of phosphoprotein phosphatase activity	TSC1	1
GO:0045792~negative regulation of cell size	TSC1	1
GO:0045859~regulation of protein kinase activity	TSC1	1
GO:0046323~glucose import	TSC1	1
GO:0051492~regulation of stress fiber assembly	TSC1	1
GO:0051496~positive regulation of stress fiber assembly	TSC1	1
GO:0051893~regulation of focal adhesion assembly	TSC1	1
GO:0051894~positive regulation of focal adhesion assembly	TSC1	1
GO:0090630~activation of GTPase activity	TSC1	1
GO:0090650~cellular response to oxygen-glucose deprivation	TSC1	1
GO:1901652~response to peptide	TSC1	1
GO:0006351~transcription, DNA-templated	TP53BP1	1
GO:2000042~negative regulation of double-strand break repair via homologous recombination	TP53BP1	1
GO:0000819~sister chromatid segregation	TOP2A	1
GO:0006265~DNA topological change	TOP2A	1
GO:0007143~female meiotic division	TOP2A	1
GO:0030263~apoptotic chromosome condensation	TOP2A	1
GO:0045870~positive regulation of single stranded viral RNA replication via double stranded DNA intermediate	TOP2A	1
GO:1905463~negative regulation of DNA duplex unwinding	TOP2A	1
GO:0010761~fibroblast migration	TNS1	1

GO:0009725~response to hormone	TIMP3	1
GO:0010951~negative regulation of endopeptidase activity	TIMP3	1
GO:0034097~response to cytokine	TIMP3	1
GO:0070373~negative regulation of ERK1 and ERK2 cascade	TIMP3	1
GO:0071310~cellular response to organic substance	TIMP3	1
GO:1903984~positive regulation of TRAIL-activated apoptotic signaling pathway	TIMP3	1
GO:1904684~negative regulation of metalloendopeptidase activity	TIMP3	1
GO:0001936~regulation of endothelial cell proliferation	TIE1	1
GO:1901201~regulation of extracellular matrix assembly	TIE1	1
GO:0001569~branching involved in blood vessel morphogenesis	TGFBR2	1
GO:0002053~positive regulation of mesenchymal cell proliferation	TGFBR2	1
GO:0010468~regulation of gene expression	TGFBR2	1
GO:0010634~positive regulation of epithelial cell migration	TGFBR2	1
GO:0032147~activation of protein kinase activity	TGFBR2	1
GO:0032924~activin receptor signaling pathway	TGFBR2	1
GO:0040008~regulation of growth	TGFBR2	1
GO:0048545~response to steroid hormone	TGFBR2	1
GO:0051138~positive regulation of NK T cell differentiation	TGFBR2	1
GO:0060443~mammary gland morphogenesis	TGFBR2	1
GO:0072091~regulation of stem cell proliferation	TGFBR2	1
GO:1990428~miRNA transport	TGFBR2	1
GO:0002040~sprouting angiogenesis	TGFB1	1
GO:0002859~negative regulation of natural killer cell mediated cytotoxicity directed against tumor cell target	TGFB1	1
GO:0006754~ATP biosynthetic process	TGFB1	1
GO:0006796~phosphate-containing compound metabolic process	TGFB1	1
GO:0008354~germ cell migration	TGFB1	1
GO:0010716~negative regulation of extracellular matrix disassembly	TGFB1	1
GO:0010763~positive regulation of fibroblast migration	TGFB1	1
GO:0010800~positive regulation of peptidyl-threonine phosphorylation	TGFB1	1
GO:0010936~negative regulation of macrophage cytokine production	TGFB1	1
GO:0017015~regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	TGFB1	1
GO:0022408~negative regulation of cell-cell adhesion	TGFB1	1
GO:0030334~regulation of cell migration	TGFB1	1
GO:0031293~membrane protein intracellular domain proteolysis	TGFB1	1
GO:0031536~positive regulation of exit from mitosis	TGFB1	1
GO:0032570~response to progesterone	TGFB1	1
GO:0032667~regulation of interleukin-23 production	TGFB1	1

GO:0033280~response to vitamin D	TGFB1	1
GO:0042130~negative regulation of T cell proliferation	TGFB1	1
GO:0042306~regulation of protein import into nucleus	TGFB1	1
GO:0043117~positive regulation of vascular permeability	TGFB1	1
GO:0045216~cell-cell junction organization	TGFB1	1
GO:0045596~negative regulation of cell differentiation	TGFB1	1
GO:0045599~negative regulation of fat cell differentiation	TGFB1	1
GO:0045918~negative regulation of cytolysis	TGFB1	1
GO:0048535~lymph node development	TGFB1	1
GO:0050714~positive regulation of protein secretion	TGFB1	1
GO:0050765~negative regulation of phagocytosis	TGFB1	1
GO:0050777~negative regulation of immune response	TGFB1	1
GO:0050921~positive regulation of chemotaxis	TGFB1	1
GO:0051098~regulation of binding	TGFB1	1
GO:0051101~regulation of DNA binding	TGFB1	1
GO:0051781~positive regulation of cell division	TGFB1	1
GO:0060312~regulation of blood vessel remodeling	TGFB1	1
GO:0060390~regulation of SMAD protein import into nucleus	TGFB1	1
GO:0060391~positive regulation of SMAD protein import into nucleus	TGFB1	1
GO:0060395~SMAD protein signal transduction	TGFB1	1
GO:0060744~mammary gland branching involved in thelarche	TGFB1	1
GO:0060751~branch elongation involved in mammary gland duct branching	TGFB1	1
GO:0060762~regulation of branching involved in mammary gland duct morphogenesis	TGFB1	1
GO:0060965~negative regulation of gene silencing by miRNA	TGFB1	1
GO:0085029~extracellular matrix assembly	TGFB1	1
GO:0097191~extrinsic apoptotic signaling pathway	TGFB1	1
GO:0098586~cellular response to virus	TGFB1	1
GO:1901203~positive regulation of extracellular matrix assembly	TGFB1	1
GO:1901666~positive regulation of NAD+ ADP-ribosyltransferase activity	TGFB1	1
GO:1902894~negative regulation of pri-miRNA transcription from RNA polymerase II promoter	TGFB1	1
GO:1903077~negative regulation of protein localization to plasma membrane	TGFB1	1
GO:1903911~positive regulation of receptor clustering	TGFB1	1
GO:1990314~cellular response to insulin-like growth factor stimulus	TGFB1	1
GO:2000636~positive regulation of primary miRNA processing	TGFB1	1
GO:1904894~positive regulation of STAT cascade	TGFB1	1
GO:0006493~protein O-linked glycosylation	TET2	1
GO:0001172~transcription, RNA-templated	TERT	1

GO:0006278~RNA-dependent DNA biosynthetic process	<i>TERT</i>	1
GO:0007005~mitochondrion organization	<i>TERT</i>	1
GO:0022616~DNA strand elongation	<i>TERT</i>	1
GO:0030422~production of siRNA involved in RNA interference	<i>TERT</i>	1
GO:0046326~positive regulation of glucose import	<i>TERT</i>	1
GO:1903620~positive regulation of transdifferentiation	<i>TERT</i>	1
GO:1903704~negative regulation of production of siRNA involved in RNA interference	<i>TERT</i>	1
GO:1904751~positive regulation of protein localization to nucleolus	<i>TERT</i>	1
GO:2000352~negative regulation of endothelial cell apoptotic process	<i>TERT</i>	1
GO:2000648~positive regulation of stem cell proliferation	<i>TERT</i>	1
GO:2000773~negative regulation of cellular senescence	<i>TERT</i>	1
GO:2001240~negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand	<i>TERT</i>	1
GO:0010909~positive regulation of heparan sulfate proteoglycan biosynthetic process	<i>TCF7L2</i>	1
GO:0032024~positive regulation of insulin secretion	<i>TCF7L2</i>	1
GO:0032350~regulation of hormone metabolic process	<i>TCF7L2</i>	1
GO:0046827~positive regulation of protein export from nucleus	<i>TCF7L2</i>	1
GO:0048625~myoblast fate commitment	<i>TCF7L2</i>	1
GO:0000070~mitotic sister chromatid segregation	<i>SMC1A</i>	1
GO:0007062~sister chromatid cohesion	<i>SMC1A</i>	1
GO:0007064~mitotic sister chromatid cohesion	<i>SMC1A</i>	1
GO:0034087~establishment of mitotic sister chromatid cohesion	<i>SMC1A</i>	1
GO:0034089~establishment of meiotic sister chromatid cohesion	<i>SMC1A</i>	1
GO:0051321~meiotic cell cycle	<i>SMC1A</i>	1
GO:0072423~response to DNA damage checkpoint signaling	<i>SMC1A</i>	1
GO:0006164~purine nucleotide biosynthetic process	<i>SLC4A7</i>	1
GO:0006221~pyrimidine nucleotide biosynthetic process	<i>SLC4A7</i>	1
GO:0051453~regulation of intracellular pH	<i>SLC4A7</i>	1
GO:0055085~transmembrane transport	<i>SLC4A7</i>	1
GO:0031344~regulation of cell projection organization	<i>SEMA4D</i>	1
GO:0050732~negative regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	<i>SEMA4D</i>	1
GO:0071526~semaphorin-plexin signaling pathway	<i>SEMA4D</i>	1
GO:0006099~tricarboxylic acid cycle	<i>SDHD</i>	1
GO:0006121~mitochondrial electron transport, succinate to ubiquinone	<i>SDHD</i>	1
GO:0042776~mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport	<i>SDHD</i>	1
GO:0050433~regulation of catecholamine secretion	<i>SDHD</i>	1
GO:0071468~cellular response to acidic pH	<i>SCNN1A</i>	1
GO:1904045~cellular response to aldosterone	<i>SCNN1A</i>	1

GO:1904117~cellular response to vasopressin	SCNN1A	1
GO:0007189~adenylate cyclase-activating G-protein coupled receptor signaling pathway	S1PR3	1
GO:0007193~adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled receptor signaling pathway	S1PR3	1
GO:0007204~positive regulation of cytosolic calcium ion concentration	S1PR3	1
GO:0032651~regulation of interleukin-1 beta production	S1PR3	1
GO:1903141~negative regulation of establishment of endothelial barrier	S1PR3	1
GO:0032743~positive regulation of interleukin-2 production	RUNX1	1
GO:0043371~negative regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation	RUNX1	1
GO:0043378~positive regulation of CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation	RUNX1	1
GO:0006888~ER to Golgi vesicle-mediated transport	RINT1	1
GO:0006890~retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER	RINT1	1
GO:0060628~regulation of ER to Golgi vesicle-mediated transport	RINT1	1
GO:0007156~homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	RET	1
GO:0030155~regulation of cell adhesion	RET	1
GO:0033141~positive regulation of peptidyl-serine phosphorylation of STAT protein	RET	1
GO:0033630~positive regulation of cell adhesion mediated by integrin	RET	1
GO:0045793~positive regulation of cell size	RET	1
GO:0031134~sister chromatid biorientation	RB1	1
GO:0034088~maintenance of mitotic sister chromatid cohesion	RB1	1
GO:0043550~regulation of lipid kinase activity	RB1	1
GO:0045651~positive regulation of macrophage differentiation	RB1	1
GO:0045842~positive regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	RB1	1
GO:0051276~chromosome organization	RB1	1
GO:0071459~protein localization to chromosome, centromeric region	RB1	1
GO:0071466~cellular response to xenobiotic stimulus	RB1	1
GO:0071901~negative regulation of protein serine/threonine kinase activity	RB1	1
GO:0071922~regulation of cohesin loading	RB1	1
GO:0090230~regulation of centromere complex assembly	RB1	1
GO:1904028~positive regulation of collagen fibril organization	RB1	1
GO:0000019~regulation of mitotic recombination	RAD50	1
GO:0031860~telomeric 3' overhang formation	RAD50	1
GO:0032206~positive regulation of telomere maintenance	RAD50	1
GO:0070192~chromosome organization involved in meiotic cell cycle	RAD50	1
GO:0006897~endocytosis	RAB34	1
GO:0019882~antigen processing and presentation	RAB34	1
GO:0032418~lysosome localization	RAB34	1

GO:0043001~Golgi to plasma membrane protein transport	RAB34	1
GO:0045880~positive regulation of smoothened signaling pathway	RAB34	1
GO:0090382~phagosome maturation	RAB34	1
GO:0090385~phagosome-lysosome fusion	RAB34	1
GO:0007185~transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway	PTPRF	1
GO:0035335~peptidyl-tyrosine dephosphorylation	PTPRF	1
GO:1900121~negative regulation of receptor binding	PTPRF	1
GO:0008589~regulation of smoothened signaling pathway	PTCH1	1
GO:0032880~regulation of protein localization	PTCH1	1
GO:0040015~negative regulation of multicellular organism growth	PTCH1	1
GO:0060603~mammary gland duct morphogenesis	PTCH1	1
GO:0071397~cellular response to cholesterol	PTCH1	1
GO:0000460~maturation of 5.8S rRNA	PRKDC	1
GO:0006464~cellular protein modification process	PRKDC	1
GO:0016233~telomere capping	PRKDC	1
GO:0031571~mitotic G1 DNA damage checkpoint	PRKDC	1
GO:0034462~small-subunit processome assembly	PRKDC	1
GO:0035234~ectopic germ cell programmed cell death	PRKDC	1
GO:0036211~protein modification process	PRKDC	1
GO:0045824~negative regulation of innate immune response	PRKDC	1
GO:2001034~positive regulation of double-strand break repair via nonhomologous end joining	PRKDC	1
GO:0010469~regulation of receptor activity	PPP2R5B	1
GO:0031952~regulation of protein autophosphorylation	PPP2R5B	1
GO:0051388~positive regulation of neurotrophin TRK receptor signaling pathway	PPP2R5B	1
GO:0070317~negative regulation of G0 to G1 transition	PPP2R5B	1
GO:0060561~apoptotic process involved in morphogenesis	PPP2R1B	1
GO:0006261~DNA-dependent DNA replication	POLD1	1
GO:0006287~base-excision repair, gap-filling	POLD1	1
GO:0006297~nucleotide-excision repair, DNA gap filling	POLD1	1
GO:0045004~DNA replication proofreading	POLD1	1
GO:0070987~error-free translesion synthesis	POLD1	1
GO:0001932~regulation of protein phosphorylation	PHIP	1
GO:0022604~regulation of cell morphogenesis	PHIP	1
GO:0045840~positive regulation of mitotic nuclear division	PHIP	1
GO:0097190~apoptotic signaling pathway	PCGF2	1
GO:0002437~inflammatory response to antigenic stimulus	NOTCH2	1
GO:0006959~humoral immune response	NOTCH2	1
GO:0030513~positive regulation of BMP signaling pathway	NOTCH2	1
GO:0032148~activation of protein kinase B activity	NOTCH2	1

GO:0046579~positive regulation of Ras protein signal transduction	NOTCH2	1
GO:0071228~cellular response to tumor cell	NOTCH2	1
GO:1902749~regulation of cell cycle G2/M phase transition	NEK10	1
GO:0032870~cellular response to hormone stimulus	NCOA3	1
GO:0035624~receptor transactivation	NCOA3	1
GO:0043697~cell dedifferentiation	NCOA3	1
GO:1902459~positive regulation of stem cell population maintenance	NCOA3	1
GO:2000035~regulation of stem cell division	NCOA3	1
GO:0045007~depurination	MUTYH	1
GO:0060546~negative regulation of necroptotic process	MUTYH	1
GO:0010886~positive regulation of cholesterol storage	MSR1	1
GO:0030301~cholesterol transport	MSR1	1
GO:0034381~plasma lipoprotein particle clearance	MSR1	1
GO:0042953~lipoprotein transport	MSR1	1
GO:0000710~meiotic mismatch repair	MSH6	1
GO:0006290~pyrimidine dimer repair	MSH6	1
GO:0097193~intrinsic apoptotic signaling pathway	MSH6	1
GO:0002204~somatic recombination of immunoglobulin genes involved in immune response	MSH2	1
GO:0006312~mitotic recombination	MSH2	1
GO:0007281~germ cell development	MSH2	1
GO:0010224~response to UV-B	MSH2	1
GO:0019724~B cell mediated immunity	MSH2	1
GO:0071168~protein localization to chromatin	MSH2	1
GO:0006412~translation	MRPS30	1
GO:0032543~mitochondrial translation	MRPS30	1
GO:0010727~negative regulation of hydrogen peroxide metabolic process	MMP3	1
GO:0071732~cellular response to nitric oxide	MMP3	1
GO:0001955~blood vessel maturation	MMP2	1
GO:0019538~protein metabolic process	MMP2	1
GO:0035094~response to nicotine	MMP2	1
GO:0042542~response to hydrogen peroxide	MMP2	1
GO:0044267~cellular protein metabolic process	MMP2	1
GO:0045906~negative regulation of vasoconstriction	MMP2	1
GO:0048013~ephrin receptor signaling pathway	MMP2	1
GO:0048246~macrophage chemotaxis	MMP2	1
GO:0071347~cellular response to interleukin-1	MMP2	1
GO:0001935~endothelial cell proliferation	MMP14	1
GO:0010954~positive regulation of protein processing	MMP14	1
GO:0031638~zymogen activation	MMP14	1
GO:0045579~positive regulation of B cell differentiation	MMP14	1
GO:0045746~negative regulation of Notch signaling pathway	MMP14	1

GO:0048870~cell motility	<i>MMP14</i>	1
GO:0051895~negative regulation of focal adhesion assembly	<i>MMP14</i>	1
GO:0030330~DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	<i>MDM4</i>	1
GO:0060261~positive regulation of transcription initiation from RNA polymerase II promoter	<i>MDC1</i>	1
GO:0030851~granulocyte differentiation	<i>L3MBTL3</i>	1
GO:0090308~regulation of methylation-dependent chromatin silencing	<i>L3MBTL3</i>	1
GO:2000060~positive regulation of protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process	<i>L3MBTL3</i>	1
GO:0034113~heterotypic cell-cell adhesion	<i>ITGAX</i>	1
GO:0002291~T cell activation via T cell receptor contact with antigen bound to MHC molecule on antigen presenting cell	<i>ITGAL</i>	1
GO:0006909~phagocytosis	<i>ITGAL</i>	1
GO:0007157~heterophilic cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	<i>ITGAL</i>	1
GO:0007159~leukocyte cell-cell adhesion	<i>ITGAL</i>	1
GO:0043113~receptor clustering	<i>ITGAL</i>	1
GO:0007044~cell-substrate junction assembly	<i>ITGA6</i>	1
GO:0031589~cell-substrate adhesion	<i>ITGA6</i>	1
GO:0050900~leukocyte migration	<i>ITGA6</i>	1
GO:0002376~immune system process	<i>IRF6</i>	1
GO:0048468~cell development	<i>IRF6</i>	1
GO:0060333~interferon-gamma-mediated signaling pathway	<i>IRF6</i>	1
GO:0060337~type I interferon signaling pathway	<i>IRF6</i>	1
GO:0002224~toll-like receptor signaling pathway	<i>IRAK4</i>	1
GO:0002755~MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	<i>IRAK4</i>	1
GO:0007254~JNK cascade	<i>IRAK4</i>	1
GO:0019221~cytokine-mediated signaling pathway	<i>IRAK4</i>	1
GO:0034162~toll-like receptor 9 signaling pathway	<i>IRAK4</i>	1
GO:0070498~interleukin-1-mediated signaling pathway	<i>IRAK4</i>	1
GO:0001558~regulation of cell growth	<i>IGFBP5</i>	1
GO:0014912~negative regulation of smooth muscle cell migration	<i>IGFBP5</i>	1
GO:0043567~regulation of insulin-like growth factor receptor signaling pathway	<i>IGFBP5</i>	1
GO:0043569~negative regulation of insulin-like growth factor receptor signaling pathway	<i>IGFBP5</i>	1
GO:0045926~negative regulation of growth	<i>IGFBP5</i>	1
GO:0060056~mammary gland involution	<i>IGFBP5</i>	1
GO:0060416~response to growth hormone	<i>IGFBP5</i>	1
GO:0010792~DNA double-strand break processing involved in repair via single-strand annealing	<i>HELQ</i>	1
GO:1905168~positive regulation of double-strand break repair via homologous recombination	<i>HELQ</i>	1
GO:0006749~glutathione metabolic process	<i>GSTT1</i>	1
GO:0010715~regulation of extracellular matrix disassembly	<i>FGFR4</i>	1

GO:0019216~regulation of lipid metabolic process	<i>FGFR4</i>	1
GO:0043085~positive regulation of catalytic activity	<i>FGFR4</i>	1
GO:0045862~positive regulation of proteolysis	<i>FGFR4</i>	1
GO:0010518~positive regulation of phospholipase activity	<i>FGFR1</i>	1
GO:0048015~phosphatidylinositol-mediated signaling	<i>FGFR1</i>	1
GO:1905564~positive regulation of vascular endothelial cell proliferation	<i>FGFR1</i>	1
GO:2000546~positive regulation of endothelial cell chemotaxis to fibroblast growth factor	<i>FGFR1</i>	1
GO:2001239~regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand	<i>FGFR1</i>	1
GO:0071932~replication fork reversal	<i>FANCM</i>	1
GO:1902527~positive regulation of protein monoubiquitination	<i>FANCM</i>	1
GO:0031398~positive regulation of protein ubiquitination	<i>FANCI</i>	1
GO:0030258~lipid modification	<i>FA2H</i>	1
GO:0006887~exocytosis	<i>EXOC2</i>	1
GO:0006893~Golgi to plasma membrane transport	<i>EXOC2</i>	1
GO:0006904~vesicle docking involved in exocytosis	<i>EXOC2</i>	1
GO:0090148~membrane fission	<i>EXOC2</i>	1
GO:0090522~vesicle tethering involved in exocytosis	<i>EXOC2</i>	1
GO:2000535~regulation of entry of bacterium into host cell	<i>EXOC2</i>	1
GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway	<i>ERBB2</i>	1
GO:0033080~immature T cell proliferation in thymus	<i>ERBB2</i>	1
GO:0038133~ERBB2-ERBB3 signaling pathway	<i>ERBB2</i>	1
GO:0038135~ERBB2-ERBB4 signaling pathway	<i>ERBB2</i>	1
GO:0045765~regulation of angiogenesis	<i>ERBB2</i>	1
GO:0045943~positive regulation of transcription from RNA polymerase I promoter	<i>ERBB2</i>	1
GO:0022223~stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway	<i>EP300</i>	1
GO:0006110~regulation of glycolytic process	<i>EP300</i>	1
GO:0006473~protein acetylation	<i>EP300</i>	1
GO:0006475~internal protein amino acid acetylation	<i>EP300</i>	1
GO:0010821~regulation of mitochondrion organization	<i>EP300</i>	1
GO:0018076~N-terminal peptidyl-lysine acetylation	<i>EP300</i>	1
GO:0018393~internal peptidyl-lysine acetylation	<i>EP300</i>	1
GO:0018394~peptidyl-lysine acetylation	<i>EP300</i>	1
GO:0030511~positive regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	<i>EP300</i>	1
GO:0031333~negative regulation of protein complex assembly	<i>EP300</i>	1
GO:0042221~response to chemical	<i>EP300</i>	1
GO:0043923~positive regulation by host of viral transcription	<i>EP300</i>	1
GO:0045721~negative regulation of gluconeogenesis	<i>EP300</i>	1
GO:0045815~positive regulation of gene expression, epigenetic	<i>EP300</i>	1

GO:0060765~regulation of androgen receptor signaling pathway	EP300	1
GO:0090043~regulation of tubulin deacetylation	EP300	1
GO:1905636~positive regulation of RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	EP300	1
GO:0002302~CD8-positive, alpha-beta T cell differentiation involved in immune response	EOMES	1
GO:0010750~positive regulation of nitric oxide mediated signal transduction	EGFR	1
GO:0038083~peptidyl-tyrosine autophosphorylation	EGFR	1
GO:0042059~negative regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway	EGFR	1
GO:0045737~positive regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity	EGFR	1
GO:0045740~positive regulation of DNA replication	EGFR	1
GO:0046328~regulation of JNK cascade	EGFR	1
GO:0050999~regulation of nitric-oxide synthase activity	EGFR	1
GO:0070141~response to UV-A	EGFR	1
GO:1900020~positive regulation of protein kinase C activity	EGFR	1
GO:0042178~xenobiotic catabolic process	CYP2D6	1
GO:0051100~negative regulation of binding	CYP2D6	1
GO:0006304~DNA modification	CYP1B1	1
GO:0006809~nitric oxide biosynthetic process	CYP1B1	1
GO:0008631~intrinsic apoptotic signaling pathway in response to oxidative stress	CYP1B1	1
GO:0009404~toxin metabolic process	CYP1B1	1
GO:0014911~positive regulation of smooth muscle cell migration	CYP1B1	1
GO:0016125~sterol metabolic process	CYP1B1	1
GO:0032354~response to follicle-stimulating hormone	CYP1B1	1
GO:0033629~negative regulation of cell adhesion mediated by integrin	CYP1B1	1
GO:0043534~blood vessel endothelial cell migration	CYP1B1	1
GO:0043542~endothelial cell migration	CYP1B1	1
GO:0044849~estrous cycle	CYP1B1	1
GO:0071373~cellular response to luteinizing hormone stimulus	CYP1B1	1
GO:0071387~cellular response to cortisol stimulus	CYP1B1	1
GO:0071393~cellular response to progesterone stimulus	CYP1B1	1
GO:0071603~endothelial cell-cell adhesion	CYP1B1	1
GO:2000377~regulation of reactive oxygen species metabolic process	CYP1B1	1
GO:0001676~long-chain fatty acid metabolic process	CYP1A1	1
GO:0002933~lipid hydroxylation	CYP1A1	1
GO:0009308~amine metabolic process	CYP1A1	1
GO:0006702~androgen biosynthetic process	CYP17A1	1
GO:0006704~glucocorticoid biosynthetic process	CYP17A1	1
GO:0042446~hormone biosynthetic process	CYP17A1	1
GO:0042448~progesterone metabolic process	CYP17A1	1
GO:0001938~positive regulation of endothelial cell proliferation	CXCL12	1

GO:0006935~chemotaxis	CXCL12	1
GO:0006952~defense response	CXCL12	1
GO:0008015~blood circulation	CXCL12	1
GO:0008064~regulation of actin polymerization or depolymerization	CXCL12	1
GO:0009408~response to heat	CXCL12	1
GO:0010818~T cell chemotaxis	CXCL12	1
GO:0031640~killing of cells of other organism	CXCL12	1
GO:0033622~integrin activation	CXCL12	1
GO:0038146~chemokine (C-X-C motif) ligand 12 signaling pathway	CXCL12	1
GO:0043434~response to peptide hormone	CXCL12	1
GO:0050930~induction of positive chemotaxis	CXCL12	1
GO:0060326~cell chemotaxis	CXCL12	1
GO:0061844~antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	CXCL12	1
GO:0070098~chemokine-mediated signaling pathway	CXCL12	1
GO:0090026~positive regulation of monocyte chemotaxis	CXCL12	1
GO:0090280~positive regulation of calcium ion import	CXCL12	1
GO:1902230~negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	CXCL12	1
GO:1903237~negative regulation of leukocyte tethering or rolling	CXCL12	1
GO:1990869~cellular response to chemokine	CXCL12	1
GO:2000406~positive regulation of T cell migration	CXCL12	1
GO:0016036~cellular response to phosphate starvation	COMT	1
GO:0032259~methylation	COMT	1
GO:0006457~protein folding	CLGN	1
GO:0000209~protein polyubiquitination	CDKN2A	1
GO:0000422~mitophagy	CDKN2A	1
GO:0001953~negative regulation of cell-matrix adhesion	CDKN2A	1
GO:0008637~apoptotic mitochondrial changes	CDKN2A	1
GO:0010389~regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle	CDKN2A	1
GO:0033235~positive regulation of protein sumoylation	CDKN2A	1
GO:0042326~negative regulation of phosphorylation	CDKN2A	1
GO:0046825~regulation of protein export from nucleus	CDKN2A	1
GO:0051444~negative regulation of ubiquitin-protein transferase activity	CDKN2A	1
GO:0051882~mitochondrial depolarization	CDKN2A	1
GO:1901798~positive regulation of signal transduction by p53 class mediator	CDKN2A	1
GO:1902510~regulation of apoptotic DNA fragmentation	CDKN2A	1
GO:1903051~negative regulation of proteolysis involved in cellular protein catabolic process	CDKN2A	1
GO:1903214~regulation of protein targeting to mitochondrion	CDKN2A	1

GO:1904667~negative regulation of ubiquitin protein ligase activity	<i>CDKN2A</i>	1
GO:2000045~regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle	<i>CDKN2A</i>	1
GO:2000059~negative regulation of protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process	<i>CDKN2A</i>	1
GO:2000111~positive regulation of macrophage apoptotic process	<i>CDKN2A</i>	1
GO:2000435~negative regulation of protein neddylation	<i>CDKN2A</i>	1
GO:0008625~extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	<i>CASP10</i>	1
GO:0051604~protein maturation	<i>CASP10</i>	1
GO:0051259~protein oligomerization	<i>BLM</i>	1
GO:0071139~resolution of recombination intermediates	<i>BLM</i>	1
GO:0072711~cellular response to hydroxyurea	<i>BLM</i>	1
GO:0072757~cellular response to camptothecin	<i>BLM</i>	1
GO:0090329~regulation of DNA-dependent DNA replication	<i>BLM</i>	1
GO:0006139~nucleobase-containing compound metabolic process	<i>ATR</i>	1
GO:0008156~negative regulation of DNA replication	<i>ATR</i>	1
GO:0070198~protein localization to chromosome, telomeric region	<i>ATR</i>	1
GO:2000779~regulation of double-strand break repair	<i>ATR</i>	1
GO:0007267~cell-cell signaling	<i>AR</i>	1
GO:0030518~intracellular steroid hormone receptor signaling pathway	<i>AR</i>	1
GO:0030520~intracellular estrogen receptor signaling pathway	<i>AR</i>	1
GO:0030521~androgen receptor signaling pathway	<i>AR</i>	1
GO:0030522~intracellular receptor signaling pathway	<i>AR</i>	1
GO:0033148~positive regulation of intracellular estrogen receptor signaling pathway	<i>AR</i>	1
GO:0045720~negative regulation of integrin biosynthetic process	<i>AR</i>	1
GO:0045726~positive regulation of integrin biosynthetic process	<i>AR</i>	1
GO:0045945~positive regulation of transcription from RNA polymerase III promoter	<i>AR</i>	1
GO:0060599~lateral sprouting involved in mammary gland duct morphogenesis	<i>AR</i>	1
GO:0060748~tertiary branching involved in mammary gland duct morphogenesis	<i>AR</i>	1
GO:0060749~mammary gland alveolus development	<i>AR</i>	1
GO:0071383~cellular response to steroid hormone stimulus	<i>AR</i>	1
GO:0071391~cellular response to estrogen stimulus	<i>AR</i>	1
GO:0071394~cellular response to testosterone stimulus	<i>AR</i>	1
GO:0000302~response to reactive oxygen species	<i>APOE</i>	1
GO:0001937~negative regulation of endothelial cell proliferation	<i>APOE</i>	1
GO:0006641~triglyceride metabolic process	<i>APOE</i>	1
GO:0006707~cholesterol catabolic process	<i>APOE</i>	1

GO:0007263~nitric oxide mediated signal transduction	APOE	1
GO:0010596~negative regulation of endothelial cell migration	APOE	1
GO:0010877~lipid transport involved in lipid storage	APOE	1
GO:0017038~protein import	APOE	1
GO:0019934~cGMP-mediated signaling	APOE	1
GO:0032269~negative regulation of cellular protein metabolic process	APOE	1
GO:0032489~regulation of Cdc42 protein signal transduction	APOE	1
GO:0043254~regulation of protein complex assembly	APOE	1
GO:0043407~negative regulation of MAP kinase activity	APOE	1
GO:0045088~regulation of innate immune response	APOE	1
GO:0045807~positive regulation of endocytosis	APOE	1
GO:0015909~long-chain fatty acid transport	APOE	1
GO:0033344~cholesterol efflux	APOE	1
GO:0042311~vasodilation	APOE	1
GO:0009972~cytidine deamination	APOBEC3B	1
GO:0010526~negative regulation of transposition, RNA-mediated	APOBEC3B	1
GO:0016554~cytidine to uridine editing	APOBEC3B	1
GO:0045869~negative regulation of single stranded viral RNA replication via double stranded DNA intermediate	APOBEC3B	1
GO:0070383~DNA cytosine deamination	APOBEC3B	1
GO:0007026~negative regulation of microtubule depolymerization	APC	1
GO:0030178~negative regulation of Wnt signaling pathway	APC	1
GO:0031274~positive regulation of pseudopodium assembly	APC	1
GO:0043161~proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process	APC	1
GO:0051988~regulation of attachment of spindle microtubules to kinetochore	APC	1
GO:0070830~bicellular tight junction assembly	APC	1
GO:1902807~negative regulation of cell cycle G1/S phase transition	APC	1
GO:1904781~positive regulation of protein localization to centrosome	APC	1
GO:0045950~negative regulation of mitotic recombination	ANKLE1	1
GO:0042359~vitamin D metabolic process	CYP1A1	1
GO:0050678~regulation of epithelial cell proliferation	PRKDC	1
GO:0003376~sphingosine-1-phosphate signaling pathway	S1PR3	1
GO:0033619~membrane protein proteolysis	RET	1
GO:0001649~osteoblast differentiation	IGFBP5	1
GO:0045445~myoblast differentiation	RB1	1
GO:0048645~animal organ formation	AR	1
GO:0060769~positive regulation of epithelial cell proliferation involved in prostate gland development	AR	1
GO:0048514~blood vessel morphogenesis	CYP1B1	1

GO:1905860~positive regulation of heparan sulfate proteoglycan binding	APOE	1
GO:0043170~macromolecule metabolic process	HELQ	1
GO:0006807~nitrogen compound metabolic process	HELQ	1
GO:0044238~primary metabolic process	PRKDC	1
GO:0016192 vesicle-mediated transport	VPS13B	1
GO:0032502~developmental process	COMT	1
GO:0009653 anatomical structure morphogenesis	S1PR3	1
GO:0010556 regulation of macromolecule biosynthetic process	ATR	1
GO:0051246~regulation of protein metabolic process	APOE	1
GO:0048513~animal organ development	FGFR1	1
GO:0050801~ion homeostasis	SLC4A7	1
GO:0051248~negative regulation of protein metabolic process	APOE	1
GO:0051094~positive regulation of developmental process	RUNX1	1
GO:0051239~regulation of multicellular organismal process	TGFBR2	1
GO:0002573~myeloid leukocyte differentiation	RUNX1	1
GO:0002521~leukocyte differentiation	TET2	1
GO:0046907~intracellular transport	APOE	1
GO:0051649~establishment of localization in cell	MSR1	1
GO:0032210~regulation of telomere maintenance via telomerase	ATM	1
GO:0036092~phosphatidylinositol-3-phosphate biosynthetic process	ATM	1
GO:0036289~peptidyl-serine autophosphorylation	ATM	1
GO:1903626~positive regulation of DNA catabolic process	ATM	1
GO:1904262~negative regulation of TORC1 signaling	ATM	1
GO:1904358~positive regulation of telomere maintenance via telomere lengthening	ATM	1
GO:0007549~sex-chromosome dosage compensation	BRCA1	1
GO:0009048~dosage compensation by inactivation of X chromosome	BRCA1	1
GO:0033147~negative regulation of intracellular estrogen receptor signaling pathway	BRCA1	1
GO:0044027~negative regulation of gene expression via chromosomal CpG island methylation	BRCA1	1
GO:0045717~negative regulation of fatty acid biosynthetic process	BRCA1	1
GO:0060816~random inactivation of X chromosome	BRCA1	1
GO:0071681~cellular response to indole-3-methanol	BRCA1	1
GO:1902042~negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	BRCA1	1
GO:2000378~negative regulation of reactive oxygen species metabolic process	BRCA1	1
GO:0031441~negative regulation of mRNA 3'-end processing	BARD1	1
GO:0046826~negative regulation of protein export from nucleus	BARD1	1
GO:0006289~nucleotide-excision repair	BRCA2	1
GO:0033600~negative regulation of mammary gland epithelial cell proliferation	BRCA2	1

GO:0045931~positive regulation of mitotic cell cycle	<i>BRCA2</i>	1
GO:1990426~mitotic recombination-dependent replication fork processing	<i>BRCA2</i>	1
GO:0042148~DNA strand invasion	<i>RAD51D</i>	1
GO:0000086~G2/M transition of mitotic cell cycle	<i>CHEK2</i>	1
GO:0006695~cholesterol biosynthetic process	<i>CHEK2</i>	1
GO:0006914~autophagy	<i>CHEK2</i>	1

RESEARCH

Open Access



# Germline mutations of breast cancer susceptibility genes through expanded genetic analysis in unselected Colombian patients

Diana Carolina Sierra-Díaz<sup>1</sup>, Adrien Morel<sup>1</sup>, Dora Janeth Fonseca-Mendoza<sup>1</sup>, Nora Contreras Bravo<sup>1</sup>, Nicolas Molano-Gonzalez<sup>9</sup>, Mariana Borrás<sup>2</sup>, Isabel Munevar<sup>2</sup>, Mauricio Lema<sup>3</sup>, Henry Idrobo<sup>4</sup>, Daniela Trujillo<sup>4</sup>, Norma Serrano<sup>5</sup>, Ana Isabel Orduz<sup>5</sup>, Diego Lopera<sup>6</sup>, Jaime González<sup>6</sup>, Gustavo Rojas<sup>6,13</sup>, Paula Londono-De Los Ríos<sup>6,13</sup>, Ray Manneh<sup>7</sup>, Rodrigo Cabrera<sup>1,11</sup>, Wilson Rubiano<sup>8</sup>, Jairo de la Peña<sup>8</sup>, María Catalina Quintero<sup>12</sup>, William Mantilla<sup>2,10</sup> and Carlos M. Restrepo<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background** In Colombia and worldwide, breast cancer (BC) is the most frequently diagnosed neoplasia and the leading cause of death from cancer among women. Studies predominantly involve hereditary and familial cases, demonstrating a gap in the literature regarding the identification of germline mutations in unselected patients from Latin-America. Identification of pathogenic/likely pathogenic (P/LP) variants is important for shaping national genetic analysis policies, genetic counseling, and early detection strategies. The present study included 400 women with unselected breast cancer (BC), in whom we analyzed ten genes, using Whole Exome Sequencing (WES), known to confer risk for BC, with the aim of determining the genomic profile of previously unreported P/LP variants in the affected population. Additionally, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) was performed to identify Large Genomic Rearrangements (LGRs) in the *BRCA1/2* genes. To ascertain the functional impact of a recurrent intronic variant (*ATM* c.5496 + 2\_5496 + 5delTAAG), a minigene assay was conducted.

**Results** We ascertained the frequency of P/LP germline variants in *BRCA2* (2.5%), *ATM* (1.25%), *BRCA1* (0.75%), *PALB2* (0.50%), *CHEK2* (0.50%), *BARD1* (0.25%), and *RAD51D* (0.25%) genes in the population of study. P/LP variants account for 6% of the total population analyzed. No LGRs were detected in our study. We identified 1.75% of recurrent variants in *BRCA2* and *ATM* genes. One of them corresponds to the *ATM* c.5496 + 2\_5496 + 5delTAAG. Functional validation of this variant demonstrated a splicing alteration probably modifying the Pincer domain and subsequent protein structure.

**Conclusion** This study described for the first time the genomic profile of ten risk genes in Colombian women with unselected BC. Our findings underscore the significance of population-based research, advocating the consideration of molecular testing in all women with cancer.

**Keywords** Unselected breast cancer, Whole exome sequencing, Pathogenic germline variants, Minigene assay

\*Correspondence:

Carlos M. Restrepo

carlos.restrepo@urosario.edu.co

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2024. **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 licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence 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 licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

## Background

Breast cancer (BC) is the most frequently diagnosed malignant neoplasm and the leading cause of death from cancer in women [1].

BC incidence in Latin-American (LATAM) countries is generally lower when compared to high-income countries (HIC). However, unlike in HIC, BC-related mortality has not shown a declining trend in LATAM and has, in fact, increased in some countries over the past decade (<https://gco.iarc.fr/>). In Colombia, the observed 5-year survival rate for BC was 72% according to the CONCORD3 trial [2], highlighting a significant disparity between LATAM and HIC. This disparity can be attributed to various factors, including disease characteristics, healthcare system issues, and the availability of early diagnosis programs, among others.

An essential factor in risk assessment and early diagnosis is the recognition of hereditary BC risk, which may account for as much as 10% of all BC cases [3].

Germline cancer risk study can have various approaches, among them, the study of selected populations based on pedigrees with hereditary and familial cancer segregation analysis to identify genes linked with specific risks, or the study of unselected cases. In the latter approach, unselected cases, which involve individuals without consideration of family history or age at diagnosis, enable the calculation of estimates related to germline mutation prevalence, assessment of cancer risk genes, and identification of at-risk relatives, free from ascertainment bias [4].

Worldwide Breast Cancer Association Consortium (BCAC) reported *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2*, *BARD1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *CDH1*, and *TP53*, as the main genes for the prediction of hereditary BC risk [5]. Furthermore, BCAC and Cancer Risks Estimates Related to Susceptibility Consortium (CARRIERS), suggested *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *PALB2*, and *CHEK2* genes as highly penetrant; both consortiums pinpointed that 10% of BC patients have cancer susceptibility germline mutation [3].

The mutational spectrum of some of these genes has been assessed in Latin American populations in studies of unselected BC, indicating carrier frequencies ranging from 10.7% in Argentina to 25.2% in Brazil [6, 7]. These differences may reflect the high ethnic variability attributed to Latin American populations.

Colombia has a mixed population composed of Amerindian (descendants of indigenous people), European immigrants (mostly Spanish), and Africans, with recent waves of settlements that have included individuals from the Middle East, Romanians, Germans (around World War I and II), and Asian populations [8], although these represent a small minority.

To date, no study in Colombia has comprehensively examined all the genes considered highly significant by the BCAC and CARRIERS consortia. Additionally, there is a lack of data on the mutational spectrum of these genes within the unselected Colombian population. Our research aims to describe for the first time in our country the genomic profile of ten genes risk for breast cancer, in 400 unselected Colombian women with BC, using whole exome sequencing (WES). This population is particularly noteworthy since most studies in our and other Latin American countries have primarily focused on hereditary cases. Our findings uncovered both new and recurrent pathogenic variants. Furthermore, through functional validation, we propose molecular mechanisms that are linked to the etiology of the disease.

## Methods

### Patients

From March 2019 to May 2022 women with BC were included in the trial, in cancer centers located throughout Colombia. The study included women with a diagnosis of invasive BC (within one year from diagnosis) supported with biopsy and immunohistochemical test. Women or their relatives with known *BRCA1* or *BRCA2* mutations were excluded. Patients older than 18 years were invited to participate in this study and those who accepted signed an informed consent.

This study was performed in compliance with the Helsinki Declaration and all experimental procedures were approved by Fundación Cardioinfantil–Instituto de Cardiología and Universidad del Rosario Ethics Committee (approval numbers: 402018 7–11-2018, DVO005 1805-CV1469 3–12-2021, Pfizer: WI241988 – Investigator initiate research, independent review board: 28–08-2018, GF1147 2018).

### Clinical data collection

The clinical and sociodemographic variables collected have been described in supplementary methods.

### Genomic DNA extraction

The quality and quantity of the DNA were evaluated through the measurement of absorbance with a Nanodrop (OD260/280 and OD260/230).

### MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification—MLPA)

MLPA was performed using the commercial kit SALSA MLPA Probemix P002-D1 for *BRCA1* and P090-C1 for *BRCA2* (MRC-Holland, Amsterdam). Experimental details have been included as supplementary methods.

### Next generation sequencing (NGS–WES)

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples according to the protocol of the Quick-DNA Miniprep plus kit (Zymo Research, Orange, California, USA). Experimental details of library preparation, WES, bioinformatic analysis and germline variant classification have been included as supplementary methods.

### Segregation analysis

All families with an index case carrier of a pathogenic or likely pathogenic germline variant classified according to the ACMG/AMP, ClinGen, or ENIGMA criteria and confirmed by Sanger sequencing were invited to participate in a segregation analysis and all relatives of the index case (with or without cancer at any age), who were willing to participate in the study, were tested. A total of 36 relatives were included in the family segregation analysis.

### Functional validation of the recurrent intronic variant in *ATM* gene (minigene assay)

Experimental details of minigene assay have been included as supplementary methods.

### Statistical analysis

Qualitative variables are summarized as frequencies and percentages while quantitative variables as medians and interquartile ranges were reported. To assess possible associations with mutation status Kruskal–Wallis test for quantitative variables and the Chi-square independence test for qualitative were used. All statistical analyses were done in software R version 4.3.0 [9].

## Results

### Population of study

We enrolled 400 patients in the study, the median age of diagnosis was 53 years, 55.5% of them were post-menopausal and 60.3% were overweight or obese. The main histologic diagnosis was ductal carcinoma (85.5%), the prevalence of triple-negative BC (TNBC) was 11.5%, the prevalence of metastatic disease was 4%, and 61.1% of the patients met NCCN criteria for hereditary BC testing. Table 1 summarizes the main data obtained from the 400 women with unselected BC.

### Germline mutations identified in women with unselected BC

All 400 women with unselected BC were assessed with ten known cancer genes as follows: *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *PALB2*, *CHEK2*, *BARD1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *CDH1*, and *TP53* which were sequenced by WES. 24

**Table 1** Baseline characteristics of the patients

Variable		n=400	%
Age at diagnosis (median–range)		53	43–64
Tumor size (median–range)		20	12–30
Positive nodes (median–range)		0	0–1
Ki67 (median–range)		25	13–45
Histologic diagnosis	Ductal	342	85,50
	Lobular	21	5,25
	Other	35	8,75
	ND	2	0,50
ER status	Negative	87	21,75
	Positive	308	77
	ND	5	1,25
PR status	Negative	117	29,25
	Positive	278	69,5
	ND	5	1,25
HER-2 status	Negative	298	74,5
	Positive	95	23,75
	ND	7	1,75
TNBC status	No	349	87,25
	Yes	46	11,50
	ND	5	1,25
Nodal stage	0	204	51
	1	134	33,50
	2	39	9,75
	3	14	3,50
	ND	9	2,25
Tumoral stage	I	91	22,75
	II	183	45,75
	III	104	26
	IV	16	4
	ND	6	1,50
Age of menarche (median–range)		13	12–14
Born children (median–range)		2	1,50–3
Age first born child (median–range)		23	19–28
Lactation	No	76	19
	Yes	322	80,50
	ND	2	0,50
Menopause	No	173	43,25
	Yes	222	55,50
	ND	5	1,25
Age of menopause (median–range)		50	46–52
Weight (median–range)		65	58–73,30
Height (median–range)		1,58	1,55–1,63
BMI (median–range)		25,96	23,57–29,14
Overweight–obesity	No	153	39
	Yes	241	60,25
	ND	3	0,75
Hormonal contraception exposure	No	201	50,25
	Yes	196	49
	ND	3	0,75

**Table 1** (continued)

Variable		n = 400	%
HRT	No	372	93
	Yes	24	6
	ND	4	1
Current or past smoking	No	296	74
	Yes	102	25,50
	ND	2	0,50
Alcohol consumption	No	347	86,75
	Yes	50	12,50
	ND	3	0,75
Radiation exposure	No	346	86,50
	Yes	25	6,25
	ND	29	7,25
Personal history of cancer	No	377	94,25
	Yes	21	5,25
	ND	2	0,50
Family history of cancer	No	120	30
	Yes	275	68,75
	ND	5	1,25
fulfill of NCCN criteria v1.2023	No	155	38,75
	Yes	243	60,75
	ND	2	0,50
Inheritance	Sporadic	158	39,50
	Familial	187	46,75
	Hereditary	50	12,50
	ND	5	1,25
P/LP variant	No	376	94
	Yes	24	6
Mutation status	No mut	376	94
	BRCA	13	3,25
	noBRCA	11	2,75

Tumor size was measured in millimeters (mm); weight is given in kilograms (kg); height is given in meters (m); BMI: body mass index (kg/m<sup>2</sup>); other (mixed, medullary, mucinous, metaplastic, tubular, micropapillary, papillary, adenocarcinoma, apocrine, and cribriform); HRT: hormonal replacement therapy; NCCN criteria v1.2023 [10]; hereditary breast cancer: autosomal dominant inheritance pattern involving at least three generations, consider cancers associated with Lynch syndrome [11]; familial breast cancer: breast cancer with a family history of one or more first- or second-degree relatives with breast cancer that does not fit the hereditary breast cancer definition [11]; P/LP variant: presence of pathogenic or likely pathogenic germline variant; no\_mut: absence of P/LP variant; BRCA: P/LP variant identified in genes *BRCA1* or *BRCA2*; noBRCA: P/LP variant identified in genes *ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2* or *RAD51D*

(6%) patients had pathogenic or like pathogenic variants (P/LP variants) identified. 18 germline pathogenic variants were identified in 19 individuals (11 in *BRCA1/2* genes and seven in *ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2*, and *RAD51D* genes). From these variants, 12 were frameshift (67%), four nonsense (22%), and two missense (11%). *PALB2* gene showed two molecular changes that were not reported in ClinVar nor dbSNP

**Table 2** Frequency of P/LP variants in the population of study and their distribution by genes

Genes	Population of study (n = 400). Frequency of patients with mutation (%)	P/LP variants (n = 21). Frequency of P/LP variants (%)
<i>BRCA2</i>	10 (2.50%)	8 (38.10%)
<i>ATM</i>	5 (1.25%)	3 (14.28%)
<i>BRCA1</i>	3 (0.75%)	3 (14.28%)
<i>PALB2</i>	2 (0.50%)	3 (14.28%)
<i>CHEK2</i>	2 (0.50%)	2 (9.52%)
<i>BARD1</i>	1 (0.25%)	1 (4.76%)
<i>RAD51D</i>	1 (0.25%)	1 (4.76%)

database, designated as novel. Three likely pathogenic variants were identified in five women in *ATM*, *CHEK2*, and *PALB2* genes. Likely pathogenic variants were represented by one missense (33%) and two intronic (67%). All the P/LP variants were in a heterozygous state. The variants are summarized in Tables 2, 3, and supplementary methods Fig. 1.

Estrogen and/or progesterone positive hormonal receptors (HR) were identified in 75% (18/24) of unselected women carrying P/LP variants. From them, germline mutations distribution was: *BRCA2*, 44.4% (8/18); *ATM*, 27.8% (5/18); *CHEK2*, 11.1% (2/18); *BRCA1*, 5.5% (1/18); *PALB2* 5.5% (1/18) and *RAD51D*, 5.5% (1/18).

P/LP variants were found in 13/24 (54.2%) women without HER-2 amplification (independently of HR status), and their gene distribution was: *BRCA2*, 46.2% (6/13); *ATM*, 38.5% (5/13); *CHEK2*, 7.7% (1/13) and *RAD51D*, 7.7% (1/13). In contrast, oncoprotein HER-2 amplification (independently of HR status) was detected in 20,8% of the tumors. 40% (2/5) of the P/LP variants were identified in *BRCA2* gene and 60% (3/5) in *BRCA1*, *CHEK2* and *PALB2* genes.

TNBC tumors (according to the absence of HR expression and HER-2 amplification) were identified in 5/24 affected women (20.8%), from them, 40% (2/5) of the variants were detected in *BRCA1* gene, and 60% (3/5) in *BRCA2*, *BARD1*, and *PALB2* genes.

Ductal BC was present in 95.8% of the patients carrying a P/LP variant; metaplastic BC was observed in 1/24 (4.2%) women with a heterozygous *PALB2* gene mutation.

Interestingly, two patients (2/24) suffered more than one primary cancer. One woman was diagnosed with lymphoma with a prior ductal BC, and she had a heterozygous *BRCA2* c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25; the other one had three cancers, thyroid, gastric, and ductal BC harboring an *ATM* c.5496+2\_5496+5del-TAAG, a likely pathogenic mutation.

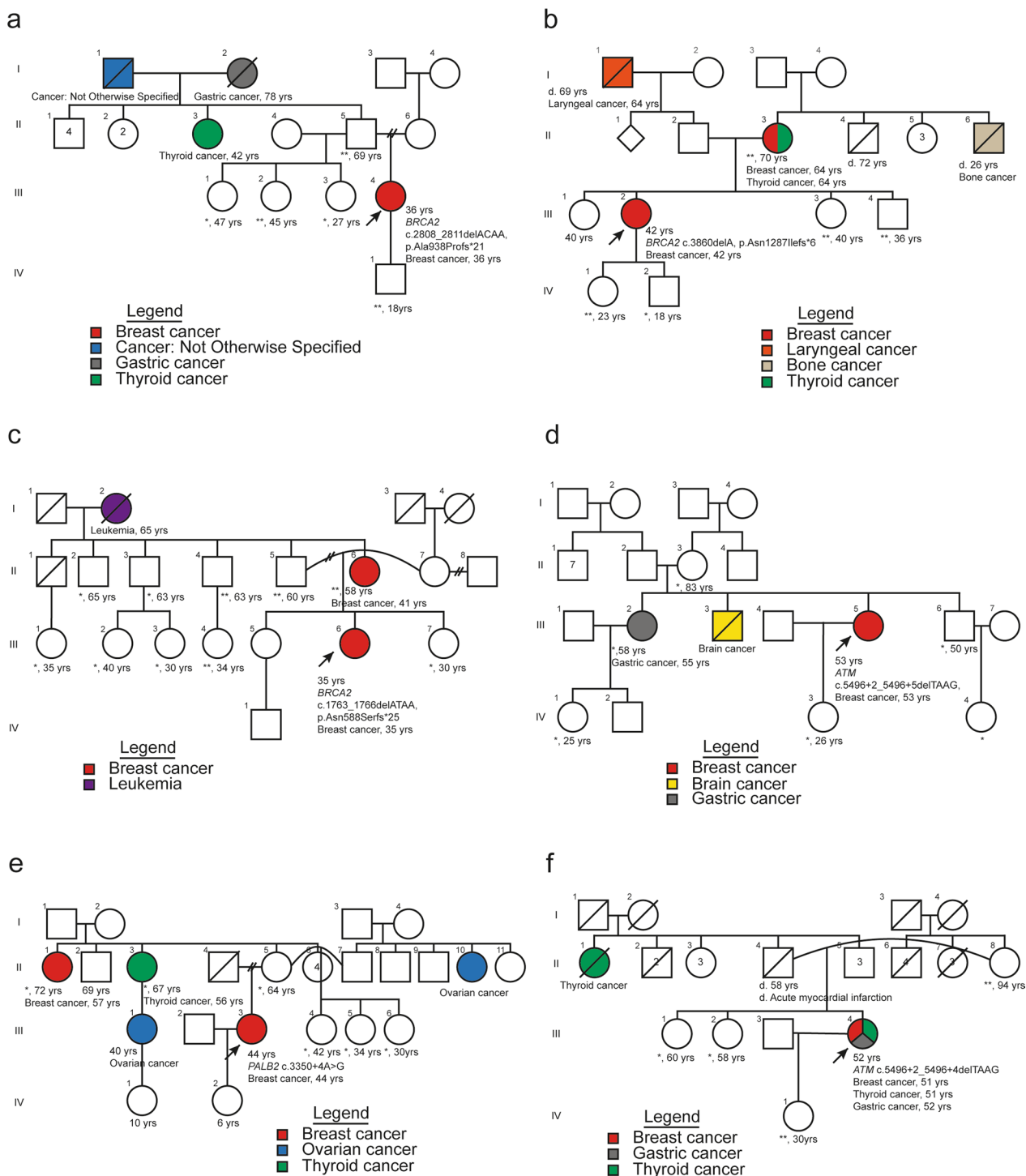
**Table 3** Molecular and clinicopathological description of germline mutations

Gene	Variant (HGVS nomenclature)	AF exomes (gnomAD v2.1.1)	AF iatino (gnomAD v2.1.1)	AF population of study	ACMG/AMP classification	ENIGMA classification	SNP ID	Molecular subtype	Personal history of cancer	Family history of cancer	Number of patients
<i>BRCA1</i>	NM_007294.3:c.5123C>A (p.Ala1708Glu)	0.00001990	0.00005784	0.00125	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs28897696	TNBC	No	No	1
<i>BRCA1</i>	NM_007294.3:c.5324T>G (p.Met1775Arg)	0.00001193	0	0.00125	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs41293463	ER-,PR+,HER2+	No	No	1
<i>BRCA1</i>	NM_007294.3:c.1674delA (p.Gly559Valfs*13)	NR	NR	0.00125	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs80357600	TNBC	No	Yes	1
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3:c.2380dupA (p.Met794Asnfs*8)	NR	NR	0.00125	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs730881602	ER+PR-,HER2-	No	No	1
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3:c.3860delA (p.Asn1287Ilefs*6)	0.0000153412	0	0.00125	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs80359406	ER-,PR-,HER2+	No	Yes	1
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3:c.4889C>G (p.Ser1630Ter)	0.00000803232	0	0.00125	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs80358711	ER-,PR+,HER2-	No	Yes	1
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3:c.5773C>T (p.Gln1925Ter)	0.00000398902	0	0.00125	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs80358806	ER+PR+,HER2-	No	Yes	1
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3:c.5851_5854delAGTT (p.Ser1951Tlpsfs*11)	NR	NR	0.00125	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs80359543	ER+PR+,HER2+	Yes	No	1
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3:c.2808_2811delACAA (p.Ala938Profs*21)	0.00000797283	0	0.00025	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs80359351	ER+PR+,HER2-;	No;	No	2
<i>BRCA2</i>	NM_000059.4:c.1763_1766delATAA (p.Asn588Serfs*25)	NR	NR	0.00025	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs80359303	ER+,PR+,HER2-;	No;	Yes	2
<i>BRCA2</i>	NM_000059.4:c.9097dupA (p.Thr3033Asnfs*11)	NR	0	0.00125	NA	Pathogenic (BRCAexchange)	rs397507419	TNBC	No	No	1
<i>ATM</i>	NM_000051.3:c.4507C>T (p.Gln1503Ter)	0.00000795817	0.00005783	0.00125	Pathogenic (PVS1+PS4 moderate+PM2 supporting)	NA	rs2227945	ER+PR+,HER2-	No	No	1
<i>ATM</i>	NM_000051.3:c.3510dupA (p.Gln1171Thrfs*8)	0.00000397874	0.00002891	0.00125	Pathogenic (PVS1+PS4 supporting+PM2)	NA	rs876658899	ER+PR+,HER2-	No	Yes	1
<i>ATM</i>	NM_000051.3:c.5496+2_5496+5delTAAG	NR	NR	0.00375	Likely pathogenic (PVS1 moderate+PS4 moderate+PM2)	NA	rs1565479572	ER+,PR+,HER2-;	No;	No	3
<i>BARD1</i>	NM_000465.3:c.176_177delAG (p.Glu59Alafs*8)	NR	NR	0.00125	Pathogenic (PVS1+PM1+PM2)	NA	rs1057517589	TNBC	No	No	1
<i>CHEK2</i>	NM_007194.3:c.1100delC (p.Thr367Metfs*15)	0.00204432	0.00005649	0.00125	Pathogenic (PVS1+PS3+PS4 moderate+PM1)	NA	rs555607708	ER+PR+,HER2+	No	Yes	1
<i>CHEK2</i>	NM_007194.3:c.349A>G (p.Arg117Gly)	0.00011941	0.0001129	0.00125	Likely pathogenic (PS3+PS4 moderate+PM1+PP3)	NA	rs28909982	ER+,PR+,HER2-	No	Yes	1

**Table 3** (continued)

Gene	Variant (HGVS nomenclature)	AF exomes (gnomAD v2.1.1)	AF Latino (gnomAD v2.1.1)	AF population of study	ACMG/AMP classification	ENIGMA classification	SNP ID	Molecular subtype	Personal history of cancer	Family history of cancer	Number of patients
PALB2	NM_024675.3:c.984delT (p.Leu329Terfs)	NR	NR	0.00125	Pathogenic (PVS1 + PM2)	NA	Novel	ER+,PR+,HER2+	No	No	1*
PALB2	NM_024675.3:c.986delT (p.Leu329Glnfs*17)	NR	NR	0.00125	Pathogenic (PVS1 + PM2)	NA	Novel	ER+,PR+,HER2+	No	No	1*
PALB2	NM_024675.3:c.3350+4A>G	0.000003977	0	0.00125	Likely pathogenic (PS3 very strong + PM2 + BP4)	NA	rs180177136	TNBC	No	Yes	1
RAD51D	NM_002878.3:c.556C>T (p.Arg186Ter)	0.00004011	0	0.00125	Pathogenic (PVS1 + PS4 supporting + PM1)	NA	rs387906843	ER+,PR+,HER2-	No	No	1

NR Not reported, NA Not applied, \*variants identified in the same patient.



**Fig. 1** Pedigrees of index cases and their relatives assessed in the segregation analysis. **a** Germline mutation located in *BRCA2* gene: c.2808\_2811delACAA, p.Ala938Profs\*21; **b** Germline mutation located in *BRCA2* gene: c.3860delA, p.Asn1287Ilefs\*6; **c** Germline mutation located in *BRCA2* gene: c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25; **d** and **f** Germline mutation located in *ATM* gene: c.5496+2\_5496+5delTAAG; **e** Germline mutation located in *PALB2* gene: c.3350+4A>G; \*\*individuals tested harboring germline mutation; \* individuals tested not harboring germline mutation

Family history of cancer was documented in 14/24 women (58.3%), in their first, second, and third consanguinity-degree relatives. *BRCA2* accounts for 50% (7/14), with P/LP variants including a variety of tumors in relatives such as breast, thyroid, bone, gastric, prostate, leukemia, and esophagus, followed by *ATM*, in 3/14 (21.4%), which referred on thyroid, gastric, and brain cancers. Two women (14.3%) have P/LP variants in the *CHEK2* gene, and their relatives have breast and pancreas cancer. One patient (1/14) who had a pathogenic variant in the *BRCA1* gene, had several relatives with BC. Lastly, an affected woman with the *PALB2* gene intronic variant, described relatives with ovary, breast, and thyroid cancers.

Three recurrent germline mutations were detected: two in *BRCA2* (c.2808\_2811delACAA, p.Ala938Profs\*21 and c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25); the other one in *ATM* (c.5496+2\_5496+5delTAAG). From them, *BRCA2* c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25, and *ATM* c.5496+2\_5496+5delTAAG were not previously reported in the gnomAD v2.1.1 database (<https://gnomad.broadinstitute.org/>).

Regarding MLPA analysis for *BRCA1/2* genes, there were no large genomic rearrangements (LGRs) in the sample of 400 unselected women with BC.

#### Correlation between mutation status and baseline characteristics of women with unselected BC

For women harboring germline mutations, statistical association tests were performed, comparing baseline characteristics of the population of study among 3 groups based on mutation status, such as absence of germline mutations (no mut), presence of germline mutations in *BRCA1/2* genes (BRCA), and germline mutations in noBRCA genes (*ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2*, and *RAD51D*) (Table 4). Women with germline mutations in *BRCA1/2* genes had an earlier age at diagnosis in comparison with no mut group (median age 36 vs 54,  $p=0.0003$ ), and 15.38% of women in the group BRCA had menopause in contrast with the no mut group were 57.68% of the patients had menopause ( $p=0.009$ ). The variable nodal stage (specifically nodal stage 2) had a higher frequency in the BRCA group (30.77% vs 9.26%,  $p=0.0425$ ) showing an association with the spread of cancer to a higher number of lymph nodes in this particular mutation status. No association with statistical significance was established for the noBRCA group.

#### Segregation analysis

Analysis was performed in six families which were ascertained by an index case: three families for three different pathogenic variants in the *BRCA2* gene, two with a likely pathogenic variant in the *ATM* gene, and one

family with a likely pathogenic variant in the *PALB2* gene (Fig. 1). In total, 13 relatives tested positive for the mutations assessed (11 in *BRCA2* and two in *ATM*). Particularly, two *BRCA2* families with a pathogenic variant were tested, one of the relatives had been diagnosed with BC at 41 years (c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25; age diagnosis index case: 35 years), and another relative was diagnosed with breast and thyroid cancer at 64 years (c.3860delA, p.Asn1287Ilefs\*6; age diagnosis index case: 42 years). All of the relatives who tested positive received genetic counseling.

#### Minigene assay

Three affected and unrelated women showed heterozygous *ATM* c.5496+2\_5496+5delTAAG variant. A minigene assay was performed to identify the alternative splicing effect in mRNA. This assay evidenced an exon 36 skipping which was confirmed by Sanger sequencing (Fig. 2).

#### Discussion

Identifying germline mutations in high and moderate-risk BC genes is of paramount importance for establishing genetic screening programs that facilitate early diagnosis and development of national public health policies. Implementation of genomic analysis through NGS and incorporation of noBRCA genes has proven to be an adequate strategy to increase sensibility regarding recurrent mutation analysis restricted only to *BRCA1/2* genes [12, 13].

Globally, germline mutation cancer prevalence, can be estimated from hereditary, familial, or unselected BC cases. European, North American, and Asian populations have been the primary focus to obtain this data.

To our knowledge, this is the first report on the prevalence of mutations in the top 10 clinically impactful genes, identified by WES in 400 women with unselected BC from various regions of Colombia.

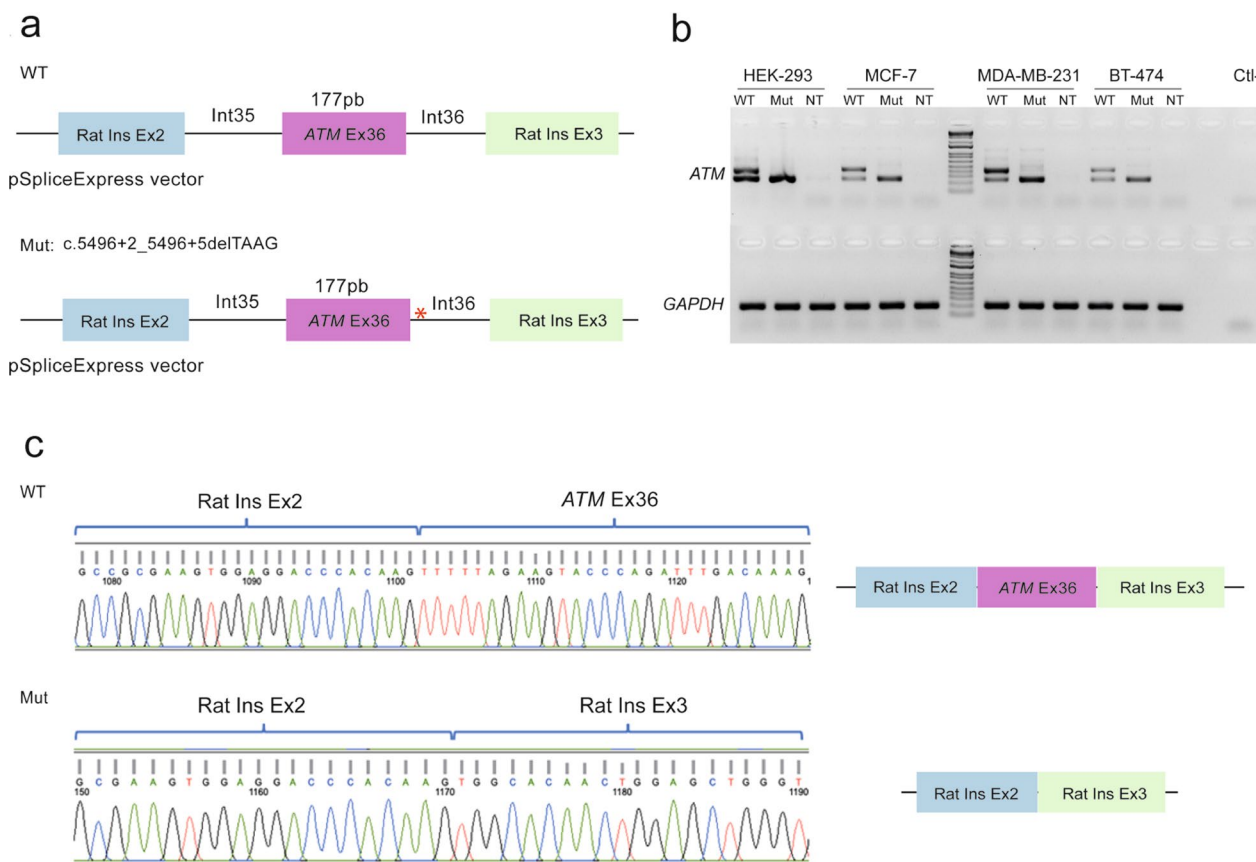
We evaluated NCCN criteria [10] in the women studied. Significantly, 20.8% of them with a P/LP variant did not fulfill those criteria. This finding demonstrates that molecular testing should be considered in all women with BC regardless of the age of diagnosis, molecular subtype, and personal or family history of cancer.

Our findings determined that 6% of the Colombian women with unselected BC had germline mutations in seven of the genes studied, being *BRCA2* the gene with the highest frequency of variants and women affected, followed by *ATM*, *BRCA1*, *PALB2*, *CHEK2*, *BARD1* and *RAD51D* genes. No P/LP variants were detected in *CDH1*, *RAD51C*, and *TP53* genes. BC prevalence of germline mutations and their frequency in cancer risk genes,

**Table 4** BRCA and noBRCA mutations statistical association test with clinical and pathological data

		No mut	BRCA	noBRCA	BRCA vs No mut	noBRCA vs No mut	p-value
Age at diagnosis		54 (43–65)	36 (30–44)	51 (45–56)	– 15.54 (– 20.92;– 10.16)	– 3.54 (– 9.1; 2.02)	<b>0.0003</b>
Tumor size		20 (12–30)	20 (15–25)	30 (16–39.5)	1.44 (– 14.61;17.49)	5.81 (– 7.41;19.02)	0.5662
Positive nodes		0 (0–1)	0 (0–1)	1 (0.25–4.25)	– 0.66 (– 1.07;–0.25)	2.71 (– 0.66;6.07)	0.0469
Ki67		25 (12–43.8)	35 (20–65)	25 (15–45)	8.59 (– 5.57;22.76)	2.77 (– 11.87;17.23)	0.3644
Histologic diagnosis	Ductal	319 (85, 29%)	13 (100%)	10 (90.91%)	–	–	0.5784
	Lobular	21 (5.61%)	0	0	0 (0.03;9.58)	0 (0.04;12.50)	
	Other	34 (9.09%)	0	1 (9.09%)	0 (0.02;5.90)	0.83 (0.23;7.59)	
ER status	Pos	291 (78.44%)	8 (61.54%)	9 (81.82%)	0.36 (0.14;1.28)	0.82 (0.25;4.32)	0.3353
PR status	Pos	261 (70.35%)	9 (69.23%)	8 (72.73%)	0.76 (0.28;2.80)	0.84 (0.29;3.63)	0.9814
HER-2 status	Pos	91 (24.66%)	2 (15.38%)	2 (18.18%)	0.50 (0.16;2.65)	0.60 (0.19;3.29)	0.8696
TNBC status	Yes	41 (11.05%)	3 (23.08%)	2 (18.18%)	2.14 (0.76;9.28)	1.57 (0.50;8.76)	0.1744
Nodal stage	0	195 (53.13%)	6 (46.15%)	3 (27.27%)	–	–	<b>0.0425</b>
	1	126 (34.33%)	3 (23.08%)	5 (45.45%)	0.66 (0.22;3.11)	1.92 (0.62;9.45)	
	2	34 (9.26%)	4 (30.77%)	1 (9.09%)	3.18 (1.12;13.77)	1.39 (0.35;17.01)	
	3	12 (3.27%)	0	2 (18.18%)	0 (0.06;22.59)	7.5 (2.00;62.44)	
Tumoral stage	I	88 (23.78%)	3 (23.08%)	0	–	–	0.3523
	II	171 (46.22%)	5 (38.46%)	7 (63.64%)	0.64 (0.21;3.17)	3.58 (0.44;137.09)	
	III	96 (25.95%)	5 (38.46%)	3 (27.27%)	1.13 (0.37;5.68)	2.72 (0.33;126.04)	
	IV	15 (4.05%)	0	1 (9.09%)	0 (0.04;16.58)	5.5 (0.67;439.91)	
Age of menarche		13 (12–14)	14 (13–15)	13 (11–13.5)	0.95 (– 0.50;2.40)	– 0.75 (– 2.28;0.80)	0.2672
Parity		2 (2–3)	2 (2–3)	2 (1–2.75)	– 0.18 (– 0.76;0.39)	– 0.64 (– 1.31;0.04)	0.4164
Born children		2 (2–3)	2 (1.5–2)	1.5 (1–2.75)	– 0.56 (– 1.01;–0.11)	– 0.57 (– 1.27;0.13)	0.2465
Age first born child		23 (19–28)	20 (18.5–23.5)	26 (21.5–33.5)	– 2.95 (– 5.63;–0.27)	2.59 (– 1.44;6.63)	0.1001
Lactation	Yes	301 (80.48%)	11 (84.62%)	10 (90.91%)	0.89 (0.30;4.51)	1.21 (0.30;9.62)	0.6466
Menopause	Yes	214 (57.68%)	2 (15.38%)	6 (54.55%)	0.12 (0.04;0.64)	0.73 (0.27;2.75)	<b>0.009</b>
Age of menopause		50 (46–52)	52.5 (51.75–53.25)	50.5 (46–54.25)	3.27 (0.26;6.28)	1.27 (– 3.21;5.75)	0.4365
Weight		65 (58–73)	68 (57–75)	73.3 (65.8–79.5)	2.95 (– 5;10.9)	6.07 (–0.05;12.2)	0.1377
Height		158 (155–163)	164 (157–165)	158 (151.5–160)	3.25 (– 0.35;6.84)	– 2.25 (– 5.76;1.26)	0.1143
BMI		25.84 (23.44–29.02)	25.33 (24.14–29)	29.4 (25.96–33.95)	– 0.07 (– 2.33;2.20)	3.14 (0.71;5.57)	0.0666
Overweight	Yes	226 (60.59%)	7 (53.85%)	8 (72.73%)	0.65 (0.26;2.19)	1.29 (0.45;5.60)	0.6297
Hormonal contraception	Yes	186 (49.87%)	5 (38.46%)	5 (45.45%)	0.64 (0.18;1.98)	0.84 (0.23;2.92)	0.8011
HRT	Yes	24 (6.45%)	0	0	0 (0.03;9.13)	0 (0.03;10.81)	1
Smoking	Yes	95 (25.40%)	3 (23.08%)	4 (36.36%)	0.79 (0.28;3.34)	1.45 (0.53;5.78)	0.6582
Alcohol consumption	Yes	47 (12.60%)	2 (15.38%)	1 (9.09%)	1.13 (0.37;6.07)	0.62 (0.17;5.58)	0.8771
Radiation exposure	Yes	23 (6.61%)	1 (8.33%)	1 (9.09%)	1.13 (0.31;10.42)	1.23 (0.34;11.52)	0.4583
Personal history cancer	Yes	19 (5.08%)	1 (7.69%)	1 (9.09%)	1.36 (0.38;12.64)	1.61 (0.44;15.30)	0.3868
Family history cancer	Yes	260 (70.08%)	9 (69.23%)	6 (54.55%)	0.77 (0.29;2.83)	0.42 (0.16;1.61)	0.5433
NCCN criteria v1.2023	Yes	224 (59.89%)	11 (84.62%)	8 (72.73%)	2.44 (0.77;12.30)	1.33 (0.46;5.75)	0.1439
Inheritance	Sporad	148 (39.89%)	5 (38.46%)	5 (45.45%)	–	–	0.8491
	Fam	175 (47.17%)	6 (46.15%)	6 (54.55%)	0.84 (0.32;3.18)	0.84 (0.32;3.18)	
	Her	48 (12.94%)	2 (15.38%)	0	1.01 (0.30;6.43)	0 (0.02;5.13)	

Qualitative variables are summarized as frequencies and percentages, and quantitative variables are reported as medians and interquartile ranges. Effect measure and IC95% were determined with means difference and OR (odds ratio) for quantitative and qualitative variables, respectively. P-values calculated using the Kruskal-Wallis test for quantitative variables and the Chi-square test for qualitative variables. Associations with statistical significance are shown in bold ( $p$ -value < 0.05). sporad: sporadic fam: familial her: hereditary



**Fig. 2** Exon skipping of exon 36 of the *ATM* gene due to germline mutation c.5496+2\_5496+5delTAAG. **a** Diagram of the minigene pSpliceExpress vectors, WT which is constituted by exon 36 of *ATM* and exons 2 and 3 from Rat insulin (Rat Ins Ex2 and Rat Ins Ex3), and Mut which represents the presence of the germline mutation of interest. **b** RT-PCR, performed after transfection of the WT and Mut plasmids, in HEK-293, MCF-7, MDA-MB-231, and BT-474 cell lines, showed exon skipping in all cell lines, negative control was not transfected cells (NT). **c** Sanger sequencing was performed to confirm the effect in splicing observed in RT-PCR

varies thoroughly depending on the selection criteria of the population studied.

Interestingly, to date at least, 41 articles have been described that analyze genes related to BC in the Latin American population. This includes a diversity of patients from Argentina, Brazil, Chile, Guatemala, Colombia, Peru, Puerto Rico, and Mexico, covering 40% of the countries considered in the region through genetic analysis (Supplementary Table 1, and the references therein). These studies have examined approximately 51,000 Latin American patients, which have provided insights into the frequencies of molecular variants of interest in the analyzed genes (*BRCA1/2* and *noBRCA*) (Supplementary Table 1 and the references therein). Concerning the mutational spectrum exhibited by the *BRCA1/2* genes, a range from 10.1% to 37.2% has been noted across the populations. This variation is estimated to be strongly linked to the migration history of the Latin American populations, including the overlap of some mutations determined by shared events and exchanges that

characterize the migration history of each geographical region [14]. Additionally, within the same population, such as Brazil, there is high variability in the mutation frequencies of the *BRCA* genes (10.1% vs 22.4%), supporting the observation that the genetic background of Latin American populations results from events leading to unique population structures within and between countries [14–16]. Specifically, the highest frequencies for the *BRCA* genes reported in the Latin American population are described in patients with breast and ovarian cancer from Afro-Colombian families, in whom 33.3% of pathogenic variants were identified [17], demonstrating the impact of patient selection criteria on the variability of reported data.

Unlike our study, most studies reported in Latin America have involved patients with hereditary BC, in whom the representation of pathogenic variants in the *BRCA* genes is substantially higher than in cases of unselected BC. For this latter group, frequencies between 1.2 and 14.5% have been reported (with eight studies in Latin

America) [6, 18–24], which is consistent with the findings identified in the present study (Table 2 and supplementary Table 1). The analysis of unselected populations has been recommended to avoid the overestimation of the true prevalence of germline cancer-related P/LP variants in the general population [25].

In Colombia, previous reports described mutations in *BRCA1/2* genes focused on hereditary/familial cases [17, 21, 26, 27]. Even though, few studies analyzed mutation prevalence in *BRCA1/2* genes from unselected BC patients, finding that their frequency ranges from 0.4 to 3.3% [20, 21], which is concordant with our results, since the frequency of women with mutations in *BRCA1/2* is 3.25%.

Beyond *BRCA* genes in Latin America NGS multigene analysis has been conducted in 78% of studies, including the current study, which has enabled the identification of P/LP variants in moderate and low cancer-risk genes, potentially actionable [28]. Our study demonstrated that while 52.3% of the P/LP variants were associated with *BRCA1/2* genes, nearly 50% of the women had mutations in *noBRCA* genes. These findings are similar to those reported in unselected BC populations from countries such as Argentina and Guatemala, where the contribution of *noBRCA* genes was described as 4.7% and 3.2%, respectively [6, 19]. Similar to studies concerning hereditary BC cases, the frequency of P/LP mutations in *noBRCA* genes constitutes a significant proportion (Supplementary Table 1). Paixão et al. (2022) found P/LP variants from 9.6% (*BRCA1/2*) to 25.2% (*noBRCA*) analyzing 321 Brazilian patients with a panel of 94 genes [7]. Additionally, Cock-Rada and colleagues assessed 25 cancer susceptibility genes in 85 women from Medellín, who met the criteria for HBOC molecular testing; this study identified mutations in six genes: *BRCA2*, *BRCA1*, *PALB2*, *ATM*, *MSH2*, and *PMS2* [29]. All these findings describe germline mutation profiles which, like our results, demonstrate the contribution to the genetic variability in BC of genes such as *ATM*, *PALB2*, and *CHEK2*, and should be taken into consideration. This finding is consistent with reports from other Latin American populations, where mutations in *PALB2* or *RAD51C* explain a significant proportion of cases. The present results, along with others previously published, demonstrate that the analysis of genes other than *BRCA1/2* increases the detection rate of P/LP variants, which maximizes the identification of germline variants in patients with hereditary and unselected BC.

In our study, we identified recurrent mutations in 1.75% of the population analyzed, indicating that most P/LP variants are private. This finding is consistent with previous reports in other LATAM populations, where the recurrence of mutations is low [13]. Three

recurrent variants were identified: two in the *BRCA2* gene (c.2808\_2811delACAA, p.Ala938Profs\*21 and c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25), and one in the *ATM* gene (c.5496+2\_5496+5delTAAG). Two women carrying recurrent mutations in *BRCA2* (c.1763\_1766delATAA, p.Asn588Serfs\*25) and *ATM* (c.5496+2\_5496+5delTAAG) genes had the diagnosis of other types of cancer that is, lymphoma and, thyroid and gastric, respectively. Co-occurrence between BC and other types of cancer has been pinpointed in the literature [30, 31]. Specifically, P/LP variants in the *ATM* gene are associated with gastric and thyroid cancers, and risk estimates have also been described; for gastric cancer, several studies associated *ATM* mutations with OR (odds ratio) ranging from 2.97 to 4.74 [32–34]. Recently, the association between *H. pylori* infection and germline P variants in genes as *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, and *PALB2*, has been described; people with *H. pylori* infection and germline mutations in those genes have a higher gastric cancer cumulative risk at 85 years of 45.5% (95% CI, 20.7 to 62.6); in contrast, the risk in people with *H. pylori* infection alone is 14.4% (95% CI, 12.2 to 16.6) [35]. Thyroid cancer (TC) has also been associated with the presence of germline mutations in *BRCA2* and *ATM* genes [36, 37]. Interestingly, a published study showed an increased oncogenic SNPs burden in cases with co-occurrence of BC and TC. In patients with double cancers, germline variants were found in *PALB2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, and *CHEK2* genes, which are known risk genes associated with BC [38].

Recurrent variants could also be considered founder mutations. The prevalence of founder mutations has been extensively documented for the *BRCA1* and *BRCA2* genes. These pathogenic variants represent the majority of observed mutations in specific populations and have been confirmed as true founders through analysis of common ancestral haplotypes [39]. In our population of study three Colombian founder mutations, previously described [21], were identified, one in *BRCA1* c.5123C>A (A1708E), and two in *BRCA2* c.1763\_1766delATAA (1991del4) and c.2808\_2811delACAA (3034del4).

Identification of recurrent pathogenic variants in the *ATM* gene is of importance, as previous studies have demonstrated that women carrying mutations in this gene have a significantly increased risk of developing BC with a risk similar to that conferred by germline mutations in the *BRCA2* gene [40]. Interestingly, the allelic frequency of the *ATM* variant c.5496+2\_5496+5delTAAG was 0.375%, although it has not been previously reported in the population database gnomAD, the variant has been identified in cases related to ataxia-telangiectasia syndrome, familial breast cancer, and hereditary cancer predisposition syndrome. These findings are not supported

by population-based studies but have been submitted by molecular diagnostic centers such as Color Diagnostics (2019), Fulgent Genetics (2021), Baylor Genetics (2022), Invitae (2022), Ambry Genetics (2023), and Myriad Genetics (2024) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000565770.15> (accessed May 7, 2024)). In all instances, the variant has been determined to be germline. However, due to the unknown origin, the number of affected individuals, or the lack of familial segregation analysis, we cannot make comparisons with the data from the current study. It is noteworthy to date, this variant has been attributed to a significant impact on RNA splicing, although this has not been experimentally proven, hence its classification according to ACMG criteria is likely pathogenic. Functional validation of this recurrent variant demonstrated an exon skipping, leading to a predicted deletion of 59 amino acids located in the Pincer domain of the ATM protein [41]. The splicing process is an event that most eukaryotes genes go through and is regulated by RNA-Binding Proteins (RBPs), *cis*-regulatory elements, and *trans*-acting factors [42]. Alternative splicing is dysregulated in cancerous cells in comparison with healthy cells, and carcinogenesis has been associated with alterations in direct and indirect regulators, leading to altered splicing profiles [43]. In the present study, the minigene assay resulted in an exon skipping, caused by a *cis*-regulatory element (c.5496+2\_5496+5delTAAG) on the *ATM* gene. This molecular finding added to the absence of this mutation in the gnomAD database, supports the pathogenic effect of the mutation in the function of the ATM protein and the possible role in BC development. Dysregulation of alternative splicing in cancer has made it a therapeutic target and several therapeutic strategies are currently under study; that is, targeting RNA splicing factors, splicing factors regulated by blocking kinases, and antiRNA molecules [44].

Although 58.3% of women with a mutation had several relatives with various types of cancer, segregation analysis was performed in some families with index cases having P/LP variants in *BRCA2*, *ATM*, and *PALB2* genes. Interestingly, segregation of P/LP variant and phenotype was observed in two families tested for *BRCA2* mutations (Fig. 1). Index cases of these families had an earlier age of onset compared with their relatives who suffered BC as well, suggesting anticipation phenomena. This finding may be associated with the greater penetrance of the *BRCA1/2* genes, compared to other genes with moderate penetrance such as *ATM*, but some authors have proposed the interference of non-genetic factors as an explanation for this anticipation [45, 46].

Germline pathogenic small indels and LGRs contribute to the development of breast and ovarian cancers [47]. Ratios of *BRCA1/2* LGRs germline mutations are

population dependent [22, 48–56]. To our knowledge, in Colombia, *BRCA1/2* LGRs have been tested in two studies. Vargas and colleagues tested 60 Afro-Colombian families with HBOC, they did not find LGRs in that population [17]. Torres and colleagues tested 221 breast/ovarian cancer families, finding a LGR in the *BRCA2* (ex1-14del) gene in two unrelated patients (0,9%) [21]. Considering the three Colombian cohorts of patients assessed for *BRCA1/2* LGRs (Vargas et al., Torres et al., and ours), the prevalence of this type of rearrangement in *BRCA1/2* genes would be 0,3% (2/681). Pondering the frequencies described previously, LGRs prevalence in *BRCA1/2* genes is low in Colombian BC patients, regardless of hereditary or family history.

This study has some limitations. The germline variants analyzed are rare and although they are located in high and moderate-risks genes, common SNPs also contribute to the development of BC. LGRs were only studied in *BRCA1/2*, although this type of rearrangement has been found in genes including *CHEK2* and *ATM*, in BC patients [57].

In conclusion, molecular analysis via WES enabled the establishment of the genomic profile of P/LP variants in ten clinically significant genes related to BC risk in the analyzed population. Additionally, this investigation was conducted in a population of women with unselected BC, which has been less addressed in the global literature compared to the vast amount of research conducted on individuals with hereditary cancer. Based on the information described and our study results, the germline mutation profile exhibits variation in genes and frequencies, contingent upon the region and characteristics of the population assessed. This underscores the importance of conducting population-based studies and determining the prevalence of clinically impactful genes. Such efforts can aid in the identification of mutations and facilitate the implementation of national genetic analysis policies, genetic counseling, and early detection strategies. Our study also highlights the utility of WES as an appropriate method for identifying germline variants located in coding and exon–intron boundary regions of genes that are clinically relevant in BC. WES analysis has the potential to detect rare, novel, and infrequently studied P/LP variants, including intronic mutations.

#### Abbreviations

ACMG/AMP	American College of Medical Genetics and Genomics/American Molecular Pathology
BC	Breast cancer
BMI	Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )
ER	Estrogen receptor
HBOC	Hereditary breast and ovary cancer
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hormonal receptors
HRT	Hormonal replacement therapy
LATAM	Latin-American

LGRs	Large genomic rearrangements
MLPA	Multiplex ligation dependant probe amplification
NCCN	National cancer comprehensive network
NGS	Next generation sequencing
P/LP	Pathogenic/likely pathogenic
PR	Progesterone receptor
SNP	Single nucleotide polymorphism
TNBC	Triple negative breast cancer
WES	Whole exome sequencing

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40246-024-00623-7>.

Supplementary material 1.

### Acknowledgements

We thank the patients and their families for their participation in the study. We would like to thank the medical students of Universidad del Rosario, in particular Mariana Angulo-Aguado, Valentina Balaguera and Kevin Llinás-Caballero for their support in sample recollection.

### Author contributions

MB, IM, ML, HI, DT, NS, AIO, DL, JG, GR, PALR, RM, WR, JP, MCQ and WM contributed to samples and clinico-pathologic data collection and curation. DCSD, AM, DJFM, NCB carried out the molecular biology experiments. DCSD, MB and CMR performed segregation analysis and genetic counseling. DCSD, AM and RC made bioinformatics analysis and variant classification. NMG performed statistical analysis. CMR and WM contributed to the study conception and design. The first draft of the manuscript was written by DCSD, DJFM, WM and CMR. All authors commented on previous version the manuscript and all of them read and approved the final version.

### Funding

The study was financially supported by Pfizer, Universidad del Rosario (ABN-062), Fundación Cardioinfantil–Instituto de Cardiología, and Hospital Universitario Mayor-Méderi (QANBG073).

### Availability of data and materials

Further data and the datasets supporting this study are available from the corresponding author upon justified demand.

### Declarations

#### Ethics approval consent to participate

This study was performed in compliance with the Helsinki Declaration and all experimental procedures were approved by Fundación Cardioinfantil–Instituto de Cardiología and Universidad del Rosario Ethics Committee (approval numbers: 402018 7-11-2018, DVO005 1805-CV1469 3-12-2021, Pfizer: WI241988—Investigator initiate research, independent review board: 28-08-2018, GF1147 2018).

#### Informed consent

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### Author details

<sup>1</sup>School of Medicine and Health Sciences, Center for Research in Genetics and Genomics (CIGGUR), Institute of Translational Medicine (IMT), Universidad Del Rosario, Bogotá, Colombia. <sup>2</sup>Fundación Cardioinfantil, Instituto de Cardiología, Bogotá, Colombia. <sup>3</sup>Clínica de Oncología Astorga, Medellín, Colombia. <sup>4</sup>Centro Médico Julián Coronel, Cali, Colombia. <sup>5</sup>Hospital Internacional de

Colombia HIC, Piedecuesta, Colombia. <sup>6</sup>Oncólogos del Occidente S.A.S, Manizales, Colombia. <sup>7</sup>SOHEC, Sociedad de Oncología y Hematología del Cesar, Valledupar, Colombia. <sup>8</sup>Hospital Universitario Mayor Méderi, Bogotá, Colombia. <sup>9</sup>Clinical Research Group, School of Medicine and Health Science, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia. <sup>10</sup>Fundación CTIC-Fundación Cardioinfantil, Instituto de Cardiología, Bogotá, Colombia. <sup>11</sup>Laboratorio de Biología Molecular y Pruebas Diagnósticas de Alta Complejidad, Fundación Cardioinfantil-Instituto de Cardiología, Bogotá, Colombia. <sup>12</sup>Integrative IPS, Bogotá, Colombia. <sup>13</sup>Oncólogos del Occidente SAS, Pereira, Colombia.

Received: 5 February 2024 Accepted: 15 May 2024

Published online: 18 June 2024



### References

- Arnold M, Morgan E, Rumgay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, et al. Current and future burden of breast cancer: global statistics for 2020 and 2040. *Breast*. 2022;66:15–23.
- Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet* marzo de. 2018;391(10125):1023–75.
- Hassan MM, Cyr AE, Hagemann IS. Estimating the breast cancer risk conferred by germline mutations. *Clin Chem*. 2022;68(3):382–4.
- Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian SV, Nathanson KL, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med*. 2015;372(23):2243–57.
- Dorling L, Carvalho S, Allen J, González-Neira A, Luccarini C, Wahlström C, et al. Breast cancer risk genes—association analysis in more than 113,000 women. *N Engl J Med*. 2021;384(5):428–39.
- Cerretini R, Mercado G, Morganstein J, Schiaffi J, Reynoso M, Montoya D, et al. Germline pathogenic variants in BRCA1, BRCA2, PALB2 and RAD51C in breast cancer women from Argentina. *Breast Cancer Res Treat*. 2019;178(3):629–36.
- Paixão D, Torrezan GT, Santiago KM, Formiga MN, Ahuno ST, Dias-Neto E, Tojal Silva I, Foulkes WD, Polak P, Carraro DM. Characterization of genetic predisposition to molecular subtypes of breast cancer in Brazilian patients. *Front Oncol*. 2022;31(12):976959.
- De Castro M, Restrepo CM. Genetics and genomic medicine in Colombia. *Mol Genet Genomic Med*. 2015;3(2):84–91.
- R Core Team. No Title. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria; 2023.
- Daly MB, Pal T, Maxwell KN, Churpek J, Kohlmann W, AlHilli Z, Arun B, Buys SS, Cheng H, Domchek SM, Friedman S. Genetic/familial high-risk assessment: breast, ovarian, and pancreatic, version 2.2024 featured updates to the NCCN guidelines. *JNCCN J Nat Compr Cancer Netw*. 2023;21(10):1001–10.
- Lynch HT, Marcus JN, Lynch J, Snyder CL, Rubinstein WS. Breast cancer genetics. In: Kirby I, Bland EMC, editors. *The breast*. Elsevier; 2009. p. 371–415.
- Tung N, Battelli C, Allen B, Kaldate R, Bhatnagar S, Bowles K, et al. Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA 1 and BRCA 2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer*. 2015;121(1):25–33.
- Torres-Mejía G, Royer R, Llacuachaqui M, Akbari MR, Giuliano AR, Martínez-Matsushita L, et al. Recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexican women with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2015;24(3):498–505.
- Dutil J, Golubeva VA, Pacheco-Torres AL, Diaz-Zabala HJ, Matta JL, Monteiro AN. The spectrum of BRCA1 and BRCA2 alleles in Latin America and the Caribbean: a clinical perspective. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;154(3):441–53.
- Guindalini RSC, Viana DV, Kitajima JPF, Rocha VM, López RVM, Zheng Y, et al. Detection of germline variants in Brazilian breast cancer patients using multigene panel testing. *Sci Rep*. 2022;12(1):4190.
- Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, Torrezan GT, Santos ÉM, Krepischki AC, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med Genet*. 2014;15(1):55.

17. Vargas E, de Deugd R, Villegas VE, Gil F, Mora L, Viaña LF, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in patients of African descent with early-onset and familial Colombian breast cancer. *Oncologist*. 2022;27(2):e151–7.
18. Abugattas J, Llacuachaqui M, Allende YS, Velásquez AA, Velarde R, Cotrina J, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from Peru. *Clin Genet*. 2015;88(4):371–5.
19. Ren M, Orozco A, Shao K, Albanez A, Ortiz J, Cao B, et al. Germline variants in hereditary breast cancer genes are associated with early age at diagnosis and family history in Guatemalan breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2021;189(2):533–9.
20. Hernández JEL, Llacuachaqui M, Palacio GV, Figueroa JD, Madrid J, Lema M, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from Medellín, Colombia. *Hered Cancer Clin Pract*. 2014;12(1):11.
21. Torres D, Bermejo JL, Rashid MU, Briceño I, Gil F, Beltran A, et al. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Colombian breast cancer patients. *Sci Rep*. 2017;7(1):4713.
22. Villarreal-Garza C, Alvarez-Gómez RM, Pérez-Plasencia C, Herrera LA, Herzog J, Castillo D, et al. Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. *Cancer*. 2015;121(3):372–8.
23. González-Rivera M, Lobo M, López-Tarruella S, Jerez Y, Del Monte-Millán M, Massarrah T, et al. Frequency of germline DNA genetic findings in an unselected prospective cohort of triple-negative breast cancer patients participating in a platinum-based neoadjuvant chemotherapy trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;156(3):507–15.
24. Godínez Paredes JM, Rodríguez I, Ren M, Orozco A, Ortiz J, Albanez A, et al. Germline pathogenic variants associated with triple-negative breast cancer in US Hispanic and Guatemalan women using hospital and community-based recruitment strategies. *Breast Cancer Res Treat*. 2024. <https://doi.org/10.1007/s10549-024-07300-2>.
25. Poliani L, Greco L, Barile M, Buono AD, Bianchi P, Basso G, et al. Canonical and uncanonical pathogenic germline variants in colorectal cancer patients by next-generation sequencing in a European referral center. *ESMO Open*. 2022;7(6):100607–100607.
26. Cifuentes-C L, Rivera-Herrera AL, Barreto G. BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and ovarian cancer families from south west Colombia. *Colombia Méd*. 2019;50(3):163–75.
27. Torres D, Rashid MU, Gil F, Umana A, Ramelli G, Robledo JF, et al. High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;103(2):225–32.
28. O'Leary E, Iacoboni D, Holle J, Michalski ST, Esplin ED, Yang S, et al. Expanded gene panel use for women with breast cancer: identification and intervention beyond breast cancer risk. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(10):3060–6.
29. Cock-Rada AM, Ossa CA, Garcia HI, Gomez LR. A multi-gene panel study in hereditary breast and ovarian cancer in Colombia. *Fam Cancer*. 2018;17(1):23–30.
30. Zheng G, Yu H, Hemminki A, Försti A, Sundquist K, Hemminki K. Familial associations of female breast cancer with other cancers. *Int J Cancer*. 2017;141(11):2253–9.
31. Ramin C, Veiga LHS, Vo JB, Curtis RE, Bodelon C, Aiello Bowles EJ, et al. Risk of second primary cancer among women in the Kaiser permanente breast cancer survivors cohort. *Breast Cancer Res*. 2023;25(1):50.
32. Hall MJ, Bernhisel R, Hughes E, Larson K, Rosenthal ET, Singh NA, et al. Germline pathogenic variants in the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene are associated with high and moderate risks for multiple cancers. *Cancer Prev Res*. 2021;14(4):433–40.
33. Helgason H, Rafnar T, Olafsdottir HS, Jonasson JG, Sigurdsson A, Stacey SN, et al. Loss-of-function variants in ATM confer risk of gastric cancer. *Nat Genet*. 2015;47(8):906–10.
34. Yoshimura A, Imoto I, Iwata H. Functions of breast cancer predisposition genes: implications for clinical management. *Int J Mol Sci*. 2022;23(13):7481.
35. Usui Y, Taniyama Y, Endo M, Koyanagi YN, Kasugai Y, Oze I, et al. Helicobacter pylori, homologous-recombination genes, and gastric cancer. *N Engl J Med*. 2023;388(13):1181–90.
36. Miasaki FY, Saito KC, Yamamoto GL, Boguszewski CL, de Carvalho GA, Kimura ET, et al. Thyroid and breast cancer in 2 sisters with monoallelic mutations in the ataxia telangiectasia Mutated (ATM) gene. *J Endocr Soc*. 2022;6(4):26.
37. Yu Y, Dong L, Li D, Chuai S, Wu Z, Zheng X, et al. Targeted DNA sequencing detects mutations related to susceptibility among familial non-medullary thyroid cancer. *Sci Rep*. 2015;5(1):16129.
38. Bakos B, Kiss A, Árvai K, Szili B, Deák-Kocsis B, Tóbiás B, et al. Co-occurrence of thyroid and breast cancer is associated with an increased oncogenic SNP burden. *BMC Cancer*. 2021;21(1):706.
39. Rebbeck TR, Friebe TM, Friedman E, Hamann U, Huo D, Kwong A, et al. Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations. *Hum Mutat*. 2018;39(5):593–620.
40. Goldgar DE, Healey S, Dowty JG, Da Silva L, Chen X, Spurdle AB, et al. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011;13(4):R73.
41. Warren C, Pavletich NP. Structure of the human ATM kinase and mechanism of Nbs1 binding. *Elife*. 2022;11:e74218.
42. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Ann Rev Biochem*. 2003;72(1):291–336.
43. Sciarillo R, Wojtuszkiewicz A, Assaraf YG, Jansen G, Kaspers GJL, Giovannetti E, et al. The role of alternative splicing in cancer: From oncogenesis to drug resistance. *Drug Res Updates*. 2020;53: 100728.
44. Peng Q, Zhou Y, Oyang L, Wu N, Tang Y, Su M, et al. Impacts and mechanisms of alternative mRNA splicing in cancer metabolism, immune response, and therapeutics. *Mol Ther*. 2022;30(3):1018–35.
45. Kedmi A, Kadouri L, Sagy I, Hamburger T, Levin G, Zimhony-Nissim N, et al. Genetic anticipation of breast cancer among BRCA1/BRCA2 mutation carriers: a retrospective study. *Int J Gynecol Obstet*. 2022;159(2):537–43.
46. Noh JM, Choi DH, Baek H, Kim MJ, Park H, Huh SJ, et al. Genetic anticipation of familial breast cancer with or without BRCA mutation in the Korean population. *Cancer Genetics* abril de. 2014;207(4):160–3.
47. Bozsik A, Pócsa T, Papp J, Vaszkó T, Butz H, Patócs A, et al. Complex characterization of germline large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes in high-risk breast cancer patients—novel variants from a large national center. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13):4650.
48. Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drüsedau M, et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet*. 1997;17(3):341–5.
49. Agata S, Viel A, Puppa LD, Cortesi L, Fersini G, Callegaro M, Palma MD, Dolcetti R, Federico M, Venuta S, Miolo G. Prevalence of BRCA1 genomic rearrangements in a large cohort of Italian breast and breast/ovarian cancer families without detectable BRCA1 and BRCA2 point mutations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45(9):791–7.
50. Smith MJ, Urquhart JE, Harkness EF, Miles EK, Bowers NL, Byers HJ, et al. The contribution of whole gene deletions and large rearrangements to the mutation spectrum in inherited tumor predisposing syndromes. *Hum Mutat*. 2016;37(3):250–6.
51. Montagna M. Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Hum Mol Genet*. 2003;12(9):1055–61.
52. Hogervorst FBL, Nederlof PM, Gille JJP, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R, et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Can Res*. 2003;63(7):1449–53.
53. Karami F, Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1–21.
54. Sluiter MD, van Rensburg EJ. Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125(2):325–49.
55. Concolino P, Rizza R, Mignone F, Costella A, Guarino D, Carboni I, et al. A comprehensive BRCA1/2 NGS pipeline for an immediate copy number variation (CNV) detection in breast and ovarian cancer molecular diagnosis. *Clin Chim Acta*. 2018;480:173–9.
56. Machado PM, Brandão RD, Cavaco BM, Eugénio J, Bento S, Nave M, et al. Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. *J Clin Oncol*. 2007;25(15):2027–34.
57. Dennis J, Tyrer JP, Walker LC, Michailidou K, Dorling L, Bolla MK, et al. Rare germline copy number variants (CNVs) and breast cancer risk. *Commun Biol*. 2022;5(1):65.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

	<b>Centro de Investigación en Genética y Genómica</b>	Código:	
	<b>Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud</b>	Versión 01	
	<b>Clonaje en el vector pSpliceExpress - Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Cat. No. 11789-100 Invitrogen)</b>	Página 1 de 4	

### 1. Objetivo

Realizar el clonaje de la región de interés (intrones y exones) en el vector pSpliceExpress, para evaluar el efecto de las variantes intrónicas en el proceso de splicing

### 2. Principio

La tecnología Gateway es un método de clonaje universal que tiene como principio las propiedades de recombinación sitio-específicas del bacteriófago lambda, para proveer un clonaje rápido y altamente eficiente de las secuencias de ADN en múltiples vectores.

El mix de la enzima Gateway® BP Clonase™ II contiene la proteína Integrasa (Int) del bacteriófago lambda, la proteína IHF de *E. coli* (*Integration Host Factor*-IHF), y el buffer necesario para la reacción. Gateway® BP Clonase™ II cataliza la reacción de recombinación *in vitro* entre el producto de PCRattB (o el vector de expression que contenga la secuencia attB) y el vector donador que contiene la secuencia attP, generando un clon que contiene la secuencia attL.

### 3. Notas



- 3.1. Almacenar el kit Gateway® BP Clonase™ II a -20°C durante 6 meses, almacenar a -80°C para períodos de tiempo prolongados.
- 3.2. Diseñar los primers de acuerdo con las recomendaciones de la tecnología Gateway:
  - Primer forward: cuatro guaninas (G) en el extremo the 5'+25 bp del sitio attB1 (ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT)+ 18-25 bp del templado o secuencia génica específica.
  - Primer reverse: cuatro guaninas (G) en el extremo the 5'+25 bp del sitio attB2 (ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT)+ 18-25 bp del templado o secuencia génica específica.
- 3.3. Realizar la PCR con la master mix Q5 de New England Biolabs (Q5® High-Fidelity 2X Master Mix cat: M0492S).  
Calcular la temperatura de annealing con la siguiente herramienta: <https://tcalculator.neb.com/#!/main>

### 4. Terminología y abreviaciones

- 4.1. **µL**: Microlitros
- 4.2. **mL**: Mililitros
- 4.3. **mg**: Miligramos
- 4.4. **x g**: Fuerza centrífuga

<b>5. Materiales y Equipos</b>	<b>6. Reactivos</b>
--------------------------------	---------------------



Elaboró	Revisó	Aprobó
<b>Nombre: Diana Carolina Sierra Díaz</b> <b>Cargo: Estudiante PhD.</b> <b>Fecha: 14-10-2022</b>	<b>Nombre: Dora Fonseca</b> <b>Cargo: Directora del laboratorio CIGGUR</b> <b>Fecha: 20-10-2022</b>	<b>Nombre: Dora Fonseca</b> <b>Cargo: Directora del laboratorio CIGGUR</b> <b>Fecha: 20-10-2022</b>

	<b>Centro de Investigación en Genética y Genómica</b>	Código:	
	<b>Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud</b>	Versión 01	
	<b>Clonaje en el vector pSpliceExpress - Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Cat. No. 11789-100 Invitrogen)</b>	Página 1 de 4	

5.1. Tubos de microcentrífuga de 1.5mL 5.2. Centrífuga 5.3. Micropipetas 5.4. Puntas para micropipetas 5.5. Hielo 5.6. Vórtex 5.7. Placa de calentamiento 5.8. Termociclador 5.9. Baño serológico 5.10. Incubadora con agitador 5.11. Nanodrop	<u>Reactivos adicionales requeridos</u> 6.1. TE1X pH:8
--	---

<b>7. Procedimiento</b>
-------------------------

Elaboró	Revisó	Aprobó
<b>Nombre: Diana Carolina Sierra Díaz</b> <b>Cargo: Estudiante PhD.</b> <b>Fecha: 14-10-2022</b>	<b>Nombre: Dora Fonseca</b> <b>Cargo: Directora del laboratorio CIGGUR</b> <b>Fecha: 20-10-2022</b>	<b>Nombre: Dora Fonseca</b> <b>Cargo: Directora del laboratorio CIGGUR</b> <b>Fecha: 20-10-2022</b>

 <b>Universidad del Rosario</b>	<b>Centro de Investigación en Genética y Genómica</b>	Código:	 <b>CIGGUR</b> Centro de Investigación en Genética y Genómica
	<b>Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud</b>	Versión 01	
	<b>Clonaje en el vector pSpliceExpress - Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Cat. No. 11789-100 Invitrogen)</b>	Página 1 de 4	

### ***Purificación del producto de PCR***

- 7.1. Visualizar el producto amplificado en un gel de agarosa (ajustar el porcentaje de agarosa de acuerdo al tamaño del fragmento de interés).
- 7.2. Transferir el producto de PCR (45-50µL) a un eppendorf de 1.5ml (estéril), agregar 150µL de TE1X pH:8, y 100µL de 30% PEG 8000/30 mM MgCl<sub>2</sub> (este reactivo viene con el kit).
- 7.3. Mezclar mediante vórtex.
- 7.4. Centrifugar a 10000gr durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 7.5. Retire cuidadosamente el sobrenadante, ya que el pellet es transparente.
- 7.6. Disuelva el pellet en 30µL de TE1X pH:8.
- 7.7. Compruebe la cantidad y la calidad del producto de PCR purificado en gel de agarosa y mediante espectrofotometría (nanodrop). La cuantificación debe ser  $\geq 10\text{ng}/\mu\text{L}$ .



### ***Reacción de recombinación***

- 7.8. Luego de cuantificar el producto de PCR purificado, realizar la siguiente mezcla en un tubo eppendorf de 1.5ml:  
 Producto de PCR purificado: 15-150ng (usualmente agregamos 150ng)  
 Midiprep vector pSpliceExpress: 150ng  
 TE1X pH 8: hasta completar un volumen de 8µL
- 7.9. Descongelar en hielo la enzima BP Clonase™ II durante 2 minutos. Mezcle brevemente utilizando vórtex suave dos veces (dos segundos cada vez)
- 7.10. Agregue 2µL de la enzima BP Clonase™ II a la mezcla del punto 7.8. Mezcle mediante vórtex breve y suave dos veces. Luego realice microcentrifugación breve.
- 7.11. Almacene la enzima BP Clonase™ II a la temperatura adecuada (-20°C ó -80°C).
- 7.12. Incube la reacción a 25°C durante 1 hora. Si requiere incrementar el número de colonias que contengan el fragmento de interés, este período de incubación puede incrementarse de 4-6 horas (usualmente aumenta el número de colonias recombinadas 2-3 veces), o durante toda la noche (usualmente aumenta el número de colonias recombinadas 5-10 veces).
- 7.13. Agregue 1µL de la solución de proteinasa K para finalizar la reacción. Mezcle mediante vórtex brevemente e incube a 37°C durante 10 minutos

### ***Transformación en las bacterias quimiocompetentes OMNIMAX 2T1 PHAGE RESISTANT CELLS (Cat. No. C8540-03).***

- 7.14. Transformar 1µL de la reacción de recombinación en 50µL de bacterias. Incubar en hielo durante 30 minutos.

Elaboró	Revisó	Aprobó
<b>Nombre: Diana Carolina Sierra Díaz</b> <b>Cargo: Estudiante PhD.</b> <b>Fecha: 14-10-2022</b>	<b>Nombre: Dora Fonseca</b> <b>Cargo: Directora del laboratorio CIGGUR</b> <b>Fecha: 20-10-2022</b>	<b>Nombre: Dora Fonseca</b> <b>Cargo: Directora del laboratorio CIGGUR</b> <b>Fecha: 20-10-2022</b>

	<b>Centro de Investigación en Genética y Genómica</b>	Código:	
	<b>Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud</b>	Versión 01	
	<b>Clonaje en el vector pSpliceExpress - Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Cat. No. 11789-100 Invitrogen)</b>	Página 1 de 4	

- 7.15. Realizar choque térmico a 42°C durante 30 segundos, luego incube en hielo durante 2 minutos.
- 7.16. Agregue 250µL de SOC e incube a 37°C durante 1 hora con agitación a 200-220rpm.
- 7.17. Plaquetear 20µL del producto de transformación (previa dilución 1:10 con SOC) en placa que contenga LB agar + 100µg de ampicilina (el vector pSpliceExpress confiere resistencia a la ampicilina a las bacterias transformadas. En caso de utilizar este procedimiento con otro vector, confirmar el antibiótico para la selección de las bacterias transformadas).
- 7.18. Incubar a 37°C durante 16 horas.
- 7.19. Si la transformación es positiva, realizar cultivo líquido de las colonias, extraer el ADN plasmídico mediante Miniprep y realizar secuenciación de Sanger para confirmar la reacción de recombinación.
- 7.20. Luego de confirmar la recombinación realizar Midiprep para posterior transfección del minigen en la línea celular de interés.
- 7.21. Realizar extracción de ARN pos-transfección, sintetizar cDNA y realizar RT-PCR para determinar si hay diferencias en los transcritos producidos por la versión *wild type* (WT) o silvestre y la versión mutante intrónica.
- 7.22. En caso de notar diferencia, si observa más de una banda en el gel, realizar extracción de banda, clonar el ADN extraído en un vector de almacenamiento y enviar a secuenciación de Sanger para determinar el efecto de la variante intrónica. En caso de solo observar una banda en el gel de agarosa, realizar extracción de banda y realizar directamente secuenciación de Sanger.

## 8. Referencias

- 8.1. Gateway® Technology A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems.
- 8.2. Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix.

Elaboró	Revisó	Aprobó
<b>Nombre: Diana Carolina Sierra Díaz</b> <b>Cargo: Estudiante PhD.</b> <b>Fecha: 14-10-2022</b>	<b>Nombre: Dora Fonseca</b> <b>Cargo: Directora del laboratorio CIGGUR</b> <b>Fecha: 20-10-2022</b>	<b>Nombre: Dora Fonseca</b> <b>Cargo: Directora del laboratorio CIGGUR</b> <b>Fecha: 20-10-2022</b>

# Functional Analysis of *BRCA1* 3'UTR Variants Predisposing to Breast Cancer

Diana Carolina Sierra-Díaz<sup>1</sup>, Rodrigo Cabrera<sup>1,2</sup>, Laura Alejandra Gonzalez-Vasquez<sup>1</sup>, Mariana Angulo-Aguado<sup>1,3</sup>, Kevin Llinás-Caballero<sup>1,4</sup>, Dora Janeth Fonseca-Mendoza<sup>1</sup>, Nora Constanza Contreras-Bravo<sup>1</sup>, Carlos Martin Restrepo<sup>1</sup>, Oscar Ortega-Recalde<sup>1,5</sup>, Adrien Morel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Research in Genetics and Genomics (CIGGUR), Institute of Translational Medicine (IMT), School of Medicine and Health Sciences, Universidad Del Rosario, Bogotá, Colombia; <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular y Pruebas Diagnósticas de Alta Complejidad, Fundación Cardioinfantil-Instituto de Cardiología, Bogotá, Colombia; <sup>3</sup>Growth Factors, Nutrients and Cancer Group, Molecular Oncology Programme, Centro Nacional Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, Spain; <sup>4</sup>Institute for Immunological Research, University of Cartagena, Cartagena, Colombia; <sup>5</sup>Departamento de Morfología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C, Colombia

Correspondence: Adrien Morel, School of Medicine and Health Sciences, Center for Research in Genetics and Genomics (CIGGUR), Institute of Translational Medicine (IMT), Universidad Del Rosario, Cra 24# 63c - 69, Bogotá, 111221, Colombia, Tel +57-6012970200, Email adrien.morel@urosario.edu.co

**Purpose:** Breast Cancer (BC) is the main female cancer diagnosed worldwide, and it has been described that few genes, such as *BRCA1*, have a high penetrance for this type of cancer. In this manuscript, we were interested in evaluating the effect of 3'UTR variants on *BRCA1* expression.

**Patients and Methods:** To accomplish this objective, Whole Exome Sequencing (WES) data of 400 patients with unselected BC was used to filter variants located in the region of interest of *BRCA1* gene, finding two of them (c.\*36C>G and c.\*369\_373del). miRGate and miRanda in silico tools were used to predict microRNA (miRNA) interaction.

**Results:** The two variants (c.\*36C>G, c.\*369\_373del) were predicted to affect miRNA interaction. After cloning of *BRCA1* 3'UTR into pMIR-Report vector, the construct was transfected into two BC cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7), and the variant c.\*36C>G evidenced overexpression of reporter gene luciferase, showing that the transcript was not being degraded by the miRNA in MDA-MB-231 cells.

**Conclusion:** The variant seems to protect against Triple Negative BC probably due to the expression level of miRNA in this particular cell line (MDA-MB-231). This is consistent with the clinical history of the patients who harbor BC Hormone Receptors positive (HR+).

**Keywords:** miRNA, 3'UTR variant, breast cancer, *BRCA1*

## Introduction

Breast cancer (BC) is the first cancer in the world in terms of incidence and mortality for women. It has been estimated that 2,261,419 were newly diagnosed and 684,996 died of BC in 2020<sup>1</sup> and is predicted an increase of approximately 10% of both rates for 2025 ([www.gco.iarc.fr](http://www.gco.iarc.fr)). The majority of BC is sporadic (93–95%) and approximately 5–7% of BC is hereditary and associated with family history.<sup>2</sup>

BC is a disease with genetic and environmental risk factors.<sup>3</sup> The main environmental factors are age, alcohol consumption, obesity, and smoking among others.<sup>4–7</sup> In the last three decades, 12 genes have been associated with the risk of developing BC, *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIPI*, *CDHI*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* and *TP53*. Some of them are high penetrance genes such as *BRCA1* and *BRCA2*, and others are moderate penetrance genes, for example *CHEK2* and *BRIPI*.<sup>8</sup>

The two major genes associated with BC are *BRCA1* and *BRCA2* discovered in 1990 and 1994, respectively. These two genes are located on chromosomes 17 and 13 and are involved in the maintenance of genome stability, especially in the double-strand DNA break repair through homologous recombination. These genes show an autosomal dominant inheritance pattern.<sup>9</sup> In fact, the cumulative risk of BC increases with aging among people having *BRCA1* and *BRCA2* pathogenic variants, reaching a maximum of 72% and 69% at the age of 80 years, respectively.<sup>10</sup> *BRCA1/2* genes account

for the cause of 25% of hereditary BC cases and in the general population, the prevalence of pathogenic variants in *BRCA1/2* genes has been estimated as 1 in 300 and 1 in 800, respectively.<sup>11</sup> In the Ashkenazi Jewish ethnic group, the prevalence is higher than the general population, due to endogamic behavior, and estimated as 1 in 40.<sup>12</sup> It has been demonstrated that *BRCA1* pathogenic variants are more frequent in Triple Negative BC (TNBC) compared to *BRCA2* gene which are more prevalent in less aggressive BC subtypes.<sup>13</sup> Nowadays, it has been described around 4900 pathogenic variants in *BRCA1/2* genes (BRCA Exchange <https://brcaexchange.org/>) and the majority of them are located in coding regions. Few pathogenic variants are reported in non-coding regions including splicing regions (70 pathogenic variants) or UTR regions (0 pathogenic variant).

Non-coding regions have paramount importance in gene expression regulation. In particular, 3'UTR interacts with several types of miRNAs, which are a type of non-coding RNAs (~22 nucleotides) that interact with 3'UTR and can inhibit the translation or/and promote mRNA degradation. Briefly, the miRNAs are transcribed by RNA pol II or III in pri-miRNA, then they are processed into short 70-nt stem-loop RNA, pre-miRNAs by the Microprocessor complex (Drosha enzyme – DiGeorge syndrome critical region 8 gene (DGCR8)). These RNAs are then exported by exportin-5 from nucleus to cytoplasm and processed into double-strand miRNAs by the RNase II enzyme, Dicer. The duplex is loaded onto Argonaute protein (AGO) and RISC complex (RNA inducing silencing complex). The strand less thermodynamically stable is removed and the complex RISC-miRNA is able to recognize 3'UTR of target mRNA. The seed region, a sequence spanning from position 2 to 8 at the 5' end of the miRNA, recognizes the miRNA response element (MRE) in the target mRNA.<sup>14,15</sup> A variant in the 3'UTR or in the miRNA can inhibit the mRNA-miRNA interaction or create a new interaction with a different miRNA that has been previously described in breast and ovarian cancer.<sup>16–19</sup>

In this study, we performed the functional analysis of germline variants located on 3'UTR of *BRCA1* gene. This study is the first analysis of these type of variants described in Colombian patients diagnosed with unselected BC.

## Materials and Methods

### Patients

Four hundred unselected BC, regarding cancer family history, female patients were aged over 18 years old, with a diagnosis of invasive BC confirmed histopathologically, without personal and family history of germline BC risk pathogenic variants. These women were attended to Fundación CardioInfantil, Hospital Universitario de Mederi, Bogota, Colombia and different cancer centers located throughout Colombia (Bucaramanga, Cali, Medellin, Manizales, Pereira).

This study was performed in compliance with the Helsinki Declaration and was approved by both, Fundación Cardioinfantil–Instituto de Cardiología and Universidad del Rosario Ethics Committee (approval numbers: 402,018 7-11-2018, DVO005 1805-CV1469 3-12-2021, Pfizer: WI241988 – Investigator initiate research, independent review board: 28–08-2018, GF1147 2018). All patients approved the informed consent and were part of a previously described study <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS21-P3-07-05>. The study was financially supported by the grant “Capital Semilla” of the University of Rosario, IV-FCS036.

### Variants Analysis

Germline variants located on 3'UTR of *BRCA1* gene (~500pb) were filtered by population frequencies, taking into consideration a Minor Allele Frequency (MAF)  $\leq 1\%$  exomes in the gnomAD database (<https://gnomad.broadinstitute.org> v2.1.1). Levels of expression of miRNAs in breast and/or BC were used to use in silico tools miRGate (<http://mirgate.bioinfo.cnio.es>) and to filter germline variants ([supplementary Tables 1–3](#)). miRanda package v1.9 on Linux (<https://cbio.mskcc.org/miRNA2003/miranda.html>) was used to predict the miRNA-3'UTR interaction.

None of the women, harboring the c.\*36C>G variant, have pathogenic/likely pathogenic germline variants in the ORF of 10 genes with known penetrance for BC (*ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2*, *TP53*, *RAD51C*, and *RAD51D*).

### pMIR-Report Construction

The 3'UTR of *BRCA1* was amplified from patient DNA using GoTaq Master Mix (Promega, cat#M7122) with the following primers (huBRCA1\_3UTR\_For:CCCACTAGTCTGCAGCCAGCCACAGGTAC, huBRCA1\_3UTR\_Rev:

CCCAAGCTTCGATCCCAAGCACTCTCCTTC), PCR products were cloned into pCR4-TOPO vector (Invitrogen, cat# 45-0030), and then cloned into the pMIR-Report<sup>TM</sup> Luciferase vector (Invitrogen, cat#AM5795) through enzyme digestion (SpeI, HindIII, New England Biolabs, cat# R0133S and # R0104S).

## Cell Culture

MDA-MB-231 and MCF-7 cells (ATCC, cat#HTB-26, cat#HTB-22) were maintained in culture with DMEM-F12 (10% FBS, 1%P/S) at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub>.

## Luciferase Assay

Cells were transfected through Fugene 6 (Promega, cat#E2692) with 1µg of vector and co-transfected with 30ng of Renilla reporter vector and incubated for 48h. Cells were lysed with Passive Buffer of Dual-Glo luciferase assay (cat#E2980) among the manufacturer's recommendations. Briefly, 20µL of cell extracts were used to the read of the luminescence by the GloMax system (Promega). Luciferase was read at 570nm through LARII reagent and Renilla at 480nm through STOP&Glo reagent. Three experiments were realized, and RLU's were normalized by experiment and compared.

## GEO Database

The GSE146477 reports an array of miRNA expression and the miR-99a expression was compared in MDA-MB-231 and MCF-7 cells.

## Statistical Tests

The replicates were compared by Mann–Whitney test using Prism 10 (<https://www.graphpad.com/features>).

## Results

On the 400 women diagnosed with BC, 2 germline variants were observed on 3'UTR of *BRCAl* gene with a MAF ≤1%. The variants c.\*36C>G and c.\*369\_373del were tested on miRGate and were located on two miRNA interaction sites, miR-99a-3p and miR-26a-2-3p, respectively ([supplementary Tables 1 and 2](#)). The first variant was observed in three patients and the second in only one patient, all in heterozygote state. The c.\*36C>G variant is located on the complementary interaction site of miR-99a-3p ([Figure 1A](#)) and the c.\*369\_373del variant is located on the miR-26a-2-3p interaction seed sequence ([Figure 1B](#)). These variants were then tested on two cell models of breast cancer, MDA-MB-231 (TNBC cells) and MCF7 cells (human breast cancer cell line with estrogen, progesterone and glucocorticoid receptors) ([Figure 1C and D](#), respectively). One variant, which has not been detected by WES, c.\*421G>T was found and included in the experiments. Higher (Relative Luciferase Units) RLU were observed for the c.\*36C>G variant compared to the WT *BRCAl* 3'UTR in the MDA-MB-231 cells (*p*-value 0.0286) ([Figure 1C](#)) but not in the MCF-7 cell line ([Figure 1D](#)). The other variants had no difference in the RLU compared to WT. The expression level of the miR-99a-3p was verified and compared between both BC cell lines from the GEO database (GSE146477) and the expression level of miR99a-3p is higher in MDA-MB-231 in comparison with MCF-7 ([supplementary Figure 1](#)).

## Discussion

BC is the cancer most frequently diagnosed in women and causes 15% of cancer-related deaths in the same population. BC is a multifactorial disease, with a high percentage of unexplained heritability. It has been well described that approximately 10% of BC are hereditary and only the 5.6% of all BC cases are caused by germline pathogenic variants on 12 BC predisposition genes.<sup>8,20</sup> At present, it is important to explore new mechanisms capable of explaining the cancer development and the heritability of this disease.

miRNAs are small non-coding RNA with an important role in the regulation of gene expression. It has been described that these miRNAs can be involved in different molecular processes in BC, such as apoptosis, epithelial-mesenchymal transition, and angiogenesis, among others.<sup>21–23</sup> The miRNAs can exert their function via their union on the 3'UTR of the gene. It has been proposed that some miRNAs can be biomarkers of breast, prostate and ovarian cancer.<sup>24,25</sup> It has been described that some miRNAs have an oncogenic and tumor suppressive function.<sup>26,27</sup> The dysregulation of miRNAs expression could explain in part the dysregulation of some genes involved in BC.

A

Score: 126.000000 Q:1 to 22 R:28 to 48 Align Len (22) (72.73%) (77.27%)

```

3' UTR BRCA1 5' CAGGACCCCAAG-AAUGAGCUUA 3'
                || |||||  || | :|||
hsa-mir-99a-3p 3' GU-CUGGGUAUCUUCGCUCGAAC 5'

```

Energy: -24.370001 kCal/Mol

B

Score: 138.000000 Q:1 to 22 R:344 to 377 Align Len (33) (54.55%) (63.64%)

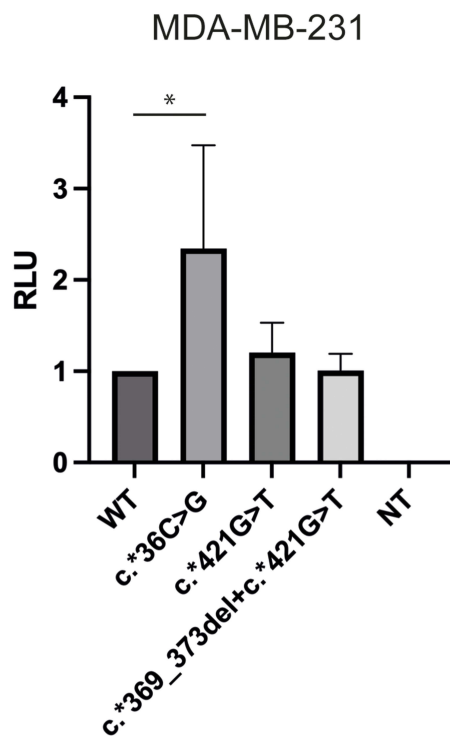
```

3' UTR BRCA1      5' GAAGCACAGAGTGGCUUGGCCUCAAGAGAAUAGC 3'
                  |||:|  |||:  |||  |||||
hsa-mir-26a-2-3p 3' CUUUGU---UCAUU-----AGU--UCUUAUCC 5'

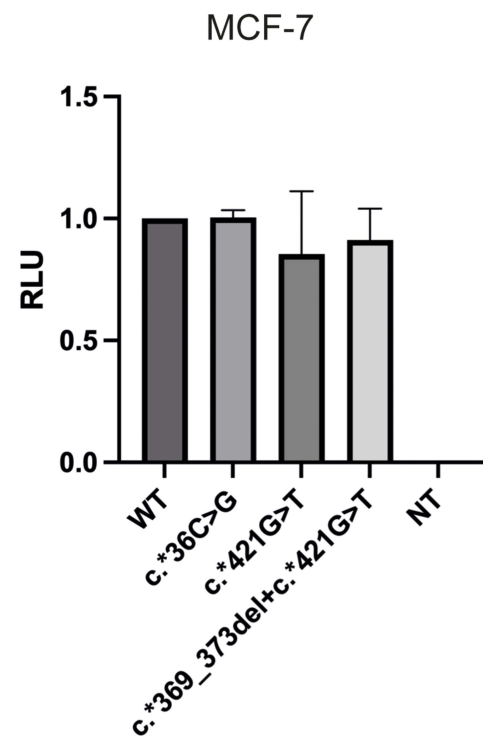
```

Energy: -16.370001 kCal/Mol

C



D



**Figure 1** Involvement of variants on 3'UTR on *BRCA1* expression. **(A)** Interaction of miR-99a-3p with *BRCA1* 3'UTR in presence of c.\*36C>G variant (red) **(B)** Interaction of miR-26a-2-3p with *BRCA1* 3'UTR in presence of c.\*369\_373del variant (red) **(C and D)** Luciferase assay representing the transfection of pMIR-Report with the different variants in MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines, respectively. Statistical significance \*p-value<0.05.

A few years ago, different studies have shown the impact of 3'UTR variants on the expression and susceptibility to cancer development.<sup>18,28,29</sup> In this study, we were interested in exploring the impact of 3'UTR variants on the gene expression of *BRCA1*. In fact, *BRCA1*, as well as *BRCA2*, have an important role in the biology of the cell, especially in tumor microenvironment in BC.

The function of BRCA1/2 consists essentially in the maintenance of genome stability through participation in DNA repair processes including homologous recombination.<sup>30</sup> Pathogenic variants on this gene have a penetrance of approximately 69% up to the age of 80 years and seem to exhibit an autosomal dominant inheritance.<sup>10</sup> On the BRCA Exchange database (brcaexchange.org) there are reported more than 2000 pathogenic variants located on coding regions and splicing sites of *BRCA1/2* genes. All 3'UTR variants are probably considered non-pathogenic, according to the current ACMG/AMP guidelines, but these variants could be considered risk factors as described by Zhang and collaborators.<sup>18</sup> In this study, we observed that the c.\*36C>G variant evidenced an overexpression of the reporter gene luciferase in MDA-MB-231 cells, a TNBC cell line. This finding is consistent with the clinicopathological characteristics of the BC in the three patients harboring this variant, who present a positive hormone receptor (HR+) subtype (supplementary Table 4). This variant seems to protect against the development of TNBC, which is a subtype of BC with a worse prognosis compared with HR+ BC. Expression of the miR-99a was validated in the two cell lines, by the GEO database (GSE146477), and we observed that the miR-99a-3p is overexpressed in MDA-MB-231 cell line in comparison with MCF-7 cell line (1 vs 0.73 fold-change). The difference in miRNA expression could explain the lack of RLU difference between the variants and WT in MCF-7 cells.

It has been demonstrated that miR-99a correlates negatively with inflammation in adipose tissue in humans. It has been well described that obesity/overweight is a pro-inflammatory status, and a BC risk factor. The mechanism, involved in obesity and hormonal changes is related to adipokines, such as leptin, adiponectin, and resistin among others. The hormonal changes in BC patients with obesity/overweight also have oxidative stress in the tumoral microenvironment regulated by the adipokines, supporting carcinogenesis in breast tissue.<sup>31–34</sup> The MCF-7 cell model could explain this situation since it expresses HR and a lower level of miR-99a. 2/4 of the patients harboring the 3'UTR variant (c.\*36C>G) have a BMI >25 kg/m<sup>2</sup> (supplementary Table 4) this finding could reinforce the hypothesis of obesity/overweight role in breast carcinogenesis.

In summary, the c.\*36C>G variant does not allow the degradation of BRCA1, as a protector effect in TNBC model, and not in the HR+ BC model, probably due to differential miRNA expression levels.

We suggest that the scientific community should analyze the impact of 3'UTR variants on gene expression, given that in a model of multifactorial disease, each variants have a little additive effect that, when added, can permit the development of the phenotype. Furthermore, 3'UTR variants allow gene expression dysregulation in different diseases with a Mendelian inheritance pattern.<sup>35,36</sup> Evolution of technologies with bioinformatics algorithm like miRGate or miRanda could help to expand the knowledge in genetics and allow us to propose new molecular mechanisms involved in different diseases including BC.

## Data Sharing Statement

Data supporting this study are available under request.

## Funding

This study was financed by the grant “Capital Semilla” of the Universidad del Rosario, IV-FCS036.

## Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

## References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA*. 2021;71(3):209–249. doi:10.3322/caac.21660
2. Melchor L, Benitez J. The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet*. 2013;132(8):845–863. doi:10.1007/s00439-013-1299-y
3. Rudolph A, Chang-Claude J, Schmidt MK. Gene–environment interaction and risk of breast cancer. *Br J Cancer*. 2016;114(2):125–133. doi:10.1038/bjc.2015.439
4. Benz CC. Impact of aging on the biology of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;66(1):65–74. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.09.001
5. Catsburg C, Miller AB, Rohan TE. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(9):2204–2209. doi:10.1002/ijc.29266
6. García-Estévez L, Cortés J, Pérez S, et al. Obesity and breast cancer: a paradoxical and controversial relationship influenced by menopausal status. *Front Oncol*. 2021;11. doi:10.3389/fonc.2021.705911
7. McDonald JA, Goyal A, Terry MB. Alcohol intake and breast cancer risk: weighing the overall evidence. *Curr Breast Cancer Rep*. 2013;5(3):208–221. doi:10.1007/s12609-013-0114-z
8. Yoshimura A, Imoto I, Iwata H. Functions of breast cancer predisposition genes: implications for clinical management. *Int J Mol Sci*. 2022;23(13):7481. doi:10.3390/ijms23137481

9. Varol U. BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *J BUON*. 2018;23(4):862–866.
10. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *JAMA*. 2017;317(23):2402–2416. doi:10.1001/jama.2017.7112
11. Kast K, Rhiem K, Wappenschmidt B, et al. Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J Med Genet*. 2016;53(7):465–471. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103672
12. Daly MB, Pal T, Berry MP, et al. Genetic/familial high-risk assessment: breast, ovarian, and pancreatic, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19(1):77–102. doi:10.6004/jnccn.2021.0001
13. Chen H, Wu J, Zhang Z, et al. Association between BRCA status and triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Front Pharmacol*. 2018;9:909. doi:10.3389/fphar.2018.00909
14. Chatterjee S, Pal JK. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell*. 2009;101(5):251–262. doi:10.1042/BC20080104
15. Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet*. 2023;1–18. doi:10.1038/s41576-023-00611-y
16. Garcia AI, Buisson M, Damiola F, et al. Mutation screening of MIR146A/B and BRCA1/2 3'-UTRs in the GENESIS study. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(9):1324–1329. doi:10.1038/ejhg.2015.284
17. Mir R, Javid J, Al Balawi IA, et al. A germline mutation in the BRCA1 3'UTR variant predicts susceptibility to breast cancer in a Saudi Arabian population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(3):859–866. doi:10.22034/APJCP.2018.19.3.859
18. Zhang L, Liu Y, Song F, et al. Functional SNP in the microRNA-367 binding site in the 3'UTR of the calcium channel ryanodine receptor gene 3 (RYR3) affects breast cancer risk and calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(33):13653–13658. doi:10.1073/pnas.1103360108
19. Santana Dos Santos E, Lallemand F, Burke L, et al. Non-coding variants in BRCA1 and BRCA2 genes: potential impact on breast and ovarian cancer predisposition. *Cancers*. 2018;10(11):453. doi:10.3390/cancers10110453
20. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):66. doi:10.1038/s41572-019-0111-2
21. Ghafouri-Fard S, Khanbabapour Sasi A, Abak A, et al. Contribution of miRNAs in the pathogenesis of breast cancer. *Front Oncol*. 2021;11. doi:10.3389/fonc.2021.768949
22. Hussen BM, Abdullah ST, Rasul MF, et al. MicroRNAs: important players in breast cancer angiogenesis and therapeutic targets. *Front Mol Biosci*. 2021;8:764025. doi:10.3389/fmolb.2021.764025
23. Tucci P. The role of microRNAs in cancer: functions, biomarkers and therapeutics. *Cancers*. 2022;14(4):872. doi:10.3390/cancers14040872
24. Galvão-Lima LJ, Morais AHF, Valentim RAM, Barreto EJS. miRNAs as biomarkers for early cancer detection and their application in the development of new diagnostic tools. *Biomed Eng Online*. 2021;20:21.
25. Zou R. Development and validation of a circulating microRNA panel for the early detection of breast cancer. *Br J Cancer*. 2022;126(3):472–481. doi:10.1038/s41416-021-01593-6
26. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. 2006;25(46):6188–6196. doi:10.1038/sj.onc.1209913
27. Loh H-Y. The regulatory role of MicroRNAs in breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19):4940. doi:10.3390/ijms20194940
28. Skeeles LE, Fleming JL, Mahler KL, Toland AE. The impact of 3'UTR variants on differential expression of candidate cancer susceptibility genes. *PLoS One*. 2013;8(3):e58609. doi:10.1371/journal.pone.0058609
29. Zhang N, Huang D, Jiang G, et al. Genome-Wide 3'-UTR single nucleotide polymorphism association study identifies significant prostate cancer risk-associated functional loci at 8p21.2 in Chinese population. *Adv Sci*. 2022;9(23):2201420. doi:10.1002/advs.202201420
30. Miklikova S, Trnkova L, Plava J, et al. The role of BRCA1/2-mutated tumor microenvironment in breast cancer. *Cancers*. 2021;13(3):575. doi:10.3390/cancers13030575
31. Bhardwaj P. Obesity promotes breast epithelium DNA damage in women carrying a germline mutation in BRCA1 or BRCA2. *Sci Transl Med*. 2023;15(684):eade1857. doi:10.1126/scitranslmed.ade1857
32. Verras G-I, Tchabashvili L, Chlorogiannis -D-D, Mulita F, Argentou M-I. Updated clinical evidence on the role of adipokines and breast cancer: a review. *Cancers*. 2023;15(5):1572. doi:10.3390/cancers15051572
33. Hanusek K, Karczmariski J, Litwiniuk A, et al. Obesity as a risk factor for breast cancer—the role of miRNA. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24):15683. doi:10.3390/ijms232415683
34. Jaiswal A, Reddy SS, Maurya M, Maurya P, Barthwal MK. MicroRNA-99a mimics inhibit M1 macrophage phenotype and adipose tissue inflammation by targeting TNF $\alpha$ . *Cell Mol Immunol*. 2019;16(5):495–507. doi:10.1038/s41423-018-0038-7
35. Simon D, Laloo B, Barillot M, et al. A mutation in the 3'-UTR of the HDAC6 gene abolishing the post-transcriptional regulation mediated by hsa-miR-433 is linked to a new form of dominant X-linked chondrodysplasia. *Hum Mol Genet*. 2010;19(10):2015–2027. doi:10.1093/hmg/ddq083
36. Wang Y, Du X, Zhou Z, et al. A gain-of-function ACTC1 3'UTR mutation that introduces a miR-139-5p target site may be associated with a dominant familial atrial septal defect. *Sci Rep*. 2016;6(1):25404. doi:10.1038/srep25404

## The Application of Clinical Genetics

Dovepress

### Publish your work in this journal

The Application of Clinical Genetics is an international, peer-reviewed open access journal that welcomes laboratory and clinical findings in the field of human genetics. Specific topics include: Population genetics; Functional genetics; Natural history of genetic disease; Management of genetic disease; Mechanisms of genetic disease; Counselling and ethical issues; Animal models; Pharmacogenetics; Prenatal diagnosis; Dysmorphology. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/the-application-of-clinical-genetics-journal>