

Perfiles de expresión génica de los tumores de mama hereditarios

Tesis doctoral que presenta para optar al
título de Doctor por la Universidad Autónoma
de Madrid el Licenciado en Biología
Ricardo Ramires Fernández

Madrid, diciembre de 2009



Spanish National Cancer Centre
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

Dr. Javier Benítez, Director del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y Profesor Honorario del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, como Tutor,

CERTIFICA:

Que Don Ricardo Ramires Fernández, Licenciado en Biología por la Universidad Católica de Pelotas - Brasil, ha realizado la presente Tesis Doctoral **“Perfiles de expresión génica de los tumores de mama hereditarios”** y que a su juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctor en Biología Molecular**, a cuyos efectos será presentado en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo su supervisión, autorizando su presentación ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste se extiende el presente certificado,

Madrid, diciembre de 2009.

Vº Bº del Tutor de la Tesis:

Javier Benítez



Spanish National Cancer Centre
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

Dra. Ana Osorio Cabrero, Investigadora del Programa de Genética del Cáncer Humano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) como Directora,

CERTIFICA:

Que Don Ricardo Ramires Fernández, Licenciado en Biología por la Universidad Católica de Pelotas - Brasil, ha realizado la presente Tesis Doctoral **“Perfiles de expresión génica de los tumores de mama hereditarios”** y que a su juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al **Grado de Doctor en Biología Molecular**, a cuyos efectos será presentado en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo su dirección, autorizando su presentación ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste se extiende el presente certificado,

Madrid, diciembre de 2009.

Vº Bº de la Directora de la Tesis:

Ana Osorio Cabrero

FINANCIACIÓN

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA EN EL GRUPO DE GENÉTICA HUMANA DEL PROGRAMA DE GENÉTICA DEL CÁNCER HUMANO DEL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS (CNIO), BAJO LA SUPERVISIÓN DE JAVIER BENÍTEZ ORTIZ Y DIRECCIÓN DE ANA OSORIO CABRERO.

LOS SIGUIENTES FONDOS HAN PERMITIDO LA REALIZACIÓN DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL:

MARIE CURIE SIXTH FRAMEWORK – ONCOTRAIN CNIO (MEST-2-CT-2004-6423)

EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DE ENFERMEDADES RARAS (CIBERER)

FONDOS DE INVESTIGACIONES SANITARIAS (FIS) - FIS PI061090

“HOW BIG WE ARE, WE DON’T FIT IN THE WORLD...”

*Refrán creado en los últimos cuatro años en
el Grupo de Genética Humana del CNIO*

A mi familia, a aquellos que siguen presentes y a los que ya no están pero que también hacen parte de esta caminata

Agradecimientos

Quando decidi começar a compor esta parte da minha tese provavelmente não tivesse nem iniciado meu período de formação universitária, mas alguma coisa me suscitada ao ouvido que seriam muitas linhas, muitos nomes e muito que agradecer e lembrar.

Cuando decidi començar a componer esta parte de mi tesis, probablemente ni hubiera empezado mi período de formación universitária, pero algo ya me decía que serían muchas líneas, muchos nombres y mucho que agradecer y recordar.

É extremamente fácil começar, porém, não o é acabar-lo. Pai e mãe: vocês que depositaram em mim o maior dos vossos desejos e amor, que fizeram de vossas vidas uma abdicação e doação à causa dos seus filhos. Quantas noites de insônia, sustos ou trabalho maior que levar nove meses junto a vocês. Quantas coisas me propiciaram, quantos sorrisos arrancaram da minha face e quanto exemplo de deram. Das noites e madrugadas de trabalho, tudo para dar-me do melhor, brigas pelo teu filho, paciência – e a impaciência – de ensinar-me o caminho adequado. Da minha personalidade levo um pouco de cada um: a maneira de ver a vida de ti, Pai e a vontade de vencer de ti, Mãe. Vocês quiseram-me, geraram-me, alimentaram-me, criaram-me e ensinaram-me que o mais importante, acima de tudo, é a dedicação, a força de querer ser mais e melhor. Vocês são a razão da minha existência. Entretanto, este carinho não é único. Como não falar de meu irmão de sangue. Mano, quanto aprendi contigo e, sobretudo, quanto sigo aprendendo. Desde as típicas brigas entre irmãos até os dias de hoje, que saibas o quanto significas para mim. Es uma pessoa inigualável, de gênio forte e de uma inteligência invejável que espero, geneticamente, poder tê-la herdado. Desde as tardes que me viste encerrado na frente do computador, escrevendo intermináveis trabalhos da universidade às visitas que te faço sempre que no Brasil estou, ainda es meu grande professor das disciplinas que se chamam moral, caráter e personalidade. À Rita não tenho palavras para agradecer o apoio e o amor de segunda mãe. Amo-vos minha GRANDE família. Gostaria que vocês soubessem que cada dia é uma nova chance de aprender mais sobre nós mesmos, de se importar mais com os outros, de rir mais do que ríamos, de realizar mais do que pensávamos ser possível, de ser mais do que éramos antes. Reconheço e agradeço o inestimável e importante apoio, amor, compreensão, abdicação e sacrifício que me foi dedicado nesta longa caminhada. Alegrem-se, pois os méritos desta vitória também são seus!

Como não mencionar meus saudosos avôs. Vó Zilma e vô Beto, a memória que mantenho viva de vocês não podia ser mais alegre e fraterna. Desde as primeiras palavras as quais tive o privilegio de ensinar à minha querida avó materna a delinear-las e sua sábia e singela forma de

escutar-me até as saudosas tardes de filme na casa de meu avô paterno, as tardes com bolinho-de-chuva e as vezes que me buscava no colégio com as mãos dadas, são momentos ímpares que, ainda criança, as recordo e as conservarei por toda minha vida. Por outro lado, o perene apoio da “Vó Zoé” ainda me dá forças a seguir esta batalha no outro lado do Atlântico. Vó, tu es uma das poucas pessoas capazes de entender-me e perseveraste junto a mim. Neste momento, também te apresentas a um título de Doutora em Ciências da Vida – obrigado por ensinar-me a ler, escrever e amar as letras que agora levam teu nome.

As amigades, juntamente com minha família, são os responsáveis pela minha vitória. Há pessoas com as quais não compartimos laços sanguíneos, mas dividimos o nosso coração. Como não recordar àqueles que me viram crescer ou que cresceram comigo. Ainda, àqueles que não tiveram a oportunidade de seguir seu caminho comigo por terem sido *chamados* a estar junto ao que denominados Ele, o meu muito obrigado e muitas saudades. Pessoas importantes foram muitas e infelizmente poucas poderei nomear aqui. Lucinha, Cacaoio, Carlos e Cadico, como não se lembrar de vocês. Esta infância atravessando a rua, percorrendo o bairro com a bicicleta, os passeios de Fusca e o carinho incondicional. Vocês foram peça-chave no meu caminho e lhes devo o meu muito obrigado.

Marcos, meu padrinho, a família Cardoso é única. Desde o dia cinco de agosto de 1996 me considero uma pessoa com mais sorte. Começamos uma árdua caminhada, de dois amigos que, hoje, seriam nada mais nada menos que grandes irmãos. Foram muitos anos de Colégio Gonzaga, Grupo Jovem, trabalhos de grupo, estudos do “Provão”, alguma vez ou outra no CTG e muitas caipirinhas. Sergio, Valéria, Marcos, Mateus, Bruna, Vó e Marcia, vocês são outra família para mim, uma família que, ainda longe, sabereis que segue ali e que os oferecerei minha gratidão eterna e carinho de filho caçula. Cada um, à sua maneira, contribuiu para que este manuscrito fosse realidade.

Há vezes na vida que não sabemos em que caminho estamos nem qual caminho escolher. São nestes momentos que pessoas tão importantes exercem um papel de anjo da guarda. Nestas simples, porém, gratas linhas, dedico esta tese, também, aos meus padrinhos José Américo e Noeli. Foram vários momentos de presença fraternal e as recordarei com muito carinho por toda a minha vida. Desde os cuidados na infância, a atenção na adolescência às conversas acadêmicas na fase adulta, são pessoas que sempre me estenderam a mão e abriram o seu coração. Vocês, dindos, e ao meu querido primo-irmão Juliano, o meu muito obrigado e a certeza de que este documento também tem palavras de vosso punho.

Na UCPel, é impossível não lembrar dos meus queridos professores que me incentivaram a começar e seguir no mundo da investigação e não desistir das Ciências Biológicas – *Ricardo, nem tudo é genética!* Graça e Gilberto, que me acolhisteis no Laboratório de Genética da Universidade onde tanto aprendi. Ao técnico Abilio, tua filosofia é mais que um poema, é um ensinamento de viver, em memória, agradeço-te. Lu, minha professora de bioquímica, diretora e minha amiga: participaste em todas as fases desta caminhada e sabes o árduo que é seguir adiante sendo um *little alien* fora das fronteiras. Resumindo, dizem que é medíocre o aluno que não supera seu professor; dado o panorama, vejo complicado que o consiga. Obrigado, mestres!

Por fin, y tras una pequeña vuelta al mundo, llego al CNIO el 2004 como estudiante de verano y fui acogido como el brasileño atípico que, aunque con nivel -1 de castellano, me sobraban sonrisas dado que no me enteraba de mucho. En el mismo año vuelvo a Brasil, concluyo la carrera y una vez más, regreso al CNIO, pero ahora con la incumbencia de una tesis doctoral por desarrollar. De ahí, las descubiertas, muchísimo más positivas que negativas – empecé bien, ¡ostras! Me ha tocado la Ana Osorio ¿Qué pasará?

Entre extracciones de ARN, amplificaciones, buff, el mundo de las pipetas me fascinaba y poco a poco, iba haciendo parte y buceando por el nuevo mundo de la biología molecular y de los micro...qué? Sí, *microarrays*. Sacaremos el BRCA3, 4, 5...luego me di cuenta que si Ross no lo ha sacado con el *Cholexa* no sería el *Oncochip* que lo iba a hacer.

De este día en adelante empecé a conocer mejor a la gente. Mis compis de piso, Sergio (*Pijow*), Antonio (*Moi*) y Josué (*el Wey*). ¿Se podría tener una convivencia mejor? Fuisteis mi familia y lo seguí siendo. Aunque lejos, en los antípodas, el corazón bananero nunca dejará de latir. Nos cuidamos unos a los otros, en casa post excesos etílicos, en La Paz, en las barbacoas CNIO, en fin, momentos que jamás olvidaré. Josué, tu sencillez de alma y espíritu, enseñándome biología molecular mientras cocinaba me sirvieron de mucho y espero muchas veces más poder compartir las fajitas que tan bien las sabes hacer. A Sergio, no tengo nada que decir, la Nochebuena Murciana dejó muy claro lo grande que sois en la familia Hernández y que será, siempre, mi familia española. El piso bananero se remodeló, unos se fueron, otros llegaron. La *piernas*, la Chaky – una de las pocas personas que son capaces de sacar lo bueno donde lo haya y contagia, gracias Chaky por estos años de convivencia y por tu cariño que siempre me has demostrado; luego el gringo loco, el encanto, Fábian (*bananas*)...aún leembras de quantas vezes comemoramos teu aniversário? Com quantas caipirinhas? Ai mano, aprendi muito contigo, me fizeste ver a vida de uma maneira mais simples, singela e melhor. Nossas conversas de bar foram ímpares, tua atenção aos problemas do *bananas Junior* me fizeram melhor e não imaginas o

quanto foi difícil acostumar-se sem a tua companhia em Madri. Teu caminho também está aberto e espero ver-te sempre e, se algo acontecer, bebe e esquece!

Volviendo al laboratorio, Marta (*Chiky*), Lara y Loren fueron maestros que me condujeron al principio de la caminata y que, al día de hoy, lo siguen siendo con nuestras conversaciones transcendentales. A Loren, *pendinnnn*, te dedico unas líneas demás. Cuantos viajes, cuantos congresos, cuantos *how big you are, what a night, low high*, eres lo que de mayor quiero ser, pero con más pinguin, eh!? Claro, hablar de Loren y no acordarse del *Pendin major*, esta especie de macho ibérico en extinción es un sacrilegio. Pocas personas tuvieron la oportunidad de conocerte como yo te conocí. Fui más allá de lo que aparentas, de lo que dices y llegué a lo que sientes. Loren y Ross, *you are the milk*, espero veros muchas veces en este futuro tan brillante que nos espera y que sus líneas acaban de empezar a trazarse. Otro tío grande es el *Ivanation, gaditano con las dos manos*, mi gran maestro de la patología y que me hizo descubrir el fantástico mundo de las células y tejidos. Cris Rodriguez y Susanna, *lou-jai!*

Pero muchas más personas también merecen algunas líneas de agradecimiento. ¿Familia etílica? Vaya, Lorena! Tu alegría y disposición para ayudar y celebrar pequeños momentos me harán falta en Copenhague. Los días – y noches en Rio de Janeiro y en Pelotas (ciudad) fueron inolvidables y esté segura de que eres una Ramires – por lo menos para mis padres y para la abuela. Fran, Jarek, Paola, Ariel, Pimenta, Tuts, Tiago, Gustavo, qué ánimos y qué marcha! El *Maestro y la Profesora* me mostraron lo bien que se puede pasar uno en la mejor ciudad del mundo! *Why not?* Gracias Javi Martín por el apoyo y por los mensajes inigualables – haremos transgénicos en Brasil! Sil Mouron, mi compañera de las milongas porteñas y con que tanto me enseñó a seguir en este mundo científico. Las tardes y noches de La Latina son inolvidables y, cuando hay vino y empanadas, hummm, mejor aún. Isabel Jacó, Águeda, Christoph, los que me disteis la bienvenida a Madrid, ¡espero veros pronto! Bibi y Filipe, sentirei falta desse carinho de irmão menor, amo-vos.

To my Danish friends, thanks a lot for the support in the end of this walk. You've received me in your country and gave me one of the best birthdays party – and hungover. Kris and Bjarne, thanks for sharing your stylish home with me and showing around the magic *København!* You've convinced me, *Tak!*

En el labo, con un flujo continuo de cerebritos, Magda y Miljana embellezan el ambiente, además de contribuir con la alegría de los chicos. Las discusiones a cerca de qué es ser guiri en España nos une, además de las dudas y planteamientos futuros – *more, Ricardo!* Alicia y Fer, que me acompañaron en todos los momentos, gracias por la comprensión y por vuestro trabajo, clave

para el éxito del mío. Maika, qué será de mi reino sin *my queen*? A Toya, que te veo como una madre en todo lo que haces. Tu dedicación al trabajo y competencia me sirven como un espejo y un modelo a seguir. Gracias por todo. Fati, sigues con el mismo pelo guapo y muy *magra*! Gracias también a Gloria y Bea por las críticas a lo largo de esta tesis que me hicieron más fuerte y preparado académicamente. A mi actual compañera de piso, Elena - la *Pendin pajaritos*, que ya no tengo claro de cómo considerarla; si compi de piso, amiga, hermana, enfermera, en fin, cuando mis hepatocitos se quejaron y pidieron descanso me enseñaste el altruismo y me cuidaste como nadie. A por el *Nobel* de informática!

A todos aquellos que de manera incógnita facilitan nuestro trabajo en el CNIO, muchísimas gracias. A veces no valoramos el hecho de tener limpio el laboratorio, vacías las papeleras, ordenadores puestos y proyectores configurados, pero grandes profesionales hacen con que esta red compleja de interacciones funcione de manera robusta. A mis grandes amigas de la cafetería CNIO, gracias por haberme apoyado a lo largo de estos años, de los desayunos dormidos, las tertulias del viernes y los carajillos con Ros e Ivanation. La comida del CNIO está lejos de recibir estrellas Michelin pero ya las tiene brillando en su entorno, cada día.

Per Catalunya, tinc a tres persones a qui he de donar les gràcies. A Rakel, la qual vaig tenir la sort de conèixer, molt al principi de la tesi a Praga on més que un curs hem après - i ensenyat que en la ciència també es pot passar-lo bé. A més, fan part d'aquesta tesi dues figures importants i que vaig tenir el plaer de conèixer, col·laborar i prendre una canya a Barcelona: Dt. Pujana i Xavi. He après molt amb vosaltres i gràcies per llençar cap a davant un dels treballs.

Por fin, y de igual relevancia, muchas otras personas hicieron parte de esta caminata tan cuanto los que ya mencioné. Javier Benítez; me diste la oportunidad a los 20 años de poder conocer un poco más de la Genética y eres el responsable de haber seguido adelante. A ti, mi más sincero agradecimiento. Asimismo, hay otra – u otras personas en un único espíritu: Ana, que hasta hoy me cuesta llamarte *Jefa*, ya que veo en ti los distintos papeles de la colega de clase, de bailoteo, de las famosas barbacoas, de las broncas de madre, de hermana (menor) y, como no, amiga. Has aguantado todas las fases de este adulto joven, aún cuando mezclava rasgos de un adolescente que acababa de dejar sus pañales familiares. Tuviste la paciencia y la sinceridad de decirme lo que había que ser dicho y, al día de hoy, me queda decir que estás leyendo tu segunda tesis. A todas las pacientes, mi respeto y admiración por haber enfrentado esta dura etapa y haberme permitido contribuir con un “grano de arena” a vuestras siguientes generaciones.

Índices

Índice General	22
English Abstract.....	37
Resumen.....	38

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del cáncer de mama	43
1.1. Epidemiología.....	43
1.2. Factores de riesgo	43
1.3. Tumorigénesis	44
1.4. Tipos histológicos	45
1.4.1. Carcinomas ductales	45
1.4.2. Carcinomas lobulillares	46
1.4.3. Otros tipos menos frecuentes.....	47
1.5. Diagnóstico.....	48
1.6. Pronóstico y tratamiento	48
2. Cáncer de mama hereditario.....	50
2.1. Antecedentes	50
2.2. Genes de alta susceptibilidad: <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	50
2.2.1. Identificación de los genes.....	50
2.2.2. Estructura génica	51
2.2.3. Espectro de mutaciones germinales: diferencias poblacionales	52

2.2.4. Penetrancia de las mutaciones.....	53
2.2.5. Biología de las proteínas <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	54
2.3. Silenciamiento somático de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	57
2.4. Familias de riesgo	58
2.5. Casos hereditarios no atribuibles a mutaciones en los genes <i>BRCA1/BRCA2</i> (BRCAX): Búsqueda de nuevos genes.....	58
3. Taxonomía molecular del cáncer de mama hereditario	59
3.1. Perfiles inmunohistoquímicos	59
3.2. Perfiles de aberraciones genómicas	60
3.3. Perfiles transcripcionales.....	61

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras incluidas en el estudio.....	71
1.1. Tumores.....	71
1.1.1. Tumores congelados.....	71
1.1.2. Micromatrices de tejidos (<i>Tissue Microarrays</i> – TMA).....	75
1.2. Selección de pacientes.....	76
2. Métodos.....	76
2.1. Estimación del porcentaje tumoral y tinción.....	76
2.2. Inmunohistoquímica de los tejidos incluidos en el TMA	77
2.3. Descripción del Oncochip y principio de la técnica	77
2.4. Preparación de las muestras para hibridación en el Oncochip	80
2.4.1. Extracción del ARN total	80

2.4.2. Amplificación del ARN total	81
2.4.3. Síntesis de la primera cadena de ADNc.....	81
2.4.4. Síntesis de la segunda cadena de ADNc.....	82
2.4.5. Purificación del ADNc de doble cadena	82
2.4.6. Precipitación	83
2.4.7. Amplificación del ARN mediante T7 ARN polimerasa	83
2.4.8. Digestión del ADNc molde	84
2.4.9. Purificación del ARNa	84
2.4.10. Precipitación del ARNa.....	85
2.4.11. Comprobación de la calidad de ARNa por electroforesis.....	85
2.5. Síntesis y marcaje del ADNc.....	86
2.5.1. Reacción de retro-transcripción.....	87
2.5.2. Degradación del ARN molde	88
2.5.3. Purificación de la muestra marcada.....	88
2.5.4. Precipitación de la muestra marcada y purificada.....	89
2.6. Hibridación en el Oncochip	90
2.6.1. Preparación de las soluciones	90
2.6.2. Lavado de los cristales	91
2.6.3. Desnaturalización de las sondas	91
2.6.4. Pre-hibridación.....	91
2.6.5. Hibridación	92
2.6.6. Lavados	92
2.6.7. Procesamiento y análisis de las imágenes	93
3. Análisis de datos.....	95

3.1. Normalización	95
3.2. Pré-procesamiento de los datos	96
3.3. Análisis no-supervisados.....	96
3.4. Análisis supervisado.....	97
3.5. Métodos de modelado de redes génicas, transcripcionales y proteicas	98

RESULTADOS

1. Análisis de expresión global	103
2. Perfiles de expresión de los tumores asociados a mutaciones en el gen <i>BRCA1</i>	104
2.1. Estatus de <i>ESR1</i> o el fenotipo basal como clasificadores principales	104
2.2. Sub-clases de tumores <i>BRCA1</i> y firmas moleculares asociadas.....	105
2.3. Marcadores que diferencian los tumores <i>BRCA1 ESR1</i> -negativo y <i>ESR1</i> -positivo.....	107
2.4. Valor pronóstico de la respuesta inmune.....	111
2.5. Análisis de la firma de RI y CC en una serie independiente de tumores <i>BRCA1</i> RE-negativos	112
2.6. Análisis de una serie independiente de tumores de mama ER-positivos	113
2.7. Regulación transcripcional de las firmas moleculares de <i>BRCA1</i>	114
2.8. Presencia de dos sub-grupos dentro de los tumores <i>BRCA1-ESR1</i> -negativos	115
2.9. Estudio de alto nivel de las firmas moleculares asociadas a los tumores <i>BRCA1</i>	117
3. Caracterización de los tumores <i>BRCAX</i>	119
3.1. La clasificación no-supervisada de los tumores <i>BRCAX</i> revela la existencia de al menos dos grupos.....	119
3.2. Genes diferencialmente expresados entre los grupos <i>BRCAX-A</i> y <i>BRCAX-B</i>	121
3.3. Los tumores <i>BRCAX</i> comparten algunas similitudes con los tumores esporádicos.....	121
3.4. Los fenotipos del cáncer de mama entre los sub-grupos <i>BRCAX</i> y esporádicos	122

3.5. Los fenotipos Luminal A y Luminal B en los tumores BRCA1 clasificados con PAM50	124
3.6. Fondo genético de los tumores BRCA1-A “más allá” del subtipo molecular	125

DISCUSIÓN

1. El transcriptoma de los tumores de mama hereditarios	131
2. Caracterización de los tumores BRCA1: el fenotipo basal como discriminador principal	135
2.1. Firmas moleculares asociadas a los tumores BRCA1	136
2.2. La respuesta inmune	137
2.3. Papel de NFkB en la regulación de las firmas moleculares asociadas al gen <i>BRCA1</i>	138
2.4. La heterogeneidad presente dentro de los tumores BRCA1 <i>ESR1</i> -negativos	139
2.5. Análisis integrador de las firmas moleculares BRCA1	140
3. Caracterización de los tumores asociados a BRCA1	141
3.1. La existencia de sub-grupos BRCA1	141
3.2. Los tumores BRCA1 se clasifican según los fenotipos moleculares establecidos en el cáncer de mama esporádico	141
3.3. Los tumores BRCA1 se clasifican según los fenotipos moleculares establecidos en el cáncer de mama esporádico	142
3.4. La Vía de Susceptibilidad BRCA1	143

CONCLUSIONES

Material suplementario	169
Tablas Suplementarias	169
Figuras suplementarias	221

Figura suplementaria S1. Agrupamiento jerárquico no-supervisado de los tumores BRCA1 <i>ESR1</i> -negativos y de la línea celular MDA-MB 436, BRCA1-mutante, utilizando 72 genes dianas de NFkB relacionados con apoptosis y sistema immune	221
Artículo originado de la tesis.....	222
Colaboraciones en otras publicaciones.....	234
Grupo de Genética Humana del CNIO	247

*Abreviaturas y
anglicismos*

A lo largo del texto de la presente tesis, el lector podrá encontrar una serie de anglicismos que hemos utilizado por su uso regular en el argot científico, si bien algunos de ellos no están admitidos en la lengua oficial en la que está escrita la tesis. A continuación se exponen las abreviaturas utilizadas en la presente tesis, algunas de las cuales proceden de anglicismos y otras son nombres de genes o proteínas:

ADN	Ácido desoxiribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AECC	Asociación Española Contra el Cáncer.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNa	Ácido ribonucleico amplificado
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico transferente
Array	Término utilizado para definir la matriz sobre la que se encuentran impresos los clones de ADN donde se realizan las hibridaciones genómicas o los cilindros tumorales donde se realizan las hibridaciones inmunohistoquímicas o valoraciones histológicas.
ATM	Gen mutado en la ataxia telangiectasia (Ataxia Telangiectasia Mutated gene).
BACH1	Factor de transcripción con cremallera de leucina homólogo a BTB y CNC (BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1).
BARD1	Gen asociado al dominio en anillo de BRCA1 (BRCA1 associated RING domain 1 gene).
BASC	Complejo de vigilancia del genoma asociado a BRCA1.
BCLC	Consortio para el ligamiento del cáncer de mama (Breast Cancer Linkage Consortium).
BIC	Servicio de información del cáncer de mama (Breast Cancer information Core)
BLM	Gen del síndrome de Bloom (Bloom Syndrome gene).
BRCA1	Gen de susceptibilidad al cáncer de mama 1 (Breast Cancer Gene 1).
BRCA2	Gen de susceptibilidad al cáncer de mama 2 (Breast Cancer Gene 2).
BRCAX	Tercera clase de cáncer de mama familiar no asociado a mutaciones en los genes <i>BRCA1</i> ó <i>BRCA2</i> . También catalogada como no-BRCA1/2.
BRCT	Dominio C-Terminal de BRCA1.
BRIP1	Helicasa 1 que interactúa con el dominio C-terminal de BRCA1 (BRCA1 Interacting Protein C-terminal helicase 1).
c.s.p.	Cantidad suficiente para
CASP	Caspasa
CCNA2	Ciclina A2.

Abreviaturas

CCNB2	Ciclina B2.
CDH3	Caderina 3 o P-caderina (cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)).
CHK2	Gen homólogo al regulador del ciclo celular CHK2 de <i>S. pombe</i> (CHK2 checkpoint homolog (<i>S. pombe</i>) gene).
CK5	Citoqueratina 5 ó KRT5.
Cy3	dUTP conjugado con Cianina 3
Cy5	dUTP conjugado con Cianina 5
dATP	2' desoxiadenosina 5'-trifosfato.
dCTP	2' desoxicitosina 5'-trifosfato.
del	Delección.
dGTP	2' desoxiguanosina 5'-trifosfato.
dNTP	2'-Deoxiribonucleósido-5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
dTTP	2' desoxitimidina 5'-trifosfato.
dUTP	2' desoxiuridina 5'-trifosfato.
EDTA	Anticoagulante: Sal de ácido etileno diamina tetracético
ERBB2	Gen homólogo 2 al oncogén v-erb-B2 de la leucemia eritroblástica viral aviar (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian) gene).
ESR1	Gen del receptor de estrógeno 1 (Estrogen Receptor 1 gene).
EST	Secuencias expresadas tag
FGFR1	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico 1.
Gatekeeper	Un gen <i>gatekeeper</i> es una clase de gen que regula directamente el crecimiento tumoral mediante su inhibición o activación de la muerte programada. Esto no es una abreviatura
HER2	Ver ERBB2.
IC	Intervalo de confianza
IPA	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
Ki-67	Antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal Ki-67 (antigen identified by monoclonal antibody Ki-67).
Kit	Término utilizado para designar el conjunto de reactivos y material que una casa comercial determinada ofrece para realizar técnicas experimentales de uso común en el laboratorio.
LOH	Pérdida de heterocigosidad (Loss of Heterozigosity).
MAF	<i>Minor allele frequency</i> (Frecuencia del alelo minoritario).
min	Minutos

Missense	Una mutación <i>missense</i> es un tipo de mutación no sinónima en la que el cambio de un nucleótido produce un cambio de aminoácido que hace que la proteína pueda no ser funcional. No es abreviatura
MMP	Metaloproteínasa
MRE11	Gen A homólogo al gen MRE11 de la recombinación meiótica de <i>S. cerevisiae</i> (MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>) gene).
MSH2	Gen homólogo 2 de mutS de <i>E. Coli</i> y causante de cáncer de colon no polipósico de tipo 1 (mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (<i>E. coli</i>) gene).
MSH6	Gen homólogo 6 de mutS de <i>E. Coli</i> (mutS homolog 6 (<i>E. coli</i>) gene).
NBS1	Gen del síndrome de rotura cromosómica Nijmegen (Nijmegen Breakage Syndrom gene).
NFKB	(v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 (avian) gene).
NFKB1	Factor nuclear kappa B, subunidad 1
NMD	Non-sense Mediated Decay system.
Nonsense	Una mutación <i>nonsense</i> es una mutación puntual en la secuencia del ADN que resulta en un codón de parada, que posiblemente produce una proteína truncada y a menudo no funcional. No es abreviatura
OCT	Componente utilizado para conservar el tejido a bajas temperaturas y poder realizar los cortes con un criostato de congelación (Optimal Cutting Temperature).
P53	Ver TP53.
PALB2	Gen compañero y localizador de BRCA2 (partner and localizer of BRCA2 gene).
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino fosfato (Phosphate Buffered Saline buffer).
PCNA	Antígeno nuclear de la proliferación celular (Proliferating Cell Nuclear Antigen).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
PGR	Gen del receptor de progesterona (ProGesterone Receptor gene)
PTEN	Gen fosfatasa y homólogo de tensina (mutado en múltiples cánceres avanzados) (Phosphatase and TENsin homolog –mutated in multiple advanced cancers 1—gene).
RAD50	Gen homólogo a RAD50 de <i>S. cerevisiae</i> (RAD50 homolog <i>S. cerevisiae</i> gene).
RAD51	Gen RAD51 homólogo a RecA de <i>E. coli</i> .
Ratio	Relación de dos datos.
RB	Gen del retinoblastoma.
RE	Receptor de estrógenos (ver <i>ESR1</i>).
RP	Receptor de progesterona (ver PGR).
RT-PCR	PCR acoplada a transcripción reversa

Abreviaturas

SDS	Dodecil sulfato sódico.
SSC	Solución salina de citrato de sodio.
SSCP	Análisis de conformación polimórfica de hebra sencilla (single-strand conformation polymorphism).
STK11	Serin-treonin quinasa 11 causante del síndrome de Peutz-Jegher (Serine/Threonine Kinase 11).
TMA	Tissue Micro Array
TP53	Gen de la proteína tumoral p53 (Tumor Protein p53 gene).
VHL	Gen supresor tumoral von Hippel-Lindau (Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene).

English Abstract

Resumen

ENGLISH ABSTRACT

Familial breast cancer accounts for around 5-10% of all breast tumor cases. From these, around 20% are attributable to mutations in the high-susceptibility genes *BRCA1* and *BRCA2*. So far no other high risk genes, specifically involved in the breast and ovarian cancer syndrome have been identified that explain the remaining hereditary cases (so-called BRCAX). The characterization of the tumoral tissue of the patients has been an important source of information to help elucidate the biological pathways specifically altered in the three types of hereditary tumors (*BRCA1*, *BRCA2* and BRCAX). Based on gene expression profiling, the “*molecular portraits*” of breast cancer have been defined and sporadic breast tumours classified into, at least, five molecular subtypes. Less is known about the molecular classification of familial breast tumors and only a couple of papers have come out describing, superficially, their molecular behavior. With the aim of better understanding the molecular alterations present in this group of tumors, we have used a cDNA *microarray* containing genes related to tumorigenesis and analyzed a series of 50 tumors consisting of 14 *BRCA1*, 14 BRCAX and 22 sporadic.

We have described molecular signatures that define two *BRCA1* subclasses depending on the expression of the gene encoding for estrogen receptor, *ESR1*. Signatures were found to be molecularly associated with different biological processes and transcriptional regulatory programs. The signature of *ESR1*-positive tumors was mainly linked to cell proliferation and regulated by ER, while the signature of *ESR1*-negative tumors was mainly linked to the immune response and possibly regulated by transcription factors of the REL/NFκB family. These signatures were then verified in an independent series of familial and sporadic breast tumors, which revealed a possible prognostic valor for each subclass. Over-expression of immune response genes appears to be a common feature of ER-negative sporadic and familial breast cancer and may be associated with good prognosis. Interestingly, the *ESR1*-negative tumors were sub-stratified into two groups presenting light differences in the magnitude of the expression of immune response transcripts and REL/NFκB transcription factors, which could be dependent on the type of *BRCA1* germline mutation.

On the other hand, we have confirmed that the BRCAX tumors are heterogeneous and can be divided in at least two main subgroups, so-called A and B, transcriptionally distinguishable and with different altered pathways within each of the groups. Once several approaches have pointed out that the BRCAX are comparable to the sporadic cases, we have analyzed their transcriptome altogether. We have found that BRCAX-A and B subgroups, can be classified as Luminal A and B

respectively, taking into account the intrinsic phenotypes defined for the sporadic breast tumors. We have found that, at the somatic level, the BRCAX-B tumors are identical to their sporadic Luminal B counterparts, while BRCAX-A, despite having a luminal A phenotype, show additional genomic alterations that could be reflecting a more specific germ-line alteration. With these findings, we have established *The BRCAX Susceptibility Pathway*, comprising twenty-one deregulated genes that, somehow, could give us a clue of where to look for susceptibility genes that can explain the tumorigenesis of this group.

Finally, both BRCA1 and BRCAX studies reveal the molecular intricacy of the familial breast tumors, leading us to perform high-level analyses, searching for gene-gene interactions that could sharp this complexity and clarify their molecular pathology.

RESUMEN

El cáncer de mama familiar representa un 5-10% de todos los casos de tumores mamarios. De esos, un 20% se atribuye a mutaciones en los genes de alta-susceptibilidad *BRCA1* y *BRCA2*. Hasta el momento, ningún otro gen de alto riesgo, específicamente involucrado en el síndrome de cáncer de mama y ovario ha sido identificado explicando los casos remanecientes (llamados BRCAX).

La caracterización del tejido tumoral de los pacientes es una importante fuente de información que puede ayudar a elucidar las vías biológicas específicamente alteradas en los tres tipos de tumores hereditarios (*BRCA1*, *BRCA2* y BRCAX). En el cáncer de mama esporádico a través de los perfiles de expresión génica, se han definido los “*molecular portraits*” clasificándolos en al menos 5 subtipos moleculares en base a su perfil de expresión génica con diferente respuesta clínica. Sin embargo se sabe mucho menos acerca de la clasificación tumoral de los tumores de mama hereditarios y solamente se han publicado dos artículos describiendo, superficialmente, el comportamiento molecular de los tumores *BRCA1*, *BRCA2* y BRCAX. Con el objetivo de comprender mejor las alteraciones moleculares presentadas por este grupo de tumores, hemos utilizado un array de ADNc que contiene genes relacionados con la tumorigenesis y hemos analizado una serie de 50 tumores: 14 *BRCA1*, 14 BRCAX y 22 esporádicos.

Dentro de los tumores *BRCA1* hemos descrito firmas moleculares que definen dos sub-clases dependiendo de la expresión del gen que codifica para el receptor de estrógenos, *ESR1*. Estas firmas moleculares parecen asociarse a distintos procesos biológicos y programas transcripcionalmente regulados. La firma molecular *ESR1*-positiva se encuentra principalmente,

conectada a proliferación celular regulada por RE, mientras que la firma molecular *ESR1*-negativa mayoritariamente se correlacionaba a la respuesta inmune, posiblemente regulada por factores de transcripción de la familia REL/NFkB.

Estas firmas moleculares fueron examinadas en series independientes de tumores familiares y esporádicos, lo que reveló un posible valor pronóstico para cada sub-clase. La sobre-expresión de genes de la respuesta inmune parece ser una característica común del cáncer de mama tanto esporádico como familiar RE-negativo y puede asociarse a un pronóstico favorable. Los tumores *ESR1*-negativos fueron sub-estratificados en dos grupos, que presentaban pequeñas diferencias en la magnitud de expresión de transcritos de la respuesta inmune y de los factores de transcripción REL/NFkB, que podría ser dependiente del tipo de mutación germinal en el gen *BRCA1*.

En cuanto a los tumores BRCAX, hemos confirmado que representan un grupo heterogéneo y se pueden dividir en al menos dos sub-grupos principales, llamados BRCAX-A y BRCAX-B, distinguibles transcripcionalmente y con distintas vías de señalización alteradas en cada uno de los grupos. Hemos visto que BRCAX-A y BRCAX-B se pueden clasificar como Luminal A y Luminal B, respectivamente, teniendo en cuenta los fenotipos moleculares definidos para los tumores esporádicos. Observamos también que a un nivel somático, los tumores BRCAX-B son idénticos a los esporádicos Luminales B, mientras que los tumores BRCAX-A muestran alteraciones genómicas adicionales que pueden estar reflejando una alteración germinal más específica. Con estos hallazgos hemos establecido "*La Vía de Susceptibilidad BRCAX*" que contiene veintiún genes desregulados que, de alguna manera, podría indicarnos donde buscar nuevos genes de susceptibilidad que pudieran explicar la tumorigenesis en e se grupo.

Finalmente, ambos estudios de *BRCA1* y BRCAX revelan la peculiaridad molecular de los tumores de mama familiares, llevándonos a realizar un análisis de alto-nivel, buscando interacciones gen-gen las cuales podrían acotar esta complejidad y clarificar su patología molecular.

Introducción

1. GENERALIDADES DEL CÁNCER DE MAMA

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres occidentales y la primera causa de muerte por cáncer en las mismas. Su incidencia ha aumentado de manera progresiva desde los años 70 y 80, debido probablemente al envejecimiento de la población en los países desarrollados y al diagnóstico precoz de la enfermedad^{86, 104}. Según el Registro de Cáncer de Mama de California, E.E.U.U., la tasa de mortalidad decrece a un ritmo de 2,5% cada año posiblemente gracias a los programas de detección precoz, mayor concienciación y una mayor eficacia terapéutica.

En España, se estima que las mujeres tienen un riesgo del 5% de padecer cáncer de mama antes de los 70 años, diagnosticándose aproximadamente 16.000 nuevos casos al año y presentando una tasa de mortalidad de alrededor del 16,7% de las muertes por cáncer en la mujer¹⁰³. La Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) cifra en 370.000 los nuevos casos de cáncer de mama en la Unión Europea. La incidencia y la tasa de mortalidad en España son de las más bajas dentro de los países desarrollados, existiendo una variación en función de la región¹⁰³.

1.2. FACTORES DE RIESGO

En el desarrollo del cáncer de mama influyen distintos factores de riesgo genéticos y ambientales. La menarquia precoz, menopausia tardía, nuliparidad, o edad avanzada en la primera gestación, son algunos de los factores de riesgo establecidos, todos ellos relacionados con una exposición prolongada de la glándula mamaria a los estrógenos circulantes. Se han investigado otras exposiciones de riesgo, como el consumo de alcohol, grasas y otras, cuya implicación no está tan clara. No obstante, el factor de riesgo más estudiado e importante es la historia familiar de cáncer de mama que es indicativa de la herencia de variantes genéticas que incrementan de manera notable la probabilidad de padecer esta enfermedad.

Las mujeres con mutaciones deletéreas en alguno de los dos genes de alta susceptibilidad, *BRCA1* o *BRCA2*, presentan un riesgo acumulado de desarrollar cáncer de mama a los 70 años, que varía entre el 40% y el 85% dependiendo de la población estudiada^{26, 43, 135}. En población española, este riesgo se ha estimado en un 52% [95% IC, 26-69%] para portadoras de mutación en *BRCA1* y 47% (95% IC, 29-60%) para *BRCA2*¹¹⁶. Mutaciones en genes como *TP53*, *ATM* o *PTEN*

también incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de mama, si bien como consecuencia de un síndrome generalizado como Li-Fraumeni, Ataxia telangiectasia o Cowden, respectivamente⁸⁰.

1.3. TUMORIGÉNESIS

EL modelo hipotético para la carcinogénesis de la mama indica que el carcinoma invasivo surge a partir de distintos estadios intermedios hiperplásicos (con o sin atipia) y neoplásico (carcinoma *in situ*) (Figura 1). A diferencia del cáncer de colon¹⁷⁶, en el cáncer de mama es difícil delinear las alteraciones genéticas que llevan de la lesión precursora al carcinoma, debido a la diversidad morfológica de las lesiones pre-invasivas. Además, la heterogeneidad del tejido con grasa, sangre, vasos linfáticos y células inflamatorias próximas a las unidades ducto-lobulares suponen una mayor posibilidad de contaminación de cara al análisis genético de estas micro-lesiones. A continuación se muestra, un esquema de la transición de hiperplasia a carcinoma invasivo⁸⁸.

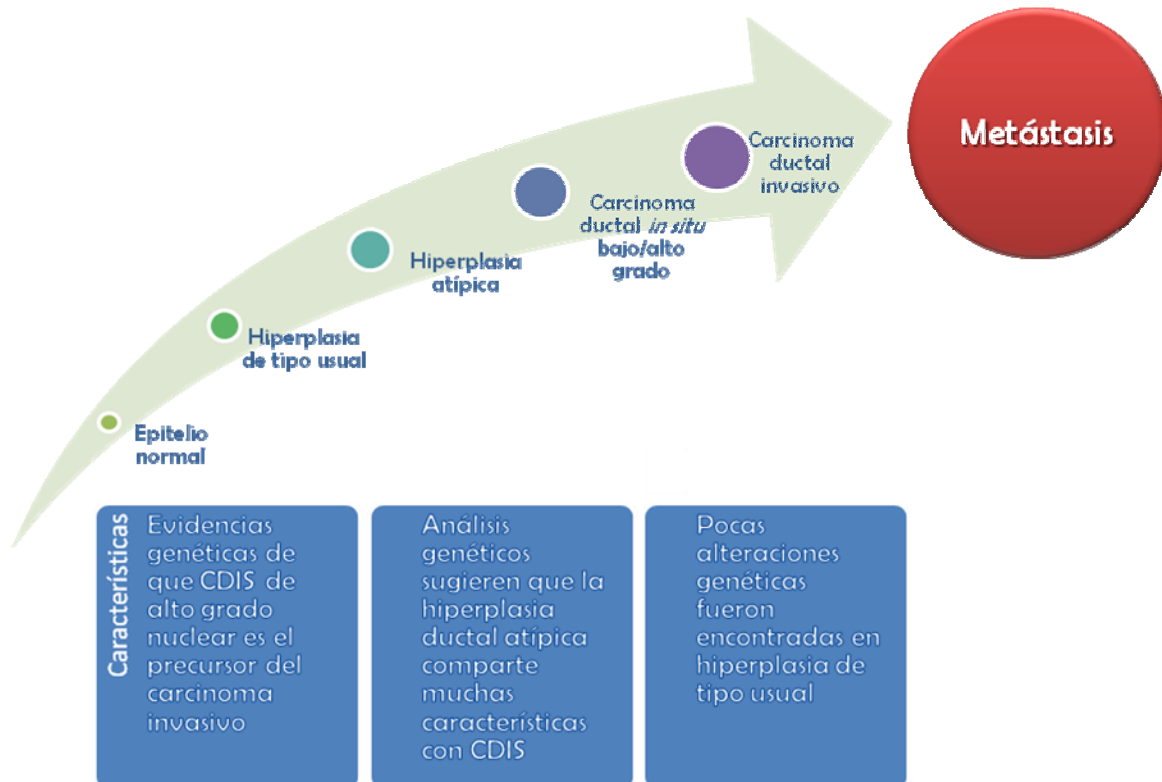


Figura 1. Modelo de carcinogénesis propuesto para el cáncer de mama.

1.4. TIPOS HISTOLÓGICOS

Se suelen diferenciar, básicamente, dos tipos de carcinomas de mama intra-epiteliales basándose en la distribución anatómica de las lesiones en la estructura ducto-lobulillar así como en su patrón de crecimiento y aspectos citológicos. Dada la diversidad histológica encontrada en los carcinomas de mama, trataremos con más profundidad el carcinoma ductal y el carcinoma lobulillar, que son los dos tipos más frecuentes y los presentes en la serie utilizada en esta tesis doctoral.

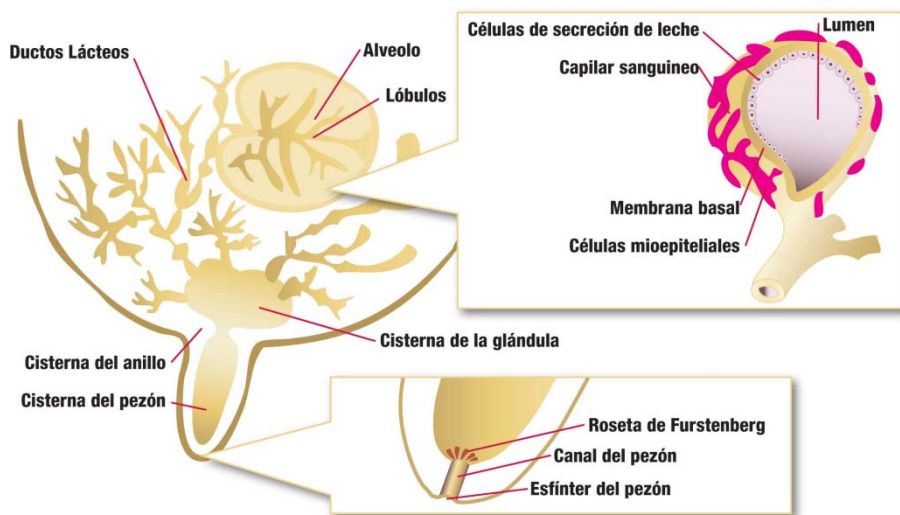


Figura 2. Imagen esquemática de la anatomía mamaria y sus estructuras

1.4.1. CARCINOMAS DUCTALES

Se originan en los ductos y representan el tipo más frecuente, pudiendo ser *in situ* (CDIS) o infiltrante (CDI) (Figura 2). El CDIS representa una proliferación de las células malignas del ducto de la mama, sin invasión del estroma circundante. El comportamiento clínico de esta neoplasia presenta una importante variabilidad y suele ser de tamaño reducido y diagnosticado a través de la mamografía. Se supone que todo carcinoma invasivo es precedido por un CDIS pero no se sabe con precisión la proporción de CDIS no tratados que evolucionan a carcinomas invasivos.

La clasificación histológica de este tipo de carcinoma se ha basado en su patrón arquitectural de crecimiento, dividiéndolos en sólido, comedo, cribiforme, papilar y variantes adherentes. Sin embargo, ya se considera que la diferenciación nuclear de las células tumorales es más importante que la arquitectura tumoral y, de ahí, las distintas clasificaciones propuestas. Como norma general, se estratifican los CDIS como bien diferenciados, medianamente diferenciados y poco diferenciados. La mayoría de las clasificaciones tiene en cuenta tanto los aspectos nucleares como arquitecturales, mientras que otras evalúan, además, la presencia de necrosis. El CDI es la forma infiltrante del carcinoma ductal, la variedad más frecuente de cáncer de mama. En él las células neoplásicas tienen su origen en el epitelio que cubre los ductos mamarios y se han desarrollado rompiendo una barrera natural que se llama capa basal e invadiendo los tejidos que rodean al ducto.

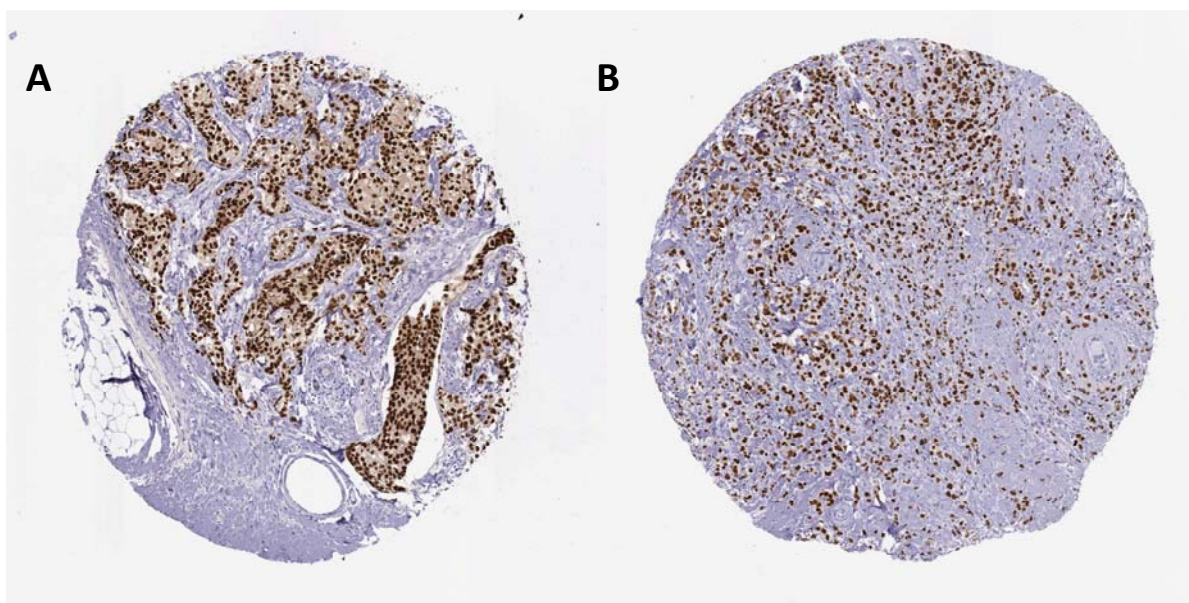


Figura 3. Inmunohistoquímica del Receptor de Estrógeno en dos tumores de mama. A) Carcinoma Ductal Infiltrante B) Carcinoma Lobulillar

1.4.2. CARCINOMAS LOBULILLARES

El carcinoma lobulillar deriva de las células del lóbulo (Figura 2) y como en el caso anterior puede ser *in situ* (CLIS) o invasivo. Dado que el Carcinoma Lobulillar *in situ* (CLIS) es una lesión microscópica y no forma un tumor palpable, la incidencia de esta neoplasia es desconocida. Su detección suele ser un hallazgo casual, ya que frecuentemente co-existe con otras lesiones como

calcificaciones, adenosis, hiperplasia y tanto ductos como lobulillos atróficos. Un estudio realizado en el año 2004 revela que en biopsias realizadas en pacientes estadounidenses con edad comprendida entre 70 y 79 años, el CLIS representó hasta un 6% de los carcinomas *in situ*⁴⁰.

En la forma típica lobulillar, una población de células neoplásicas sustituye al epitelio normal del acino y de los ductos intra-lobulillares. Las células neoplásicas son suficientemente numerosas para causar el crecimiento de estas estructuras, tanto del lobulillo completo como del tejido normal adyacente. Genéticamente, los CLIS presentan algunas características importantes: suelen ser presentar positividad para RE y RP, especialmente en lesiones de bajo grado nuclear; en cambio, raramente se encuentra expresión proteica de HER2. Finalmente, Caderina E es un marcador relevante para la diferenciación entre CDIS de CLIS, presentando una débil reactividad inmunohistoquímica en el segundo. El carcinoma lobulillar infiltrante es un carcinoma con origen en los acinos glandulares cuyas células proliferan rompiendo la membrana basal e infiltrando los tejidos adyacentes. Este tipo de cáncer representa aproximadamente el 5% de todos los cánceres malignos invasivos y tiende a ser más frecuente en mujeres entre 45 y 55 años de edad. Con frecuencia, el carcinoma lobulillar infiltrante puede encontrarse en más de una región de la misma mama (multicéntrico) o bien en ambas (bilateral)²⁹.

1.4.3. OTROS TIPOS MENOS FRECUENTES

Como se menciona en el apartado anterior, nosotros nos hemos centrado en el estudio de los carcinomas ductales y lobulillares dado lo que son los que tenemos representados en nuestra serie. Sin embargo, otros tipos de carcinomas de mama, menos frecuentes, también presentan relevancia clínica.

De manera general, podemos citar los carcinomas tubulares (un carcinoma infiltrante bien diferenciado con buen pronóstico), carcinomas mucino-productores (tumores bien delimitados), carcinoma con diferenciación neuroendocrina (carcinomas donde hay expresión de marcadores neuroendocrinos), carcinoma papilar invasivo (carcinoma con clara configuración papilar), carcinoma apocrino (un tipo de carcinoma invasivo con diferenciación apocrina prominente), carcinoma secretor (presentan secreción abundante tanto extra como intracelular de aparición temprana), carcinoma cístico adenoide (carcinoma de baja malignidad mayoritariamente nodular), carcinoma medular (morfología anaplásica y poco agresivo), carcinoma metaplásico

(uno de los grupos más heterogéneos de carcinomas, metaplásico), carcinoma inflamatorio (presencia de células tumorales en los linfáticos dermales), etc.

1.5. DIAGNÓSTICO

La mamografía sigue siendo hoy en día la prueba más utilizada para el diagnóstico del cáncer de mama y la utilizada como método de cribado poblacional. Las campañas de cribado que actualmente se realizan en la población general, permiten detectar el tumor en etapas tempranas, en las que la probabilidad de curación es muy alta y por lo tanto reducir la mortalidad por cáncer de mama. En Estados Unidos, un grupo de del *Breast Health Center*, en el estado de Nebraska, recomienda que, mujeres con edad comprendida de 20 a 39, hagan la mamografía cada 3 años y auto-exploración mamaria cada mes. A partir de los 40 años, se recomienda que realicen mamografías anuales. Sin embargo, mujeres con parientes pos menopáusicas de primer grado diagnosticados con cáncer de mama deberían iniciar la prevención 10 años antes de la población general¹⁸⁰

Por otro lado, la mamografía no es capaz de detectar todos los posibles tumores de mama. El rango de falsos negativos en las mamografías varía entre 4–34%, con lo cual un diagnóstico de cáncer de mama no está excluido por un mamograma negativo. En presencia de alguna anomalía, las pruebas diagnósticas incluyen ecografía de un hallazgo mamográfico, anomalía palpable o sitio de dolor. Algunos métodos diagnósticos como la ecografía 3D, permiten ver zonas muy heterogéneas en las cuales un estudio histológico ecoguiado, permite el diagnóstico de hiperplasia ductal atípica o carcinoma intraductal en un porcentaje importante de casos¹³⁷. También, la resonancia magnética con contraste permite caracterizar áreas muy específicas de la mama y poder acceder al diagnóstico histológico de estas lesiones. Las biopsias guiadas por imagen permiten un diagnóstico menos invasivo y un mejor coste-beneficio, además de ofrecer un diagnóstico histológico, complementando hallazgos de la imagen.

1.6. PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO

Se conoce como factor pronóstico a cualquier parámetro que permita predecir la evolución clínica de la enfermedad en ausencia de tratamiento adyuvante. Se consideran como

factores pronóstico principales establecidos los siguientes: tamaño, extensión local, grado, receptores hormonales y ganglios axilares.

Tabla 1. Influencia de varios indicadores pronósticos en el cáncer de mama.

Indicador	Buen pronóstico	Mal pronóstico
Tamaño	< 1 cm.	> 5 cm.
Extensión local	Ausente	Presente
Grado	Bajo	Alto
Receptores hormonales	RE+, RP+	RE-, RP-
Ganglios axilares	Tumor -	Tumor +

La identificación de marcadores moleculares con significado pronóstico ayuda a los pacientes a evitar tratamientos que, posiblemente, no presentarán efectividad. Estudios clínicos mostraron que combinando, por ejemplo, quimioterapia adyuvante al tamoxifeno en el tratamiento de cáncer de mama hormono-positivo y linfonodo-negativo incrementa la supervivencia. No obstante, las pacientes tratadas únicamente con tamoxifeno presentan una probabilidad de recurrencia a los 10 años de tan solo 15%. Eso sugiere que un 85% de los pacientes recibirían quimioterapia citotóxica sin que esta agregue ningún valor terapéutico^{107, 130, 143, 148}.

Concomitantemente, la tecnología de los *microarrays* de expresión permitió desarrollar herramientas precisas y fiables con la finalidad de delimitar la evolución de los pacientes con cáncer de mama. De varias herramientas que surgieron a lo largo de los últimos años, el *MammaPrint* es el más reconocido recibió dada su aprobación por la federación americana. Se basa en la expresión de 70 genes involucrados en procesos de proliferación y metástasis tumoral, estratificando los pacientes con buen o mal pronóstico. Esta micromatriz ya es una realidad en la práctica clínica en los Estados Unidos y está aprobada por la agencia americana responsable por la regulación de nuevos fármacos y métodos diagnósticos.

2. CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

2.1. ANTECEDENTES

La mayoría de los casos de cáncer de mama son esporádicos, pero entre un 5%-10% de los casos son de tipo familiar y se atribuyen a la herencia de mutaciones en varios genes de susceptibilidad^{106, 140}. Las principales características del cáncer de mama familiar son una incidencia insusualmente elevada de esta enfermedad en una familia, una edad temprana de diagnóstico, mayor frecuencia de casos bilaterales y la aparición de otros tipos de tumores asociados, principalmente cáncer de ovario y en menor medida próstata, páncreas y otros⁶⁶.

En 1970 se sugiere la presencia de un factor genético responsable de la elevada incidencia de cáncer de mama en una familia con tres hermanas que presentaban cáncer de mama bilateral. En 1984, Williams y Anderson dieron la primera evidencia de un gen dominante de susceptibilidad al cáncer de mama¹⁸¹. En 1988, su hipótesis fue apoyada¹²³ y demostrada cuando se localizó la región cromosómica⁵⁶ dónde se identificó *BRCA1* en 1994¹¹⁵.

Los dos genes de alta susceptibilidad al cáncer de mama identificados hasta la fecha son *BRCA1* y *BRCA2*¹⁸³. El descubrimiento de estos dos genes ha permitido extender el conocimiento durante estos años sobre la epidemiología genética del cáncer de mama, el riesgo aproximado a padecer la enfermedad, la distribución por etnias y las consecuencias clínicas de sus mutaciones.

2.2. GENES DE ALTA SUSCEPTIBILIDAD: *BRCA1* Y *BRCA2*

2.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES

En 1990, el primer gen de susceptibilidad al cáncer de mama, *BRCA1*, fue localizado mediante análisis de ligamiento en el cromosoma 17q21⁵⁶. En 1995 se demostró que varias familias con cáncer de mama y ovario presentaban ligamiento con el mismo locus¹²¹. *BRCA1* fue aislado en 1994 utilizando la técnica de clonaje posicional¹¹⁵. En los primeros estudios se estimó que *BRCA1* estaría implicado en aproximadamente el 45% de los casos de cáncer de mama familiar y en la mayoría de las familias que además presentaban cáncer de ovario^{37, 121}.

A pesar de este importante descubrimiento, aún existía una alta proporción de familias con cáncer de mama que no estaban ligadas a *BRCA1*, sino a un segundo locus en el cromosoma 13q12-13¹⁸⁴. Se postuló que la mayoría de las familias que restaban serían debidas a mutaciones en este gen. En diciembre de 1995 fue aislado *BRCA2*¹⁸³ que se consideró responsable del 35% de los casos de cáncer de mama familiar y que estaría implicado en los casos en los que aparecían varones afectados¹⁶⁴.

Aunque según los primeros datos estos dos genes explicarían la mayoría de los casos de cáncer de mama hereditario, hoy en día se sabe que los porcentajes fueron sobrestimados, ya que se trataba de familias muy seleccionadas y con muchos individuos afectados. Estudios más recientes revelan que el porcentaje de familias con cáncer de mama atribuidas a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* globalmente no supera el 25% y es altamente dependiente de de la población estudiada^{13, 27, 34, 55, 99} y del fenotipo de las familias seleccionadas^{116, 135}

2.2.2. ESTRUCTURA GÉNICA

El gen *BRCA1* se localiza en 17q21. Está compuesto de 24 exones (Figura 4, en azul), que transcriben un ARN mensajero (ARNm) de 7.173 pares de bases (pb) de longitud. Del total de exones, 22 codifican una proteína de 1.863 aminoácidos. La estructura de *BRCA1* es inusual ya que el tamaño medio de los exones es de 140 pares de bases, excepto el del exón 11, de aproximadamente 3.500 pb, que constituye casi el 60% de la región codificante. La proteína *BRCA1* posee varios dominios funcionales por los que interacciona con multitud de proteínas y con el ADN. Destaca un dominio “RING finger”, situado cerca del extremo N-terminal, y un dominio BRCT (*BRCA1* C-Terminal) compuesto de secuencias repetitivas claves para la interacción con proteínas implicadas en la reparación del ADN o en el metabolismo.

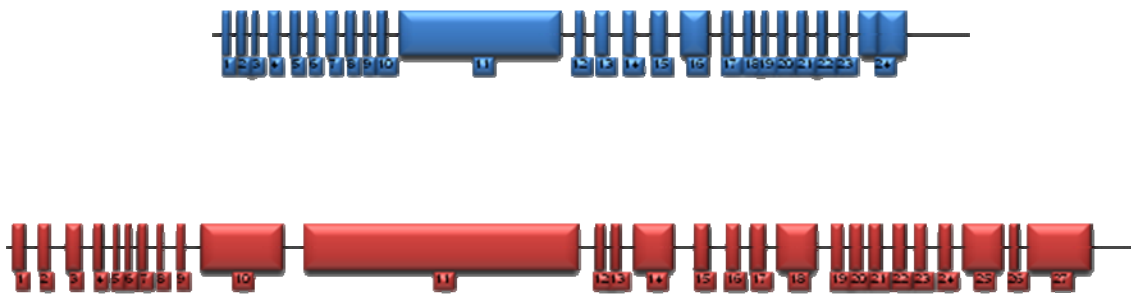


Figura 4. Estructura génica de los genes *BRCA1* (en azul) y *BRCA2* (en rojo)

El gen *BRCA2* se localiza en 13q12-q13. Tiene un total de 10.930 nucleótidos distribuidos en 27 exones (Figura 4, en rojo), de los que 26 son traducidos produciendo una proteína de 3.418 aminoácidos. Al igual que *BRCA1*, también presenta un exón 11 muy grande, con un tamaño de 5.000 pb. La proteína *BRCA2* solo contiene dos dominios funcionales conocidos de los que destacan las repeticiones BRC situadas en la región central de la proteína y que son esenciales para la función de *BRCA2* en la reparación del ADN y la interacción con *RAD51*²⁰.

2.2.3. ESPECTRO DE MUTACIONES GERMINALES: DIFERENCIAS POBLACIONALES

Desde que *BRCA1* y *BRCA2* fueron aislados, se han descrito en cada gen más de 1600 variantes distintas entre mutaciones, polimorfismos y variantes de significado desconocido, según datos del Breast Cancer Information Core, (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>). En general, las mutaciones causantes de patología son pequeñas inserciones, deleciones o mutaciones sin sentido, que provocan la aparición de un codón de parada, que al traducirse da lugar a un truncamiento de la proteína. La ausencia de función que provoca este tipo de mutación, concuerda con el papel de los genes BRCA como genes supresores de tumores.

Las mutaciones se distribuyen a lo largo de toda la secuencia codificante de los genes, por lo que en general, no se puede hablar de puntos calientes y además, aproximadamente el 50% de las mismas han sido identificadas una sola vez. Este hecho, unido al enorme tamaño que presentan *BRCA1* y *BRCA2*, hace que su estudio resulte costoso, ya que la mayoría de las veces es necesario analizar toda la secuencia codificante.

A pesar de ello, se han identificado una serie de mutaciones, que han ido apareciendo de forma recurrente. La mayoría de estas mutaciones son características de poblaciones concretas, en que aparecen con una frecuencia inusualmente elevada. Existen mutaciones que aparecen específicamente en ciertos grupos étnicos y reciben el nombre de mutaciones fundadoras. La población judía ashkenazi es un claro ejemplo, ya que existen tres mutaciones, 185delAG y 5382insC en *BRCA1*¹⁵² y 6174delT en *BRCA2*¹²⁵, que presentan una frecuencia del 2,5% en la población general y son responsables de casi la totalidad de los casos de cáncer de mama hereditario asociados a los genes BRCA. Otros ejemplos de mutaciones fundadoras se presentan en las poblaciones de Islandia¹⁷² o Polonia⁵⁵. La importancia de las mutaciones de efecto fundador radica en la posibilidad de dirigir las pruebas genéticas hacia estas mutaciones en aquellas pacientes con cáncer de mama familiar de una etnia determinada. En el polo opuesto se sitúan otras poblaciones como la española o la italiana, en las que el especto mutacional en los genes BRCA es muy amplio y solamente existen mutaciones fundadoras en áreas geográficas restringidas^{27, 34}, por lo que es necesario realizar el análisis de la secuencia completa de ambos genes en la mayoría de los casos.

2.2.4. PENETRANCIA DE LAS MUTACIONES

La penetrancia estimada para las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, puede variar entre un 45 y un 80% dependiendo de la población analizada y de cómo se haya realizado la selección de pacientes⁵. Según un estudio reciente realizado en familias españolas con cáncer de mama y ovario hereditario que acuden a las consultas de consejo genético, se estima que las mujeres portadoras de mutación en *BRCA1* tienen un riesgo acumulado de padecer cáncer mama de un 52% [95% CI, 26-69%] a la edad de 70 años y de un 22% (95% IC, 0-40%) de padecer cáncer de ovario³⁷. Por su parte, las mutaciones en *BRCA2* también tienen una penetrancia del 47% (95% IC, 29-60%) para cáncer de mama. El riesgo de cáncer de ovario es algo menor para las portadoras de mutación en *BRCA2*, pero sin embargo los varones con mutación en *BRCA2* tienen un riesgo incrementado de cáncer de mama (6%) cien veces superior al de la población general. Las mutaciones en ambos genes se asocian con un riesgo incrementado para otros tipos de tumores, como cáncer de próstata en el caso de *BRCA1* o cáncer de páncreas en el caso de *BRCA2*.

La variabilidad en los riesgos, se observa incluso a nivel intrafamiliar, sugiriendo la existencia de factores modificadores tanto genéticos como ambientales. Distintos estudios han

evaluado asociaciones entre variantes genéticas y el riesgo de desarrollar cáncer en los portadores de mutación en *BRCA1/2*. Recientemente, el consorcio internacional para el estudio de gene modificadores de *BRCA1/2* - CIMBA (Consortium of Investigators of Modifiers of *BRCA1/2*) ha confirmado algunas asociaciones entre SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) candidatos y una modificación en el riesgo a padecer cáncer de mama en portadores de mutaciones en *BRCA1/2*. Por el momento, se ha confirmado la asociación de un SNP (rs1801320) en la región 5' no traducida (UTR) del gen *RAD51* con un incremento en el riesgo en portadoras de mutación en *BRCA2*⁷, así como tres alelos identificados en un estudio de asociación de genoma completo en cáncer de mama esporádico³⁸ - *FGFR2* (rs2981582), *TNRC9* (rs3803662), y *MAP3K1* (rs889312)- que además de incrementar el riesgo a padecer cáncer de mama en la población general, también lo hacen en portadoras de mutación en *BRCA1* y/o *BRCA2*⁸.

2.2.5. BIOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS BRCA1 Y BRCA2

BRCA1 y *BRCA2* son considerados genes “gatekeepers”, cuya mutación o expresión alterada provoca que la célula pierda los controles normales de la división y muerte programada, promoviendo el crecimiento de las células cancerosas. Ambos genes se involucran en la reparación del ADN, pero se sabe que *BRCA1* participa además en los controles del ciclo celular, de la ubiquitinación de proteínas y de la remodelación de la cromatina.

2.2.5.1. REPARACIÓN DEL ADN

BRCA1 y *BRCA2* participan en el proceso de reparación de roturas de doble hebra en el ADN mediante el mecanismo de recombinación homóloga. Tras el daño en el ADN, ATM desencadena una serie de reacciones que culminan en la fosforilación de *BRCA1* mediada por *CHK2*^{30, 189}. Una vez fosforilada, *BRCA1* es capaz de interactuar con *BARD1*, *RAD51* y *BRCA2* para participar en la recombinación homóloga. En este proceso, *RAD51* juega un papel clave al asociarse con *BRCA2*, a través de las repeticiones *BRC* y de su dominio C-terminal¹⁸². Una vez asociadas, se sitúan en las regiones de daño del ADN junto con *BRCA1* formando los complejos de reparación del ADN^{25, 149}.

El único sistema de reparación libre de errores es la recombinación homóloga. Cuando esta vía no funciona correctamente, las roturas de doble cadena son reparadas por un mecanismo propenso a cometer errores, como la unión de extremos no homólogos (“non-homologous end joining”, NHEJ), y los errores pueden conducir a que se produzcan reordenamientos cromosómicos^{132, 191}. Esta inestabilidad cromosómica resultante representa uno de los rasgos claves de la carcinogénesis. *BRCA1* actúa en un doble papel como activador de la reparación por recombinación homóloga e inhibidor de la reparación por unión de extremos no homólogos¹⁸⁹. Se ha visto que las células que presentan mutaciones en *BRCA1* o en *BRCA2* son más sensibles a las radiaciones ionizantes y, por ello, más propensas a cometer errores durante la reparación. Asimismo, también son muy sensibles a agentes que producen roturas en la doble cadena de ADN, como el cisplatino y la mitomicina C^{120, 165, 188}. *BRCA1* también participa en la reparación por escisión de nucleótido (NER) a través de los mecanismos de la reparación acoplada a transcripción⁹⁴ y de la reparación genómica global⁵⁸.

2.2.5.2. CONTROL DEL CICLO CELULAR

Los puntos de control son necesarios para comprobar si existen errores durante el ciclo celular. En caso de encontrar un error, el ciclo se detiene para permitir que la célula pueda subsanarlo. Si no se puede reparar el error, entra en funcionamiento la maquinaria apoptótica que conducirá a la célula hacia la muerte celular programada. En estos puntos de control, *BRCA1* interviene a través del complejo proteico BASC (complejo de vigilancia del genoma asociado a *BRCA1*)¹⁷⁹. Otras proteínas forman parte de este complejo como NBS1 (gen del síndrome de rotura Nijmegen), RAD50-MRE11, ATM (cuyo gen está alterado en la ataxia telangiectasia), BLM (síndrome de Bloom), el factor C de replicación del ADN y los complejos MLH1-PMS1 y MSH2-MSH6.

La mayoría de las células con inactivación de los genes *BRCA1* y *BRCA2* experimentan apoptosis gracias a los puntos de control. Sin embargo, si proteínas cruciales de los puntos de control tales como p53 o p21 están alteradas, las células sobreviven sufriendo una inestabilidad genómica que les llevará a poseer importantes anomalías en el cariotipo.

2.2.5.3. UBIQUITINACIÓN

El proceso por el cual las proteínas son “marcadas” para ser degradadas se denomina ubiquitinación. Las proteínas involucradas en este proceso poseen un dominio en forma de anillo a través del cual interactúan. Un claro ejemplo son BRCA1 y BARD1 que, con el dominio en anillo cerca del extremo N-terminal, participan en la ubiquitinación¹⁸⁵. Recientemente se ha descrito que la ubiquitinación mediada por BRCA1 ocurre en respuesta al daño en el ADN¹¹⁹.

2.2.5.4. REMODELACIÓN DE LA CROMATINA

Varios complejos proteicos se implican en remodelar la cromatina en las cercanías de los sitios de rotura de la doble hebra de ADN para favorecer la reparación. En este sentido, BRCA1 forma parte del complejo BASC, que actúa en este proceso, pero también interactúa con el complejo SW1-SNF, con histonas desacetilasas o con BACH1 para la remodelación de la cromatina y una correcta reparación.

2.2.5.5. RELACIÓN CÁNCER DE MAMA - ANEMIA DE FANCONI

Juntos, la vía BRCA-FA consiste en los genes del cáncer de mama hereditario *BRCA1* y *BRCA2* (BRCA) y una red de por lo menos 12 genes de la Anemia de Fanconi (AF) – los cuales llamamos de *FANCA* hasta *FANCN*¹⁶⁹. Alteraciones en esta vía lleva a un incremento de la sensibilidad celular a agentes que causan daño al ADN, defectos en el *checkpoint* del ciclo celular y predisposición al cáncer. En cuanto portadores de mutaciones en heterocigocis en los genes BRCA están predispuestos a cáncer de mama y ovario¹⁵⁰, los portadores de mutaciones en homocigocis en los genes de la AF desarrollan otros tipos de cánceres como leucemias¹⁶⁹. Se identificó la conexión entre BRCA y AF a través del descubrimiento de que la herencia de dos copias mutantes de *BRCA2* causaba Anemia de fanconi en el grupo *FAND1*⁷². El hallazgo de que *BRCA2* era de hecho *FANCD1* aclaró la conexión previamente propuesta entre las proteínas BRCA y AF. Todavía no se asociaron mutaciones en *BRCA1* a algún otro gen de la AF, pero otro gen conocido como un interactor suyo (*BACH1*) fue clasificado como un nuevo gen AF, llamado FANCF⁹⁸. Las proteínas BRCA y AF dependen, mutuamente, para la localización nuclear. Finalmente, BRCA1 es necesario para que haya la formación del *foci* FANCD2 y su monoubiquitinación es necesaria para la translocación de BRCA2/FANCD1 a la cromatina, inducido por el daño al ADN⁵⁰.

2.2.5.6. OTRAS FUNCIONES

Se han descrito papeles de *BRCA1* en el silenciamiento del cromosoma X o como regulador de la transcripción de varios genes^{122, 190}.

2.3. SILENCIAMIENTO SOMÁTICO DE *BRCA1* Y *BRCA2*

En los tumores de mama hereditarios, mutaciones en heterocigocis en *BRCA1* o *BRCA2*, predisponen a las pacientes a padecer cáncer de mama. Sin embargo, un segundo evento en el alelo salvaje es necesario para que desencadene el proceso de tumorigenesis, pudiendo darse por mutaciones o, menos frecuentemente, por metilación del promotor de *BRCA1/2*³⁶.

Los genes que se implican en cáncer hereditario como *RB* (Retinoblastoma) o *VHL* (Von Hippel-Lindau) aparecen mutados con frecuencia en los tumores esporádicos correspondientes^{16, 52}. Del mismo modo, se pensó que *BRCA1* y *BRCA2* podrían relacionarse con el desarrollo de los tumores de mama en general. Sin embargo, varios autores buscaron mutaciones somáticas en ambos genes sin éxito alguno en cáncer de mama esporádico^{48, 93, 166}.

No obstante, sí se han descrito otros mecanismos de inactivación de *BRCA1* en tumores de mama esporádicos. Aproximadamente un 30% de los tumores de mama esporádicos, presentan expresión reducida de *BRCA1*, bien por un mecanismo de LOH, metilación aberrante del promotor de *BRCA1* o ambos. La metilación aberrante aparece en hasta un 14% de los cánceres de mama esporádicos y en el 5-31% de los cánceres de ovario^{22, 41} y puede ir acompañada de la pérdida del otro alelo de *BRCA1*^{41, 162}, lo que lleva a que un alelo se haya perdido por deleción y el restante no se exprese por la hipermetilación de su promotor. Otros mecanismos de inactivación de *BRCA1* que implican una menor expresión proteica son: la pérdida de una copia alélica entera por un mecanismo de disomía uniparental^{162, 177} o la sobre-expresión de inhibidores de la expresión de *BRCA1*¹⁷⁴, u otros mecanismos todavía por conocer¹⁰⁸.

2.4. FAMILIAS DE RIESGO

No todas las mujeres con una historia personal de cáncer de mama poseen los suficientes antecedentes familiares de la enfermedad, como para sugerir que un gen de alta penetrancia como *BRCA1* o *BRCA2* sea el responsable de esta susceptibilidad. En este sentido, se han propuesto distintos criterios de selección de casos de alto riesgo, que varían poco y que en general consideran como candidatos a estudio genético aquellos pacientes que presentan más de un 10% de probabilidades de portar una mutación en *BRCA1* o *BRCA2*. A continuación se detallan los criterios de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM):

- Un caso de cáncer de mama en una mujer de 40 años o menor.
- Diagnóstico de cáncer de mama y ovario en la misma paciente.
- Dos o más casos de cáncer de mama, uno de los cuales es bilateral o en una mujer menor de 50 años.
- Un caso de cáncer de mama en mujer de menos de 50 años o bilateral, y un caso de cáncer de ovario en familiares de primer o segundo grado.
- Tres casos de cáncer de mama y ovario (al menos 1 caso de ovario) en familiares de primer o segundo grado.
- Dos casos de cáncer de ovario en familiares de primer o segundo grado.
- Un caso de cáncer de mama en varón y al menos 1 familiar de primer o segundo grado con cáncer de mama u ovario.

2.5. CASOS HEREDITARIOS NO ATRIBUIBLES A MUTACIONES EN LOS GENES *BRCA1/BRCA2* (BRCA_X): BÚSQUEDA DE NUEVOS GENES.

Como ya se ha mencionado, las mutaciones germinales en los genes de alta susceptibilidad *BRCA1* y *BRCA2* son responsables de aproximadamente un 20% de los tumores de mama hereditarios^{28, 126, 168, 170}, pero la etiología de los casos restantes, conocidos genéricamente como BRCA_X, es desconocida. A pesar de que se han llevado a cabo varios estudios de ligamiento^{14, 53, 147, 153, 168}, no se ha identificado ningún otro gen de alto riesgo específicamente implicado en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, desde que se descubrieran *BRCA1* y *BRCA2*

hace ya 15 años. Una de las mayores limitaciones para este tipo de estudio parece ser la dependencia del fondo genético observado por ejemplo, en análisis de ligamiento realizados en población sueca (10q23.32-q25.3)¹⁴, euro-australiana (2p)¹⁵³, escandinava (13q21-q22)⁷⁶ y española (3q26, 6q25 and 21q22)¹⁴⁷, que apuntan a regiones candidatas distintas.

Desde hace unos años se viene aceptando la idea del modelo poligénico⁶, que explicaría la mayoría del exceso de riesgo familiar observado, por la combinación de variantes de riesgo bajo o moderado que se acumularían en estas familias y serían responsables de la susceptibilidad observada. Actualmente, se considera que hay tres tipos de alelos de susceptibilidad para cáncer de mama dependiendo del riesgo que confieren y de su frecuencia en la población general, que, en conjunto, serían capaces de explicar aproximadamente un 30% de los casos familiares:

- Alelos de alto riesgo (más de 10 veces de incremento) y frecuencia muy baja (MAF<0.005) como son las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*.
- Variante raras (MAF: 0.005-0.01) que confieren riesgo moderado en genes como *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* y *BRIP1*, que presentan una relación funcional con *BRCA1* y *BRCA2* y fueron secuenciados en familias con una fuerte historia familiar de cáncer de mama¹⁷³. Estas variantes suponen aproximadamente un 5% del componente genético del riesgo.
- Alelos de bajo riesgo frecuentes en la población general (MAF>0.05) que confieren un riesgo relativo inferior al 1.5. Esta tercera categoría de genes han sido identificados en los estudios de asociación de genoma completo y explicarían otro 5% del riesgo familiar⁵¹.

3. TAXONOMÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

3.1. PERFILES INMUNOHISTOQUÍMICOS

Dos importantes factores han llevado a varios grupos a intentar caracterizar desde un punto de vista morfológico e inmunohistoquímico los tumores *BRCA1*, *BRCA2* y *BRCAX* con el fin de facilitar la selección de pacientes candidatos a la prueba genética, añadiendo el análisis del tumor como un criterio adicional a los antecedentes familiares. Son estos el tamaño considerable de los genes *BRCA1/2*, que hace que el estudio de los mismos sea un proceso largo y costoso y que solamente el 25% de las familias estudiadas finalmente resultan portadoras de mutación en *BRCA1/2*, ya que la selección basada en la historia familiar es un criterio inespecífico.

En este sentido, los primeros estudios del Consorcio de Ligamiento del Cáncer de Mama (BCLC, *Breast Cancer Linkage Consortium*) sugerían que el cáncer que se presenta en portadoras de mutación en los genes *BRCA1* y *BRCA2* se diferencia morfológicamente del cáncer de mama esporádico de edad comparable^{87, 90, 92}. En este sentido, los tumores *BRCA1* parecen presentar características más específicas que los diferencian del resto, mostrando una alta incidencia de carcinoma medular y alto grado histológico⁸⁷. Sin embargo, los tumores de portadoras de mutación en *BRCA2* no muestran ninguna diferencia significativa en el tipo histológico comparando con esporádicos^{87, 90}, aunque hay estudios que los relacionan con carcinomas lobulillares^{9, 109}; tienden a ser de más alto grado que los controles esporádicos, aunque esta asociación no es tan fuerte como en los casos *BRCA1*⁸⁷. En cuanto al estudio inmunohistoquímico (IHQ), los tumores *BRCA1* se han caracterizado por una alta frecuencia de casos negativos para receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP)^{9, 46, 92, 129}, sobreexpresión de P53^{32, 92, 105, 129} y poca o inexistente expresión de ERBB2^{10, 92, 127}. Los tumores *BRCA2* presentan positividad para RE y RP^{10, 92, 129}, variable expresión de TP53 y ERBB2^{10, 92, 127} y tinción citoplásmica de RAD51⁷⁰.

Referente a los tumores BRCAX, el estudio del tejido tumoral de estos pacientes mediante perfiles inmunohistoquímicos ha sugerido la existencia de distintos sub-grupos. En 2000 Lakhani *et al.*,⁸⁹ analizó la histopatología de 82 tumores BRCAX que presentaron grado bajo, reducida infiltración linfocítica y, en general, se diferenciaban, histológicamente, de los tumores asociados a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*. Palacios *et al.*,¹²⁹ analizó 37 tumores familiares sin mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* mediante un panel de 11 anticuerpos; a diferencia de los tumores *BRCA1*, los BRCAX presentaban positividad para RE y RP y eran de bajo grado. Comparados con los tumores asociados a *BRCA2*, los tumores BRCAX también presentaban bajo grado y un bajo índice de proliferación. En 2007, Honrado *et al.*, confirmó la heterogeneidad de los BRCAX, utilizando 25 marcadores inmunohistoquímicos en 50 tumores, y sugiriendo que estos podían clasificarse a lo largo de los 5 fenotipos moleculares previamente descritos por Perou *et al.*,^{68, 133} (ver apartado 3.3 de la introducción).

3.2. PERFILES DE ABERRACIONES GENÓMICAS

El primer paso hacia la caracterización genómica de los tumores asociados a mutaciones germinales en *BRCA1* ó *BRCA2* mostró que estos presentaban mayor inestabilidad genómica que los tumores esporádicos. Se describieron una serie de regiones alteradas tanto en casos

esporádicos como hereditarios (+1q, +8q, +16p, -8p), pero también una serie de aberraciones genómicas asociadas a *BRCA1* (-5q, -4q, -4p, -2q, -12q) o a *BRCA2* (-13q, -6q, +17q22-q24 y 20q13) específicamente. De este modo, se postuló que la acumulación de cambios genómicos durante la progresión tumoral podría seguir una única ruta en aquellos individuos genéticamente predispuestos a padecer cáncer, y especialmente aquéllos con *BRCA1* mutado¹⁷¹.

En cuanto a la caracterización citogenética de los tumores BRCAx, cabe destacar el trabajo del grupo de Jeffrey Trent que describió la heterogeneidad presente en un conjunto de 16 tumores BRCAx mediante análisis de expresión génica y dotación genómica usando la misma plataforma: se describieron dos grupos que presentaban perfiles de expresión y aberraciones genómicas diferentes y, en el segundo de ellos, la amplificación en 8q24 era bastante frecuente⁶⁰.

Por otra parte, esta heterogeneidad quedó también patente en un estudio realizado por nuestro grupo¹¹³ en el que un conjunto de casos BRCAx presentaban un patrón genómico muy similar al de tumores *BRCA1*, de los que se vio que una gran mayoría tenían hipermetilación del promotor de *BRCA1*³. Sin embargo, más estudios son necesarios en este terreno para ahondar en la descripción de esta clase de tumores.

3.3. PERFILES TRANSCRIPCIONALES

Los biochips de expresión génica representan una de las herramientas recientes con las que cuentan los investigadores para hacer frente a la resolución de los problemas biológicos basados en nuevos enfoques que se orientan a la obtención masiva de información. El desarrollo de estos enfoques integrados para el análisis ha venido de la mano de la capacidad de gestionar y almacenar grandes cantidades de información, por tanto no es de extrañar que la llegada de estos dispositivos haya coincidido con la madurez de la bioinformática.

En el año 2000, un grupo de Stanford, coordinado por Botstein, publica lo que sería el primer descubrimiento clave en cáncer de mama utilizando la tecnología de microarrays de DNA mediante la clasificación de estos tumores en grupos previamente no reconocidos en base a su perfil de expresión¹³³. Con una lista de 534 genes obtenidos a través de *arrays* de ADNc, se logró definir cinco grupos - o fenotipos moleculares- con unos patrones de expresión diferentes: el subtipo de cáncer basal, el subtipo asociado a sobreexpresión de ERBB2, el subtipo de cáncer de mama similar a tejido normal y los subtipos luminales A y B^{133, 156, 157}. Es interesante destacar que

el subtipo luminal A se asoció a un mejor pronóstico, mientras que el subtipo basal y ERBB2 lo hacían a un peor pronóstico¹⁵⁶ (Figura 5). Estos análisis permitieron la asociación de los perfiles de expresión con la evolución clínica de las pacientes, asociaciones que han sido posteriormente validadas en otras series^{73, 156, 157}. Este estudio dio lugar a un nuevo panorama tanto en el laboratorio como en la práctica clínica.

Los marcadores moleculares principales de estos grupos son la la expresión de citoqueratina-5 y citoqueratina-17 en el caso del subtipo basal; expresión de ERBB2 y varios genes cercanos en el subtipo ERBB2; genes de células adiposas y otras células de origen no epitelial en el fenotipo *normal-like* y altos niveles de expresión de citoqueratina-8 y citoqueratina-18 en el subtipo luminal A.

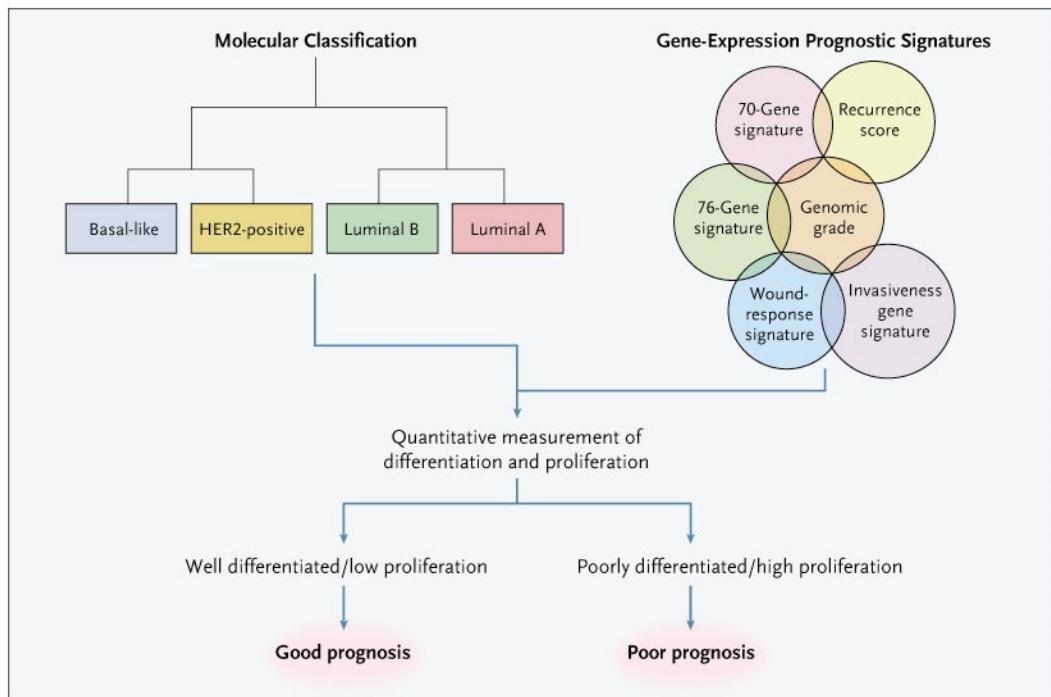


Figura 5. Clasificación molecular de los tumores de mama. Combinando las distintas firmas moleculares ya descritas, el uso de los *arrays* de expresión permitieron un gran avance en la patología molecular de los carcinomas de mama, desde la caracterización molecular hasta su aplicación en la práctica clínica y determinación del pronóstico de las pacientes. Figura extraída de Sotiriou y Pusztai *et al*, 2009¹⁶⁰.

El grado tumoral puede distinguir tumores Luminal A de Luminal B. El ultimo suele ser de alto grado genómico bastante similar a los grupos basal-like y HER2+, mientras que los tumores Luminal A presentan una similitud más hacia los tejidos normales cuando analizada la misma característica. Además, en un estudio reciente, se ha propuesto y validado el marcador de

proliferación Ki-67 en una serie de más de 3000 pacientes con cáncer de mama RE-positivo como un marcador donde los tumores con una expresión protéica de más del 13,25% son considerados Luminales B.

En la práctica, sería difícil analizar los más de 500 genes que se describieron en el trabajo original para definir los fenotipos. Por ello, Parker *et al.*,¹³¹, han propuesto recientemente una lista optimizada de los 50 genes que mejor clasifican los tumores en cuanto a su fenotipo molecular y su evolución clínica. Se utilizó para ello un predictor, desarrollado en base a datos generados por *microarrays* y qRT-PCR de 189 tumores. Además, utilizando este predictor, se ha evaluado tanto el pronóstico como respuesta al tratamiento con taxanos y regímenes de antraciclinas. Esta firma de genes es un paso importante de la caracterización tumoral hacia la aplicación clínica de la estratificación molecular de los pacientes, ya que con un número tan reducido de genes se puede utilizar técnicas cuantitativas de ARNm como la qRT-PCR.

Además de describir molecularmente, los tumores de mama, la tecnología de los *arrays* de expresión también tiene como objetivo valer en la práctica clínica de modo que se asociaría con un pronóstico concreto y un tratamiento personalizado. En este sentido, el estudio de Laura van't Veer es más acreditado en describir una firma de 70 genes capaz de clasificar los tumores en buen y mal pronóstico, en pacientes con menos de 61 años, ganglio linfático negativo, estadio I o II con un tamaño tumoral de hasta 5 cm¹⁷⁵. Aunque haya otros *microarrays* disponibles, esta firma de genes ya está comercializada en un *chip* y es de uso diario en la clínica en los Estados Unidos (*MammaPrint*®).

En cuanto a los tumores de mama hereditarios, los datos sobre su perfil de expresión son escasos. En 2001, Hedenfalk⁵⁹ publicó un trabajo describiendo diferencias a nivel del perfil de expresión entre los tumores de pacientes con mutación germinal en *BRCA1* y *BRCA2* utilizando un microarray de ADNc. En este trabajo se identificaron 176 genes diferencialmente expresados entre los dos grupos, si bien el análisis se realizó tan sólo con 7 y 8 tumores asociados a mutaciones germinales en *BRCA1* y *BRCA2* respectivamente. En el caso de tumores BRCAx, hasta el momento solamente se ha publicado un trabajo¹⁵, en el que el análisis del perfil de expresión de 16 tumores, utilizando de nuevo un microarray de ADNc, sugería que este grupo es genéticamente heterogéneo¹⁶. Dada la dificultad para conseguir series grandes de tumores hereditarios, que hayan sido genéticamente caracterizados y de los que se tenga material congelado para realizar una extracción de ARN, estos resultados no han sido validados ni se han realizado estudios más amplios.

Objetivos

A lo largo de los últimos años muchos trabajos se han centrado en la caracterización y en la biología de los tumores de mama esporádicos. Específicamente en los últimos diez años, con los avances en las herramientas de alto rendimiento, se ha profundizado en conocer la patología molecular de esos tumores además de diferenciar a los pacientes según su perfil genético. Los estudios de expresión han revelado la existencia de distintos mecanismos de patogénesis responsables de los distintos fenotipos conocidos y nos han ayudado a comprender la diferente evolución clínica que presentan estas pacientes.

No obstante, poco se ha hecho considerando los casos de cáncer de mama hereditarios. Hasta la fecha, se conocen solamente dos trabajos cuyo objetivo es perfilar las diferencias genéticas entre los tumores hereditarios. Dado el bajo número de pacientes incluidos en estos estudios, así como las limitaciones en cuanto al análisis de datos, es fundamental una nueva aproximación que permita un mejor entendimiento acerca de la biología de estos tumores. Por lo tanto, nuestros objetivos al inicio de esta tesis fueron los siguientes:

- 1. Establecer los perfiles de expresión génica de los tres grupos de tumores hereditarios BRCA1, BRCA2 y BRCAX:**
 - i. Identificar los genes diferencialmente expresados en cada uno de estos grupos
 - ii. Ubicar los genes más alterados encontrados en estos grupos tumorales en vías de señalización conocidas

- 2. Encontrar aquellos genes que diferencien mejor los tres grupos de tumores hereditarios, para utilizarlos como marcadores que nos permitan predecir si un tumor está o no asociado a los genes *BRCA1* y *BRCA2*.**

- 3. Basándonos en el perfil de expresión, subclasificar los tumores BRCAX en grupos genéticamente distintos y buscar nuevos genes de susceptibilidad.**

Material y Métodos

1. MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

1.1. TUMORES

1.1.1. TUMORES CONGELADOS

Se recogieron para el estudio un total de 89 muestras. Sin embargo, dado que trabajamos con tumores frescos, donde el ARN debería estar en condiciones óptimas para el proceso de amplificación e hibridación y necesitábamos un mínimo de datos clínicos disponibles, solamente se utilizaron en el presente estudio 57 tumores que cumplían estos criterios. Los 57 tumores procedían de 14 pacientes portadoras de mutaciones germinales en el gen *BRCA1*, 7 portadoras de mutaciones en el gen *BRCA2* y 14 de pacientes pertenecientes a familias BRCAX -con un elevado número de casos de cáncer de mama/ovario y sin mutaciones germinales en los genes *BRCA1* y *BRCA2* – y 22 tumores esporádicos que se utilizaron como controles. Los tumores BRCA2+ se utilizaron para las hibridaciones, pero no para el análisis de datos, ya que su reducido número no lo permitió. En las tablas 2, 3 y 4 se resumen las características histopatológicas básicas de los tumores, así como la historia familiar en el caso de los tumores BRCAX y el tipo de mutación germinal en los tumores asociados al gen *BRCA1*.

En todos los casos, los tumores fueron congelados inmediatamente después de la cirugía e incluidos en bloques con OCT (matriz de polivinilo), para su posterior valoración y corte. Dada la dificultad en la colección de este tipo de muestras, fue necesario establecer una colaboración para su recogida entre varios hospitales españoles (Fundación Jiménez Díaz y Hospital Clínico San Carlos en Madrid, Institut Català d'Oncologia en Barcelona y Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca) e italiano (Istituto dei Tumori, de Milán).

Tabla 2. Datos histopatológicos de los 14 tumores BRCA1 incluidos en el estudio.

Tumor	Tipo	Grado	RE	RP	HER2 [§]	Otros tumores en el probandus	Mutación germinal
X1	IDC	III	Pos*	Pos*	Neg	CB Bil + CO 53 años [¶]	3522C>T (Q1135X) ^f
X3	IDC	III	Neg*	Neg*	Neg	No	1499insA (479ter)**
X15	IDC	III	Neg*	Neg*	Neg	No	4023G>T (E1302X)**
X17	IDC	III	Neg*	Pos*	Neg	No	P727L ^{††,‡‡}
X28	IDC	III	Neg*	Neg*	Neg	Cáncer de páncreas a los 67 años	1499insA (479ter)**
X33	IDC	III	Pos*	Pos*	Neg	CM Bil	4035delTT (1328ter)**
X36	IDC	III	Neg*	Neg*	Neg	No	1100delAT (328ter)**
X58	IDC	III	Neg*	Neg*	Neg	CM Bil	1100delAT (328ter)**
X62	IDC	III	Neg*	Neg*	Neg	CM Bil	300T>G (C61G) ^{‡‡}
X04T91	NA	NA	NA	NA	NA	No	3887delAG**
X05T126	IDC	III	Neg [‡]	Neg [‡]	NA	No	A1708E ^{‡‡}
X02T144	NA	NA	NA	NA	NA	No	3598del11 (1163 ter)**
X02T329D	IDC	III	Neg [‡]	Neg [‡]	Neg	No	IVS6-1C/T
X02T329I	IDC	III	NA	NA	Pos	No	IVS6-1C/T

CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante, NA: Información no disponible

* Receptor medido a través de Retro-transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa e IHQ (los casos fueron considerados positivos para RE y RP cuando > 10% de las células presentaban tinción). [‡] Receptor medido solamente por IHQ. [§] Según las 4 categorías 0, +, ++, +++ DAKO system, propuesto para la evaluación del HercepTest; solamente los casos clasificados como +++ fueron dados como positivos. [¶] CM Bil: Cáncer de Mama Bilateral, CO: Cáncer de Ovario. ^{||} Nomenclatura de las mutaciones según el Breast Cancer Information Core: <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>.

^{‡‡} Mutaciones que no causan codones de parada prematura y no activan el mecanismo de degradación del ARNm.

Legendas: Los mismos símbolos se aplican a los tumores BRCAx y esporádicos, tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 3: Datos histopatológicos de los 14 tumores BRCAx incluidos en el estudio.

Tumor ID	Tipo	RE	RP	HER2 ⁵	Edad del diagnóstico	Antecedentes ^b
BX9	NA	Neg [*]	Pos	Neg	43	5CM
BX47	CDI	Neg [‡]	Neg	NA	49 ^a	2CM
BX67	NA	Pos [*]	Pos	Neg	66	1CO
BX74	NA	Pos [*]	Neg	NA	26	2CM1CO
BX75	NA	Pos [*]	Neg	NA	32	5CM
BX76	NA	Pos [*]	Pos	NA	32	1CM
BX77	NA	Pos [*]	Pos	NA	56	4CM
BX87	NA	Pos [*]	Pos	NA	57	5CM
BX94	NA	Pos [*]	Pos	NA	50	2CM
BX129	CDI	Pos [‡]	Neg	Pos	49	2CM
BX132	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BX134	CDI	Pos [‡]	Neg	Neg	53 ^a	1CM
BX248	CLI	Pos [‡]	Pos	Neg	46	1CM
BX264	NA	NA	NA	NA	NA	1CM

CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante, NA: Información no disponible, CLI: Carcinoma Lobulillar Infiltrante, CMA: Carcinoma Medular Atípico

^d Paciente diagnosticado con cancer de mama bilateral. La edad del diagnostico corresponde al segundo tumor.

^b Teniendo en cuenta familiares de primer y segundo grado d cancer de mama y/u ovario
CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de Ovario.

Tabla 4: Datos histopatológicos de los 22 tumores esporádicos incluidos en el estudio

Tumor ID	Tipo	Grado	RE	RP	HER2 ⁵	Edad del diagnóstico
S42	NA	NA	Pos*	Pos	Neg	44
S43	NA	NA	Neg*	Neg	Neg	74
S46	NA	NA	Pos*	Pos	Neg	76
S50	NA	NA	Pos*	Pos	Neg	66
S51	NA	NA	Pos*	Pos	Neg	85
S53	NA	NA	Pos*	Pos	Neg	45
S55	NA	NA	Pos*	Pos	Neg	43
S61	NA	NA	Pos*	Neg	Neg	57
S495	CMA	III	Neg [†]	Neg	Neg	33
S531	CLI	NA	Pos [†]	Pos	Pos	40
S537	CDI	II	Pos [†]	Neg	Neg	85
S538	CDI	III	Pos [†]	Pos	Neg	39
S551	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S555	CDI	II	Pos [†]	Pos	Pos	43
S561	CDI	I	Pos [†]	Pos	Neg	48
S568	CDI	II	Pos [†]	Neg	Pos	57
S573	CDI	III	Pos [†]	Pos	Neg	81
S594	CDI	II	Pos [†]	Pos	Neg	80
S595	CDI	I	Pos [†]	Pos	Neg	63
S604	CDI	II	Pos [†]	Neg	Pos	60
S606	CDI	II	Pos [†]	Pos	Neg	43
S613	CDI	III	Pos [†]	Pos	Pos	51

1.1.2. MICROMATRICES DE TEJIDOS (*TISSUE MICROARRAYS – TMA*)

Se utilizaron dos TMA, que contenían, por duplicado, un total de 31 tumores *BRCA1+*, 24 tumores *BRCA2+* y 46 tumores de pacientes clasificadas como BRCAX y 20 tumores *BRCA1+*, 18 tumores *BRCA2+* y 38 tumores de pacientes clasificadas como BRCAX, respectivamente. Para la construcción de los TMA, se seleccionaron áreas representativas de cada uno de los tumores mediante observación de secciones completas del tumor teñidas con hematoxilina-eosina. Las zonas seleccionadas se marcaron en los bloques individuales de parafina obteniendo dos cilindros de tejido de 1 mm. de diámetro de cada espécimen. Además, se incluyeron como controles 4 muestras no neoplásicas de tejido mamario y 4 cilindros de tejido de amígdala normal. Utilizando la tecnología disponible en la unidad de histología e inmunohistoquímica del CNIO los cilindros del tejido fueron puestos en un orden predeterminado en un nuevo bloque de parafina usando un aparato específico (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) dotado con dos agujas huecas que se desplazan en los dos ejes del plano mediante un sistema manual de rosca calibrado. Una de las agujas sirve para extraer cilindros de parafina del bloque receptor y la otra para extraer cilindros del bloque donante, que posteriormente se introducen en el bloque receptor⁸². Una sección teñida con hematoxilina-eosina, fue revisada para confirmar la presencia de áreas morfológicamente representativas de las lesiones originales.

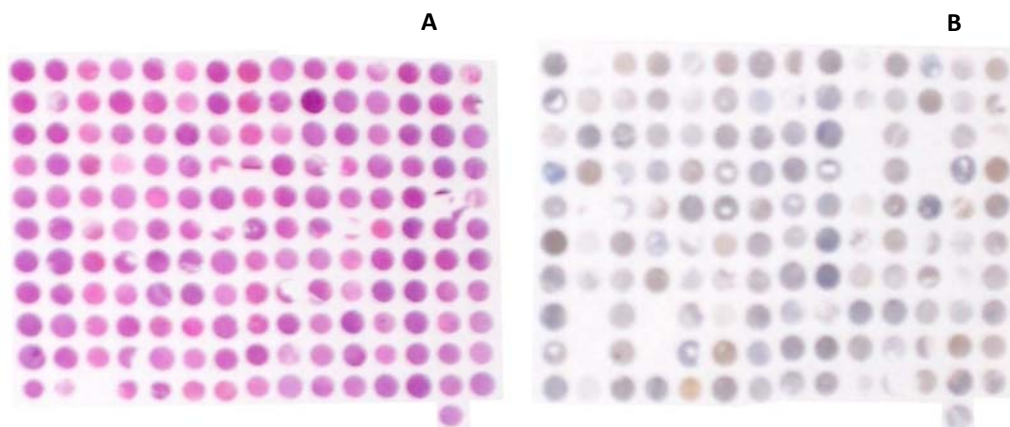


Figura 6. Matriz de tejido - A, teñida con hematoxilina y eosina. B, con inmunohistoquímica

1.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Todos los tumores hereditarios incluidos en el estudio procedían de pacientes que cumplían alguno de los siguientes criterios:

- Presencia en la familia de al menos tres casos de cáncer de mama o cáncer de ovario, al menos uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años.
- Presencia en la familia de al menos dos casos de parientes de primer grado afectadas de cáncer de mama o cáncer de ovario, al menos una de ellas diagnosticada antes de los 50 años.

En todas las pacientes, se había realizado previamente un análisis molecular de los genes *BRCA1* y *BRCA2* en DNA germinal, utilizando las técnicas de *DHPLC* (Cromatografía Líquida Desnaturalizante de Alto Rendimiento) y secuenciación directa de las variantes encontradas.

2. MÉTODOS

2.1. ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE TUMORAL Y TINCIÓN

Para tener una estimación del porcentaje de células normales y tumorales de cada pieza tumoral congelada, de la que posteriormente se extraería ADN y ARN, se realizaron cortes de 5 μ m a los que se aplicó una tinción de hematoxilina-eosina, según el siguiente protocolo:

- a. Obtener un corte de 5 μ m de cada tumor incluido previamente en OCT (compuesto utilizado para conservar y mantener los bloques de tejidos congelados).
- b. Hidratar con etanol (absoluto 2 minutos y al 95% 2 minutos).
- c. Lavar con agua 2 minutos.
- d. Tinción con hematoxilina durante 15 minutos.
- e. Lavar con agua 2 minutos.
- f. Tinción con eosina durante 2 minutos.

- g. Deshidratación:
- Etanol 95% 30 segundos.
 - Etanol absoluto 2 minutos.
 - Xilol 30 segundos (x2).
- h. Montar el cubre con Eukitt o DPX.

Se consideraron para el estudio aquellos tumores con un porcentaje de celularidad mínimo del 80%.

2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS TEJIDOS INCLUIDOS EN EL TMA

Para la evaluación de la tinción IHQ de los distintos marcadores, se valoró el porcentaje de células teñidas y posteriormente se eligió un punto de corte como umbral para considerar un caso positivo, que utilizamos después en los análisis estadísticos de Chi-cuadrado. Estos puntos de corte se eligieron en función de la mediana de los valores o de los puntos de corte previamente publicados para esos mismos marcadores. Los siguientes marcadores se trataron de forma excepcional: Ki-67, en el que en lugar de dos niveles (positivo/negativo) establecimos tres niveles de positividad: 0-5%, 6-25% y >25%; HER-2, evaluado según el sistema de cuatro categorías (0 a 3+) propuesto por DAKO para la evaluación del HercepTest. Para las proteínas MMP7 (*Metaloproteínasa 7*) y CD133 (*Prominina 1*) la tinción inmunohistoquímica fue realizada por el método de marcaje con Biotina-Estreptavidina (Dako, Glostrup, Dinamarca) con recuperación antigénica. La inmunofluorescencia fue realizada con un anticuerpo secundario marcado (Alexa 488 para MMP7 e Alexa 555 para CD133).

2.3. DESCRIPCIÓN DEL ONCOCHIP Y PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

El Oncochip 12K es una matriz o *microarray* de ADN complementario generado por la Unidad de Genómica del CNIO. Está formado por 48 sub-matrices organizadas en 12 filas y 4 columnas, y cada subunidad contiene 576 puntos de hibridación dispuestos en 24 filas y 24 columnas. En total incluye 11.675 clones humanos (Research Genetics, Huntsville, AL) que

representan 9.348 genes humanos y sub-secuencias de secuencias nucleotídicas que se transcriben pero que están aún sin caracterizar (expressed sequence tag o EST).

Los genes representados en este *microarray* de expresión fueron seleccionados por su participación probada *in vitro* o *in silico* en procesos tumorigénicos, por su relación con la respuesta a fármacos y/o por su expresión específica de tejido (<http://www.cnio.es/UserFiles/File/Biotecnologia/Genomica/>). Esta plataforma de alta densidad, además, contiene controles internos de calidad y al menos, un duplicado por clon para garantizar la reproducibilidad y especificidad del ensayo. Debido al método usado para construir estos *microarrays* no podemos conocer a priori cuántas copias de cada sonda hay en cada punto así que, para evitar problemas de saturación se usa una referencia con la cual se comparan los niveles de expresión de cada gen. Paralelamente a la extracción y tratamiento del ARNm de la muestra problema se trata el ARNm de una muestra de referencia, en nuestro caso ARNm procedente de un pool de diferentes líneas celulares (Universal reference total RNA, Stratagene), en cuya hibridación competitiva se basa el método.

Sobre el portaobjetos o "*microarray*" se hibrida una mezcla de ADNc de la muestra problema y del "*pool*" (mezcla) de referencia, ambos marcados previamente con distintos fluorocromos. Marcamos con **Cy5** "rojo" el ADNc problema y con **Cy3** "verde" la muestra de referencia, estableciéndose en cada punto una *hibridación competitiva*. De este modo, si un gen está sobre-expresado en la muestra problema aparecerá el color rojo, debido a que se uniría más ADNc problema marcado con **Cy5** en ese punto del *microarray*. Por el contrario, si el punto aparece de color verde podremos decir que dicho gen tiene niveles de expresión bajos. También pueden aparecer tonalidades amarillentas relacionadas con niveles intermedios de expresión.

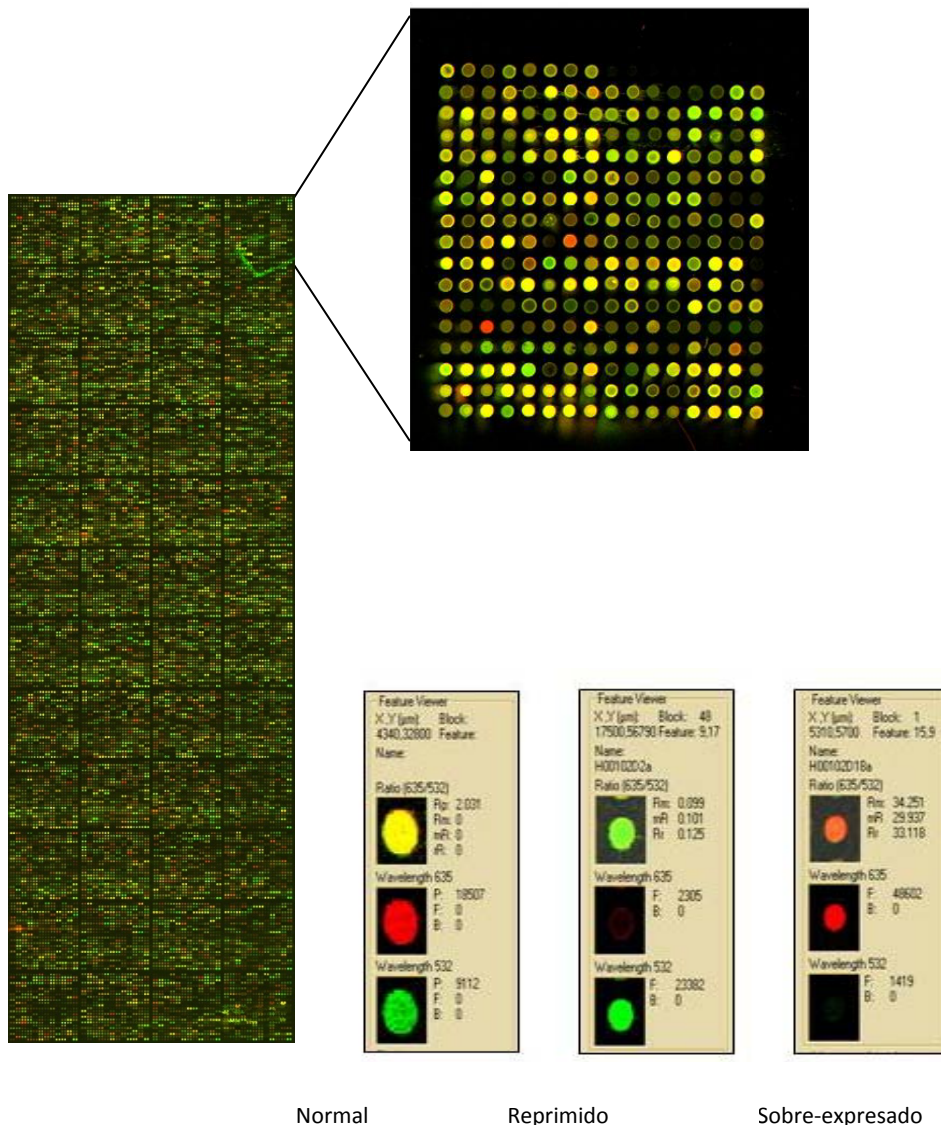


Figura 7. Aquellos genes más expresados en la muestra problema (marcada con Cy5) que en la muestra referencia aparecen de color rojo. En cambio los puntos verdes indican una expresión menor de la muestra referencia (marcada con Cy3) y los puntos amarillos representan genes que se expresan de un modo similar en ambos especímenes.

2.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA HIBRIDACIÓN EN EL ONCOCHIP

2.4.1. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

El ARN total se extrajo a partir de 10 a 20 cortes de 10 μm realizados en criostato, de los tejidos congelados, mediante el kit de extracción de ARN Trizol Reagent (Gibco) y siguiendo el protocolo estandarizado para muestras congeladas. Todo el proceso debe realizarse en frío para evitar la degradación del ARN. La calidad del ARN se testó en geles de agarosa al 1,0% y su concentración y pureza se midieron usando técnicas espectrofotométricas.

- Verificación de la calidad del ARN por electroforesis:

Cargamos en un gel de agarosa al 1,0% (1 g de agarosa de baja densidad/100 mL de TBE: Tris, Edta, ácido bórico y agua destilada) 1 μL de ARN. Podemos considerar que el ARN es de buena calidad cuando observamos dos bandas correspondientes a las subunidades ribosómicas 18s y 28s (Figura 8).

- Cuantificación espectrofotométrica del ARN:

Leemos la absorbancia a 260nm (UA260) de una solución 1/300. Debemos considerar que 1UA260 corresponde a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración de la solución problema es igual a: $\mu\text{g}/\mu\text{L} = (\text{UA260 (solución lectura)} \times 300 \times 40)/1000$. Si el ARN no presenta impurezas el ratio UA 260/280 estará entre 1,9 y 2,1.

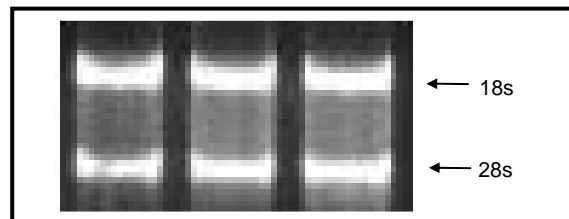


Figura 8. ARN testado en un gel de agarosa al 1%.

2.4.2. AMPLIFICACIÓN DEL ARN TOTAL

Debido a que muchas muestras presentan áreas de tumor muy pequeñas, es necesario realizar un proceso de amplificación del ARN para conseguir la cantidad suficiente para poder hibridar las muestras en el *microarray*. Este proceso conlleva la síntesis de ADNc de doble cadena, realizada mediante el kit *Superscript choice system for ADNc synthesis* (Invitrogen) y la posterior transcripción “*in vitro*” del ARN mediante la enzima la T7-RNA polimerasa, utilizando el kit *Megascript T7* (Ambion).

2.4.3. SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE ADNc

1. Añadimos 5 µg de ARN, 1 µL de oligoT7-dT (Ambion) y agua libre de ARNasa hasta un volumen final de 5 µL en un tubo eppendorf de 0,200 µL.
2. Incubamos durante 10 minutos a 70 °C.
3. Tampón de la primera cadena *First Strand Buffer 5x*, 1 µL de DTT (0,1M), 0,5 µL de dNTPs (10mM) y 0,5 µL de RNAsin (40 U/µL).
4. Incubamos durante 2 minutos a 42 °C.
5. Añadimos 0,5 µL de la enzima *SuperScript RT II* (200 U/µL) y repartimos 4,5 µL a cada tubo, que contenía: ARN, oligoT7-dT y agua libre de AARNasa.
6. Incubamos durante 1 hora a 42º de temperatura.

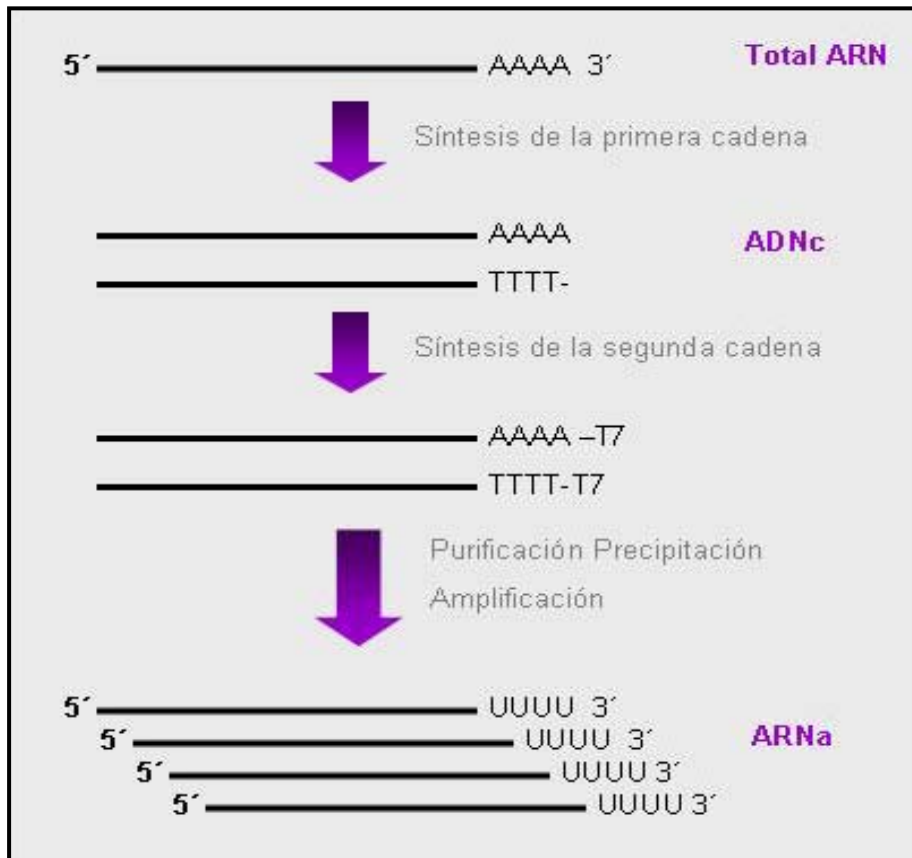


Figura 9. Proceso de amplificación del ARN (ARNA).

2.4.4. SÍNTESIS DE LA SEGUNDA CADENA DE ADN_c

1. Añadimos secuencialmente a cada tubo 45,5 µL de agua, 15 µL de Tampón de Segunda cadena *Second Strand Buffer* 5x, 1,5 µL de dNTPs (10mM), 0,5 µL de *E. Coli* ADN ligasa (10 U/µL), 2 µL de ADN polimerasa (2 U/µL) y 0,5 µL de RNAsa H.
2. Incubamos durante 2 horas a 16 °C.
3. Añadimos 1 µL de T4 ADN polimerasa.

2.4.5. PURIFICACIÓN DEL ADN_c DE DOBLE CADENA

1. Dispensamos 76 µL de agua libre de RNasa a cada tubo y 156 µL de fenolcloroformoisoamílico 25:24:1 (Sigma) y mezclamos bien con la pipeta.

2. Trasvasamos los 352 μL a un tubo de fase (*Eppendorf Phase Lock Gel*).
3. Centrifugamos a 1.200 rpm/2 minutos.
4. Recuperamos la fase acuosa, aproximadamente 152 μL .

2.4.6. PRECIPITACIÓN

1. Añadimos y mezclamos bien 0,5 volúmenes de acetato amónico (AcNH_4) (7,5M), 2,5 volúmenes de etanol absoluto a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y 1 μL de acrilamida lineal (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).
2. Dejamos los tubos a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ toda la noche o a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 hora
3. Centrifugamos a velocidad máxima en microcentrífuga, a temperatura ambiente, durante 30 minutos.
4. Retiramos el sobrenadante.
5. Añadimos etanol al 75% a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.
6. Centrifugamos a velocidad máxima durante 5 minutos.
7. Retiramos el sobrenadante asegurándonos de que no queda ningún resto de etanol.
8. Dejamos secar al aire aproximadamente 5 minutos.
9. Resuspendemos el precipitado seco en 8 μL de agua libre de ARNasa.

2.4.7. AMPLIFICACIÓN DEL ARN MEDIANTE T7 ARN POLIMERASA

1. Añadimos a los 8 μL de ADNc de doble cadena: 2 μL ATP, CTP, GTP, UTP (75mM), 2 μL tampón T7 10x y 2 μL de enzima T7.
2. Incubamos a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 horas.

2.4.8. DIGESTIÓN DEL ADN_c MOLDE

1. Añadimos 1 μ L de ADNasa libre de ARNasa a cada tubo de amplificado.
2. Incubamos a 37 °C durante 15 minutos.

2.4.9. PURIFICACIÓN DEL ARN AMPLIFICADO

Para la purificación del ARNa se utilizó el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen):

1. Llevamos la muestra a un volumen final de 100 μ L añadiendo 81 μ L de agua libre de ARNasa.
2. Añadimos 350 μ L de un tampón preparado anteriormente (10 mL de tampón RLT + 100 μ L de β -mercaptoetanol), 250 μ L de etanol a temperatura ambiente., mezclamos y depositamos en la columna.
3. Centrifugamos a 10.000 rpm durante 15 segundos.
4. Volvemos a pasar por la columna del mismo modo la muestra que la atravesó antes.
5. Vaciamos el tubo de la columna.
6. Transferimos la columna a un nuevo tubo.
7. Echamos 500 μ L de tampón RPE en la columna.
8. Centrifugamos a 10.000 rpm/15 segundos.
9. Vaciamos el tubo de la columna.
10. Echamos a la columna 500 μ L de tampón RPE.
11. Centrifugamos a 10.000 rpm durante 15 segundos.
12. Vaciamos el tubo de la columna.
13. Centrifugamos 2 minutos a velocidad máxima para secar la membrana. Asegurándose que no queden restos de etanol en la columna.
14. Transferimos la columna a un tubo eppendorf nuevo de 1,5 mL y echamos 50 μ L de agua

libre de ARNasa sobre la membrana de la columna y lo dejamos durante 2 minutos.

15. Centrifugamos durante 1 minuto a 10.000 rpm para eluir.

16. Echamos 50 μ L de agua libre de ARNasa sobre la membrana de la columna y esperamos 2 minutos.

17. Centrifugamos durante 1 minuto a 10.000 rpm para eluir.

2.4.10. PRECIPITACIÓN DEL ARN AMPLIFICADO

1. Añadimos y mezclamos bien 0,5 volúmenes de acetato amónico (NH₄Ac) (7,5M) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C.

2. Dejamos los tubos a -20 °C toda la noche o a -80 °C durante 1 hora.

3. Centrifugamos a velocidad máxima en microcentrífuga, a temperatura ambiente durante 30 minutos.

4. Retiramos el sobrenadante.

5. Añadimos etanol al 75% a -20 °C.

6. Centrifugamos a velocidad máxima durante 5 minutos.

7. Retiramos el sobrenadante.

8. Dejamos secar al aire aproximadamente 5 minutos.

9. Resuspendemos el precipitado seco en 12 μ L de agua libre de ARNasa.

2.4.11. COMPROBACIÓN DE LA CALIDAD DE ARN AMPLIFICADO POR ELECTROFORESIS

- Cargamos en un gel de agarosa al 1,2% (1 g de agarosa de baja densidad en 100 mL de TBE): 1 μ L del ARNa purificado (Figura 9). Ponemos un marcador de pesos moleculares para ver si es un ARNa de calidad: los pesos moleculares (PM) de los ARNm van de 0,5 a 7 Kb, la fracción mayoritaria se encuentra entre 0,5 y 1,5 Kb. En los ARNa purificados deberíamos de haber eliminado los mensajeros de un tamaño menor.

- La concentración y la pureza se determinan mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro. Leemos UA260 de una solución 1/300 considerando que $1\text{UA}260 = 40\ \mu\text{g}/\text{mL}$. Así: $\mu\text{g}/\mu\text{L} = (\text{UA}260\ (\text{solución lectura}) \times 300 \times 40)/1000$. Así: $\mu\text{g}/\mu\text{L} = (\text{UA}260\ (\text{solución lectura}) \times 300 \times 40)/1000$. Si el ARNa no presenta impurezas el cociente UA 260/280 estará entre 1,9 y 2,1.

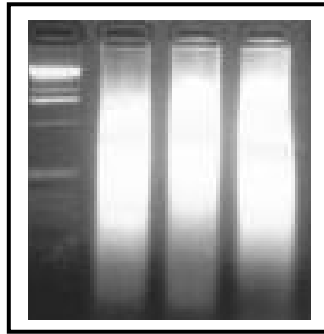


Figura 10. ARN amplificados testados en un gel de agarosa al 1% junto con el marcador de 1 Kb.

2.5. SÍNTESIS Y MARCAJE DEL ADN_c

A partir del ARNa se sintetiza de nuevo ADN_c mediante la enzima *Superscript Reverse Transcriptase* (Invitrogen) e incorporando en las reacciones los fluorocromos (Amersham) **Cy3** (color verde) para la muestra de referencia y **Cy5** (color rojo) para las muestras problema. Cada muestra sometida a hibridación se enfrentará a una muestra de referencia. En nuestro caso utilizaremos RNA procedente de un pool de diferentes líneas celulares (Universal reference total ARN, Stratagene), que nos asegura que todos los casos estén enfrentados exactamente a la misma referencia, permitiéndonos posteriormente la comparación entre todas las muestras. La preparación del ADN_c fluorescente para *microarrays*, a partir de ARN amplificado, sigue este protocolo:

2.5.1. REACCIÓN DE RETRO-TRANSCRIPCIÓN

Para iniciar cada hibridación prevista mezclamos en 2 tubos distintos (a y b).

a) Muestra de referencia (Cy3):

2,5 µg de ARN amplificado.

b) Muestra de problema (Cy5):

2,5 µg de ARN amplificado.

A continuación seguimos los siguientes pasos, protegiendo durante todo el proceso las muestras de la luz:

1. Desnaturalizamos en un bloque térmico a 70 °C durante 5-10 minutos.
2. Pasamos rápidamente los tubos a 4 °C, dejarlos 5 min en hielo.
3. Preparamos 2 mezclas de reacción de retro-transcripción, una para Cy5 y otra para Cy3:

First Strand Buffer (5x)	5 µL
DTT (0,1M)	2,5 µL
dNTPs (50x)	0,5 µL
Cy3-dUTP o Cy5-dUTP (10mM)	1,5 µL
RNAsin (40 U/µL)	0,75 µL
Enzima SuperScript II (200 U/µL)	1,25 µL

4. Mezclamos en agitador.
5. Añadimos 11,5 µL de cada mezcla Cy3 o Cy5 a sus respectivas muestras de ARN en función del marcaje previsto. El volumen final en cada tubo debe ser de 13,5 µL.
6. Mezclamos despacio (sin agitador) los tubos.

7. Centrifugamos 1 segundo.
8. Incubamos a temperatura ambiente durante 10 minutos.
9. Incubamos a 37 °C durante 2 horas.

2.5.2. DEGRADACIÓN DEL ARN MOLDE

1. Añadimos 12,3 µL de NaOH (0,1N) a cada tubo.
2. Incubamos a 70 °C durante 10 minutos.
3. Neutralizamos el pH añadiendo 12,5 µL de HCl (0,1N).

2.5.3. PURIFICACIÓN DE LA MUESTRA MARCADA

Se lleva a cabo utilizando las columnas GFX (Amersham) y el protocolo del proveedor.

1. Para cada ADNc a purificar se introduce una columna dentro de un tubo recolector limpio.
2. Añadimos 500 µL de tampón de captura a cada columna.
3. Transferimos cada ADNc a una columna, evitando que permanezcan en contacto con el tampón de captura más de 10 minutos ya que, se reduciría la cantidad de ADNc recuperado.
4. Mezclamos suavemente el ADNc mediante pipeteos.
5. Centrifugamos inmediatamente cada columna a velocidad máxima durante 30 segundos.
6. Eliminamos el líquido filtrado sin tirar el tubo de recolección.
7. Añadimos 600 µL de tampón de lavado a cada columna.
8. Centrifugamos a velocidad máxima durante 30 segundos.
9. Eliminamos el líquido filtrado sin tirar el tubo de recolección.
10. Añadimos 600 µL de tampón de lavado a cada columna.
11. Repetimos dos veces los pasos del 7 al 9, para eliminar todo el fluoróforo no incorporado.

12. Centrifugamos cada columna a velocidad máxima durante 10 segundos más para eliminar completamente los líquidos remanentes.

13. Transferimos las columnas GFX a un tubo eppendorf de 1,5 mL y eluimos cubriendo totalmente la matriz de fibra de vidrio de cada columna con 60 μ L de tampón de elución. La recuperación del ADNc puede incrementarse si se calienta el tampón de elución a 65 °C.

14. Dejamos la columna GFX a temperatura ambiente durante 5 minutos.

15. Centrifugamos a velocidad máxima durante 1 minuto para recoger el ADNc marcado y purificado.

16. Añadimos 60 μ L de tampón de elución directamente encima de la matriz de fibra de vidrio de cada columna.

17. Dejamos la columna GFX a temperatura ambiente durante 5 minutos.

18. Centrifugamos a velocidad máxima durante 1 minuto para recoger el ADNc marcado y purificado. El tampón debe cubrir totalmente la membrana.

2.5.4. PRECIPITACIÓN DE LA MUESTRA MARCADA Y PURIFICADA

1. Combinamos los productos purificados (marcados con Cy3 y Cy5) que van a hibridarse juntos.

2. El volumen final es 240 μ L: 120 μ L de muestra referencia marcada con Cy3 y 120 μ L de muestra problema marcada con Cy5.

3. Añadimos 20 μ L de Human COT-1ADN (Invitrogen) 1 μ g/ μ L.

4. Añadimos 1/10 volúmenes de acetato sódico (NaOAc) (3M) y 2,5 volúmenes de etanol al 95-100% de pureza.

5. Incubamos a -20 °C durante un mínimo de 1 hora o a -80 °C durante 1 hora.

6. Centrifugamos a velocidad máxima durante 15 minutos a 4 °C.

7. Eliminamos completamente el sobrenadante (centrifugar otra vez brevemente si fuese necesario).

8. Dejamos secar unos 5 minutos.
9. Resuspendemos el precipitado en 42 μL de tampón (Ambion SlideHyb Hybridization Buffer).
10. Añadimos 2 μL de agentes bloqueantes (10 μg de ADNpolydA y 4 μg de ARNt de levadura).
11. Desnaturalizamos el ADNc marcado calentándolo a 95 °C durante 3 minutos.
12. Centrifugamos unos segundos.
13. Aplicamos la mezcla de hibridación sobre la cara impresa del *microarray* pre-hibridado (ver protocolo de hibridación de *microarrays*).

2.6. HIBRIDACIÓN EN EL ONCOCHIP

2.6.1. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

SSC 20x. Disolver 175 gramos de NaCl (PM: 58,44) y 88 gramos de citrato sódico (PM: 294,10) en 500 de agua. Ajustar el pH a 7,0 con HCl (1N) y completar con agua hasta 1 L de volumen final.

SDS 10%. Disolver en agua 10 gramos de SDS (sulfato lauril sódico) (PM: 288,38) en un volumen final de 100 mL.

SDS 0,1%. 40 μL de 10% SDS en 400 mL de agua.

Solución de pre-hibridación. Mezclar en este orden: 100 mL de agua, 40 mL de SSC 20x (4x concentración final), 2 mL de SDS 10% (0,1 concentración final) y 400 μL de BSA 10% (w/v) (0,002% final).

Tampones de lavado: Preparar 2 L de cada tampón por grupo de 8 cristales hibridados y se dejan los dos tampones pre-calentando a la temperatura de la hibridación (42 °C):

Tampón 1: 200 mL de SSC 20x y 100 mL de SDS 10% c.s.p. 2 L.

Tampón 2: 50 mL de SSC 20x y 100 mL de SDS 10% c.s.p. 2 L.

2.6.2. LAVADO DE LOS CRISTALES

Este lavado tiene el objetivo de evitar posibles artefactos tras la hibridación.

1. Sacamos los cristales de la cámara de vacío lo incubamos con agitación suave en un agitador orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente de la solución de SDS 0,1%.
2. Enjuagamos los cristales con agua a temperatura ambiente.

2.6.3. DESNATURALIZACIÓN DE LAS SONDAS

1. Dejamos los cristales en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos.
2. Enjuagamos los cristales con agua a temperatura ambiente.
3. Introducimos cada cristal en un tubo Falcon de 50 mL con la etiqueta del código de barras de cada *microarray* hacia abajo.
4. Centrifugamos 800g durante 5 minutos los tubos Falcon para secar los cristales.
5. Sacamos los cristales de los tubos Falcon.

2.6.4. PRE-HIBRIDACIÓN

1. Incubamos los cristales en la solución de pre-hibridación a 65 °C durante 45-60 minutos.
2. Enjuagamos los cristales con agua a temperatura ambiente.
3. Dejamos los cristales en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos.
4. Enjuagamos los cristales con agua a temperatura ambiente.
5. Introducimos cada cristal en un tubo Falcon de 50 mL con la etiqueta del código de barras de cada *microarray* hacia abajo.

6. Centrifugamos 800g durante 5 minutos los tubos Falcon para secar los cristales.
7. Sacamos los cristales de los tubos Falcon.

2.6.5. HIBRIDACIÓN

1. Llenamos los pocillos de la cámara de hibridación con agua.
2. Depositamos la mezcla de hibridación con la muestra marcada sobre la cara impresa del *microarray*. Para conseguir la distribución homogénea de la muestra marcada sobre la cámara impresa se recomienda depositar la mezcla de hibridación en varias zonas del área impresa del cristal.
3. Emplazamos rápidamente el cubre-objetos de forma que solape con la superficie impresa para evitar la evaporación y precipitación de la solución de hibridación y a la vez cuidadosamente para evitar que ésta se desborde y que aparezcan burbujas.
4. Colocamos el cristal en la cámara de hibridación.
5. Sellamos la cámara de hibridación de forma estanco.
6. Incubamos a 42 °C de 15 a 20 horas.

2.6.6. LAVADOS

Durante los lavados es de máxima importancia prevenir el secado de los cristales para evitar un fuerte ruido de fondo. Asimismo, conviene que los lavados se hagan protegiendo los cristales de la luz, por lo que se recomienda cubrir los recipientes con papel de aluminio.

1. Abrimos la cámara de hibridación evitando movimientos bruscos que desplacen el cubre encima del cristal.
2. Para despegar el cubre sumergimos cada *microarray* en 50 mL del tampón 1 de lavado, pre-calentado a 42 °C.
3. Hacemos un primer lavado con 600 µL de tampón 1 durante 15 minutos. Dejamos 10 minutos en la estufa a 42 °C y 5 minutos en el agitador orbital a temperatura ambiente.

4. Repetimos 2 veces más el mismo lavado con tampón 1.
5. Hacemos un primer lavado con 600 μ L de tampón 2 durante 15 minutos. Dejamos 10 minutos en la estufa a 42 °C y 5 minutos en el agitador orbital a temperatura ambiente.
6. Repetimos 2 veces más el mismo lavado con tampón 1.
7. Introducimos cada cristal en un tubo Falcon de 50 mL con la etiqueta del código de barras de cada *microarray* hacia abajo.
8. Centrifugamos 5 minutos a 800g los tubos Falcon para secar los cristales.
9. Sacamos los cristales de los tubos Falcon.
10. Protegemos los cristales de la luz guardándolos en un envase adecuado.

Escaneamos los cristales lo antes posible.

2.6.7. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES

La detección de fluorescencia se llevó a cabo utilizando el escáner de fluorescencia Scan Array 5.000 (Agilent) que resuelve la fluorescencia en función de coordenadas espaciales. Una vez escaneado cada *microarray* se procesó y analizó.

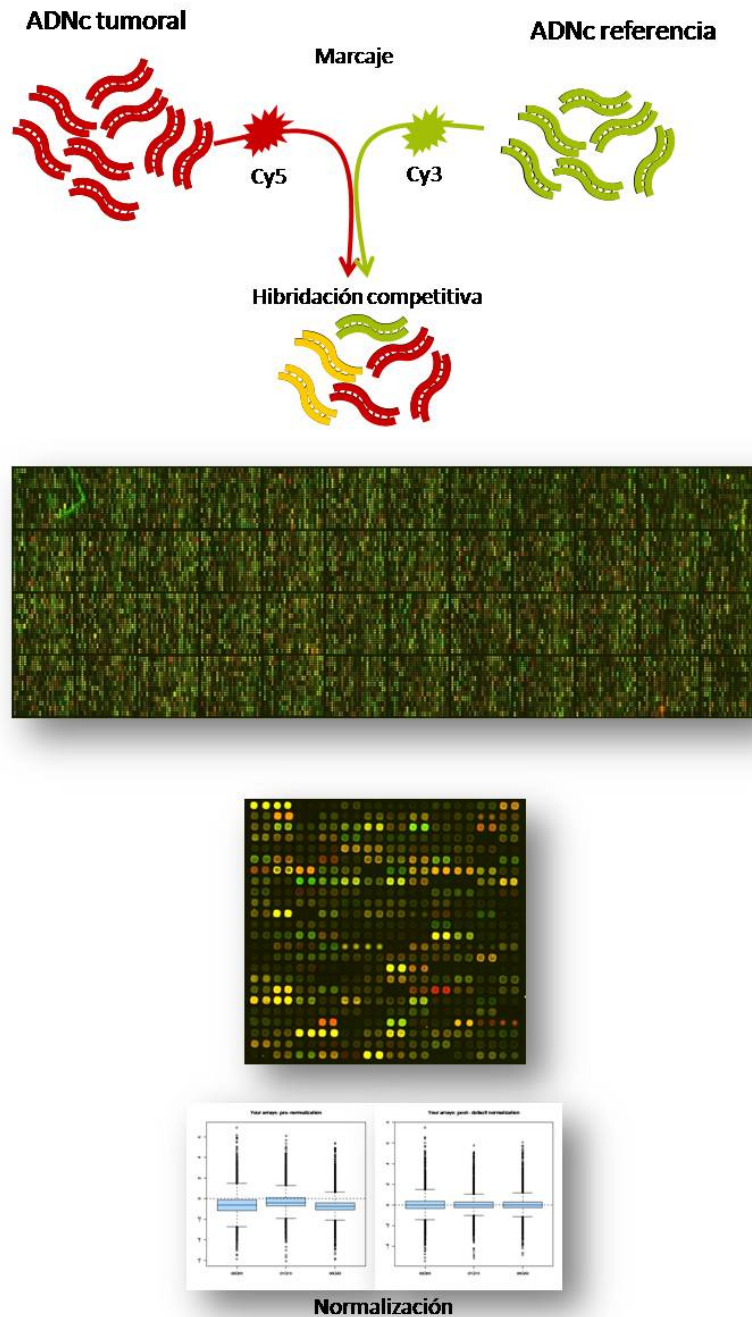


Figura 11. Esquema general del proceso de extracción del ARN, marcaje, hibridación en el *microarray* de ADNc y posterior escaneo de los portas. En cada punto del *array* se va a producir una *hibridación competitiva* entre la muestra referencia marcada con Cy3 y la muestra problema (tumor, muestras normales, líneas celulares) marcada con Cy5. Los puntos rojos representan genes sobre-expresados en la muestra problema, los puntos verdes a genes reprimidos y los amarillos a genes con niveles de expresión similares en la muestra referencia y problema.

3. ANÁLISIS DE DATOS

3.1. NORMALIZACIÓN

Antes de poder usar los datos experimentales es necesario normalizar los datos para intentar ajustar los efectos que son debidos a las variaciones en la tecnología y no en la biología. En particular, normalizando los datos pretendemos ajustar las diferencias existentes entre los dos fluorocromos, en el marcaje, intensidad, etc. En el presente estudio, los datos se normalizaron siguiendo el método LOWESS¹ incluido en el programa de análisis de datos de expresión *GEPAS* (*Gene Expression Pattern Analysis Suite*, <http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>). Además, se sustrajo la mitad de la media de la señal de fondo existente para cada uno de los puntos de hibridación del *array*, lo que evita sobrestimar las señales. Los puntos presentes en áreas defectuosas de la matriz, así como aquellos que presentaban morfología de halo o con intensidades (suma de las medias de los dos canales) menores a la suma de la medias del fondo, se consideraron valores perdidos. Las réplicas inconsistentes (aquéllas que distan de la mediana de las réplicas más del umbral establecido) se descartaron y se hizo media de los duplicados consistentes. Se eliminaron aquellos clones cuyos datos de expresión estuvieran perdidos en uno o más *arrays* dentro de la serie de casos analizada. Cada uno de los *microarrays* fue normalizado utilizando el programa *DNMAD* (<http://dnmad.bioinfo.cnio.es/>): Diagnosis and Normalization for Microarray Data^{154, 155} que nos permite usar el fondo de cada uno de los sub-*arrays* que componen el *microarray*, para normalizar según la media de los cocientes (Cy5/Cy3) en cada uno de ellos.

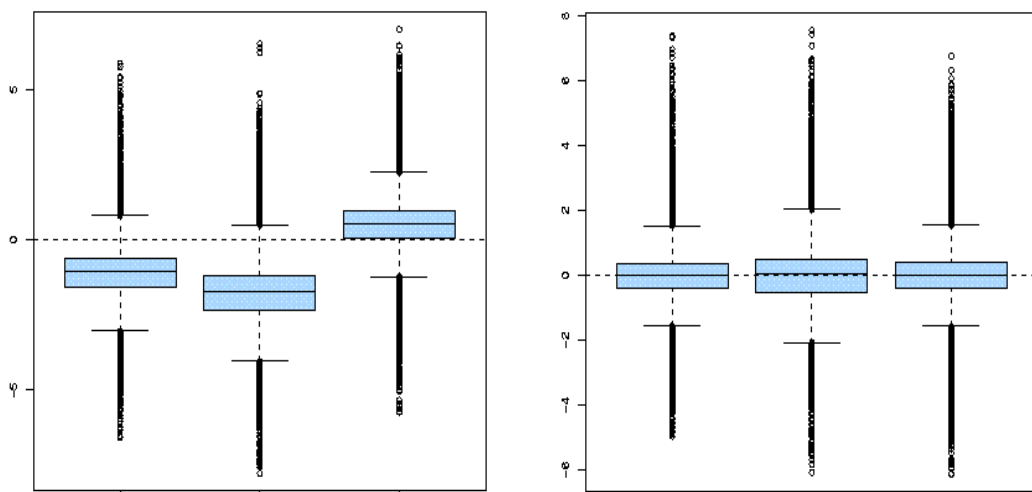


Figura 12. Las cajas para cada caso hibridado en un *array* distinto, muestran el cociente Cy5/Cy3 antes y después de la normalización de los datos.

3.2. PRE-PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

El adecuado pre-procesamiento de los patrones de expresión es un paso indispensable para conseguir posteriormente unos buenos resultados con el agrupamiento. Para ello se utilizó la herramienta *Preprocessor* (<http://gepas.bioinfo.cnio.es/cgi-bin/preprocess>)⁶³⁻⁶⁵ que incluye entre otras las siguientes funciones:

Transformación logarítmica de la escala. Sirve para conseguir que tanto las represiones como las activaciones tengan el mismo peso.

Tratamiento de las réplicas. La existencia de réplicas requiere la eliminación de aquellas inconsistentes y la fusión de las demás. Para la determinación de las réplicas inconsistentes se aplica el umbral de distancia máxima entre la réplica y la mediana de todas las réplicas de ese punto. Todas aquellas réplicas que se hallen a una distancia mayor que el umbral elegido son eliminadas y el resto son promediadas usando el valor medio.

Eliminación de los patrones planos. Se eliminan los patrones que no tengan un número determinado de picos, definiendo como picos aquellos valores que sean mayores en valor absoluto que un determinado umbral.

3.3. ANÁLISIS NO-SUPERVISADOS

La información se analiza mediante un algoritmo de agrupación ("*clustering*") jerárquica, que genera dendrogramas, agrupando los elementos según su similitud. En el dendrograma, la longitud de las ramas es una representación de la distancia entre los distintos partes del mismo. En la figura 13 podemos ver un dendrograma en el cual los genes se sitúan en vertical y las muestras en la parte superior en horizontal. Los genes sobre-expresados aparecen en color rojo y los reprimidos en color verde. Este análisis nos permite definir el patrón de agrupamiento de los tumores, según el perfil de expresión de los genes.

Independientemente del algoritmo elegido para el agrupamiento hay criterios utilizados que son necesarios para poder agrupar los patrones de expresión juntando los que son más parecidos y separándolos de los más distintos. Existen fundamentalmente dos criterios:

- El primero es agrupar los patrones de expresión según sus niveles de activación o represión.

- El segundo criterio agrupa los patrones de expresión que muestran las mismas tendencias, según cómo responden, si activan y/o reprimen a la vez, y no tanto en qué medida lo hacen.

Si queremos usar el primero, utilizamos distancias euclídeas mientras que, si nos interesa el segundo criterio usamos las medidas de correlación.

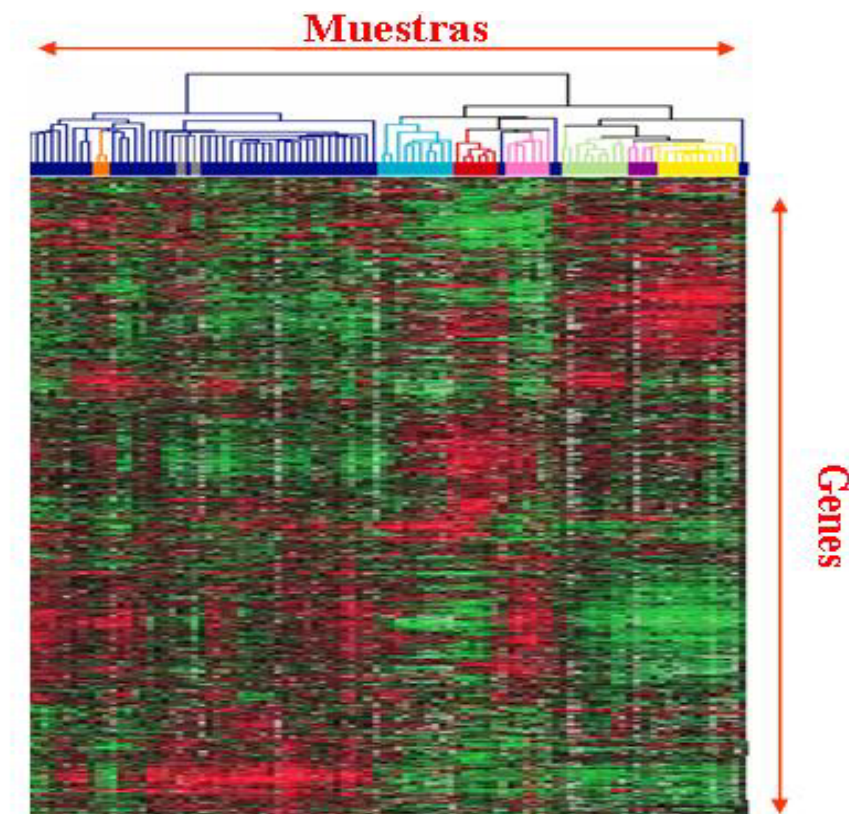


Figura 13. Dendrograma correspondiente a la agrupación jerárquica de los patrones de expresión de los genes situados en vertical en las muestras dispuestas en la parte superior.

3.4. ANÁLISIS SUPERVISADO

Para la búsqueda de genes diferencialmente expresados entre dos tipos de muestras, por ejemplo entre controles y tumores o entre sub-grupos de una determinada clase tumoral, aplicamos análisis supervisados y t-tests incluidos en el programa *POMELOII* (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>) y *Gene Cluster*, desarrollado en el Centro para la Investigación Genómica de Cambridge (www.broad.mit.edu/cancer/software/software.html) y disponibles de

forma gratuita en la red. La visualización de los datos ha sido realizada a través del Gene Pattern (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/index.html>) y Tree View (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>).

3.5. MÉTODOS DE MODELADO DE REDES GÉNICAS, TRANSCRIPCIONALES Y PROTEICAS

Una vez obtenidas las listas de genes o firmas moleculares originadas, en este caso, del estudio de los tumores BRCA1, utilizamos distintas herramientas cuya función reside en analizar las interacciones entre/intra los diferentes genes en estudio. Uno de ellos, el *Ingenuity Pathways Analysis (IPA - Ingenuity Systems, Mountain View, California)* que es una aplicación en red que permite analizar la biología de distintos organismos a distintos niveles, integrando datos a partir de una variada plataforma experimental, permitiendo profundizar en las interacciones moleculares y químicas, fenotipos celulares y enfermedades. IPA fue utilizado para evaluar el enriquecimiento de grupos de genes, funciones biológicas sobre-representadas y vías de señalización. Este programa informático también fue utilizado para identificar interacciones físicas directas entre proteínas y funcionales entre genes.

Para los tumores BRCA1, el análisis de los sitios de unión a factores de transcripción fue realizado utilizando oPOSSUM⁶⁷ con los promotores definidos como -2 kilobases al principio del sitio de transcripción y utilizando anotaciones JASPAR con un umbral del 80%. El test exacto de Fisher fue usado para evaluar los resultados de enriquecimiento y la corrección por *Bonferroni* teniendo en cuenta el número de motivos analizados.

Asignamos reguladores del tipo *Cis* al Receptor de Estrógenos o al locus génico más próximo (extremo 5') de la versión de mayo del 2004 del genoma humano (UCSC Genome Browser). Las redes de interacciones (interactoma) se construyeron combinando tres bases de datos previamente publicadas consistiendo principalmente de interacciones experimentalmente corroboradas. La base de datos referente en el Human Protein Reference Database⁴⁹ contiene interacciones binarias de proteínas de las bases de datos actualmente disponibles. Interacciones entre dos híbridos con alta fiabilidad de Pujana *et al.*, (2007) y Stelzl *et al.*, (2005) fue incorporado y homodímeros y predicciones basadas en ortologías fueron excluidos para evitar sesgo. Proteínas sin ID Entrez Gene asignado tampoco fueron consideradas para el análisis. Distancias más cortas fueron calculadas utilizando el lenguaje de programación "R". Diferencias entre las distribuciones de los caminos más cortos fueron comprobadas con Mann–Whitney *U*-test y representaciones de

los términos GO evaluadas con Onto-Express⁸¹ teniendo en cuenta como referencia el grupo de proteína del componente global de redes.

1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GLOBAL

Nuestro primer análisis consistió en generar un dendograma partiendo de la serie completa de tumores, BRCA1, BRCA2, BRCAX y esporádicos, con el objetivo de evaluar su comportamiento. Para ello realizamos un agrupamiento jerárquico no-supervisado de las muestras (Figura 14) utilizando el programa Gene Cluster, en base a los valores de expresión de los 5,498 genes que permanecieron tras el proceso de filtrado. Observamos que los tumores se organizaban de manera bastante heterogénea y no siempre dependiente de la mutación germinal.

La mayoría de los tumores asociados a mutaciones en *BRCA1* formaban un grupo homogéneo, básicamente compuesto por los tumores que presentaban negatividad para el gen codificante para el receptor de estrógenos, *ESR1*. Otros tumores BRCA1+, sin embargo, se mezclaban con el resto de las muestras. Los tumores BRCA2+, presentaron una importante heterogeneidad, posiblemente por el reducido número muestral (7 casos), por lo que no los consideramos en los análisis subsecuentes. Los tumores BRCAX, como era esperado, presentaban una gran complejidad. Un pequeño grupo bastante robusto que comprendía los tumores *ESR1*-negativos, se agrupaba junto a la mayoría de los tumores BRCA1, también *ESR1*-negativos. Esto nos llevó a pensar que, más que el origen genético, era el receptor de estrógenos el que coordinaba en parte la organización del dendograma, si bien no totalmente.

En cuanto a los tumores de mama esporádicos, que en su mayoría presentaban positividad para *ESR1*, también mostraban cierta heterogeneidad. Más adelante, vimos que obedecían a la distribución según los fenotipos moleculares establecidos por Perou y colaboradores en cáncer de mama esporádico¹³³.

Dado que el agrupamiento no-supervisado general no nos ofrecía mucha información por su complejidad, decidimos analizar por separado los tumores BRCA1 y BRCAX y utilizar los tumores esporádicos como grupo control.

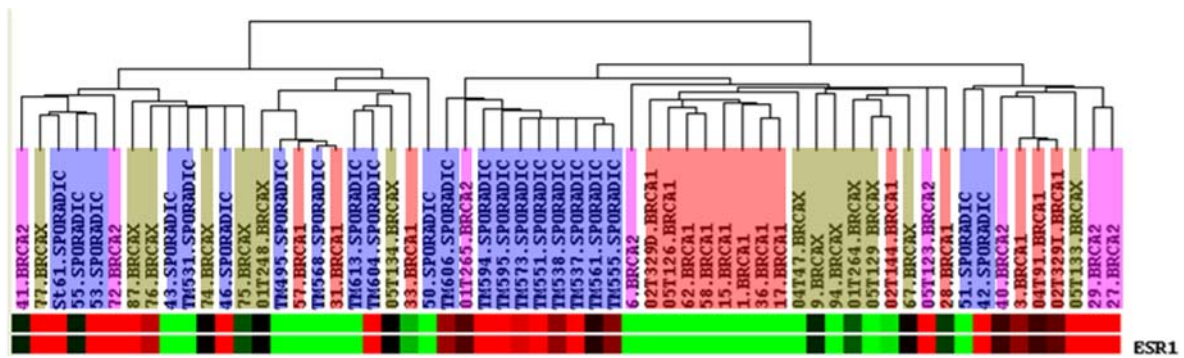


Figura 14. Agrupamiento jerárquico no-supervisado de los tumores BRCA1, BRCA2, BRCAx y esporádicos en base al perfil transcripcional de 5,498 genes. Se observa la heterogeneidad intrínseca de estos tumores y la organización dependiente en parte del estatus del receptor de estrógenos.

2. PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS TUMORES ASOCIADOS A MUTACIONES EN EL GEN *BRCA1*

2.1. ESTATUS DE *ESR1* O EL FENOTIPO BASAL COMO CLASIFICADORES PRINCIPALES

Empezamos analizando los 14 tumores BRCA1+ presentes en nuestra serie, realizando un agrupamiento no-supervisado con los 5.570 genes que quedaron tras el filtrado de los datos. Los tumores se estratificaron en dos ramas principales (Figura 15A), claramente marcadas por la expresión de *ESR1*: un grupo de tumores (cinco muestras, rama de la derecha, rosa) sobre-expresaba este gen, mientras el resto (nueve muestras, rama de la izquierda, azul) mayoritariamente mostró una expresión modesta o indetectable de *ESR1*.

Posteriormente realizamos una revisión exhaustiva de la literatura^{15, 19, 33, 35, 44, 69, 70, 73, 75, 78, 84, 85, 97, 101, 102, 128, 129, 138, 141, 156-159, 161, 187}, buscando genes presentes en la *intrinsic gene list* previamente establecidos en el cáncer de mama esporádico^{73, 133} (ver apartado 3.3 de la introducción). Identificamos 55 marcadores presentes en nuestra plataforma y que podrían ser utilizados para la clasificación tumoral. Realizando un clustering de las muestras con estos 55 genes y de nuevo se identificaron dos clases principales de tumores (Figura 15B): unos (rama derecha) sobre-expresando marcadores típicamente encontrados en tumores esporádicos luminales como *GATA3*, *TFF1* and *SCUBE2* y otros (rama izquierda) negativos para *ESR1*, *PGR* Y *HER2* (triple-negativos), sobre-expresando genes del lamina basal como *CDH3*, *CRYAB* and *KRT5-17*.

El agrupamiento según estos marcadores se mostró consistente con la clasificación previa con excepción de una muestra (#33), la cual era positiva para *ESR1* y *GATA3* (Figura 15B) y aun así, se agrupó en la rama *ESR1*-negativo cuando usábamos los 5.570 genes (Figura 15A). Esta

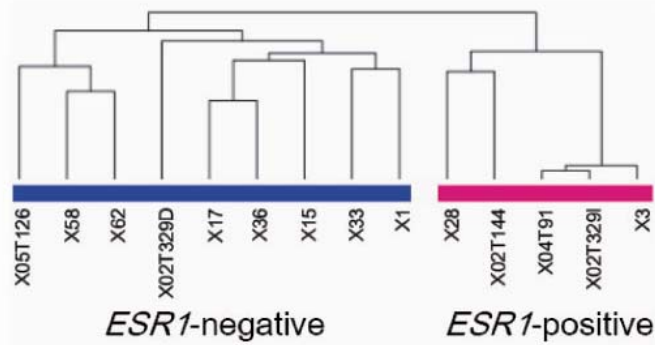
discrepancia se podría explicar dado que esta muestra sobre-expresaba marcadores de ambos fenotipos, basal y luminal y podría compartir características con los tumores basales aunque fuera positiva para *ESR1*. Posteriormente, tras la publicación de la llamada lista PAM50 comprobamos que el grupo *ESR1*-positivo representaba el fenotipo Luminal A (ver apartado 3.3) .

Nuestros resultados sugieren que la presencia/ausencia de fenotipo basal es el mayor discriminador de los dos grupos encontrados dentro de los tumores BRCA1, ya que observamos la misma organización utilizando la totalidad de los 5.570 genes, que utilizando solamente los 55 que permiten discriminar el fenotipo basal. Por otra parte confirmamos que los tumores BRCA1+ presentan este fenotipo en un porcentaje inusualmente elevado (65% en nuestra serie) dada su prevalencia (15%) cuando consideramos el cáncer de mama esporádico^{156, 157, 159} .

2.2. SUB-CLASES DE TUMORES BRCA1 Y FIRMAS MOLECULARES ASOCIADAS

Con el objetivo de analizar más en profundidad aquellos genes con un perfil de expresión más alterado en cada uno de los dos sub-grupos identificados dentro de los tumores BRCA1, aplicamos un test *t* entre el valor de expresión para cada gen en cada muestra tumoral y el valor de expresión de la referencia. Aplicando una FDR de 1/1.000, obtuvimos un total de 212 genes diferencialmente expresados dentro del grupo *ESR1*-positivo (posteriormente llamado Lista #1) y 670 genes diferencialmente expresados en el grupo de tumores *ESR1*-negativos (Lista #2) (Tablas suplementarias S1 y S2, respectivamente).

A



B

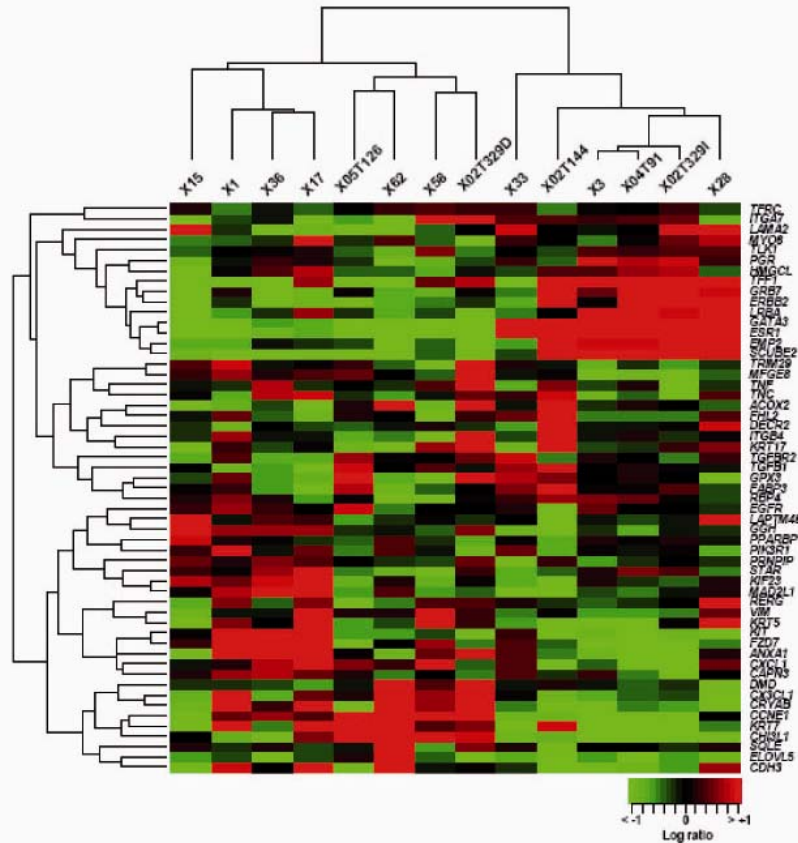


Figure 15A. Dendrogram resultante del agrupamiento jerárquico no-supervisado de los 14 tumores BRCA1 utilizando los 5.570 genes que permanecieron tras el filtrado de datos. Se observan dos grupos principales mediados por la expresión del gen *ESR1* (la rama rosa comprende los tumores que sobre-expresan el receptor de estrógenos y azul comprende los tumores que presentan niveles bajo o indetectables de este gen). **15B.** Dendrograma resultante del agrupamiento jerárquico no-supervisado de los 14 tumores BRCA1 utilizando los niveles transcripcionales de 55 genes marcadores de los 5 fenotipos descritos (Perou *et al*, 2000). Se observan los mismos grupos encontrados previamente con excepción de la muestra #33.

Para este análisis, la muestra #33 fue considerada en el grupo *ESR1*-negativo, ya que según datos inmunohistoquímicos y el perfil de expresión global, este caso era más parecido a los tumores *ESR-1* negativos. Analizamos las diferencias biológicas entre los dos grupos de genes a través de las anotaciones de *Gene Ontology* (iniciativa bioinformática cuyo objetivo es unificar la nomenclatura de los genes y de sus productos a lo largo de todas las especies, permitiendo además, una mejor comprensión de sus funciones y relaciones). Teniendo en cuenta el número de genes anotados para cada término dentro de los 5.570, los procesos biológicos que encabezaron la Lista de genes #1 (clase *ESR1*-positiva) fueron “Transcripción DNA-dependiente” y “Ciclo Celular” mientras que los que encabezaban la Lista #2 (clase *ESR1*-negativa) fueron “Respuesta Inmune” y “Ciclo Celular”.

Consistente con la asociación a proliferación celular¹⁸, “Respuesta al Estímulo de Estrógenos” se encontró sobre-representada en la Lista #1 pero no en la Lista #2. Además, utilizando informaciones ya publicadas, realizamos el análisis funcional del perfil de expresión de la línea celular RE-positiva MCF7²¹ y mostró un número de genes en común con la Lista #1 más elevado de lo esperado, regulados transcripcionalmente por la vía de señalización del RE. Treinta y tres (15%) genes de la Lista #1 que se encuentran *upstream* (aguas arriba) de la señalización del RE. Por otra parte, ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina ya divulgados identificaron un sitio de unión al RE *Cis* en otros 60 genes (28%) de la lista.

En cuanto a la Lista #2, contenía además varios genes supresores de tumores (*EPHA3* y *EPHB2*) y proto-oncogenes (*AKT1*, *AURKA*, *ETV6*, *MITF* and *PIK3CA*), sugiriendo su papel crítico en la tumorigénesis mamaria. En general, este análisis resalta procesos biológicos candidatos que parecen ser críticos en la génesis de los tumores *BRCA1*, más allá de la señalización del RE.

2.3. MARCADORES QUE DIFERENCIAN LOS TUMORES BRCA1 *ESR1*-NEGATIVO Y *ESR1*-POSITIVO

Para identificar los marcadores que mejor diferenciaban los grupos basados en *ESR1*, comparamos las Listas #1 y #2 utilizando un *fold-change threshold* (umbral de cambio de magnitud en la expresión) mayor o menor de 2 y -2, y una FDR menor del 5%. El análisis se llevó a cabo a través de la herramienta bioinformática *Pomelo II* (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>) que identificó un total de 31 genes que cumplieran los criterios anteriormente mencionados (Tabla 5). De estos, dos genes de los más diferencialmente expresados (*CD133* Y *MMP7*) y para los cuales había

anticuerpos disponibles para un análisis inmunohistoquímico, fueron seleccionados para validación en una serie independiente de tumores BRCA1. Para la validación, se utilizaron los tumores BRCA1+ incluidos en los TMAs detallados en el apartado 1.1.2 de material y métodos. Los niveles de proteínas (evaluados a través de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia) de CD133 y MMP7 se correlacionaron considerablemente con los niveles de expresión génica previamente analizados (Figura 16): MMP7 mostró una tinción intensa en 80% (9/11) de los tumores BRCA1+ RE-negativos pero en ninguno de los tumores BRCA1+ RE-positivos (0/4). CD133 presentó una tinción intensa en un 90% de los tumores RE-negativos (10/11) pero estaba completamente ausente en los 4 casos RE-positivos. (P-valor=0.01 y 0.004, respectivamente).

Resultados

Tabla 5. Descripción de los 31 genes que mejor diferencian las clases de tumores BRCA1+

Nombre (HUGO)	Descripción	Cambio	FDR
<i>C10orf116</i>	Chromosome 10 open reading frame 116	3.77	6.4207E-04
<i>CD133</i>	Prominin 1	-2.70	1.5661E-02
<i>CRABP2</i>	Cellular retinoic acid binding protein 2	2.12	7.7835E-03
<i>FRFR3</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3	2.13	1.0152E-05
<i>ESR1</i>	Estrogen receptor 1	4.25	4.4951E-04
<i>F2RL2</i>	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	2.12	8.3191E-03
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3	3.30	1.3560E-03
<i>GPR98</i>	G protein-coupled receptor 98	3.40	6.0975E-03
<i>HIST1H1C</i>	Histone cluster 1, H1c	2.49	1.6326E-03
<i>HSPB8</i>	Heat shock 22kDa protein 8	2.86	4.4951E-04
<i>LAMP3</i>	Lysosomal-associated membrane protein 3	-2.29	9.6204E-03
<i>LDHB</i>	Lactate dehydrogenase B	-2.32	6.4207E-04
<i>LMO4</i>	LIM domain only 4	-2.42	1.3021E-03
<i>LOC124220</i>	Similar to common salivary protein 1	3.78	4.8845E-04
<i>LOC391271</i>	Hypothetical LOC391271	2.65	9.3351E-05
<i>MAML2</i>	Mastermind-like 2 (Drosophila)	-2.14	1.0648E-02
<i>MID1</i>	Midline 1 (Oritz/BBB syndrome)	-2.07	2.1773E-02
<i>MMP7</i>	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	-2.85	7.1351E-03
<i>PRAME</i>	Preferentially expressed antigen in melanoma	-4.30	4.3286E-04
<i>PSAT1</i>	Phosphoserine aminotransferase 1	-2.11	3.2517E-03
<i>REEP5</i>	Receptor accessory protein 5	2.04	6.4207E-04
<i>RP5-860F19.3</i>	Early B-cell factor 4	2.02	8.3191E-03
<i>RTN4RL1</i>	Reticulon 4 receptor-like 1	2.28	6.4207E-04
<i>SCUBE2</i>	Signal peptide, CUB domain, EGF-like 2	4.13	3.3991E-05
<i>SLITRK6</i>	SLIT and NTRK-like family, member 6	3.57	6.4207E-04
<i>STARD10</i>	STAR-related lipid transfer (START) domain containing 10	3.16	3.2803E-04
<i>TFF1</i>	Trefoil factor 1	3.38	1.3021E-03
<i>TMEM16A</i>	Transmembrane protein 16A	2.24	6.1384E-03
<i>TNFRSF21</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	-2.07	1.6305E-03
<i>TSPAN13</i>	Tetraspanin 13	2.34	1.1854E-02
<i>UBD</i>	Ubiquitin D	-2.27	2.9004E-02

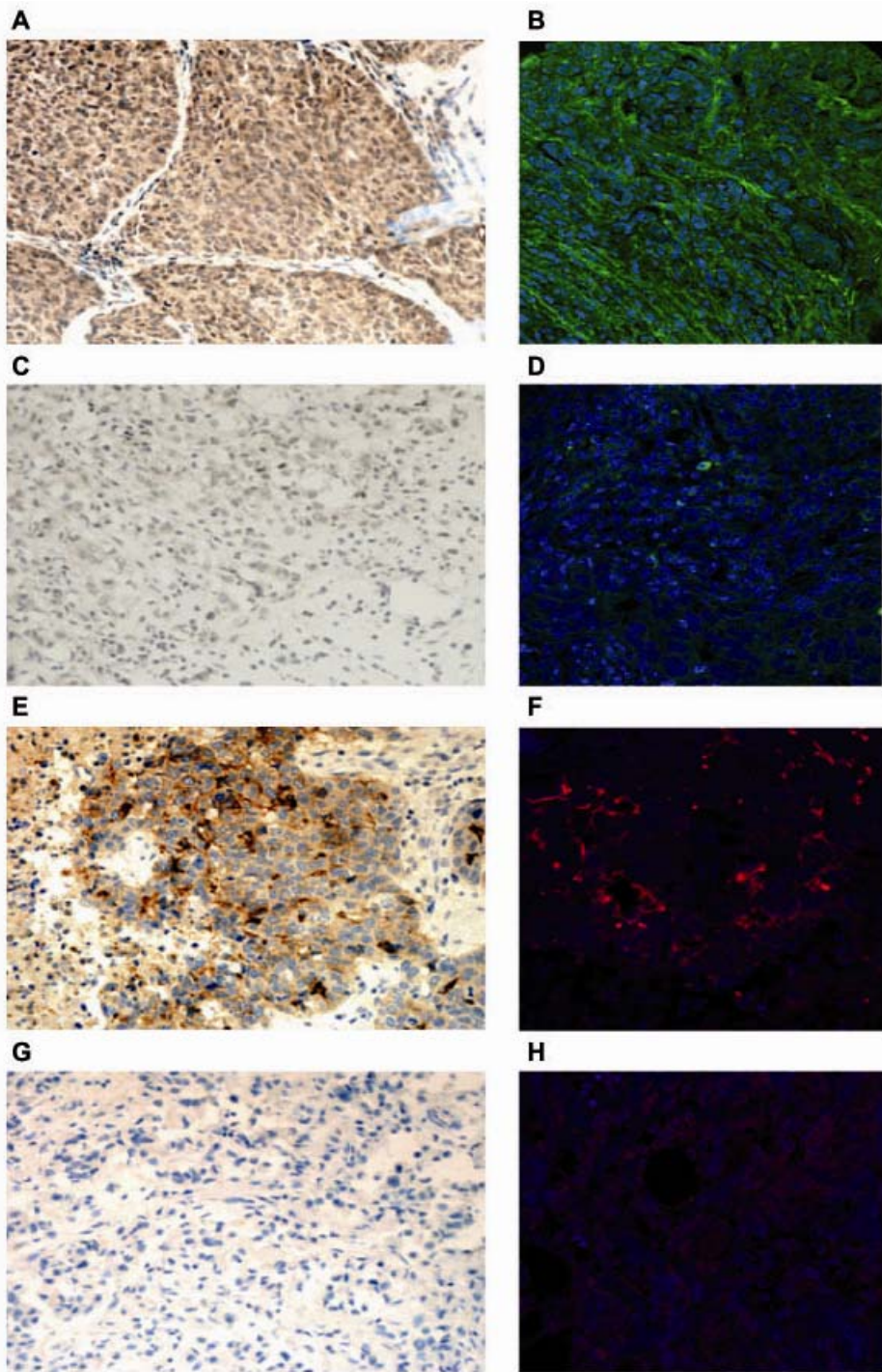


Figura 16. Validación a través de ensayos de inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF) de los resultados de expresión génica obtenidos de los genes *MMP7* y *CD133*. A y B: Tumor BRCA1 RE-negativo sobre-expresando *MMP7*. C y D: Tumor BRCA1 RE-positivo reprimiendo *MMP7*. E y F: Tumor BRCA1 RE-negativo sobre-expresando *CD133*. G y H: Tumor BRCA1 RE-positivo reprimiendo *CD133*.

2.4. VALOR PRONÓSTICO DE LA RESPUESTA INMUNE

La asociación encontrada entre la Lista #2 y el proceso biológico Respuesta Inmune fue abordada utilizando términos de *Gene Ontology* como Vía de señalización mediada por Citoquinas y Quimiocinas o Proliferación de Linfocitos. Se identificaron 52 genes anotados en estos procesos, la mayoría sobre-expresados en los tumores *ESR1*-negativos.

Se ha mostrado recientemente, que los niveles de expresión de los genes implicados en la respuesta inmune mostraban un valor pronóstico en los tumores esporádicos RE-negativos^{84, 167}. Teschendorff *et al.*¹⁶⁷ describió cinco sub-clases tumorales dentro de los tumores RE-negativos que podían ser diferenciados según el patrón de cuatro grupos de perfiles transcripcionales asociados a Ciclo Celular, Respuesta Inmune, Matriz Extracelular y Respuesta a Hormonas Esteroideas. Estos perfiles se relacionaron con la evolución clínica de los pacientes y se observó una asociación clara entre un buen pronóstico y la sobre-expresión de genes de la respuesta inmune, independiente de la infiltración linfocítica. En el mismo estudio, los autores analizaron además, la serie de 18 tumores *BRCA1+* publicados por van't Veer y colaboradores¹⁷⁵, y verificaron que estos presentaban una elevada similitud con la clase encontrada en los tumores esporádicos positivos para Respuesta Inmune y Ciclo Celular. En concordancia con estos hallazgos, en nuestra serie, las dos vías de señalización más enriquecidas en la Lista #2 fueron Respuesta Inmune y Ciclo Celular.

Examinando la Lista #2 y la firma publicada por Teschendorff y colaboradores^{84, 167}, se identificaron 18 genes en común, más elevado que el número esperado por casualidad (P-valor < 10⁻⁷). Por otra parte, la expresión diferencial de algunos de los genes también presentes en la Lista #2 se han asociado con la metástasis de cáncer de mama, a hueso (*CX3CL1, FARSLA, FST, GBP2, HLADPA1, HLADPB1, HLADRB1, MITF, NEDD4L, SERPINA1* y *TGFBI*)⁷⁷ o a pulmón (*ALDH3A1, COL1A1, EFEMP1, GSN, HLADPA1, HLADPB1, MAN1A1, PTPRN2* y *TNC*)¹¹⁷. El número de genes en común con la Lista #2 es, nuevamente, más elevado de lo esperado (P-valor<0.05). Estas observaciones sugieren la posible asociación entre los genes de este grupo y el pronóstico de las pacientes con tumores asociados a *BRCA1*.

2.5. ANÁLISIS DE LA FIRMA DE RI Y CC EN UNA SERIE INDEPENDIENTE DE TUMORES *BRCA1* RE-NEGATIVOS

Dado que pensábamos que el enriquecimiento en genes de Respuesta Inmune y metástasis observada en la Lista #2, podría indicar un posible valor pronóstico, decidimos analizar el valor de expresión de estos genes y su asociación con datos histopatológicos y otras variables clínicas en la serie independiente de 18 tumores *BRCA1* RE-negativos publicada por van't Veer ¹⁷⁵.

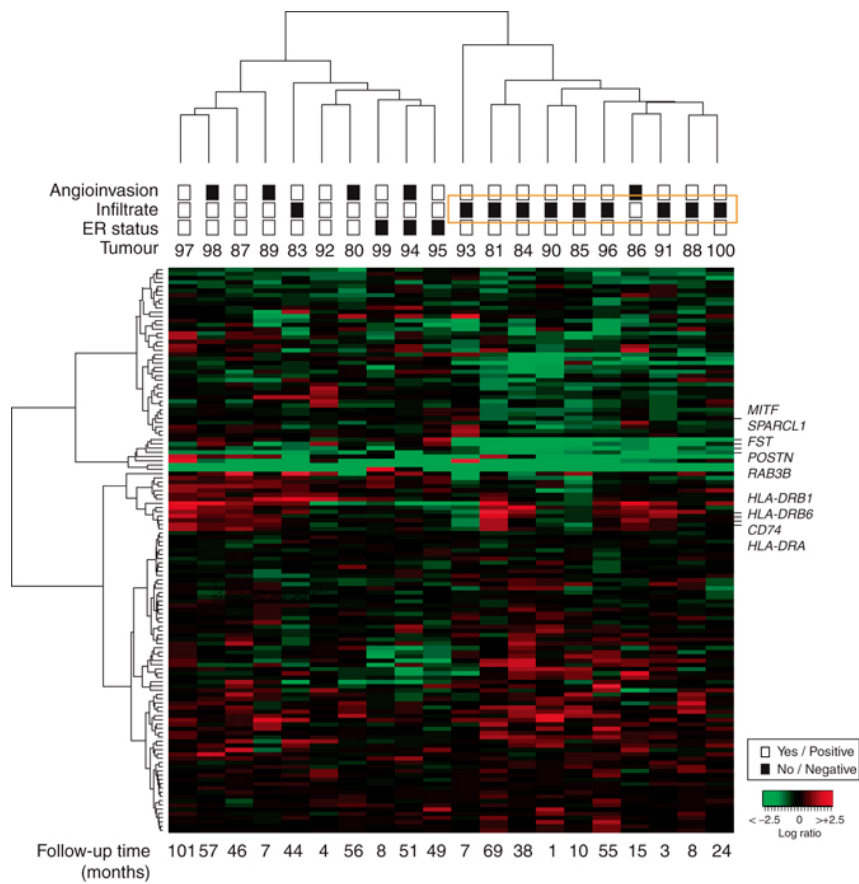


Figura 17. Agrupamiento jerárquico no-supervisado obtenido con 94 genes diferencialmente expresados en los tumores *BRCA1 ESR1*-negativos aplicando la corrección de *Bonferroni*, con los 18 tumores *BRCA1+* y 2 tumores *BRCA2+* (#99 and #94) de la serie publicada por van't Veer y colaboradores (van't Veer *et al*, 2002). Se observa el agrupamiento de los tumores según la presencia o ausencia de infiltrado linfocítico/angioinvasión. Se destacan genes relevantes en metástasis del cáncer de mama y aquellos que diferencian los grupos. Los valores de expresión están representados en log2. Figura tomada de Fernández-Ramires *et al*.⁴²

La clasificación no-supervisada de los tumores según los valores de expresión del total de genes de esta Lista (n=670) mostró una agrupación según la presencia de infiltrado linfocítico, consistente con la expresión diferencial de genes de respuesta inmune. Con el objetivo de reducir la dimensionalidad del número de genes, realizamos un agrupamiento no-supervisado con los genes diferencialmente expresados en nuestra serie de tumores RE-negativos aplicando la corrección de *Bonferroni* (n=94) (Tabla suplementaria S3).

Este número reducido de genes optimizó la clasificación según la presencia o ausencia de infiltrado linfocítico, y resaltó aquellos genes con mayores diferencias de expresión en esta condición (Figura 17). Entre estos genes, se encontraban genes asociados a metástasis tales como (*FST* y *MITF*) y a la respuesta inmune (familias *CD* e *HLA*). Todos los tumores excepto uno, con infiltrado linfocítico y sobre-expresión de genes de la respuesta inmune, mostraron ausencia de angiоinvasión, lo que lleva a especular que estos genes tienen un papel importante en el pronóstico de los tumores *BRCA1+* RE-negativos. Finalmente, los resultados de esta serie independiente de tumores apoyan el significado biológico de la respuesta inmune en la clasificación molecular y clínica de los tumores *BRCA1*.

2.6. ANÁLISIS DE UNA SERIE INDEPENDIENTE DE TUMORES DE MAMA ER-POSITIVOS

Los niveles de expresión de los transcritos representados en la Lista #1 (tumores *BRCA1 ESR1*-positivos) fueron analizados en una serie independiente, publicada por van't Veer y colaboradores en el año 2002, consistente en 56 tumores de mama esporádicos RE-positivos¹⁷⁵ con información histopatológica disponible. Este análisis identificó un grupo de tumores con pronóstico favorable, casi todos de grado 1 o 2 y ausencia de metástasis a los 5 años (Figura 18). Estos tumores que presentaban un buen pronóstico se caracterizaban, mayoritariamente, por la sobre-expresión de *ERBB3* y la represión de genes relacionados con ciclo-celular como *CCNA2* y *CCNB2*. Notablemente, la expresión de *ERBB3* fue recientemente asociado a una evolución favorable en los carcinomas ductales invasivos⁹⁶.

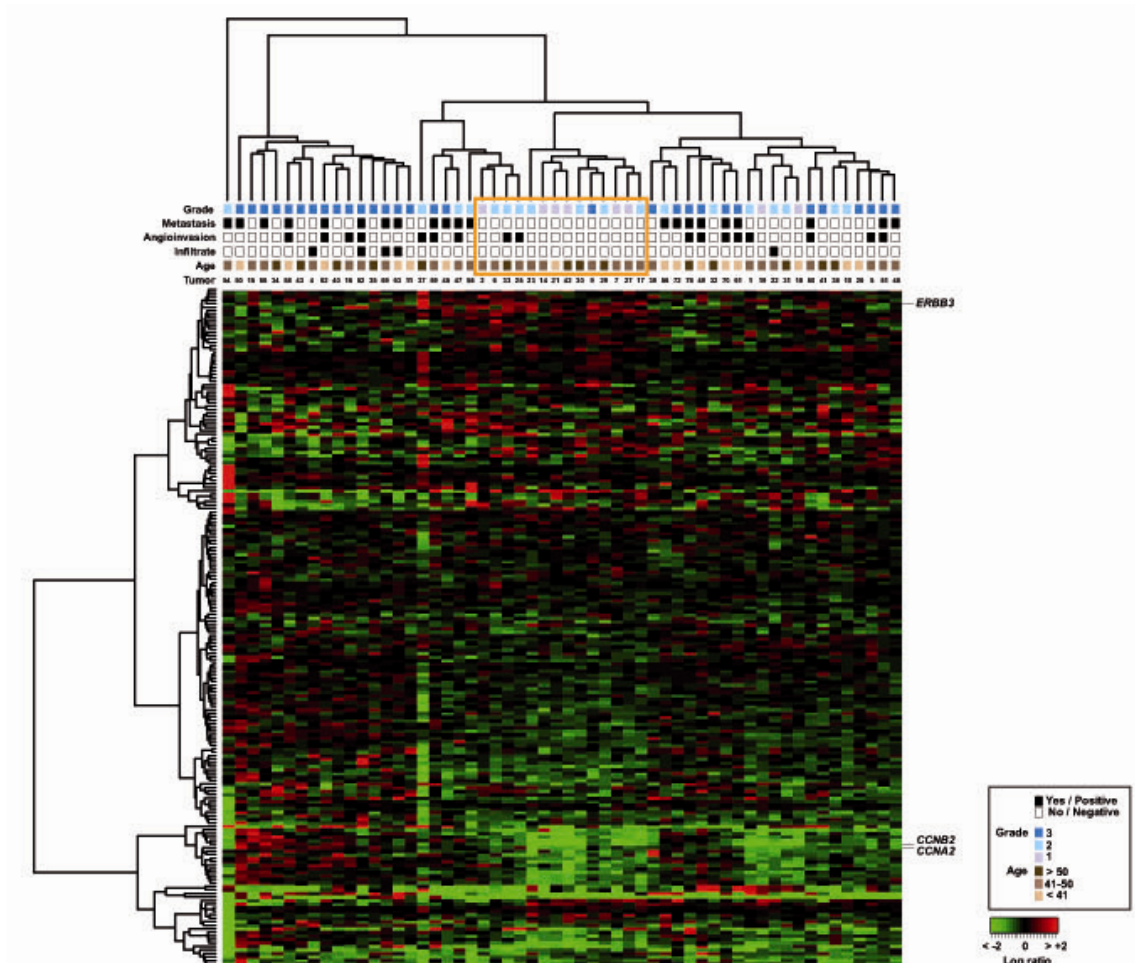


Figura 18. Agrupamiento jerárquico no-supervisado obtenido con la firma molecular de la Lista #1 y verificada en 56 tumores esporádicos, RE-positivos publicados por (van't Veer *et al*, 2002). En el cuadro naranja se incluyen los tumores con pronóstico favorable presentando represión de genes del ciclo celular (*CCNA2* y *CCNB2*) y sobre-expresión de *ERBB3*. Los valores de expresión están representados en \log_2 .

2.7. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LAS FIRMAS MOLECULARES DE *BRCA1*

Con el objetivo de investigar la regulación de las firmas moleculares de los tumores *BRCA1*, realizamos un análisis combinado de los sitios de unión a factores de transcripción ya predichos, con las diferencias de expresión encontradas en nuestra serie. Como era esperado, encontramos que varios genes de la Lista #1 estaban regulados directa o indirectamente por el RE. Por otra parte, la predicción de factores de transcripción que pudieran unirse a promotores de genes de la Lista #2, indicó una sobre-representación de sitios de unión de la familia REL/NF κ B (Test exacto de Fisher, P-valores < 0.01). En concordancia con estas predicciones, dos factores de transcripción de esta familia, presentes en nuestra plataforma, *NFkB* y *RELB*, presentaron sobre-expresión en los tumores *BRCA1* *ESR1*-negativos, con cambios relativos a los tumores *ESR1*-

positivos de 3.7 y 4.1 respectivamente (two-tailed *t*-test P-valor < 0.05; *RELA* mostró significación marginal con P-valor = 0.056).

2.8. PRESENCIA DE DOS SUB-GRUPOS DENTRO DE LOS TUMORES *BRCA1-ESR1*-NEGATIVOS

Aunque los genes implicados en la respuesta inmune estaban diferencialmente expresados en una misma dirección en todos los tumores *BRCA1-ESR1*-negativos, observamos que estos se podían estratificar en dos sub-grupos adicionales (A y B, Figura 19A) dependiendo de la magnitud de la expresión de genes específicos. Asimismo, los niveles de expresión de los factores de transcripción REL/NFκB clasificaron nuestros tumores *BRCA1 ESR1*-negativos de la misma forma (Figura 19B).

Observamos que todos los tumores *BRCA1 ESR1*-negativos con niveles de expresión menores de *NFκB2* y *RELB* y genes de la respuesta inmune, procedían de pacientes con mutaciones que provocaban un codón de parada prematuro en una región del gen que activa el mecanismo de degradación de ARNm mediado por codón de parada prematuro (*NMD Nonsense-Mediated mRNA Decay*) y por tanto llevarían a una completa ausencia de la proteína BRCA1 en el tumor¹³⁴ (Tabla 3). Sin embargo, 3 de los 5 tumores *BRCA1 ESR1*-negativos, que mostraron los niveles de expresión más altos, se originaron de mutaciones *missense* (mutaciones que causan un cambio de aminoácido) que dan lugar a una proteína aberrante pero aun presente.

Se ha descrito que BRCA1 es coactivador del complejo NFκB y que interacciona directamente con RELA¹². Es posible por tanto que el hecho de que exista en el tumor proteína BRCA1, aunque aberrante, pueda provocar una mayor expresión del complejo, mientras que en aquellos casos en los que la proteína está ausente, la expresión sea menor.

Para evaluar estas observaciones, examinamos los niveles de expresión de 72 genes dianas de NFκB relacionados con apoptosis y sistema inmune (<http://people.bu.edu/gilmore/NFκB/target/index.html>) en nuestra serie de tumores *BRCA1 ESR1*-negativos y en la línea celular MDA-MB 436 que tiene *BRCA1* mutado y presenta bajos niveles de expresión de ARNm de *BRCA1*. Realizando un agrupamiento no-supervisado, observamos que la clasificación de los sub-grupos A y B se mantenía y que la línea MDA-MB 436 se agrupaba con los tumores que presentaban bajos niveles de expresión de genes dianas de NFκB (Figura suplementaria S1).

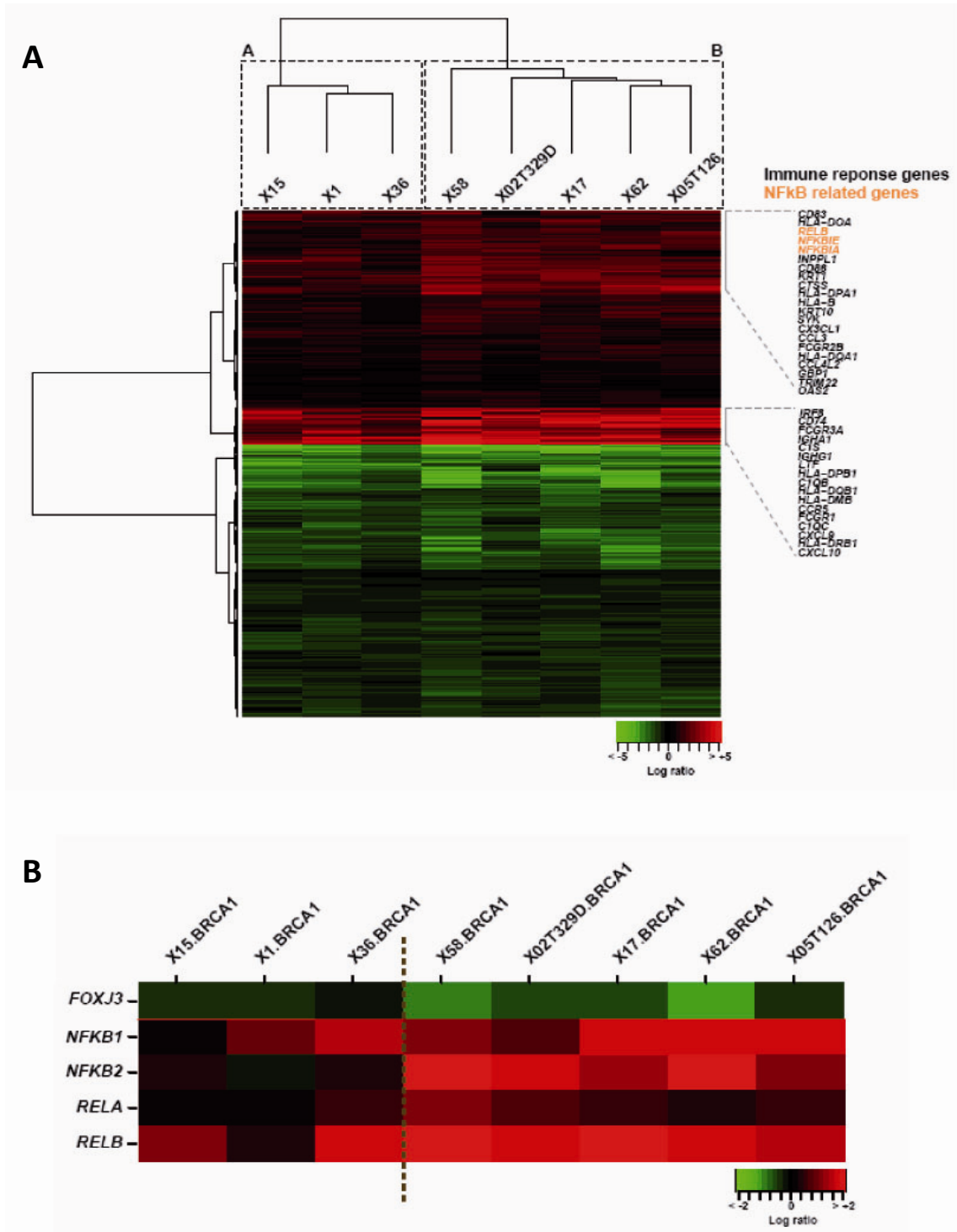


Figura 19A. Agrupamiento jerárquico no-supervisado de 9 tumores BRCA1 *ESR1*-negativos utilizando genes de la Lista #2. Se observan dos sub-grupos, A (izquierda) y B (derecha), mostrando diferencias en la magnitud de la expresión de genes relacionados a respuesta inmune. **Figura 19B.** Agrupamiento jerárquico no-supervisado de los mismos 9 tumores BRCA1 *ESR1*-negativos utilizando factores de transcripción de la familia REL/NFkB. Se observan los mismos grupos (A y B) observados anteriormente.

2.9. ESTUDIO DE ALTO NIVEL DE LAS FIRMAS MOLECULARES ASOCIADAS A LOS TUMORES BRCA1

Para comprender mejor las firmas moleculares identificadas en los dos grupos de tumores BRCA1 y su posible papel en la tumorigenesis, las analizamos en un contexto de red de interacciones de proteína-proteína humanas que llamaremos red de interacción. Este análisis mostró que muchas proteínas codificadas por estas firmas moleculares estaban incluidas en un componente más grande constituido por 235 nodos o proteínas y 523 interacciones (Figura 20), lo que sugiere que los productos génicos de las Listas #1 y #2 actúan en procesos o vías funcionalmente relacionadas.

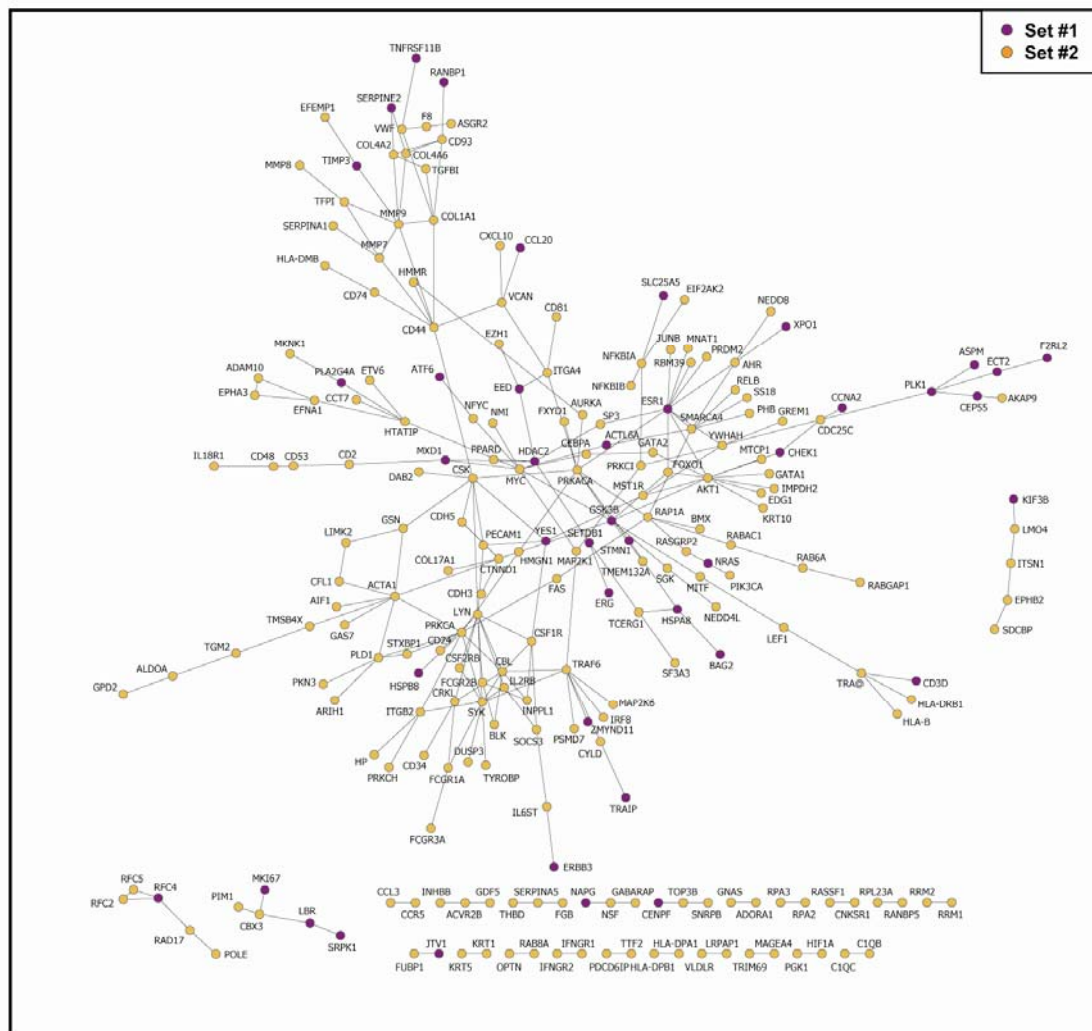


Figura 20. Red de interacciones de las proteínas codificadas por las Listas #1 y #2

Tabla 6. Términos GO enriquecidos por las proteínas codificadas por las Listas #1 y #2.

Término GO	Lista #1	Lista #2
	(n=198)*	(n=632)*
	Numero de interactores (FDR)**	Numero de interactores (FDR)**
Ciclo Celular	159 (<10 ⁻⁹)	267 (<0.001)
Muerte Celular	138 (<10 ⁻⁹)	261 (<0.001)
Respuesta Inmune	No-significativo	191 (<0.001)
Vía de Señalización del Receptor de Hormonas Esteroideas	28 (<10 ⁻¹⁰)	No-significante

*Numero de productos génicos en el Interactoma

**Numero total de interactores y su correspondiente FDR para los términos GO enriquecidos

Se tuvieron en cuenta para el análisis las relaciones funcionales directas entre proteínas. Para determinar las relaciones exactas entre las mismas, se calcularon las distancias mínimas entre proteínas codificadas por las Listas #1 y #2 y se compararon con la distribución completa de las distancias mínimas en el componente global. Las distancias mínimas identificadas entre las firmas moleculares eran más pequeñas que aquellas del componente global (Mann-Whitney U test P-valor < 0.001), lo que refuerza la posible existencia de relaciones dinámicas.

Con el objetivo de analizar la asociación funcional entre las firmas moleculares #1 y #2, evaluamos las terminologías representadas de los procesos biológicos de GO en sus proteínas vecinas (proteínas que interactúan directamente con cada una de las firmas y excluyendo proteínas que pertenecen a cualquiera de las firmas estudiadas) (Tabla 6). Este análisis confirmó la sobre-representación previamente observadas de ciertos procesos biológicos en las Listas #1 y #2: la Lista #1 presentó una sobre-representación de proteínas vecinas involucradas en la Vía de Señalización de Receptores de Hormonas Esteroideas, Ciclo Celular y Muerte Celular pero no respuesta Inmune; la Lista #2 no mostró sobre-representación de proteínas relacionadas en la Vía de Señalización de Receptores de Hormonas Esteroideas y sí de Respuesta Inmune, Ciclo Celular y Muerte Celular. En resumen, la correlación existente entre el análisis de genes y proteínas apoya

el papel de estos procesos en la génesis tumoral en los pacientes *BRCA1* y sugiere una posible implicación de los mismos en el pronóstico de los pacientes. Asimismo, este estudio proporciona un entendimiento biológico a un nivel integrador de las firmas moleculares de *BRCA1* más allá de la función de los genes a nivel individual.

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS TUMORES BRCA1

3.1. LA CLASIFICACIÓN NO-SUPERVISADA DE LOS TUMORES BRCA1 REVELA LA EXISTENCIA DE AL MENOS DOS GRUPOS

Para definir los posibles subgrupos representados dentro de los tumores BRCA1, realizamos como primer paso un análisis de descubrimiento de clases (*class discovery*). Para ello, aplicamos un proceso de re-muestreo en el grupo de 14 tumores BRCA1, usando el programa *Gene Pattern 2.0* con el objetivo de obtener la clasificación más robusta basada en los niveles de expresión de 6375 genes restantes después del filtrado de los datos. Aplicamos distintos algoritmos, de los cuales *Person Average* se mostró el más robusto. El análisis reveló la existencia de dos grupos principales, que llamamos BRCA1-A (BX9, BX47, BX67, BX129, BX132, BX143, BX248 y BX264) y BRCA1-B (BX74, BX75, BX76, BX77, BX87 y BX94) (Figura 21A).



Figura 21A. Re-muestreo de la serie BRCAX, utilizando el método *Consensus Clustering*, corrobora la existencia de dos sub-grupos, aquí llamados A y B. **Figura 21B.** El mismo análisis pero incluyendo las 22 muestras esporádicas (en negro). Se observa la robustez de ambos grupos BRCAX como entidades independientes entre sí y una semejanza transcripcional aparente entre el grupo de tumores BRCAX-B y un grupo de esporádicos.

3.2. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE LOS GRUPOS BRCA-A Y BRCA-B.

Utilizamos la herramienta bioinformática *Pomelo II* (<http://pomelo2.bioinfo.cnio.es/>) para establecer los genes más diferencialmente expresados entre los grupos BRCA-A y BRCA-B, responsables de la separación de las dos clases. Se realizaron dos análisis utilizando distintos umbrales de FDR. Primero, aplicando una FDR <0.15 obtuvimos una lista de 142 genes (Tabla suplementaria S4) los cuales fueron analizados usando *IPA* buscando vías de señalización enriquecidas. Las vías más enriquecidas presentes en el grupo BRCA-A, fueron Presentación de Antígenos, Modificaciones Post-Traduccionales, Respuesta Celular a Terapias y Eliminación de Radicales Libres, mientras que Modificaciones Post-Transcripcionales del ARN y Síntesis de Proteínas se encontraban sobre-representadas en la clase BRCA-B. Ambos grupos compartieron 23 vías enriquecidas. Posteriormente aplicamos una FDR más estricta de <0.05 con el objetivo de identificar genes que mejor podrían diferenciar los dos sub-grupos de tumores BRCA. Un total de 17 genes cumplieron estos criterios (Tabla suplementaria 2) y, entre estos, 13 presentaban diferencias considerables en cuanto a niveles de ARNm y fueron considerados para una posible validación inmunohistoquímica. Se seleccionaron algunos anticuerpos disponibles para las proteínas codificadas por algunos de estos genes y fueron hibridados en la serie independiente de 84 tumores (TMAs) descritos en el apartado 1.1.2 de material y métodos.

3.3. LOS TUMORES BRCA COMPARTEN ALGUNAS SIMILITUDES CON LOS TUMORES ESPORÁDICOS

Dado que se ha sugerido que los tumores BRCA podrían ser similares a los esporádicos a nivel somático⁶², realizamos un análisis conjunto de ambos grupos para investigar sus posibles similitudes o diferencias. Para ello, el mismo análisis de re-muestreo fue realizado con los 14 tumores BRCA pero ahora incluyendo la serie de 22 tumores esporádicos. Las 36 muestras fueron divididas en 4 grupos (Figura 21B): El primer grupo estaba constituido por seis tumores esporádicos y seis BRCA que representaban el grupo BRCA-B completo (BX74, BX75, BX76, BX77, BX87 y BX94) definido en el análisis previo; el segundo se constituyó básicamente de tumores esporádicos (seis muestras, luego llamadas SPO-2) e incluía dos tumores BRCA (BX47 and BX67), clasificado como BRCA-A, previamente; el tercer grupo estaba constituido exclusivamente por tumores BRCA, la mayoría de los cuales (5/8) habían sido clasificados como BRCA-A en el primer análisis (BX9, BX129, BX132, BX248, BX264). Finalmente, el último grupo

estaba formado por tumores esporádicos (diez muestras, luego llamadas SPO-3) y un tumor previamente clasificado como BRCAX-A (BX143).

Es interesante que en este análisis, los grupos previamente definidos como BRCAX-A y BRCAX-B se mantuvieron como grupos distintos casi de la misma forma que antes, aunque el grupo BRCAX-B resultó ser similar a uno de los grupos de tumores esporádicos (SPO-1), mientras que la mayoría de los tumores BRCAX-A permanecieron como un grupo homogéneo y distinto al resto de tumores, tanto BRCAX como esporádicos. Para los siguientes análisis, consideramos como BRCAX-A solamente los cinco tumores que permanecieron como un grupo robusto tras el proceso de re-muestreo con la clase de esporádicos.

3.4. LOS FENOTIPOS DEL CÁNCER DE MAMA ENTRE LOS SUB-GRUPOS BRCAX Y ESPORÁDICOS

Se sabe desde el año 2000 cuando Perou *et al.*, publica la lista de genes capaz de subestratificar los tumores de mama esporádicos¹³³, que el cáncer de mama no puede ser abordado como una única entidad biológica, dado que cada sub-grupo – o fenotipo descrito se asocia a un comportamiento biológico distinto. Con el objetivo de saber si los grupos identificados en el análisis de re-muestreo de las clases de tumores esporádicos y familiares estaban solamente reflejando los distintos subtipos moleculares del cáncer de mama, evaluamos los niveles de expresión de ARNm de un grupo de genes llamados PAM50, recientemente establecido como la lista de genes capaz de clasificar los carcinomas mamarios según su fenotipo molecular de forma más robusta¹³¹. Dado que la mayoría de los tumores BRCAX y esporádicos presentaban positividad para el receptor de estrógenos, decidimos incluir en el análisis la serie de tumores *BRCA1+*, 8 de los cuales habían sido previamente clasificados como de fenotipo basal (ver apartado 2.1 de resultados), para asegurar que este último estuviera representado y la clasificación fuera más robusta. Utilizando los 38 genes incluidos en el PAM50 presentes en nuestro *microarray* (76%) de los genes, fuimos capaces de clasificar los 49 tumores a lo largo de los subtipos moleculares conocidos (Figura 22).

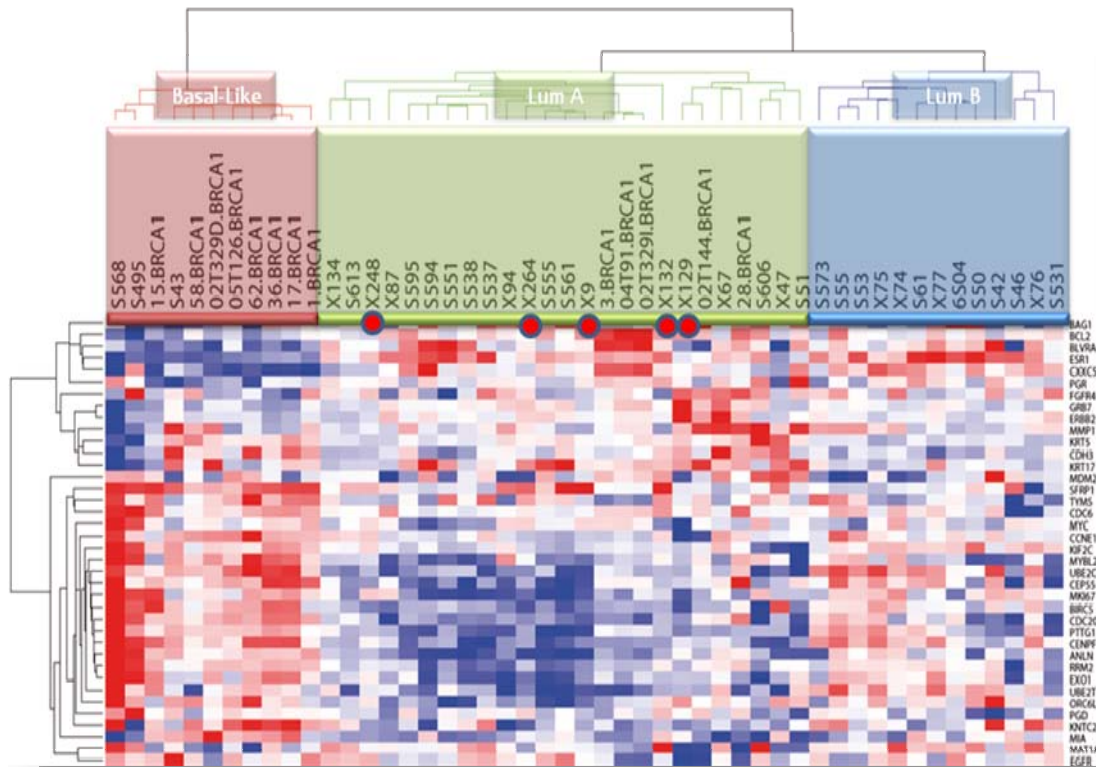


Figura 22. Agrupamiento jerárquico no-supervisado utilizando los genes que mejor clasifican los tumores de mama según los distintos fenotipos moleculares (PAM50) utilizando las muestras BRCA1, BRCA2 y esporádicas.

Antes de nada, es importante recalcar que los mismos tumores BRCA1 que habían sido definidos como basales anteriormente (ver apartado 2.1 de resultados) fueron clasificados de la misma manera con PAM50, lo cual confirmó nuestros resultados previos. Por otra parte, los 5 tumores BRCA1 que en el análisis anterior fueron clasificados simplemente como no-basales, resultaron ser Luminales A al utilizar la lista más específica de genes PAM50. Esta clasificación no se había llevado a cabo en los análisis previos de los tumores BRCA1 porque en ese momento no se habían publicado la lista PAM50. En cuanto al resto de los tumores, solamente tres esporádicos, dos de los cuales eran triple-negativos por IHQ (Tabla 4) resultaron tener un fenotipo basal.

La mayoría de los tumores esporádicos y todos los tumores BRCA2 fueron clasificados como Luminales: casi todos los tumores BRCA2-A fueron clasificados como Luminales A mientras que el grupo BRCA2-B fue clasificado como Luminal B, apoyando la robustez de los grupos previamente definidos. En cuanto a los tumores esporádicos, los que se agruparon con el grupo

BRCAX-B en el re-muestreo (SPO-1), resultaron ser también similares a un nivel de fenotipo, ya que mayoritariamente se clasificaron como Luminales B. El grupo de esporádicos que parecía ser más homogéneo en el re-muestreo (SPO-3) (Figura 21B) fue mayoritariamente clasificado como Luminal A (Figura 22). Es importante resaltar que los grupos BRCAX-A y SPO-3, ambos clasificados como diferentes y homogéneos en el re-muestreo utilizando el total de genes (6,735), eran similares al nivel de fenotipo (Luminal A) definido a través del PAM50. Los seis tumores esporádicos que habían sido clasificados como SPO-2 en el re-muestreo, presentaron una elevada heterogeneidad en relación a su fenotipo: dos de los tumores (S568 y S495) se clasificaron como basales mientras que los tumores S42 y S50 como Luminales B. Finalmente, entre los tumores Luminales, había un grupo pequeño de tumores que no presentaban un fenotipo claro, incluyendo las muestras esporádicas S606 y S51; BX47 y BX67 (no incluidos en los grupos A o B) y el tumor BRCAX-A, BX129. Aunque no hayamos podido asignar un fenotipo definido para estos tumores, el grupo al cual presentaron más cercanía de ramas en el clustering fue el de los Luminales A.

3.5. LOS FENOTIPOS LUMINAL A Y LUMINAL B EN LOS TUMORES BRCAX CLASIFICADOS CON PAM50

Para tratar de validar los resultados obtenidos a través de los *microarrays* de expresión, diferencialmente expresados entre los grupos BRCAX-A y BRCAX-B (las proteínas codificadas por los genes *ENG*, *WBP1* Y *HAO1*), utilizamos 84 tumores BRCAX incluidos en los TMAs previamente descritos. La caracterización que hicimos consistió en utilizar los marcadores RE, RP, HER2 además del marcador de proliferación Ki-67. En un estudio reciente con casi tres mil tumores de mama RE positivos, Cheang y colaboradores propusieron una nueva clasificación de los tumores Luminal A y Luminales B, basándose en la expresión del marcador de proliferación Ki-67²³. Se observó que, además de utilizar el valor de expresión proteica del RE, RP y HER2, aplicando un punto de corte de 13,25% para Ki-67, los tumores que sobrepasaban este umbral resultarían pertenecer al fenotipo Luminal B. Aplicamos esta misma clasificación en nuestros tumores incluidos en el TMA y los clasificamos siguiendo lo que se propuso en el trabajo anteriormente mencionado, encontrando que un 82% de los tumores podían ser clasificados como Luminal A y un 18% como Luminal B.

No obstante, no hemos sido capaces de establecer una correlación entre los datos obtenidos con los perfiles de expresión génica y los datos obtenidos con el estudio inmunohistoquímicos. Esto se puede deber a una correlación no exacta entre la expresión de

ARNm y su posterior traducción en proteína o bien por que en nuestra serie de tumores embebidos en parafina utilizada en la validación consiste, en su mayoría, de tumores BRCA1 del fenotipo Luminal A, con lo cual no nos dio potencia estadística suficiente como para determinar con un mínimo grado de fiabilidad la correlación previamente analizada.

3.6. FONDO GENÉTICO DE LOS TUMORES BRCA1-A “MÁS ALLÁ” DEL SUBTIPO MOLECULAR

De los resultados expuestos en los tres apartados anteriores, llegamos a la conclusión de que, si bien los tumores BRCA1 eran similares a los esporádicos a nivel de fenotipos, uno de los grupos, el BRCA1-A, presentaba un fondo genético que lo hacía diferente al resto de tumores cuando realizábamos el análisis de remuestreo con los 6,735 genes.

Nuestro siguiente objetivo fue identificar cuáles eran los genes que hacían diferentes al grupo BRCA1-A, ya que pensamos que aquí podría residir la causa de la susceptibilidad al cáncer observada en estas familias. Para responder a esta hipótesis, realizamos un análisis de expresión diferencial utilizando la herramienta bioinformática *Pomelo II* entre el grupo BRCA1-A y el grupo SPO-3, que representaba el grupo de tumores más similar al nivel fenotípico pero diferente cuando consideramos el transcriptoma completo de estos tumores. Encontramos 157 genes diferencialmente expresados entre los dos grupos ($FDR < 0.05$) (Figura 23).

La mayoría (123/157) de los genes estaban reprimidos en el grupo BRCA1-A con respecto al grupo SPO-3. Los 157 genes fueron cargados en el programa IPA para realizar un análisis funcional de aquellos presentes en la firma molecular. De ellos, 146 fueron reconocidos por el programa y utilizados para la generación de las vías de señalización (Tabla suplementaria S5). Realizamos un análisis de enriquecimiento, buscando vías generales que pudieran ser responsables de las diferencias genéticas entre los tumores familiares y esporádicos. Interacción y señalización célula a célula, crecimiento y proliferación celular, ciclo celular y muerte celular encabezaron las funciones más alteradas dentro del grupo BRCA1-A.

Además, para verificar el comportamiento de estos genes a lo largo de todas las clases tumorales y comprobar si este patrón de expresión era específico de los tumores BRCA1-A, realizamos un análisis no supervisado incluyendo todos los tumores utilizados para el análisis con PAM50, según el valor de expresión de los 157 genes (Figura 23). Sorprendentemente, vimos que los tumores BRCA1-A, se agrupaban con la mayoría de los tumores BRCA1-independientemente

de su fenotipo (basal o luminal)- mientras que eran diferentes del resto de las clases esporádicas y familiares. Esto nos llevó a pensar que algunas de las vías de señalización alteradas en el grupo BRCA1-A podrían converger con aquellas encontradas en los tumores asociados a *BRCA1*.

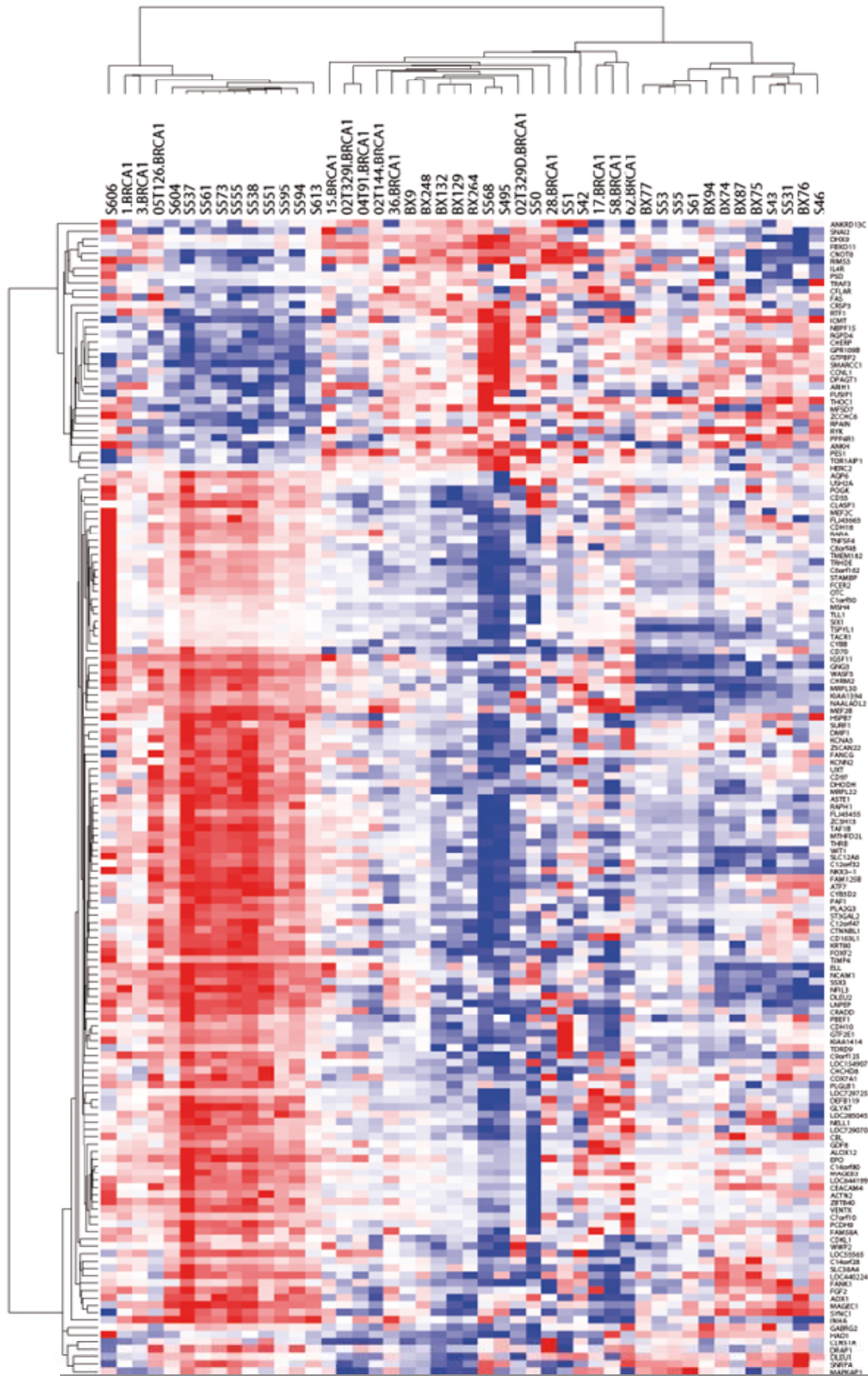


Figura 23. Agrupamiento jerárquico no-supervisado de los 46 tumores utilizados para el análisis con PAM-50 utilizando los 157 genes obtenidos a través del análisis de expresión diferencial entre los grupos BRCA-A y SPO-2.

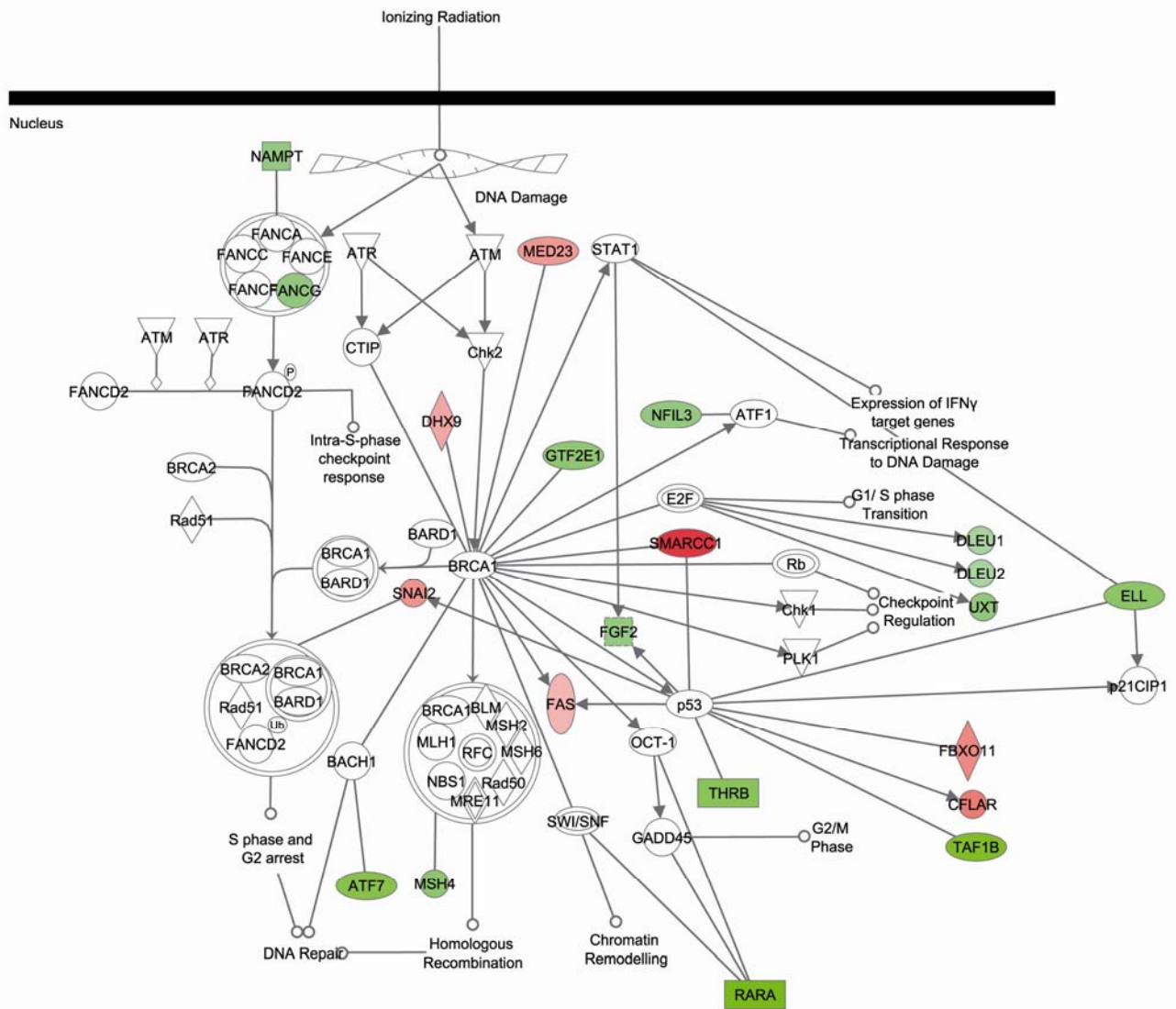


Figura 24. La Vía de Susceptibilidad BRCAX, donde se representan los 21 genes obtenidos a través de la expresión diferencial entre los grupos BRCAX-A y SPO-2, cargados en el programa IPA *Path Design* observándose una estrecha relación entre estos genes y aquellos pre-establecidos en la vía molecular del gen BRCA1

Por otro lado, analizamos los niveles de interacción entre estos 157 genes a través del programa IPA, con la herramienta *Path Design*, la cual nos permite ubicar y conectar los genes en rutas canónicas. De esta forma fuimos capaces de establecer lo que llamamos “La Vía de Susceptibilidad BRCAX”, donde 21 de los 146 genes que pudieron ser ubicados (15%) se conectaba, directamente, a la vía molecular “Papel de BRCA1 en la Respuesta al Daño al ADN” previamente establecida por el programa IPA y corroborando la agrupación encontrada del grupo BRCAX-A con los tumores BRCA1. Examinando a fondo las interacciones funcionales entre los 21 genes de nuestra firma a la vía molecular pre-establecida, se observó una red clara de activación/interacción/represión que se conectaba directamente a BRCA1 o que dependía de

otras moléculas *upstream/downstream* de este gen, desarrollando un papel importante en funciones ampliamente conocidas en la génesis del cáncer de mama como son los procesos de reparación del ADN.

1. EL TRANSCRIPTOMA DE LOS TUMORES DE MAMA HEREDITARIOS

El desarrollo tecnológico experimentado en los últimos años con los *microarrays* de expresión, que permiten el análisis de miles de genes a la vez en un solo experimento, han permitido profundizar en el conocimiento de la biología molecular de los tumores. El cáncer de mama en concreto ha sido uno de los más estudiados y sobre los que más trabajos de investigación se han publicado, tratando de conocer en detalle los genes implicados en su desarrollo.

Uno de los primeros descubrimientos clave en cáncer de mama utilizando la tecnología de *microarrays* de DNA, fue la clasificación de estos tumores en grupos previamente no reconocidos¹¹. Sobre un total de 40 tumores de mama esporádicos y utilizando un *microarray* de cDNA, los autores identificaron tres grupos biológicamente distintos dentro de los tumores ER-negativos, que definieron como: tumores con fenotipo basal (*basal-like*), tumores ERBB2 (con expresión de *ERBB2* y varios genes cercanos); y tumores con fenotipo de mama normal (*normal-breast-like*), que expresaban genes de células adiposas y otras células de origen no epitelial. Los tumores ER-positivos, clasificados como un solo grupo en el trabajo original, fueron posteriormente separados en al menos dos grupos distintos: el subtipo luminal A (con altos niveles de expresión de citoqueratina-8 y citoqueratina-18) y el luminal B¹². Estos resultados se han confirmado en estudios posteriores^{133, 156, 157, 159} y actualmente se acepta esta clasificación de los tumores de mama esporádicos en al menos 5 subgrupos moleculares, que además presentan diferencias en cuanto a su evolución clínica.

Se sabe mucho menos con respecto al cáncer de mama hereditario, siendo las publicaciones escasas. En 2001, Hedenfalk publicó un trabajo describiendo diferencias a nivel del perfil de expresión, entre los tumores de pacientes con mutación germinal en *BRCA1* y *BRCA2* utilizando un *microarray* de cDNA; en este trabajo se identificaron 176 genes diferencialmente expresados entre los dos grupos, si bien el análisis se realizó tan sólo con 7 y 8 tumores asociados a mutaciones germinales en *BRCA1* y *BRCA2* respectivamente⁵⁹. En el caso de tumores BRCA, hasta el momento solamente se ha publicado un trabajo⁶⁰, en el que el análisis del perfil de expresión de 16 tumores, utilizando de nuevo un *microarray* de cDNA, sugería que este grupo es genéticamente heterogéneo. Los resultados obtenidos en estos trabajos, aunque de indudable interés, no han sido validados en otras series independientes, paso obligatorio de cara a la extracción de conclusiones válidas y una eventual aplicación de los resultados obtenidos a la clínica.

Dada la escasez de estudios que caracterizen los tumores hereditarios son necesarias otras aproximaciones. Además de conocer los genes alterados en este grupo de tumores, es importante que se conozca la relación entre ellos y sus productos, abordaje que todavía no se ha llevado a cabo. Nuestro trabajo representa el tercer análisis de expresión, enfocado específicamente al estudio de los tumores de mama hereditarios BRCA1, BRCA2 y BRCAX.

Una de las hipótesis previas a este estudio, era la de que los tumores hereditarios, se agruparían en grupos homogéneos y discretos en función de la mutación germinal presentada. Sin embargo, el análisis global de expresión de la serie completa de tumores, reveló que cada uno de los grupos BRCA1, BRCA2 y BRCAX presentaba una elevada heterogeneidad intrínseca (Figura 14), sobre todo en el caso de los grupos BRCA2 y BRCAX. Esto era esperado en el caso de los tumores BRCAX, ya que es probable que no sea una única alteración germinal la que explique todos los casos, si no más bien una combinación de variantes, que puede ser distinta en diferentes subgrupos de tumores BRCAX. Por otro lado, ya se había descrito que a nivel genómico el grupo BRCAX presentaba heterogeneidad^{68, 113, 114}. Nos sorprendió más el hallazgo en el caso de los tumores BRCA1 y BRCA2, ya que en estos sí existe una mutación germinal concreta en un gen de alto riesgo, que es común a todos los tumores dentro de cada uno de los grupos. Los datos iniciales indicaron una fuerte influencia del estatus del RE en la generación de los grupos, tal y como ocurre en el cáncer de mama esporádico y que también había sido propuesto por Melchor *et al.*, a través de los *arrays* de CGH¹¹⁴ en tumores de mama hereditarios. En su trabajo, describe los patrones de aberraciones cromosómicas según el estatus de este receptor, encontrado un mayor número de alteraciones en aquellos tumores que reprimían la expresión proteica del RE. Más adelante, discutiremos la influencia de la expresión génica del RE en los grupos encontrados además de su relación con los fenotipos moleculares establecidos para los tumores de mama esporádicos.

La heterogeneidad a nivel somático que presentaba cada uno de los grupos, no nos permitió identificar marcadores concretos de cada una de las clases, BRCA1, BRCA2 y BRCAX (segundo objetivo de este trabajo) y nos obligó a analizar cada una de ellas por separado.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS TUMORES BRCA1: EL FENOTIPO BASAL COMO DISCRIMINADOR PRINCIPAL

Como se ha comentado anteriormente, se tiene poca información sobre el perfil de expresión de los tumores hereditarios, sin embargo, los tumores con mutación germinal en el gen *BRCA1* parecen mostrar un perfil de expresión más definido. Se ha descrito recientemente que estos tumores presentarían en su mayoría un fenotipo basal, aunque hay discrepancias sobre el porcentaje exacto^{17, 47, 54, 61, 85, 91, 136, 142, 146, 175}. Además, solamente en uno de estos estudios, el de van't Veer y colaboradores¹⁷⁵, se utiliza el perfil de expresión (técnica *goldstandard* para definir los fenotipos) para clasificar 18 tumores BRCA1, en este caso todos con fenotipo basal.

En nuestra serie de 14 tumores BRCA1, tras un primer análisis no-supervisado, observamos dos grupos bien diferenciados en base a su perfil global de expresión, claramente mediado por la expresión del gen que codifica para el receptor de estrógenos, *ESR1*. El sesenta por ciento de los tumores analizados presentaron niveles reducidos o indetectables de *ESR1* (tumores BRCA1 *ESR1*-negativos) y sobre-expresaron genes típicamente encontrados en los tumores del fenotipo basal, mientras que el resto de los tumores presentaron sobre-expresión del gen *ESR1* y presentaron un perfil no-basal. Aunque nuestra serie de tumores sea relativamente pequeña, los resultados están dentro del rango descrito en otras series, en las cuales el porcentaje de tumores asociados a *BRCA1* con un fenotipo basal definido por marcadores inmunohistoquímicos y plataformas de análisis genómicos varía del 44 al 100%^{17, 47, 54, 61, 85, 91, 136, 142, 146, 175}. Es importante resaltar que en nuestro estudio hemos utilizado la técnica *goldstandard* para definir el fenotipo basal, al igual que ocurre en el estudio de van't Veer y que, a pesar de ser dos series de tamaño similar, en nuestro estudio solo el 60% de los tumores BRCA1 presentan fenotipo basal, mientras que en el de van't Veer el porcentaje es prácticamente del 100%. Todavía no se sabe por qué algunos tumores BRCA1 evolucionan hacia un fenotipo basal y otros no, pero una hipótesis es que podría depender del tipo de mutación germinal y por lo tanto el porcentaje podría variar entre poblaciones.

En cualquier caso, es importante profundizar en este campo, debido a las repercusiones que puede tener de cara al tratamiento de las pacientes. Por un lado, verificamos que el porcentaje de tumores basales no es tan alto con respecto a lo descrito en otras series. Dado que la mayoría de los tumores basales son triple-negativos (RE-, RP- y HER2-), eso podría suponer que un porcentaje más alto de lo esperado podría beneficiarse de terapias hormonales y anti-HER2 utilizadas de manera rutinaria en el tratamiento del cáncer de mama. También, el diseño de

nuevas dianas terapéuticas para estas pacientes podría centrarse en un transcriptoma más afinado, considerando el grupo de tumores BRCA1 como una clase heterogénea y, posiblemente, con implicaciones clínicas distintas.

2.1. FIRMAS MOLECULARES ASOCIADAS A LOS TUMORES BRCA1

Además de la clasificación global por *ESR1* o por marcadores basales, este estudio revela una complejidad extra de los tumores BRCA1. El enriquecimiento en genes relacionados con la transcripción dependiente de ADN, ciclo celular y directa o indirectamente regulados por RE fue detectado en los genes diferencialmente expresados en el grupo de tumores BRCA1 *ESR1*-positivos (Lista #1). Estudios recientes han sugerido que procesos relacionados con proliferación celular y señalización mediada por estrógenos tienen un papel crucial en el pronóstico del cáncer de mama^{178, 186}. El análisis de algunos de los genes de la Lista#1 en una serie externa compuesta de 56 tumores de mama esporádicos RE-positivos, reveló un grupo de tumores con una represión significativa de genes involucrados en ciclo celular¹⁷⁵ (Figura 19) que no presentaban angiogénesis o metástasis. Uno de los genes sobre-expresados en la Lista #1, miembro de la familia *EGFR*, fue *ERBB3*⁸³. En un estudio reciente, Lee *et al.*⁹⁶ analizó 378 tumores de mama ductales invasivos mediante un panel de anticuerpos. Encontraron una asociación entre la expresión de *ERBB3* y el estatus positivo tanto para RE como para RP y una correlación inversa con el grado tumoral lo que es concordante con nuestros hallazgos.

El hecho de que los genes de la Lista #1 puedan correlacionarse con un pronóstico más favorable, puede indicar que los tumores BRCA1 que no son basales también puedan tener un mejor pronóstico dentro de los tumores ER positivos. Posteriormente pudimos comprobar que nuestros tumores BRCA1 no basales, tenían fenotipo Luminal A, que se ha descrito como el de mejor pronóstico dentro de los fenotipos moleculares y con represión de genes involucrados en ciclo celular y proliferación¹⁵⁶.

Dos de los 31 genes más diferencialmente entre las Listas #1 y #2, cuya expresión diferencial fue validada en una serie de tumores BRCA1 independiente (ver apartado 1.1.2) fueron *MMP7* y *CD133*. *MMP7*, pertenece a una familia de, al menos, once enzimas involucradas en la remodelación tanto del tejido normal como neoplásico, y su sobre-expresión ha sido asociada con la capacidad de invasión en distintos tipos de tumores^{31, 100, 139}. La sobre-expresión de *MMP7* en los tumores *BRCA1 ESR1*-negativos podría relacionarse con un comportamiento más agresivo,

debido a un incremento en el potencial de migración celular y metástasis a través de la degradación de la matriz extracelular y resistencia a los estímulos apoptóticos³¹. La función de CD133, una glicoproteína de membrana, localizada en las proyecciones de la misma, permanece aún sin elucidar pero se especula que puede participar en la regulación de la topología de la membrana. Se acepta la idea de que niveles altos de CD133 son marcadores de linajes celulares como las células troncales-like, y la expresión de esta proteína en sangre periférica se correlaciona con metástasis en hueso^{111, 118, 151}. Nuestros datos demuestran que los tumores BRCA1 con fenotipo basal sobre-expresan tanto ARNm como la proteína CD133, apoyando la idea de un posible origen en las células troncales en este tipo de tumor¹¹² sugiriendo que los pacientes en esta condición presentarían un pronóstico menos favorable que aquellos con niveles bajos o indetectables^{11, 57}.

2.2. LA RESPUESTA INMUNE

El análisis de aquellos genes más diferencialmente expresados en los tumores BRCA1 *ESR1*-negativos (Lista #2) reveló un enriquecimiento de genes involucrados en la respuesta inmune además de ciclo celular. Recientemente, Teschendorff *et al.*¹⁶⁷ ha descrito cinco sub-clases tumorales dentro de los tumores RE-negativos que podían ser diferenciadas según el patrón de cuatro grupos de perfiles transcripcionales asociados a Ciclo Celular, Respuesta Inmune, Matriz Extracelular y respuesta a Hormonas Esteroideas. Estos grupos fueron relacionados con la evolución clínica de los pacientes y se observó una asociación clara entre la sobre-expresión de genes de la respuesta inmune y un mejor pronóstico, independiente de la infiltración linfocítica. En el mismo estudio, los autores analizaron la serie de 18 tumores BRCA1 ER-negativos publicados por van't Veer y colaboradores¹⁷⁵, y verificaron que estos presentaban una elevada similitud con la clase de tumores esporádicos con sobre-expresión de las firmas de Ciclo Celular y Respuesta Inmune.

Este resultado está en concordancia con nuestros hallazgos, y nos llevó a hipotetizar que con la firma molecular originada se podría identificar un grupo de tumores con un pronóstico favorable dentro de los tumores BRCA1 RE-negativos. Dado que carecíamos de los datos clínicos como la evolución de las pacientes incluídas en nuestro estudio, llevamos a cabo un análisis del comportamiento de la Lista #2 en una serie independiente previamente publicada. Utilizando una aproximación similar a la utilizada para la Lista #1, analizamos el transcriptoma de la Lista #2 en

los dieciocho tumores BRCA1 publicados por van't Veer y colaboradores¹⁷⁵ y vimos que cuando aplicamos nuestra firma molecular en estos tumores, las muestras se clasificaban, mayoritariamente, según la presencia o de infiltrado linfocítico y ausencia de angioinvasión (Figura 18). El infiltrado linfocítico es conocido como un factor asociado al pronóstico favorable^{2, 95, 110, 124, 144}, y un estudio reciente publicado por Kreike *et al.*⁸⁴ centrado en los tumores de mama esporádicos triplo-negativos (RE, RP y HER2 negativos) reveló que la supervivencia libre de metástasis en los 5 años en pacientes con infiltrado linfocítico moderado o intenso en sus tumores fue del 88%, bastante más elevado que en aquellos con infiltrado mínimo o ausente. En nuestro caso, no fuimos capaces de determinar si la firma molecular podría predecir la evolución clínica de los pacientes independientemente del infiltrado linfocítico, dada la casi perfecta correlación encontrada entre infiltrado linfocítico y ausencia de angioinvasión. Sin embargo, nuestros resultados arrojan evidencias de que la activación de genes responsables de desencadenar la respuesta inmune podría jugar un papel clave en el pronóstico de las pacientes asociadas a tumores BRCA1-*ESR1*-negativo

2.3. PAPEL DE NFKB EN LA REGULACIÓN DE LAS FIRMAS MOLECULARES ASOCIADAS AL GEN *BRCA1*

Analizando qué posibles factores de transcripción podrían estar controlando estas firmas moleculares, encontramos que la Lista #2, obtenida de los tumores BRCA1 *ESR1*-negativos, presentaba un enriquecimiento de genes regulados por el complejo NFkB y sobre-expresión de dos genes de esta familia, *NFkB2* y *RELB* (Figura 17B).

El Factor Nuclear *kappa* B es un factor de transcripción ubicuo que coordina distintos productos génicos como moléculas de adhesión celular, quimiocinas, citoquinas, factores de crecimiento y reguladores de la apoptosis²⁴. Niveles aberrantes de sub-unidades de NFkB (*NFkB3* y *NFkB1*) son encontrados en un elevado porcentaje de varios tipos de cáncer de mama y está inversamente correlacionado al estatus del RE¹⁷⁸, lo que es consistente con nuestros hallazgos. La activación de la vía NFkB ha sido relacionada con la evolución tumoral, sin embargo, se han descrito efectos contrarios con respecto a la progresión tumoral especialmente en células epiteliales⁷⁹.

2.4. LA HETEROGENEIDAD PRESENTE DENTRO DE LOS TUMORES BRCA1 *ESR1*-NEGATIVOS

Como ya hemos comentado, la sobre-expresión de genes relacionados con la respuesta inmune fue una de las características intrínsecas de los tumores BRCA1 *ESR1*-negativos estudiados en nuestra serie. Observamos además que según la magnitud de la sobre-expresión de estos genes, los tumores se estratificaban en dos sub-grupos diferentes (A y B), que también podían ser clasificados según los niveles de expresión de los genes del complejo REL/NFκB. Se observó que la correlación se mantenía también al analizar los valores de expresión de genes diana de NFκB como los genes involucrados en apoptosis *PYCARD*, *BCL2A1*, *CASP4*, *TRAF1* and *TRAF2*¹² y otros, como los involucrados en la cascada de la transcripción y de activación de procesos inmunológicos (*CCR5*, *CD48*, *NFKB2*, y *RELB*).

Hay una discordancia ampliamente discutida a cerca de la evolución clínica de los pacientes portadores de mutación en *BRCA1*^{4, 17, 39, 45, 74, 142, 145, 163}, dado que no todos han confirmado una supervivencia disminuida asociada a pacientes con tumores BRCA1 RE-negativos, lo que sería esperado dada la sobre-representación del fenotipo basal. Según nuestros resultados, especulamos que una posible explicación podría residir en la existencia de, al menos, dos sub-grupos con distintos pronóstico, producidos tanto por los niveles de expresión de los genes relacionados con NFκB, como por aquellos involucrados en la respuesta inmune.

Se ha sugerido que BRCA1 se comporta como un co-activador de NFκB¹². Es importante resaltar que todos los tumores del grupo *ESR1*-negativo en el grupo A que mostraron niveles más bajos de transcritos del complejo NFκB y sus genes diana, portaban mutaciones en la región central de *BRCA1*, las cuales se piensa que activan el mecanismo de degradación de ARNm mediado por codón de parada prematuro¹³⁴ (*Nonsense Mediated mRNA Decay, NMD*) (Tabla 2), lo cual lleva a una ausencia completa de la proteína BRCA1 en el tumor. Por otra parte, la línea celular mutante para *BRCA1*, MDA-MB-436, que presenta niveles mínimos de mRNA de *BRCA1* medidos por RT-qPCR, mostró el mismo patrón de expresión de genes relacionados a *NFκB* que lo encontrado en tumores *BRCA1 ESR1*-negativos del grupo A.

No obstante, un 60% de los tumores *ESR1*-negativos (grupo B) que presentaban los niveles más elevados de *NFKB2* y *RELB*, poseían mutaciones en *BRCA1* que no activan el mecanismo *NMD*, pudiendo generar una proteína aberrante pero conservando determinadas actividades como la capacidad de activar la maquinaria NFκB. Indudablemente el número de casos analizados es muy pequeño y podemos solamente especular, sin embargo, las implicaciones

de estos resultados, si se confirman, podrían ser relevantes en el pronóstico de los portadores de mutación en *BRCA1*, según el tipo de alteración germinal presentada.

2.5. ANÁLISIS INTEGRADOR DE LAS FIRMAS MOLECULARES BRCA1

Realizamos un análisis de alto nivel de las firmas moleculares de *BRCA1* utilizando datos de los sitios de unión a factores de transcripción y la red de interacciones de proteínas humana. Además, examinamos las interacciones de las vías moleculares involucradas en los dos Listas, #1 y #2, identificadas para *ESR1*-positivo y *ESR1*-negativo y encontramos una fuerte correlación con las firmas moleculares anteriormente descritas. Este es el primer estudio de alto nivel de firmas moleculares de cáncer de mama hereditario que se lleva a cabo y revela la existencia de, por lo menos, dos módulos principales: en la Lista #1, de tumores *ESR1*-positivos, hemos confirmado que el RE es el principal regulador de distintos genes y está, claramente, involucrado en la proliferación celular; el segundo modulo está representado por el enriquecimiento de genes de la respuesta inmune/relacionados con NFkB.

3. CARACTERIZACIÓN DE LOS TUMORES ASOCIADOS A BRCA

En el caso de los tumores BRCA, nuestro estudio representa el segundo estudio de perfiles de expresión génica y el primero donde se realiza un análisis de redes génicas y protéicas además de disponer de una serie amplia de tumores esporádicos utilizados como controles.

3.1. LA EXISTENCIA DE SUB-GRUPOS BRCA

Hemos visto que, basándonos en el transcriptoma completo de estos tumores (6,375 genes), aquellos clasificados como BRCA se pueden dividir en, al menos, dos subgrupos que hemos llamado BRCA-A y BRCA-B. Como ya se ha mencionado, la heterogeneidad dentro de este grupo era esperada y además es concordante con el único trabajo previamente publicado, analizando el perfil de expresión de una serie de tumores BRCA de tamaño similar a la nuestra⁶⁰, donde los autores proponen que al menos se podrían dividir en 2 subgrupos, molecularmente distinguibles. Ellos suponen de la posible existencia de otros subgrupos pero, como ocurre en nuestro estudio, la dificultad de recopilar este tipo de muestras limita el tamaño muestral y por tanto el diseño del análisis. En cuanto a los genes diferencialmente expresados en cada grupo, Hedenfalk y colaboradores encuentran enriquecimiento en genes ribosomales, proponiendo que la capacidad de biosíntesis de proteínas sería una de las principales diferencias entre las dos clases de tumores BRCA descritas. De manera análoga, modificaciones pos-traduccionales del RNA y síntesis de proteínas son dos de las vías moleculares más representadas cuando analizamos las vías diferencialmente enriquecidas entre los dos grupos descritos por nosotros (sobrerrepresentada en el grupo BRCA-B). Merece la pena resaltar esta concordancia, dadas las importantes diferencias existentes entre los dos estudios, no solamente en cuanto a la plataforma utilizada si no también, en cuanto al método de análisis de datos.

3.2. LOS TUMORES BRCA SE CLASIFICAN SEGÚN LOS FENOTIPOS MOLECULARES ESTABLECIDOS EN EL CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO

Una diferencia clave entre nuestro estudio y el publicado por Hedenfalk y colaboradores, es que ellos no analizaron la presencia de los fenotipos moleculares definidos por Perou *et al.*, pocos años antes. Posteriormente se ha sugerido, en base a los perfiles genómicos e

inmunohistoquímicos de los tumores BRCA1, que estos podrían ser clasificados en los mismos cinco subtipos intrínsecos que los tumores esporádicos^{113, 129}.

Por lo tanto, no podíamos descartar que las dos clases de tumores BRCA1 encontrados por el grupo de Hedenfalk, así como los subgrupos aquí descritos, estuviesen reflejando, solamente, los fenotipos moleculares de los tumores de mama. Al analizar el comportamiento de nuestra serie de tumores BRCA1 con un grupo de 22 tumores esporádicos, los mismos grupos BRCA1-A y BRCA1-B se mantuvieron prácticamente iguales cuando repetimos el análisis de remuestreo con los 6,375 genes, confirmando que los dos grupos eran robustos y que no habían sido generados por casualidad por el bajo tamaño muestral.

Sin embargo, observamos que el grupo BRCA1-B compartía un alto nivel de similitud con un grupo de tumores esporádicos (llamado SPO-1, ver Figura 22), mientras que el grupo BRCA1-A se mantuvo como un grupo homogéneo, distinto de BRCA1-B y de los demás esporádicos. Esto nos llevó a pensar que tal vez el grupo BRCA1-A podría compartir una o varias alteraciones genéticas comunes que los haría diferentes al resto, mientras que el fondo genético responsable de la susceptibilidad en el grupo BRCA1-B, no los haría distinguibles de los demás a un nivel somático.

3.3. LOS TUMORES BRCA1 SE CLASIFICAN SEGÚN LOS FENOTIPOS MOLECULARES ESTABLECIDOS EN EL CÁNCER DE MAMA ESPORÁDICO

A pesar de lo comentado hasta ahora, seguíamos sin poder descartar que todos los grupos definidos hasta el momento dentro de los tumores esporádicos y BRCA1, no estuvieran reflejando otra cosa que los distintos fenotipos moleculares. Por ello, nuestro siguiente paso fue evaluar los niveles de expresión del grupo de genes llamado PAM50¹³¹, que han sido definidos recientemente como los que mejor discriminan los cinco fenotipos moleculares principales. Los 38 genes (76%) presentes en nuestro microarray nos permitieron clasificar nuestra serie de tumores BRCA1, BRCA1 y esporádicos en, por lo menos, tres de los subtipos conocidos: Basal, Luminal A y Luminal B. Todos los tumores BRCA1 y la mayoría de los esporádicos, resultaron tener un perfil luminal (luminal A o luminal B), mientras que el grupo de tumores basales estaba representado básicamente por los BRCA1-*ESR1*-negativos que habían sido clasificados como tales previamente (ver apartado 3.4 de resultados y Figura 22). Mas concretamente, los tumores BRCA1-A resultaron en su mayoría, Luminales A, al igual que el grupo SPO-3 mientras que los BRCA1-B fueron en su

mayoría Luminales B, al igual que el grupo SPO-1 con el que también compartían similitud a nivel del transcriptoma completo. De estos resultados se derivan varias ideas interesantes.

Por una parte se confirma la hipótesis de que los tumores BRCAX son similares a los esporádicos, en cuanto a que se pueden distribuir a lo largo de los fenotipos moleculares establecidos; como se ha comentado anteriormente, esto es algo que ya se había propuesto previamente mediante estudios de IHQ y arrays de CGH^{68, 113}, pero esta es la primera vez que se confirma con un microarray de expresión, que se considera la técnica *gold standard* para definir los fenotipos.

Por otro lado, en nuestra serie, encontramos que la mayoría de los tumores BRCAX presentan un fenotipo luminal A o luminal B; esto no descarta que otros fenotipos estén representados dentro de los tumores BRCAX, ya que disponemos de una serie pequeña, pero sí sugiere que dentro de los BRCAX podría haber dos grupos con distinta respuesta clínica, como ya se sabe que tienen los tumores esporádicos con fenotipo Luminal A y Luminal B¹⁵⁶. Lamentablemente, la falta de datos clínicos en nuestra serie, no nos permite comprobarlo, pero es una hipótesis que puede ser interesante para tratar de investigar en el futuro.

Por último, combinando el análisis de transcriptoma completo (ver apartado anterior) con el análisis de fenotipos, nos encontramos con que BRCAX-B es similar al grupo de esporádicos SPO-3 tanto a nivel de fenotipo como de transcriptoma completo, mientras que BRCAX-A se parece a los esporádicos solo a nivel de fenotipo, sugiriendo que en este grupo pueda haber alteraciones genéticas adicionales, reflejo quizás de una alteración concreta, específica de este grupo, a nivel germinal.

3.4. LA VÍA DE SUSCEPTIBILIDAD BRCAX

Como ya se ha expuesto, la base genética que explica la mayoría de los casos BRCAX permanece aún sin explicar y en concreto, no se ha identificado ningún gen de alto riesgo específicamente implicado en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario además de *BRCA1* y *BRCA2*.

En este análisis de expresión, hemos identificado un grupo de tumores BRCAX (BRCAX-A) que parecen mostrar una serie de alteraciones genómicas que los diferencian del otro grupo de BRCAX identificado (BRCAX-B) así como de los tumores esporádicos. Estas diferencias residen

principalmente en los 157 genes (Tabla suplementaria S5) que muestran diferencias de expresión estadísticamente significativas ($FDR < 0,05$) entre el grupo BRCAX-A y el grupo SPO-3, que es el más similar a nivel de fenotipo. Este perfil de 157 genes, efectivamente parece ser específico del grupo BRCAX-A frente al resto de los tumores, pero sorprendentemente es compartido por los tumores BRCA1, independientemente de su fenotipo (basal o luminal A) (Figura 23).

Se ha sugerido que algunos tumores BRCAX podrían compartir similitudes con los tumores BRCA1 a un nivel fenotípico (fenotipo basal, por ejemplo) debido a la posible presencia de mutaciones germinales no identificadas en *BRCA1* o inactivación bialélica del gen *BRCA1* a nivel somático^{68, 113}. En nuestro estudio, utilizando los perfiles de expresión, hemos encontrado un grupo de genes alterados que parecen tener en común los grupos BRCAX-A y BRCA1, más allá del fenotipo, que podrían reflejar que la alteración germinal causante de la susceptibilidad en los tumores BRCAX-A, en algún punto, converge con la vía de *BRCA1*. Además, 21 de los 146 (15%) genes que pudieron ser analizados en cuanto a sus conexiones funcionales, resultaron tener una interacción directa con la vía molecular “*Papel de BRCA1 en la Respuesta al Daño al ADN*” bien por estar ubicados en la propia vía, o bien a través de interactores directos de *BRCA1* como es TP53, *Rb* o *E2F* (Figura 24), constituyendo lo que hemos denominado “*La Vía de Susceptibilidad BRCAX*”. Algunos de los genes son particularmente interesantes, como *MSH4* que está implicado en el proceso de reparación de roturas de cadena doble de ADN mediante recombinación homóloga⁶²; *FANCG*, que es un componente de la vía FA-BRCA y ha sido descrito como interactivo directo de *BRCA2*; o TFIIE, el cual es parte del complejo de la ARN polimerasa II al igual que *BRCA1*¹⁴⁹ y de cual su expresión ha sido recientemente descrita como regulada por *BRCA1*⁷¹.

La resolución de nuestra plataforma no nos permite identificar genes concretos candidatos a ser analizados como posibles genes de susceptibilidad, pero sí apuntar a una vía de señalización, en este caso la vía de *BRCA1*, como de interés para acotar la búsqueda de tales genes. Recientemente se han identificado algunas variantes de moderado riesgo, que podrían explicar en conjunto hasta un 5% de los casos hereditarios. Son las variantes en los genes *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1/FANCI* y *PALB2/FANCD1*. Es importante resaltar que todos estos genes están funcionalmente relacionados con *BRCA1* y/o *BRCA2*, lo que apoya nuestra idea. Sin embargo, somos conscientes de que es imprescindible validar estos resultados en una serie independiente más amplia de tumores BRCAX.

Conclusiones

1. Hemos encontrado que cada uno de los tres grupos de tumores de mama hereditarios BRCA1, BRCA2 y BRCAX presenta heterogeneidad intrínseca en cuanto a las alteraciones somáticas moleculares que presentan. Sus perfiles de expresión revelan una complejidad mayor de la esperada, que no nos ha permitido identificar un grupo discreto de marcadores que permita distinguir de una forma específica los tres grupos de tumores.
2. Los tumores de pacientes con mutaciones germinales en el gen *BRCA1* se dividen al menos en dos grupos principales según su perfil transcripcional, que están claramente determinados por la presencia de fenotipo basal o luminal A respectivamente.
3. Los tumores BRCA1 con fenotipo basal presentan un enriquecimiento en genes alterados relacionados con la respuesta inmune y el ciclo celular, que se ha descrito previamente como una firma asociada con buen pronóstico dentro de los tumores ER negativos. Esta sobre-expresión de genes relacionados con la respuesta inmune podría estar mediada a su vez por la sobre-expresión de genes del complejo NFkB.
4. Los tumores BRCA1 con fenotipo basal, se pueden estratificar en otros dos sub-grupos según la magnitud de la sobre-expresión de los genes de la respuesta inmune y el complejo NFkB. La mayor o menor expresión de estos genes podría estar mediada por el tipo de mutación germinal en *BRCA1*.
5. Los tumores asociados a mutaciones en el gen *BRCA2* se presentaron como el grupo más heterogéneo en base a sus perfiles de expresión génica. El bajo tamaño muestral no nos permitió profundizar en las bases moleculares responsables de esta aparente heterogeneidad, pero es un tema de interés para futuros estudios.
6. Dentro de los tumores BRCAX hemos encontrado al menos dos sub-grupos distintos en base a su perfil transcripcional, que hemos llamado BRCAX-A y BRCAX-B. Este resultado concuerda con el único análisis de expresión previo realizando en una serie de tumores BRCAX de tamaño similar y confirma que estos tumores son heterogéneos a nivel genómico, probablemente porque también lo son a nivel genético.
7. Hemos clasificado por primera vez mediante un estudio de perfil de expresión, los tumores BRCAX según los fenotipos moleculares definidos para el cáncer de mama esporádico. Hemos demostrado que a este nivel, los tumores BRCAX y esporádicos son similares. Los tumores BRCAX-A fueron clasificados mayoritariamente como luminales A, mientras que los BRCAX-B lo fueron como luminales B, lo que sugiere que los dos sub-grupos BRCAX podrían tener diferente respuesta clínica.
8. El grupo BRCAX-B es idéntico al grupo de esporádicos luminal B, tanto a nivel de fenotipo como de transcriptoma completo. El grupo BRCAX-A se parece al grupo de esporádicos luminal A solo a nivel de fenotipo, existiendo en este grupo alteraciones genómicas adicionales, reflejo quizás de una alteración concreta, específica de este grupo, a nivel germinal.

9. Proponemos a través del análisis funcional del perfil de expresión de los tumores BRCA1-A, la vía de señalización relacionada con *BRCA1* como candidata para la búsqueda de nuevos genes responsables de la susceptibilidad en este grupo.

Bibliografía

1. Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Tarraga, J., Montaner, D., Alloza, E., Vaquerizas, J.M., Conde, L., Blaschke, C., Vera, J. & Dopazo, J. (2006): BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. Nucleic Acids Res **34**, W472-6.
2. Alexe, G., Dalgin, G.S., Scandfeld, D., Tamayo, P., Mesirov, J.P., Delisi, C., Harris, L., Barnard, N., Martel, M., Levine, A.J., Ganesan, S. & Bhanot, G. (2007): High expression of lymphocyte-associated genes in node-negative HER2+ breast cancers correlates with lower recurrence rates. Cancer Res **67**, 10669-76.
3. Alvarez, S., Diaz-Uriarte, R., Osorio, A., Barroso, A., Melchor, L., Paz, M.F., Honrado, E., Rodriguez, R., Urioste, M., Valle, L., Diez, O., Cigudosa, J.C., Dopazo, J., Esteller, M. & Benitez, J. (2005): A predictor based on the somatic genomic changes of the BRCA1/BRCA2 breast cancer tumors identifies the non-BRCA1/BRCA2 tumors with BRCA1 promoter hypermethylation. Clin Cancer Res **11**, 1146-53.
4. Ansquer, Y., Gautier, C., Fourquet, A., Asselain, B. & Stoppa-Lyonnet, D. (1998): Survival in early-onset BRCA1 breast-cancer patients. Institut Curie Breast Cancer Group. Lancet **352**, 541.
5. Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D.M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjakoski, K., Kallioniemi, O.P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D.G. & Easton, D.F. (2003): Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. Am J Hum Genet **72**, 1117-30.
6. Antoniou, A.C. & Easton, D.F. (2003): Polygenic inheritance of breast cancer: Implications for design of association studies. Genet Epidemiol **25**, 190-202.
7. Antoniou, A.C., Sinilnikova, O.M., Simard, J., Leone, M., Dumont, M., Neuhausen, S.L., Struwing, J.P., Stoppa-Lyonnet, D., Barjhoux, L., Hughes, D.J., Coupier, I., Belotti, M., Lasset, C., Bonadona, V., Bignon, Y.J., Rebbeck, T.R., Wagner, T., Lynch, H.T., Domchek, S.M., Nathanson, K.L., Garber, J.E., Weitzel, J., Narod, S.A., Tomlinson, G., Olopade, O.I., Godwin, A., Isaacs, C., Jakubowska, A., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Byrski, T., Huzarski, T., Peock, S., Cook, M., Baynes, C., Murray, A., Rogers, M., Daly, P.A., Dorkins, H., Schmutzler, R.K., Vermold, B., Engel, C., Meindl, A., Arnold, N., Niederacher, D., Deissler, H., Spurdle, A.B., Chen, X., Waddell, N., Cloonan, N., Kirchoff, T., Offit, K., Friedman, E., Kaufmann, B., Laitman, Y., Galore, G., Rennert, G., Lejbkowitz, F., Raskin, L., Andrulis, I.L., Ilyushik, E., Ozcelik, H., Devilee, P., Vreeswijk, M.P., Greene, M.H., Prindiville, S.A., Osorio, A., Benitez, J., Zikan, M., Szabo, C.I., Kilpivaara, O., Nevanlinna, H., Hamann, U., Durocher, F., Arason, A., Couch, F.J., Easton, D.F. & Chenevix-Trench, G. (2007): RAD51 135G-->C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. Am J Hum Genet **81**, 1186-200.
8. Antoniou, A.C., Spurdle, A.B., Sinilnikova, O.M., Healey, S., Pooley, K.A., Schmutzler, R.K., Vermold, B., Engel, C., Meindl, A., Arnold, N., Hofmann, W., Sutter, C., Niederacher, D., Deissler, H., Caldes, T., Kampjarvi, K., Nevanlinna, H., Simard, J., Beesley, J., Chen, X., Neuhausen, S.L., Rebbeck, T.R., Wagner, T., Lynch, H.T., Isaacs, C., Weitzel, J., Ganz, P.A., Daly, M.B., Tomlinson, G., Olopade, O.I., Blum, J.L., Couch, F.J., Peterlongo, P., Manoukian, S., Barile, M., Radice, P., Szabo, C.I., Pereira, L.H., Greene, M.H., Rennert, G., Lejbkowitz, F., Barnett-Griness, O., Andrulis, I.L., Ozcelik, H., Gerdes, A.M., Caligo, M.A., Laitman, Y., Kaufman, B., Milgrom, R., Friedman, E., Domchek, S.M., Nathanson, K.L., Osorio, A., Llort, G., Milne, R.L., Benitez, J., Hamann, U.,

Hogervorst, F.B., Manders, P., Ligtenberg, M.J., van den Ouweland, A.M., Peock, S., Cook, M., Platte, R., Evans, D.G., Eeles, R., Pichert, G., Chu, C., Eccles, D., Davidson, R., Douglas, F., Godwin, A.K., Barjhoux, L., Mazoyer, S., Sobol, H., Bourdon, V., Eisinger, F., Chompret, A., Capoulade, C., Bressac-de Paillerets, B., Lenoir, G.M., Gauthier-Villars, M., Houdayer, C., Stoppa-Lyonnet, D., Chenevix-Trench, G. & Easton, D.F. (2008): Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Am J Hum Genet **82**, 937-48.

9. Armes, J.E., Egan, A.J., Southey, M.C., Dite, G.S., McCredie, M.R., Giles, G.G., Hopper, J.L. & Venter, D.J. (1998): The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population-based study. Cancer **83**, 2335-45.

10. Armes, J.E., Trute, L., White, D., Southey, M.C., Hammet, F., Tesoriero, A., Hutchins, A.M., Dite, G.S., McCredie, M.R., Giles, G.G., Hopper, J.L. & Venter, D.J. (1999): Distinct molecular pathogeneses of early-onset breast cancers in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a population-based study. Cancer Res **59**, 2011-7.

11. Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D. & Rich, J.N. (2006): Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature **444**, 756-60.

12. Benezra, M., Chevallier, N., Morrison, D.J., MacLachlan, T.K., El-Deiry, W.S. & Licht, J.D. (2003): BRCA1 augments transcription by the NF-kappaB transcription factor by binding to the Rel domain of the p65/RelA subunit. J Biol Chem **278**, 26333-41.

13. Bergman, A., Flodin, A., Engwall, Y., Arkblad, E.L., Berg, K., Einbeigi, Z., Martinsson, T., Wahlstrom, J., Karlsson, P. & Nordling, M. (2005): A high frequency of germline BRCA1/2 mutations in western Sweden detected with complementary screening techniques. Fam Cancer **4**, 89-96.

14. Bergman, A., Karlsson, P., Berggren, J., Martinsson, T., Bjorck, K., Nilsson, S., Wahlstrom, J., Wallgren, A. & Nordling, M. (2007): Genome-wide linkage scan for breast cancer susceptibility loci in Swedish hereditary non-BRCA1/2 families: suggestive linkage to 10q23.32-q25.3. Genes Chromosomes Cancer **46**, 302-9.

15. Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Charafe-Jauffret, E., Mamessier, E., Adelaide, J., Debono, S., Houvenaeghel, G., Maraninchi, D., Viens, P., Charpin, C., Jacquemier, J. & Birnbaum, D. (2006): Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. Cancer Res **66**, 4636-44.

16. Blanquet, V., Turleau, C., Gross-Morand, M.S., Senamaud-Beaufort, C., Doz, F. & Besmond, C. (1995): Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. Hum Mol Genet **4**, 383-8.

17. Bonadona, V., Dussart-Moser, S., Voirin, N., Sinilnikova, O.M., Mignotte, H., Mathevet, P., Bremond, A., Treilleux, I., Martin, A., Romestaing, P., Raudrant, D., Rudigoz, R.C., Lenoir, G.M. & Lasset, C. (2007): Prognosis of early-onset breast cancer based on BRCA1/2 mutation status in a French population-based cohort and review. Breast Cancer Res Treat **101**, 233-45.

18. Butt, A.J., Sutherland, R.L. & Musgrove, E.A. (2007): Live or let die: oestrogen regulation of survival signalling in endocrine response. Breast Cancer Res **9**, 306.

19. Calza, S., Hall, P., Auer, G., Bjohle, J., Klaar, S., Kronenwett, U., Liu, E.T., Miller, L., Ploner, A., Smeds, J., Bergh, J. & Pawitan, Y. (2006): Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. Breast Cancer Res **8**, R34.
20. Carreira, A., Hilario, J., Amitani, I., Baskin, R.J., Shivji, M.K., Venkitaraman, A.R. & Kowalczykowski, S.C. (2009): The BRC repeats of BRCA2 modulate the DNA-binding selectivity of RAD51. Cell **136**, 1032-43.
21. Carroll, J.S., Meyer, C.A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T.R., Eeckhoute, J., Brodsky, A.S., Keeton, E.K., Fertuck, K.C., Hall, G.F., Wang, Q., Bekiranov, S., Sementchenko, V., Fox, E.A., Silver, P.A., Gingeras, T.R., Liu, X.S. & Brown, M. (2006): Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. Nat Genet **38**, 1289-97.
22. Catteau, A., Harris, W.H., Xu, C.F. & Solomon, E. (1999): Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. Oncogene **18**, 1957-65.
23. Cheang, M.C., Chia, S.K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P.S., Parker, J.S., Perou, C.M., Ellis, M.J. & Nielsen, T.O. (2009): Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst **101**, 736-50.
24. Chen, F., Castranova, V., Shi, X. & Demers, L.M. (1999): New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. Clin Chem **45**, 7-17.
25. Chen, J., Silver, D.P., Walpita, D., Cantor, S.B., Gazdar, A.F., Tomlinson, G., Couch, F.J., Weber, B.L., Ashley, T., Livingston, D.M. & Scully, R. (1998): Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. Mol Cell **2**, 317-28.
26. Chen, S. & Parmigiani, G. (2007): Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. J Clin Oncol **25**, 1329-33.
27. Cipollini, G., Tommasi, S., Paradiso, A., Aretini, P., Bonatti, F., Brunetti, I., Bruno, M., Lombardi, G., Schittulli, F., Sensi, E., Tancredi, M., Bevilacqua, G. & Caligo, M.A. (2004): Genetic alterations in hereditary breast cancer. Ann Oncol **15 Suppl 1**, I7-I13.
28. Colombo, M., Giarola, M., Mariani, L., Ripamonti, C.B., De Benedetti, V., Sardella, M., Losa, M., Manoukian, S., Peissel, B., Pierotti, M.A., Pilotti, S. & Radice, P. (2008): Cyclin D1 expression analysis in familial breast cancers may discriminate BRCA1 from BRCA2-linked cases. Mod Pathol **21**, 1262-70.
29. Contreras, A. & Sattar, H. (2009): Lobular neoplasia of the breast: an update. Arch Pathol Lab Med **133**, 1116-20.
30. Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. & Elledge, S.J. (1999): Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. Science **286**, 1162-6.
31. Crawford, H.C., Scoggins, C.R., Washington, M.K., Matrisian, L.M. & Leach, S.D. (2002): Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. J Clin Invest **109**, 1437-44.
32. Crook, T., Brooks, L.A., Crossland, S., Osin, P., Barker, K.T., Waller, J., Philp, E., Smith, P.D., Yulug, I., Peto, J., Parker, G., Allday, M.J., Crompton, M.R. & Gusterson, B.A. (1998): p53 mutation

with frequent novel condons but not a mutator phenotype in BRCA1- and BRCA2-associated breast tumours. Oncogene **17**, 1681-9.

33. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P. & Narod, S.A. (2007): Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res **13**, 4429-34.

34. Diez, O., Osorio, A., Duran, M., Martinez-Ferrandis, J.I., de la Hoya, M., Salazar, R., Vega, A., Campos, B., Rodriguez-Lopez, R., Velasco, E., Chaves, J., Diaz-Rubio, E., Jesus Cruz, J., Torres, M., Esteban, E., Cervantes, A., Alonso, C., San Roman, J.M., Gonzalez-Sarmiento, R., Miner, C., Carracedo, A., Eugenia Armengod, M., Caldes, T., Benitez, J. & Baiget, M. (2003): Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. Hum Mutat **22**, 301-12.

35. Dufloth, R.M., Matos, I., Schmitt, F. & Zeferino, L.C. (2007): Tissue microarrays for testing basal biomarkers in familial breast cancer cases. Sao Paulo Med J **125**, 226-30.

36. Dworkin, A.M., Spearman, A.D., Tseng, S.Y., Sweet, K. & Toland, A.E. (2009): Methylation not a frequent "second hit" in tumors with germline BRCA mutations. Fam Cancer **8**, 339-46.

37. Easton, D.F., Bishop, D.T., Ford, D. & Crockford, G.P. (1993): Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet **52**, 678-701.

38. Easton, D.F., *et al.* (2007): Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. Nature **447**, 1087-93.

39. Eerola, H., Vahteristo, P., Sarantaus, L., Kyyronen, P., Pyrhonen, S., Blomqvist, C., Pukkala, E., Nevanlinna, H. & Sankila, R. (2001): Survival of breast cancer patients in BRCA1, BRCA2, and non-BRCA1/2 breast cancer families: a relative survival analysis from Finland. Int J Cancer **93**, 368-72.

40. Ehemann, C.R., Shaw, K.M., Ryerson, A.B., Miller, J.W., Ajani, U.A. & White, M.C. (2009): The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**, 1763-9.

41. Esteller, M., Silva, J.M., Dominguez, G., Bonilla, F., Matias-Guiu, X., Lerma, E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes, I.C., Repasky, E.A., Gabrielson, E., Schutte, M., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000): Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. J Natl Cancer Inst **92**, 564-9.

42. Fernandez-Ramires, R., Sole, X., De Cecco, L., Llorca, G., Cazorla, A., Bonifaci, N., Garcia, M.J., Caldes, T., Blanco, I., Gariboldi, M., Pierotti, M.A., Pujana, M.A., Benitez, J. & Osorio, A. (2009): Gene expression profiling integrated into network modelling reveals heterogeneity in the mechanisms of BRCA1 tumorigenesis. Br J Cancer **101**, 1469-80.

43. Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D.T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., Sobol, H., Teare, M.D., Struwing, J., Arason, A., Scherneck, S., Peto, J., Rebbeck, T.R., Tonin, P., Neuhausen, S., Barkardottir, R., Eyfjord, J., Lynch, H., Ponder, B.A., Gayther, S.A., Zelada-Hedman, M. & *et al.* (1998): Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet **62**, 676-89.

44. Foulkes, W.D., Brunet, J.S., Stefansson, I.M., Straume, O., Chappuis, P.O., Begin, L.R., Hamel, N., Goffin, J.R., Wong, N., Trudel, M., Kapusta, L., Porter, P. & Akslen, L.A. (2004): The

prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. Cancer Res **64**, 830-5.

45. Foulkes, W.D., Chappuis, P.O., Wong, N., Brunet, J.S., Vesprini, D., Rozen, F., Yuan, Z.Q., Pollak, M.N., Kuperstein, G., Narod, S.A. & Begin, L.R. (2000): Primary node negative breast cancer in BRCA1 mutation carriers has a poor outcome. Ann Oncol **11**, 307-13.

46. Foulkes, W.D., Metcalfe, K., Sun, P., Hanna, W.M., Lynch, H.T., Ghadirian, P., Tung, N., Olopade, O.I., Weber, B.L., McLennan, J., Olivotto, I.A., Begin, L.R. & Narod, S.A. (2004): Estrogen receptor status in BRCA1- and BRCA2-related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type. Clin Cancer Res **10**, 2029-34.

47. Foulkes, W.D., Stefansson, I.M., Chappuis, P.O., Begin, L.R., Goffin, J.R., Wong, N., Trudel, M. & Akslen, L.A. (2003): Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. J Natl Cancer Inst **95**, 1482-5.

48. Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L.M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y. & *et al.* (1994): BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. Science **266**, 120-2.

49. Gandhi, T.K., Zhong, J., Mathivanan, S., Karthick, L., Chandrika, K.N., Mohan, S.S., Sharma, S., Pinkert, S., Nagaraju, S., Periaswamy, B., Mishra, G., Nandakumar, K., Shen, B., Deshpande, N., Nayak, R., Sarker, M., Boeke, J.D., Parmigiani, G., Schultz, J., Bader, J.S. & Pandey, A. (2006): Analysis of the human protein interactome and comparison with yeast, worm and fly interaction datasets. Nat Genet **38**, 285-93.

50. Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M. & D'Andrea, A.D. (2001): Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. Mol Cell **7**, 249-62.

51. Ghossaini, M. & Pharoah, P.D. (2009): Polygenic susceptibility to breast cancer: current state-of-the-art. Future Oncol **5**, 689-701.

52. Gnarr, J.R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M.H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F.M. & *et al.* (1994): Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. Nat Genet **7**, 85-90.

53. Gonzalez-Neira, A., Rosa-Rosa, J.M., Osorio, A., Gonzalez, E., Southey, M., Sinilnikova, O., Lynch, H., Oldenburg, R.A., van Asperen, C.J., Hoogerbrugge, N., Pita, G., Devilee, P., Goldgar, D. & Benitez, J. (2007): Genomewide high-density SNP linkage analysis of non-BRCA1/2 breast cancer families identifies various candidate regions and has greater power than microsatellite studies. BMC Genomics **8**, 299.

54. Goodwin, P.J., Phillips, K.A. & West, D.W. (2007): Prognosis of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. N Engl J Med **357**, 1555; author reply 1556.

55. Gorski, B., Jakubowska, A., Huzarski, T., Byrski, T., Gronwald, J., Grzybowska, E., Mackiewicz, A., Stawicka, M., Bebenek, M., Sorokin, D., Fiszera-Maliszewska, L., Haus, O., Janiszewska, H., Niepsuj, S., Gozdz, S., Zaremba, L., Posmyk, M., Pluzanska, M., Kilar, E., Czudowska, D., Wasko, B., Miturski, R., Kowalczyk, J.R., Urbanski, K., Szwiec, M., Koc, J., Debniak, B., Rozmiarek, A., Debniak, T., Cybulski, C., Kowalska, E., Toloczko-Grabarek, A., Zajaczek, S., Menkiszak, J., Medrek, K., Masojc, B., Mierzejewski, M., Narod, S.A. & Lubinski, J. (2004): A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. Int J Cancer **110**, 683-6.

56. Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B. & King, M.C. (1990): Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science **250**, 1684-9.
57. Hambarzumyan, D., Squatrito, M. & Holland, E.C. (2006): Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. Cancer Cell **10**, 454-6.
58. Hartman, A.R. & Ford, J.M. (2002): BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. Nat Genet **32**, 180-4.
59. Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., Meltzer, P., Gusterson, B., Esteller, M., Kallioniemi, O.P., Wilfond, B., Borg, A., Trent, J., Raffeld, M., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Dougherty, E., Kononen, J., Bubendorf, L., Fehrle, W., Pittaluga, S., Grubberger, S., Loman, N., Johannsson, O., Olsson, H. & Sauter, G. (2001): Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. N Engl J Med **344**, 539-48.
60. Hedenfalk, I., Ringner, M., Ben-Dor, A., Yakhini, Z., Chen, Y., Chebil, G., Ach, R., Loman, N., Olsson, H., Meltzer, P., Borg, A. & Trent, J. (2003): Molecular classification of familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 2532-7.
61. Hedenfalk, I.A., Ringner, M., Trent, J.M. & Borg, A. (2002): Gene expression in inherited breast cancer. Adv Cancer Res **84**, 1-34.
62. Her, C., Zhao, N., Wu, X. & Tompkins, J.D. (2007): MutS homologues hMSH4 and hMSH5: diverse functional implications in humans. Front Biosci **12**, 905-11.
63. Herrero, J., Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., Mateos, A., Vaquerizas, J.M., Santoyo, J. & Dopazo, J. (2003): GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis. Nucleic Acids Res **31**, 3461-7.
64. Herrero, J., Diaz-Uriarte, R. & Dopazo, J. (2003): Gene expression data preprocessing. Bioinformatics **19**, 655-6.
65. Herrero, J., Vaquerizas, J.M., Al-Shahrour, F., Conde, L., Mateos, A., Diaz-Uriarte, J.S. & Dopazo, J. (2004): New challenges in gene expression data analysis and the extended GEPAS. Nucleic Acids Res **32**, W485-91.
66. Hiripi, E., Lorenzo Bermejo, J., Li, X., Sundquist, J. & Hemminki, K. (2009): Familial association of pancreatic cancer with other malignancies in Swedish families. Br J Cancer.
67. Ho Sui, S.J., Mortimer, J.R., Arenillas, D.J., Brumm, J., Walsh, C.J., Kennedy, B.P. & Wasserman, W.W. (2005): oPOSSUM: identification of over-represented transcription factor binding sites in co-expressed genes. Nucleic Acids Res **33**, 3154-64.
68. Honrado, E., Osorio, A., Milne, R.L., Paz, M.F., Melchor, L., Cascon, A., Urioste, M., Cazorla, A., Diez, O., Lerma, E., Esteller, M., Palacios, J. & Benitez, J. (2007): Immunohistochemical classification of non-BRCA1/2 tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCA families. Mod Pathol **20**, 1298-306.
69. Honrado, E., Osorio, A., Palacios, J. & Benitez, J. (2006): Pathology and gene expression of hereditary breast tumors associated with BRCA1, BRCA2 and CHEK2 gene mutations. Oncogene **25**, 5837-45.
70. Honrado, E., Osorio, A., Palacios, J., Milne, R.L., Sanchez, L., Diez, O., Cazorla, A., Syrjakoski, K., Huntsman, D., Heikkila, P., Lerma, E., Kallioniemi, A., Rivas, C., Foulkes, W.D.,

- Nevanlinna, H. & Benitez, J. (2005): Immunohistochemical expression of DNA repair proteins in familial breast cancer differentiate BRCA2-associated tumors. J Clin Oncol **23**, 7503-11.
71. Horwitz, A.A., Affar el, B., Heine, G.F., Shi, Y. & Parvin, J.D. (2007): A mechanism for transcriptional repression dependent on the BRCA1 E3 ubiquitin ligase. Proc Natl Acad Sci U S A **104**, 6614-9.
72. Howlett, N.G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., Ikeda, H., Fox, E.A. & D'Andrea, A.D. (2002): Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. Science **297**, 606-9.
73. Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M.G., Sawyer, L.R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Ruiz Orrico, A., Dreher, D., Palazzo, J.P., Perreard, L., Nelson, E., Mone, M., Hansen, H., Mullins, M., Quackenbush, J.F., Ellis, M.J., Olopade, O.I., Bernard, P.S. & Perou, C.M. (2006): The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. BMC Genomics **7**, 96.
74. Johannsson, O.T., Ranstam, J., Borg, A. & Olsson, H. (1998): Survival of BRCA1 breast and ovarian cancer patients: a population-based study from southern Sweden. J Clin Oncol **16**, 397-404.
75. Jumppanen, M., Gruvberger-Saal, S., Kauraniemi, P., Tanner, M., Bendahl, P.O., Lundin, M., Krogh, M., Kataja, P., Borg, A., Ferno, M. & Isola, J. (2007): Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. Breast Cancer Res **9**, R16.
76. Kainu, T., Juo, S.H., Desper, R., Schaffer, A.A., Gillanders, E., Rozenblum, E., Freas-Lutz, D., Weaver, D., Stephan, D., Bailey-Wilson, J., Kallioniemi, O.P., Tirkkonen, M., Syrjakoski, K., Kuukasjarvi, T., Koivisto, P., Karhu, R., Holli, K., Arason, A., Johannesdottir, G., Bergthorsson, J.T., Johannsdottir, H., Egilsson, V., Barkardottir, R.B., Johannsson, O., Haraldsson, K., Sandberg, T., Holmberg, E., Gronberg, H., Olsson, H., Borg, A., Vehmanen, P., Eerola, H., Heikkila, P., Pyrhonen, S. & Nevanlinna, H. (2000): Somatic deletions in hereditary breast cancers implicate 13q21 as a putative novel breast cancer susceptibility locus. Proc Natl Acad Sci U S A **97**, 9603-8.
77. Kang, Y., He, W., Tulley, S., Gupta, G.P., Serganova, I., Chen, C.R., Manova-Todorova, K., Blasberg, R., Gerald, W.L. & Massague, J. (2005): Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. Proc Natl Acad Sci U S A **102**, 13909-14.
78. Kapp, A.V., Jeffrey, S.S., Langerod, A., Borresen-Dale, A.L., Han, W., Noh, D.Y., Bukholm, I.R., Nicolau, M., Brown, P.O. & Tibshirani, R. (2006): Discovery and validation of breast cancer subtypes. BMC Genomics **7**, 231.
79. Karin, M. (2006): Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature **441**, 431-6.
80. Key, T.J., Verkasalo, P.K. & Banks, E. (2001): Epidemiology of breast cancer. Lancet Oncol **2**, 133-40.
81. Khatri, P., Voichita, C., Kattan, K., Ansari, N., Khatri, A., Georgescu, C., Tarca, A.L. & Draghici, S. (2007): Onto-Tools: new additions and improvements in 2006. Nucleic Acids Res **35**, W206-11.

82. Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G. & Kallioniemi, O.P. (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med **4**, 844-7.
83. Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. & Aaronson, S.A. (1989): Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. Proc Natl Acad Sci U S A **86**, 9193-7.
84. Kreike, B., van Kouwenhove, M., Horlings, H., Weigelt, B., Peterse, H., Bartelink, H. & van de Vijver, M.J. (2007): Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. Breast Cancer Res **9**, R65.
85. Laakso, M., Loman, N., Borg, A. & Isola, J. (2005): Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. Mod Pathol **18**, 1321-8.
86. Lacey, J.V., Jr., Devesa, S.S. & Brinton, L.A. (2002): Recent trends in breast cancer incidence and mortality. Environ Mol Mutagen **39**, 82-8.
87. Lakhani, S., Easton, D., Stratton, M. & tBCL, C. (1997): Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet **349**, 1505-10.
88. Lakhani, S.R. (1999): The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. J Pathol **187**, 272-8.
89. Lakhani, S.R., Gusterson, B.A., Jacquemier, J., Sloane, J.P., Anderson, T.J., van de Vijver, M.J., Venter, D., Freeman, A., Antoniou, A., McGuffog, L., Smyth, E., Steel, C.M., Haites, N., Scott, R.J., Goldgar, D., Neuhausen, S., Daly, P.A., Ormiston, W., McManus, R., Scherneck, S., Ponder, B.A., Futreal, P.A., Peto, J., Stoppa-Lyonnet, D., Bignon, Y.J. & Stratton, M.R. (2000): The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. Clin Cancer Res **6**, 782-9.
90. Lakhani, S.R., Jacquemier, J., Sloane, J.P., Gusterson, B.A., Anderson, T.J., van de Vijver, M.J., Farid, L.M., Venter, D., Antoniou, A., Storfer-Isser, A., Smyth, E., Steel, C.M., Haites, N., Scott, R.J., Goldgar, D., Neuhausen, S., Daly, P.A., Ormiston, W., McManus, R., Scherneck, S., Ponder, B.A., Ford, D., Peto, J., Stoppa-Lyonnet, D., Bignon, Y.J., Struewing, J.P., Spurr, N.K., Bishop, D.T., Klijn, J.G., Devilee, P., Cornelisse, C.J., Lasset, C., Lenoir, G., Barkardottir, R.B., Egilsson, V., Hamann, U., Chang-Claude, J., Sobol, H., Weber, B., Stratton, M.R. & Easton, D.F. (1998): Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. J Natl Cancer Inst **90**, 1138-45.
91. Lakhani, S.R., Reis-Filho, J.S., Fulford, L., Penault-Llorca, F., van der Vijver, M., Parry, S., Bishop, T., Benitez, J., Rivas, C., Bignon, Y.J., Chang-Claude, J., Hamann, U., Cornelisse, C.J., Devilee, P., Beckmann, M.W., Nestle-Kramling, C., Daly, P.A., Haites, N., Varley, J., Laloo, F., Evans, G., Maugard, C., Meijers-Heijboer, H., Klijn, J.G., Olah, E., Gusterson, B.A., Pilotti, S., Radice, P., Scherneck, S., Sobol, H., Jacquemier, J., Wagner, T., Peto, J., Stratton, M.R., McGuffog, L. & Easton, D.F. (2005): Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. Clin Cancer Res **11**, 5175-80.
92. Lakhani, S.R., Van De Vijver, M.J., Jacquemier, J., Anderson, T.J., Osin, P.P., McGuffog, L. & Easton, D.F. (2002): The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. J Clin Oncol **20**, 2310-8.

93. Lancaster, J.M., Wooster, R., Mangion, J., Phelan, C.M., Cochran, C., Gumbs, C., Seal, S., Barfoot, R., Collins, N., Bignell, G., Patel, S., Hamoudi, R., Larsson, C., Wiseman, R.W., Berchuck, A., Iglehart, J.D., Marks, J.R., Ashworth, A., Stratton, M.R. & Futreal, P.A. (1996): BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. Nat Genet **13**, 238-40.
94. Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J. & Sarasin, A. (2000): BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. Cancer Res **60**, 5548-52.
95. Lee, A.H., Gillett, C.E., Ryder, K., Fentiman, I.S., Miles, D.W. & Millis, R.R. (2006): Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. Histopathology **48**, 692-701.
96. Lee, Y., Cho, S., Seo, J.H., Shin, B.K., Kim, H.K., Kim, I. & Kim, A. (2007): Correlated expression of erbB-3 with hormone receptor expression and favorable clinical outcome in invasive ductal carcinomas of the breast. Am J Clin Pathol **128**, 1041-9.
97. Lerma, E., Peiro, G., Ramon, T., Fernandez, S., Martinez, D., Pons, C., Munoz, F., Sabate, J.M., Alonso, C., Ojeda, B., Prat, J. & Barnadas, A. (2007): Immunohistochemical heterogeneity of breast carcinomas negative for estrogen receptors, progesterone receptors and Her2/neu (basal-like breast carcinomas). Mod Pathol **20**, 1200-7.
98. Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W.W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M.A., Pals, G., Arwert, F., Mathew, C.G., Zdzienicka, M.Z., Hiom, K., De Winter, J.P. & Joenje, H. (2005): The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. Nat Genet **37**, 934-5.
99. Levy-Lahad, E., Catane, R., Eisenberg, S., Kaufman, B., Hornreich, G., Lishinsky, E., Shohat, M., Weber, B.L., Beller, U., Lahad, A. & Halle, D. (1997): Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. Am J Hum Genet **60**, 1059-67.
100. Liu, D., Nakano, J., Ishikawa, S., Yokomise, H., Ueno, M., Kadota, K., Urushihara, M. & Huang, C.L. (2007): Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. Lung Cancer **58**, 384-91.
101. Livasy, C.A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M.S., Olopade, O.I., Moore, D.T. & Perou, C.M. (2006): Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Mod Pathol **19**, 264-71.
102. Livasy, C.A., Perou, C.M., Karaca, G., Cowan, D.W., Maia, D., Jackson, S., Tse, C.K., Nyante, S. & Millikan, R.C. (2007): Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. Hum Pathol **38**, 197-204.
103. Lopez-Abente, G., Pollan, M., Aragonés, N., Pérez-Gómez, B., Hebar, V. & Suárez, B. (2003): Plan Integral del Cáncer: Situación del Cáncer en España. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
104. Lopez-Abente, G., Pollan, M., Vergara, A., Ardanaz, E., Moreo, P., Moreno, C. & Ruiz, M. (2000): [Time trends in cancer incidence in Navarra and Zaragoza, Spain]. Gac Sanit **14**, 100-9.
105. Lynch, B.J., Holden, J.A., Buys, S.S., Neuhausen, S.L. & Gaffney, D.K. (1998): Pathobiologic characteristics of hereditary breast cancer. Hum Pathol **29**, 1140-4.

106. Lynch, H.T., Casey, M.J., Snyder, C.L., Bewtra, C., Lynch, J.F., Butts, M. & Godwin, A.K. (2009): Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. Mol Oncol **3**, 97-137.
107. Ma, C.X., Sanchez, C.G. & Ellis, M.J. (2009): Predicting endocrine therapy responsiveness in breast cancer. Oncology (Williston Park) **23**, 133-42.
108. Magdinier, F., Ribieras, S., Lenoir, G.M., Frappart, L. & Dante, R. (1998): Down-regulation of BRCA1 in human sporadic breast cancer; analysis of DNA methylation patterns of the putative promoter region. Oncogene **17**, 3169-76.
109. Marcus, J.N., Watson, P., Page, D.L., Narod, S.A., Tonin, P., Lenoir, G.M., Serova, O. & Lynch, H.T. (1997): BRCA2 hereditary breast cancer pathophenotype. Breast Cancer Res Treat **44**, 275-7.
110. Marques, L.A., Franco, E.L., Torloni, H., Brentani, M.M., da Silva-Neto, J.B. & Brentani, R.R. (1990): Independent prognostic value of laminin receptor expression in breast cancer survival. Cancer Res **50**, 1479-83.
111. Mehra, N., Penning, M., Maas, J., Beerepoot, L.V., van Daal, N., van Gils, C.H., Giles, R.H. & Voest, E.E. (2006): Progenitor marker CD133 mRNA is elevated in peripheral blood of cancer patients with bone metastases. Clin Cancer Res **12**, 4859-66.
112. Melchor, L. & Benitez, J. (2008): An Integrative Hypothesis about the Origin and Development of Sporadic and Familial Breast Cancer Subtypes. Carcinogenesis.
113. Melchor, L., Honrado, E., Garcia, M.J., Alvarez, S., Palacios, J., Osorio, A., Nathanson, K.L. & Benitez, J. (2007): Distinct genomic aberration patterns are found in familial breast cancer associated with different immunohistochemical subtypes. Oncogene.
114. Melchor, L., Honrado, E., Huang, J., Alvarez, S., Naylor, T.L., Garcia, M.J., Osorio, A., Blesa, D., Stratton, M.R., Weber, B.L., Cigudosa, J.C., Rahman, N., Nathanson, K.L. & Benitez, J. (2007): Estrogen receptor status could modulate the genomic pattern in familial and sporadic breast cancer. Clin Cancer Res **13**, 7305-13.
115. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W. & *et al.* (1994): A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science **266**, 66-71.
116. Milne, R.L., Osorio, A., Cajal, T.R., Vega, A., Llorca, G., de la Hoya, M., Diez, O., Alonso, M.C., Lazaro, C., Blanco, I., Sanchez-de-Abajo, A., Caldes, T., Blanco, A., Grana, B., Duran, M., Velasco, E., Chirivella, I., Cardenosa, E.E., Tejada, M.I., Beristain, E., Miramar, M.D., Calvo, M.T., Martinez, E., Guillen, C., Salazar, R., San Roman, C., Antoniou, A.C., Urioste, M. & Benitez, J. (2008): The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. Clin Cancer Res **14**, 2861-9.
117. Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., Viale, A., Olshen, A.B., Gerald, W.L. & Massague, J. (2005): Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. Nature **436**, 518-24.
118. Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K. & Buck, D.W. (1997): A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. Blood **90**, 5013-21.

119. Morris, J.R. & Solomon, E. (2004): BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. Hum Mol Genet **13**, 807-17.
120. Moynahan, M.E., Cui, T.Y. & Jasin, M. (2001): Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. Cancer Res **61**, 4842-50.
121. Narod, S.A., Ford, D., Devilee, P., Barkardottir, R.B., Lynch, H.T., Smith, S.A., Ponder, B.A., Weber, B.L., Garber, J.E., Birch, J.M. & *et al.* (1995): An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet **56**, 254-64.
122. Narod, S.A. & Foulkes, W.D. (2004): BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Nat Rev Cancer **4**, 665-76.
123. Newman, B., Austin, M.A., Lee, M. & King, M.C. (1988): Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. Proc Natl Acad Sci U S A **85**, 3044-8.
124. Nixon, A.J., Neubergh, D., Hayes, D.F., Gelman, R., Connolly, J.L., Schnitt, S., Abner, A., Recht, A., Vicini, F. & Harris, J.R. (1994): Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. J Clin Oncol **12**, 888-94.
125. Oddoux, C., Struewing, J.P., Clayton, C.M., Neuhausen, S., Brody, L.C., Kaback, M., Haas, B., Norton, L., Borgen, P., Jhanwar, S., Goldgar, D., Ostrer, H. & Offit, K. (1996): The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. Nat Genet **14**, 188-90.
126. Oldenburg, R.A., Kroeze-Jansema, K., Meijers-Heijboer, H., van Asperen, C.J., Hoogerbrugge, N., van Leeuwen, I., Vasen, H.F., Cleton-Jansen, A.M., Kraan, J., Houwing-Duistermaat, J.J., Morreau, H., Cornelisse, C.J. & Devilee, P. (2006): Characterization of familial non-BRCA1/2 breast tumors by loss of heterozygosity and immunophenotyping. Clin Cancer Res **12**, 1693-700.
127. Palacios, J., Honrado, E., Cigudosa, J.C. & Benitez, J. (2005): ERBB2 and MYC alterations in BRCA1- and BRCA2-associated cancers. Genes Chromosomes Cancer **42**, 204-5; author reply 206.
128. Palacios, J., Honrado, E., Osorio, A., Cazorla, A., Sarrio, D., Barroso, A., Rodriguez, S., Cigudosa, J.C., Diez, O., Alonso, C., Lerma, E., Dopazo, J., Rivas, C. & Benitez, J. (2005): Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. Breast Cancer Res Treat **90**, 5-14.
129. Palacios, J., Honrado, E., Osorio, A., Cazorla, A., Sarrio, D., Barroso, A., Rodriguez, S., Cigudosa, J.C., Diez, O., Alonso, C., Lerma, E., Sanchez, L., Rivas, C. & Benitez, J. (2003): Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Clin Cancer Res **9**, 3606-14.
130. Papila, C., Uzun, H., Balci, H., Zerdali, H., Sezgin, C., Can, G. & Yanardag, H. (2009): Clinical significance and prognostic value of serum sHER-2/neu levels in patients with solid tumors. Med Oncol **26**, 151-6.
131. Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J.F., Stijleman, I.J., Palazzo, J., Marron, J.S., Nobel, A.B., Mardis, E.,

Nielsen, T.O., Ellis, M.J., Perou, C.M. & Bernard, P.S. (2009): Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. J Clin Oncol **27**, 1160-7.

132. Patel, K.J., Yu, V.P., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F.C., Evans, M.J., Colledge, W.H., Friedman, L.S., Ponder, B.A. & Venkitaraman, A.R. (1998): Involvement of Brca2 in DNA repair. Mol Cell **1**, 347-57.

133. Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O. & Botstein, D. (2000): Molecular portraits of human breast tumours. Nature **406**, 747-52.

134. Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O.M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G.M. & Mazoyer, S. (2002): The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. Hum Mol Genet **11**, 2805-14.

135. Pharoah, P.D., Antoniou, A., Hopper, J. & Easton, D. (2003): Re: On the use of familial aggregation in population-based case probands for calculating penetrance. J Natl Cancer Inst **95**, 75-6; author reply 77-8.

136. Pinilla, S.M., Honrado, E., Hardisson, D., Benitez, J. & Palacios, J. (2006): Caveolin-1 expression is associated with a basal-like phenotype in sporadic and hereditary breast cancer. Breast Cancer Res Treat **99**, 85-90.

137. Rahunen, F.D., Bremers, A.J., Fabry, H.F., van Amerongen, A.H., Boom, R.P. & Meijer, S. (2002): Ultrasound-guided lumpectomy of nonpalpable breast cancer versus wire-guided resection: a randomized clinical trial. Ann Surg Oncol **9**, 994-8.

138. Rakha, E.A., El-Sayed, M.E., Green, A.R., Lee, A.H., Robertson, J.F. & Ellis, I.O. (2007): Prognostic markers in triple-negative breast cancer. Cancer **109**, 25-32.

139. Ramankulov, A., Lein, M., Johannsen, M., Schrader, M., Miller, K. & Jung, K. (2008): Plasma matrix metalloproteinase-7 as a metastatic marker and survival predictor in patients with renal cell carcinomas. Cancer Sci **99**, 1188-94.

140. Ramus, S.J. & Gayther, S.A. (2009): The contribution of BRCA1 and BRCA2 to ovarian cancer. Mol Oncol **3**, 138-50.

141. Reis-Filho, J.S. & Tutt, A.N. (2008): Triple negative tumours: a critical review. Histopathology **52**, 108-18.

142. Rennert, G., Bisland-Naggan, S., Barnett-Griness, O., Bar-Joseph, N., Zhang, S., Rennert, H.S. & Narod, S.A. (2007): Clinical outcomes of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. N Engl J Med **357**, 115-23.

143. Richter-Ehrenstein, C., Muller, S., Noske, A. & Schneider, A. (2009): Diagnostic accuracy and prognostic value of core biopsy in the management of breast cancer: a series of 542 patients. Int J Surg Pathol **17**, 323-6.

144. Rilke, F., Colnaghi, M.I., Cascinelli, N., Andreola, S., Baldini, M.T., Bufalino, R., Della Porta, G., Menard, S., Pierotti, M.A. & Testori, A. (1991): Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. Int J Cancer **49**, 44-9.

145. Robson, M. (2004): Breast cancer surveillance in women with hereditary risk due to BRCA1 or BRCA2 mutations. Clin Breast Cancer **5**, 260-8; discussion 269-71.

146. Robson, M.E., Chappuis, P.O., Satagopan, J., Wong, N., Boyd, J., Goffin, J.R., Hudis, C., Roberge, D., Norton, L., Begin, L.R., Offit, K. & Foulkes, W.D. (2004): A combined analysis of outcome following breast cancer: differences in survival based on BRCA1/BRCA2 mutation status and administration of adjuvant treatment. Breast Cancer Res **6**, R8-R17.
147. Rosa-Rosa, J.M., Pita, G., Urioste, M., Lloret, G., Brunet, J., Lazaro, C., Blanco, I., Ramon y Cajal, T., Diez, O., de la Hoya, M., Caldes, T., Tejada, M.I., Gonzalez-Neira, A. & Benitez, J. (2009): Genome-wide linkage scan reveals three putative breast-cancer-susceptibility loci. Am J Hum Genet **84**, 115-22.
148. Ross, J.S. (2009): Multigene classifiers, prognostic factors, and predictors of breast cancer clinical outcome. Adv Anat Pathol **16**, 204-15.
149. Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T. & Livingston, D.M. (1997): Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. Cell **88**, 265-75.
150. Scully, R. & Livingston, D.M. (2000): In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. Nature **408**, 429-32.
151. Shmelkov, S.V., St Clair, R., Lyden, D. & Rafii, S. (2005): AC133/CD133/Prominin-1. Int J Biochem Cell Biol **37**, 715-9.
152. Simard, J., Tonin, P., Durocher, F., Morgan, K., Rommens, J., Gingras, S., Samson, C., Leblanc, J.F., Belanger, C., Dion, F. & *et al.* (1994): Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. Nat Genet **8**, 392-8.
153. Smith, P., McGuffog, L., Easton, D.F., Mann, G.J., Pupo, G.M., Newman, B., Chenevix-Trench, G., Szabo, C., Southey, M., Renard, H., Odefrey, F., Lynch, H., Stoppa-Lyonnet, D., Couch, F., Hopper, J.L., Giles, G.G., McCredie, M.R., Buys, S., Andrulis, I., Senie, R., Goldgar, D.E., Oldenburg, R., Kroeze-Jansema, K., Kraan, J., Meijers-Heijboer, H., Klijn, J.G., van Asperen, C., van Leeuwen, I., Vasen, H.F., Cornelisse, C.J., Devilee, P., Baskcomb, L., Seal, S., Barfoot, R., Mangion, J., Hall, A., Edkins, S., Rapley, E., Wooster, R., Chang-Claude, J., Eccles, D., Evans, D.G., Futreal, P.A., Nathanson, K.L., Weber, B.L., Rahman, N. & Stratton, M.R. (2006): A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes. Genes Chromosomes Cancer **45**, 646-55.
154. Smyth, G.K. & Speed, T. (2003): Normalization of cDNA microarray data. Methods **31**, 265-73.
155. Smyth, G.K., Yang, Y.H. & Speed, T. (2003): Statistical issues in cDNA microarray data analysis. Methods Mol Biol **224**, 111-36.
156. Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Eystein Lonning, P. & Borresen-Dale, A.L. (2001): Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A **98**, 10869-74.
157. Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C.M., Lonning, P.E., Brown, P.O., Borresen-Dale, A.L. & Botstein, D. (2003): Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 8418-23.
158. Sorlie, T., Wang, Y., Xiao, C., Johnsen, H., Naume, B., Samaha, R.R. & Borresen-Dale, A.L. (2006): Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. BMC Genomics **7**, 127.

159. Sotiriou, C., Neo, S.Y., McShane, L.M., Korn, E.L., Long, P.M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S.B., Harris, A.L. & Liu, E.T. (2003): Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci U S A **100**, 10393-8.
160. Sotiriou, C. & Pusztai, L. (2009): Gene-expression signatures in breast cancer. N Engl J Med **360**, 790-800.
161. Sotiriou, C., Wirapati, P., Loi, S., Harris, A., Fox, S., Smeds, J., Nordgren, H., Farmer, P., Praz, V., Haibe-Kains, B., Desmedt, C., Larsimont, D., Cardoso, F., Peterse, H., Nuyten, D., Buyse, M., Van de Vijver, M.J., Bergh, J., Piccart, M. & Delorenzi, M. (2006): Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. J Natl Cancer Inst **98**, 262-72.
162. Staff, S., Isola, J. & Tanner, M. (2003): Haplo-insufficiency of BRCA1 in sporadic breast cancer. Cancer Res **63**, 4978-83.
163. Stoppa-Lyonnet, D., Ansquer, Y., Dreyfus, H., Gautier, C., Gauthier-Villars, M., Bournstyn, E., Clough, K.B., Magdelenat, H., Pouillart, P., Vincent-Salomon, A., Fourquet, A. & Asselain, B. (2000): Familial invasive breast cancers: worse outcome related to BRCA1 mutations. J Clin Oncol **18**, 4053-9.
164. Stratton, M.R., Ford, D., Neuhasen, S., Seal, S., Wooster, R., Friedman, L.S., King, M.C., Egilsson, V., Devilee, P., McManus, R. & *et al.* (1994): Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q. Nat Genet **7**, 103-7.
165. Tassone, P., Tagliaferri, P., Perricelli, A., Blotta, S., Quaresima, B., Martelli, M.L., Goel, A., Barbieri, V., Costanzo, F., Boland, C.R. & Venuta, S. (2003): BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells. Br J Cancer **88**, 1285-91.
166. Teng, D.H., Bogden, R., Mitchell, J., Baumgard, M., Bell, R., Berry, S., Davis, T., Ha, P.C., Kehrer, R., Jammulapati, S., Chen, Q., Offit, K., Skolnick, M.H., Tavtigian, S.V., Jhanwar, S., Swedlund, B., Wong, A.K. & Kamb, A. (1996): Low incidence of BRCA2 mutations in breast carcinoma and other cancers. Nat Genet **13**, 241-4.
167. Teschendorff, A.E., Miremadi, A., Pinder, S.E., Ellis, I.O. & Caldas, C. (2007): An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. Genome Biol **8**, R157.
168. Thompson, D., Szabo, C.I., Mangion, J., Oldenburg, R.A., Odefrey, F., Seal, S., Barfoot, R., Kroeze-Jansema, K., Teare, D., Rahman, N., Renard, H., Mann, G., Hopper, J.L., Buys, S.S., Andrulis, I.L., Senie, R., Daly, M.B., West, D., Ostrander, E.A., Offit, K., Peretz, T., Osorio, A., Benitez, J., Nathanson, K.L., Sinilnikova, O.M., Olah, E., Bignon, Y.J., Ruiz, P., Badzioch, M.D., Vasen, H.F., Futreal, A.P., Phelan, C.M., Narod, S.A., Lynch, H.T., Ponder, B.A., Eeles, R.A., Meijers-Heijboer, H., Stoppa-Lyonnet, D., Couch, F.J., Eccles, D.M., Evans, D.G., Chang-Claude, J., Lenoir, G., Weber, B.L., Devilee, P., Easton, D.F., Goldgar, D.E. & Stratton, M.R. (2002): Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. Proc Natl Acad Sci U S A **99**, 827-31.
169. Thompson, L.H. (2005): Unraveling the Fanconi anemia-DNA repair connection. Nat Genet **37**, 921-2.
170. Tilanus-Linthorst, M.M., Alves, C., Seynaeve, C., Menke-Pluymers, M.B., Eggermont, A.M. & Brekelmans, C.T. (2006): Contralateral recurrence and prognostic factors in familial non-BRCA1/2-associated breast cancer. Br J Surg **93**, 961-8.

171. Tirkkonen, M., Johannsson, O., Agnarsson, B.A., Olsson, H., Ingvarsson, S., Karhu, R., Tanner, M., Isola, J., Barkardottir, R.B., Borg, A. & Kallioniemi, O.P. (1997): Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. Cancer Res **57**, 1222-7.
172. Tulinius, H., Olafsdottir, G.H., Sigvaldason, H., Arason, A., Barkardottir, R.B., Egilsson, V., Ogmundsdottir, H.M., Tryggvadottir, L., Gudlaugsdottir, S. & Eyfjord, J.E. (2002): The effect of a single BRCA2 mutation on cancer in Iceland. J Med Genet **39**, 457-62.
173. Turnbull, C. & Rahman, N. (2008): Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. Annu Rev Genomics Hum Genet **9**, 321-45.
174. Turner, N.C., Reis-Filho, J.S., Russell, A.M., Springall, R.J., Ryder, K., Steele, D., Savage, K., Gillett, C.E., Schmitt, F.C., Ashworth, A. & Tutt, A.N. (2007): BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. Oncogene **26**, 2126-32.
175. van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R. & Friend, S.H. (2002): Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature **415**, 530-6.
176. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M. & Bos, J.L. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med **319**, 525-32.
177. Walsh, C.S., Ogawa, S., Scoles, D.R., Miller, C.W., Kawamata, N., Narod, S.A., Koeffler, H.P. & Karlan, B.Y. (2008): Genome-wide loss of heterozygosity and uniparental disomy in BRCA1/2-associated ovarian carcinomas. Clin Cancer Res **14**, 7645-51.
178. Wang, X., Belguise, K., Kersual, N., Kirsch, K.H., Mineva, N.D., Galtier, F., Chalbos, D. & Sonenshein, G.E. (2007): Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. Nat Cell Biol **9**, 470-8.
179. Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J. & Qin, J. (2000): BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. Genes Dev **14**, 927-39.
180. Watson, L. (2001): Breast cancer: diagnosis, treatment and prognosis. Radiol Technol **73**, 45-61; quiz 62-4, 67.
181. Williams, W.R. & Anderson, D.E. (1984): Genetic epidemiology of breast cancer: segregation analysis of 200 Danish pedigrees. Genet Epidemiol **1**, 7-20.
182. Wong, A.K., Pero, R., Ormonde, P.A., Tavtigian, S.V. & Bartel, P.L. (1997): RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. J Biol Chem **272**, 31941-4.
183. Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. & Micklem, G. (1995): Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature **378**, 789-92.
184. Wooster, R., Neuhausen, S.L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D. & *et al.* (1994): Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Science **265**, 2088-90.

185. Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X.L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M. & Baer, R. (1996): Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. Nat Genet **14**, 430-40.
186. Yager, J.D. & Davidson, N.E. (2006): Estrogen carcinogenesis in breast cancer. N Engl J Med **354**, 270-82.
187. Yehiely, F., Moyano, J.V., Evans, J.R., Nielsen, T.O. & Cryns, V.L. (2006): Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. Trends Mol Med **12**, 537-44.
188. Yuan, S.S., Lee, S.Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G.E. & Lee, E.Y. (1999): BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. Cancer Res **59**, 3547-51.
189. Zhang, J., Willers, H., Feng, Z., Ghosh, J.C., Kim, S., Weaver, D.T., Chung, J.H., Powell, S.N. & Xia, F. (2004): Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. Mol Cell Biol **24**, 708-18.
190. Zheng, L., Li, S., Boyer, T.G. & Lee, W.H. (2000): Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. Oncogene **19**, 6159-75.
191. Zhong, Q., Chen, C.F., Li, S., Chen, Y., Wang, C.C., Xiao, J., Chen, P.L., Sharp, Z.D. & Lee, W.H. (1999): Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. Science **285**, 747-50.

Material suplementario

MATERIAL SUPLEMENTARIO

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria S1. Genes diferencialmente expresados en los tumores BRCA1 *ESR1*-positivos.

Nombre (HUGO)	Descripción	FDR
<i>ADSL</i>	Adenylosuccinate lyase	3.8660E-04
<i>CCNA2</i>	Cyclin A2	3.6138E-04
<i>CEP55</i>	Centrosomal protein 55kDa	3.6138E-04
<i>CNBP</i>	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein	3.3487E-04
<i>ERBB3</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	3.3487E-04
<i>POLH</i>	Polymerase (DNA directed), eta	3.3487E-04
<i>PPAP2C</i>	Phosphatidic acid phosphatase type 2C	3.3487E-04
<i>RFC4</i>	Replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	3.5060E-04
<i>SLITRK6</i>	SLIT and NTRK-like family, member 6	3.3487E-04
<i>SRPK1</i>	SFRS protein kinase 1	3.3487E-04
<i>SRR</i>	Serine racemase	3.8025E-04
<i>SUGT1</i>	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (<i>S. cerevisiae</i>)	3.3487E-04
<i>TACSTD2</i>	Tumor-associated calcium signal transducer 2	3.3814E-04
<i>ABCC5</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	4.1806E-04
<i>ABCD3</i>	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	6.7772E-04
<i>ABCF2</i>	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2	4.6276E-04
<i>ACTL6A</i>	Actin-like 6A	9.9657E-04
<i>AK2</i>	Adenylate kinase 2	7.6504E-04
<i>ALDH9A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1	4.5839E-04
<i>ANLN</i>	Anillin, actin binding protein	8.2482E-04

Material Suplementario

ARID3A	AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like)	5.7791E-04
ASNS	Asparagine synthetase	4.3928E-04
ASPM	Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	4.5729E-04
ASTN2	Astrotactin 2	7.0084E-04
ATF6	Activating transcription factor 6	9.5451E-04
BAG2	BCL2-associated athanogene 2	4.6276E-04
BARX2	BARX homeobox 2	4.6276E-04
BBC3	BCL2 binding component 3	7.1567E-04
C10orf116	Chromosome 10 open reading frame 116	8.9050E-04
C13orf3	Chromosome 13 open reading frame 3	8.6167E-04
C2orf7	Chromosome 2 open reading frame 7	7.0027E-04
C6orf167	Chromosome 6 open reading frame 167	6.7772E-04
C6orf173	Chromosome 6 open reading frame 173	3.8660E-04
C7	Complement component 7	9.8667E-04
C8orf38	Chromosome 8 open reading frame 38	5.7655E-04
CCDC74A	Coiled-coil domain containing 74A	6.0594E-04
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	3.8660E-04
CCNB2	Cyclin B2	4.6276E-04
CD1C	CD1c molecule	7.5006E-04
CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)	5.6280E-04
CDC45	Cell division cycle associated 5	8.7304E-04
CENPF	Centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	5.3518E-04
CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	4.5729E-04
CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	9.7491E-04
CLDN4	Claudin 4	6.7088E-04
COX7A2	Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)	5.1101E-04
CRABP2	Cellular retinoic acid binding protein 2	9.4600E-04

Material Suplementario

CRLF1	Cytokine receptor-like factor 1	4.6276E-04
CRSP6		9.4600E-04
CTPS	CTP synthase	8.9050E-04
DC2	DC2 protein	6.3637E-04
DDX6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	5.8902E-04
DGCR2	DiGeorge syndrome critical region gene 2	6.4415E-04
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	6.7772E-04
DIO2	Deiodinase, iodothyronine, type II	9.8128E-04
DKC1	Dyskeratosis congenita 1, dyskerin	9.4185E-04
DNASE1L1	Deoxyribonuclease I-like 1	6.2056E-04
DNASE1L3	Deoxyribonuclease I-like 3	4.6276E-04
DTL	Denticleless homolog (Drosophila)	7.1330E-04
ECT2	Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	8.7304E-04
EED	Embryonic ectoderm development	5.3474E-04
EML1	Echinoderm microtubule associated protein like 1	4.6276E-04
EMP2	Epithelial membrane protein 2	4.6276E-04
ERG	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)	7.6504E-04
ESR1	Estrogen receptor 1	5.7655E-04
EXO1	Exonuclease 1	5.1703E-04
F2RL2	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	7.1567E-04
FAM114A1	Family with sequence similarity 114, member A1	6.7772E-04
FAM84B	Family with sequence similarity 84, member B	3.8660E-04
FAM8A1	Family with sequence similarity 8, member A1	4.5729E-04
FBX05	F-box protein 5	6.7772E-04
FIS1	Fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	9.4185E-04
FLJ31951		7.1413E-04
FOLR2	Folate receptor 2 (fetal)	4.6276E-04

Material Suplementario

FRZB	Frizzled-related protein			6.3637E-04
GABPB2	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2			4.6276E-04
GAL	Galanin prepropeptide			7.0027E-04
GALNT12	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide (GalNAc-T12)	N-acetylgalactosaminyltransferase	12	6.7772E-04
GATA3	GATA binding protein 3			5.7655E-04
GGPS1	Geranylgeranyl diphosphate synthase 1			5.1703E-04
GIT2	G protein-coupled receptor kinase interactor 2			8.3690E-04
GPC1	Glypican 1			8.1719E-04
GPR126	G protein-coupled receptor 126			5.8902E-04
GPR180	G protein-coupled receptor 180			8.7304E-04
GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5			8.5447E-04
GRLF1	Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1			4.4573E-04
GRM7	Glutamate receptor, metabotropic 7			6.7137E-04
GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta			4.6276E-04
GTF3C2	General transcription factor IIIC, polypeptide 2, beta 110kDa			5.8902E-04
HDAC2	Histone deacetylase 2			6.1628E-04
HOXB13	Homeobox B13			5.8902E-04
HSPA8	Heat shock 70kDa protein 8			5.4924E-04
HSPB8	Heat shock 22kDa protein 8			7.1413E-04
INTU	Inturned planar cell polarity effector homolog (Drosophila)			7.6504E-04
ITM2C	Integral membrane protein 2C			6.7299E-04
JTV1	JTV1 gene			6.1870E-04
KCNK2	Potassium channel, subfamily K, member 2			6.7772E-04
KIAA0274				6.2911E-04
KIAA0644	KIAA0644 gene product			5.6280E-04
KIAA1794				6.7772E-04

Material Suplementario

KIF3B	Kinesin family member 3B	9.0832E-04
KNTC1	Kinetochores associated 1	7.0084E-04
LBR	Lamin B receptor	7.2796E-04
LDHB	Lactate dehydrogenase B	8.7304E-04
LHFP	Lipoma HMGIC fusion partner	5.4924E-04
LIN9	Lin-9 homolog (C. elegans)	9.6557E-04
LOC124220	Similar to common salivary protein 1	8.7304E-04
LOC284106		5.8902E-04
LOC55565		4.5983E-04
LOC728340	General transcription factor IIH, polypeptide 2, 44kDa-like	5.7030E-04
MALL	Mal, T-cell differentiation protein-like	8.3472E-04
MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	5.7791E-04
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule	6.3330E-04
MID1	Midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	9.8485E-04
MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	7.2467E-04
MLC1	Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1	4.5623E-04
MRPL50	Mitochondrial ribosomal protein L50	7.9352E-04
MSH6	MutS homolog 6 (E. coli)	5.7655E-04
MXD1	MAX dimerization protein 1	5.5590E-04
NAPG	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, gamma	7.0210E-04
NCAPD3	Non-SMC condensin II complex, subunit D3	4.1806E-04
NDE1	NudE nuclear distribution gene E homolog 1 (A. nidulans)	5.7655E-04
NOL1	Nucleolar protein 1, 120kDa	6.7772E-04
NONO	Non-POU domain containing, octamer-binding	5.6347E-04
NPY	Neuropeptide Y	9.8128E-04
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	9.0362E-04
NRP2	Neuropilin 2	5.9605E-04

Material Suplementario

<i>NUP155</i>	Nucleoporin 155kDa	5.4924E-04
<i>ONECUT2</i>	One cut homeobox 2	6.9309E-04
<i>PAF1</i>	Paf1, RNA polymerase II associated factor, homolog (S. cerevisiae)	7.9597E-04
<i>PAPOLA</i>	Poly(A) polymerase alpha	4.3800E-04
<i>PARP14</i>	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	4.1806E-04
<i>PCDH8</i>	Protocadherin 8	9.8128E-04
<i>PHF19</i>	PHD finger protein 19	6.2104E-04
<i>PHLDA3</i>	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 3	8.5370E-04
<i>PIM2</i>	Pim-2 oncogene	4.1806E-04
<i>PLA2G4A</i>	Phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	7.1567E-04
<i>PLK1</i>	Polo-like kinase 1 (Drosophila)	7.0084E-04
<i>POLE3</i>	Polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	8.2482E-04
<i>POLQ</i>	Polymerase (DNA directed), theta	7.5006E-04
<i>PRAME</i>	Preferentially expressed antigen in melanoma	4.6276E-04
<i>PRC1</i>	Protein regulator of cytokinesis 1	8.9050E-04
<i>PRDX5</i>	Peroxiredoxin 5	9.0832E-04
<i>PRPF18</i>	PRP18 pre-mRNA processing factor 18 homolog (S. cerevisiae)	9.1226E-04
<i>PSAT1</i>	Phosphoserine aminotransferase 1	5.6280E-04
<i>PSENER</i>	Presenilin enhancer 2 homolog (C. elegans)	6.9706E-04
<i>PTGES</i>	Prostaglandin E synthase	8.6199E-04
<i>PTPN5</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 5 (striatum-enriched)	5.3474E-04
<i>RAB31</i>	RAB31, member RAS oncogene family	5.7791E-04
<i>RAD51</i>	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)	6.6860E-04
<i>RANBP1</i>	RAN binding protein 1	6.3187E-04
<i>RBM35B</i>	RNA binding motif protein 35B	4.5729E-04
<i>REEP5</i>	Receptor accessory protein 5	9.6557E-04
<i>RNASE4</i>		4.6276E-04

Material Suplementario

RP11-93B10.1		4.3851E-04
RP5-860F19.3		6.9309E-04
RPL27A	Ribosomal protein L27a	6.8332E-04
RTN3	Reticulon 3	7.9597E-04
RTN4RL1	Reticulon 4 receptor-like 1	5.6280E-04
RWDD3	RWD domain containing 3	5.1703E-04
SCUBE2	Signal peptide, CUB domain, EGF-like 2	4.6276E-04
SEC31A	SEC31 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	4.1806E-04
SERPINE2	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	5.3214E-04
SETDB1	SET domain, bifurcated 1	5.8902E-04
SGCE	Sarcoglycan, epsilon	4.5729E-04
SHMT2	Serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	7.2240E-04
SLC25A5	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5	5.8139E-04
STAMBPL1	STAM binding protein-like 1	5.3518E-04
STARD10	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10	8.2482E-04
STIL	SCL/TAL1 interrupting locus	7.6773E-04
STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	6.1870E-04
STMN1	Stathmin 1/oncoprotein 18	4.5729E-04
STOML1	Stomatin (EPB72)-like 1	5.7655E-04
TAF1A	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, A, 48kDa	6.7772E-04
TFAM	Transcription factor A, mitochondrial	4.9418E-04
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	4.6276E-04
TMCO4	Transmembrane and coiled-coil domains 4	9.6853E-04
TMEFF1	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	6.7772E-04
TMEM125	Transmembrane protein 125	8.2482E-04
TMLHE	Trimethyllysine hydroxylase, epsilon	8.8773E-04
TMTC3	Transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 3	7.9352E-04

Material Suplementario

TNFAIP8	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	8.6199E-04
TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	4.6276E-04
TP53INP1	Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	6.1870E-04
TPBG	Trophoblast glycoprotein	5.1703E-04
TPI1	Triosephosphate isomerase 1	6.2104E-04
TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	8.2355E-04
TRAIIP	TRAF interacting protein	4.6276E-04
TSC22D3	TSC22 domain family, member 3	9.4185E-04
TSGA2		9.4255E-04
TTC27	Tetratricopeptide repeat domain 27	8.2459E-04
UBE2B	Ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homolog)	4.5622E-04
UBE2T	Ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	5.6280E-04
UBPH		6.7495E-04
UCK2	Uridine-cytidine kinase 2	5.3518E-04
UTP11L	UTP11-like, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, (yeast)	6.7772E-04
VPS28	Vacuolar protein sorting 28 homolog (S. cerevisiae)	6.7772E-04
VPS37C	Vacuolar protein sorting 37 homolog C (S. cerevisiae)	4.1806E-04
VRK2	Vaccinia related kinase 2	4.5729E-04
WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase	4.5622E-04
WNK2	WNK lysine deficient protein kinase 2	4.6276E-04
WWC1	WW and C2 domain containing 1	5.4924E-04
XIST	X (inactive)-specific transcript	4.6276E-04
XPO1	Exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	4.6276E-04
YES1	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1	9.2286E-04
ZCCHC11	Zinc finger, CCHC domain containing 11	6.8893E-04
ZFP37	Zinc finger protein 37 homolog (mouse)	9.4600E-04
ZMYND11	Zinc finger, MYND domain containing 11	7.6773E-04

Material Suplementario

ZNF627	Zinc finger protein 627	7.5006E-04
ZNF641	Zinc finger protein 641	5.8902E-04
ZNF658	Zinc finger protein 658	9.4255E-04
ZNF76	Zinc finger protein 76 (expressed in testis)	9.4600E-04

Material Suplementario

Tabla suplementaria S2. Genes diferencialmente expresados en los tumores BRCA1 *ESR1*-negativos

Nombre (HUGO)	Descripción	FDR
<i>76P</i>		4.3414E-04
<i>ABCC2</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	8.7453E-05
<i>ABCC4</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	7.1219E-05
<i>ACO1</i>	Aconitase 1, soluble	2.7178E-04
<i>ACP5</i>	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	2.7178E-04
<i>ACSS2</i>	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	8.3926E-04
<i>ACTA1</i>	Actin, alpha 1, skeletal muscle	8.9015E-04
<i>ACTR8</i>	ARP8 actin-related protein 8 homolog (yeast)	3.5762E-04
<i>ACVR2B</i>	Activin A receptor, type IIB	1.5101E-04
<i>ADAM10</i>	ADAM metallopeptidase domain 10	5.2558E-04
<i>ADH4</i>	Alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	1.8400E-04
<i>ADORA1</i>	Adenosine A1 receptor	3.6792E-04
<i>AGT</i>	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	9.1427E-05
<i>AHR</i>	Aryl hydrocarbon receptor	1.5168E-04
<i>AIF1</i>	Allograft inflammatory factor 1	7.2309E-04
<i>AIM1L</i>	Absent in melanoma 1-like	2.7802E-04
<i>AKAP9</i>	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	9.9081E-04
<i>AKR1B1</i>	Aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	1.9664E-04
<i>AKT1</i>	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	3.4114E-04
<i>ALDH2</i>	Aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	4.2480E-04
<i>ALDH3A1</i>	Aldehyde dehydrogenase 3 family, memberA1	6.0084E-04
<i>ALDOA</i>	Aldolase A, fructose-bisphosphate	4.5996E-04
<i>ALG2</i>	Asparagine-linked glycosylation 2 homolog (S. cerevisiae, alpha-1,3-mannosyltransferase)	3.3276E-04
<i>ALOX5AP</i>	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	4.0726E-04

Material Suplementario

AMOTL1	Angiomotin like 1	5.2026E-04
ANP32B	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B	6.6492E-04
AP2B1	Adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	9.9879E-04
APOH	Apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	2.4772E-05
ARHGAP25	Rho GTPase activating protein 25	4.4459E-04
ARIH1	Ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1 (Drosophila)	8.6662E-04
ARL2BP	ADP-ribosylation factor-like 2 binding protein	8.2967E-04
ARL4D	ADP-ribosylation factor-like 4D	5.5783E-04
ARL8B	ADP-ribosylation factor-like 8B	1.8237E-04
ASGR2	Asialoglycoprotein receptor 2	7.0597E-05
ASPN	Asporin	7.0458E-04
ATG9B	ATG9 autophagy related 9 homolog B (S. cerevisiae)	7.5907E-04
ATP6AP1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1	6.7275E-04
ATXN7L1	Ataxin 7-like 1	8.2331E-04
AURKA	Aurora kinase A	2.5162E-04
BACH1	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1	3.5160E-04
BAG4	BCL2-associated athanogene 4	2.6790E-04
BAT2D1	BAT2 domain containing 1	3.1189E-04
BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	2.8039E-04
BCL7B	B-cell CLL/lymphoma 7B	1.9515E-04
BFAR	Bifunctional apoptosis regulator	2.4046E-04
BLK	B lymphoid tyrosine kinase	1.8400E-04
BLMH	Bleomycin hydrolase	4.7021E-04
BLR1	Burkitt lymphoma receptor 1, GTP binding protein (chemokine (C-X-C motif) receptor 5)	4.7384E-04
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	2.8039E-04
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	3.6286E-04

Material Suplementario

BMX	BMX non-receptor tyrosine kinase	5.7723E-04
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	9.9425E-05
BTAF1	BTAF1 RNA polymerase II, B-TFIID transcription factor-associated, 170kDa (Mot1 homolog, <i>S. cerevisiae</i>)	7.1219E-05
C11orf9	Chromosome 11 open reading frame 9	6.7353E-04
C14orf10		6.1750E-05
C14orf130	Chromosome 14 open reading frame 130	4.5996E-04
C14orf29		8.0263E-04
C14orf43	Chromosome 14 open reading frame 43	1.8237E-04
C16orf45	Chromosome 16 open reading frame 45	4.8703E-04
C17orf81	Chromosome 17 open reading frame 81	8.8013E-04
C18orf1	Chromosome 18 open reading frame 1	1.8471E-04
C18orf4		3.7335E-04
C19orf44	Chromosome 19 open reading frame 44	5.3753E-04
C1orf166	Chromosome 1 open reading frame 166	3.6792E-04
C1orf198	Chromosome 1 open reading frame 198	6.3502E-04
C1orf2	Chromosome 1 open reading frame 2	3.0252E-04
C1QB	Complement component 1, q subcomponent, B chain	4.6712E-04
C1QC	Complement component 1, q subcomponent, C chain	1.6015E-04
C1S	Complement component 1, s subcomponent	2.1290E-05
C20orf118	Chromosome 20 open reading frame 118	4.6953E-04
C3AR1	Complement component 3a receptor 1	1.5101E-04
C3orf50	Chromosome 3 open reading frame 50	2.3277E-04
C3orf57	Chromosome 3 open reading frame 57	1.8237E-04
C5orf32	Chromosome 5 open reading frame 32	7.8613E-04
C8orf75	Chromosome 8 open reading frame 75	3.5038E-04
CAPG	Capping protein (actin filament), gelsolin-like	1.9986E-04

Material Suplementario

CAPN12	Calpain 12	3.8425E-04
CAPN3	Calpain 3, (p94)	7.1749E-04
CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	4.8703E-04
CBX3	Chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)	6.5307E-04
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	5.4337E-05
CCL3L1	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	3.2614E-04
CCL4L2		5.9560E-04
CCNE2	Cyclin E2	3.0252E-04
CCNF	Cyclin F	3.0432E-04
CCNG1	Cyclin G1	1.7624E-04
CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	9.1030E-04
CCR7	Chemokine (C-C motif) receptor 7	4.9343E-04
CCR9	Chemokine (C-C motif) receptor 9	1.6288E-04
CCT7	Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)	1.5101E-04
CD2	CD2 molecule	7.5034E-04
CD24	CD24 molecule	1.7121E-04
CD34	CD34 molecule	3.4686E-04
CD37	CD37 molecule	4.4230E-04
CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	2.2542E-04
CD48	CD48 molecule	6.0132E-04
CD53	CD53 molecule	9.2133E-04
CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	6.1535E-05
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	3.4301E-05
CD81	CD81 molecule	6.7963E-04
CD83	CD83 molecule	1.8400E-04
CD86	CD86 molecule	4.8560E-04
CD93	CD93 molecule	7.1309E-04

Material Suplementario

CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	3.7199E-04
CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C (<i>S. pombe</i>)	1.8237E-04
CDC42SE1	CDC42 small effector 1	4.6534E-04
CDH11	Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	4.9343E-04
CDH3	Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	6.7117E-04
CDH5	Cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)	3.2149E-04
CDK2AP1	CDK2-associated protein 1	6.8948E-04
CDS1	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 1	8.2967E-04
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	4.0391E-04
CENPL	Centromere protein L	4.9343E-04
CENTD1	Centaurin, delta 1	5.7872E-04
CFL1	Cofilin 1 (non-muscle)	9.4108E-04
CHD1	Chromodomain helicase DNA binding protein 1	4.9973E-05
CHKA	Choline kinase alpha	6.3202E-04
CIAO1	Cytosolic iron-sulfur protein assembly 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	6.8264E-04
CLEC14A	C-type lectin domain family 14, member A	3.6141E-04
CLMN	Calmin (calponin-like, transmembrane)	7.4615E-04
CMTM7	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7	6.7620E-04
CNKSRI	Connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1	6.2607E-04
CNTNAP1	Contactin associated protein 1	4.7384E-04
COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1	8.8735E-04
COL17A1	Collagen, type XVII, alpha 1	1.8400E-04
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	2.6616E-04
COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2	1.9585E-04
COL4A6	Collagen, type IV, alpha 6	1.5101E-04
COL5A2	Collagen, type V, alpha 2	3.1925E-04
COL6A3	Collagen, type VI, alpha 3	6.0084E-04

Material Suplementario

COX15	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	8.4753E-05
CRISPLD2	Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2	6.9625E-04
CRKL	V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	2.6543E-04
CRNKL1	Crooked neck pre-mRNA splicing factor-like 1 (Drosophila)	1.8448E-04
CRSP3		3.5038E-04
CRSP8		2.7178E-04
CRYAB	Crystallin, alpha B	5.3418E-04
CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	1.3498E-04
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog	5.2430E-04
CSF2RB	Colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	3.7769E-04
CSK	C-src tyrosine kinase	8.8735E-04
CSPG2		4.2480E-04
CTH	Cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	6.7205E-04
CTHRC1	Collagen triple helix repeat containing 1	1.8471E-04
CTNND1	Catenin (cadherin-associated protein), delta 1	6.4154E-04
CTSH	Cathepsin H	4.4824E-04
CTSS	Cathepsin S	9.9057E-04
CUGBP2	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	6.4876E-04
CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	4.7947E-04
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1.8113E-04
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	1.1358E-04
CYLD	Cylindromatosis (turban tumor syndrome)	9.5245E-04
CYP11B1	Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1	7.3656E-04
CYP51A1	Cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	9.6720E-05
CYP7B1	Cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1	2.2037E-04
CYYR1	Cysteine/tyrosine-rich 1	1.8471E-04

Material Suplementario

DAB2	Disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	4.9073E-04
DAK	Dihydroxyacetone kinase 2 homolog (S. cerevisiae)	7.0597E-05
DAPK3	Death-associated protein kinase 3	5.7172E-04
ddb2	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa	1.4444E-04
DDX39	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	4.7744E-04
DDX3Y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	2.8039E-04
DDX41	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41	5.8937E-04
DDX51	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 51	1.8400E-04
DDX56	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 56	1.6119E-04
DIO3	Deiodinase, iodothyronine, type III	9.2505E-04
DKFZP564O0823	DKFZP564O0823 protein	2.7178E-04
DKFZP686A01247		2.9779E-04
DLGAP1	Discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1	2.8421E-04
DMRT2	Doublesex and mab-3 related transcription factor 2	8.9315E-04
DNA2L	DNA2 DNA replication helicase 2-like (yeast)	3.4606E-04
DNAJC16	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 16	8.5099E-04
DNTT	Deoxynucleotidyltransferase, terminal	6.7275E-04
DSC2	Desmocollin 2	3.1189E-04
DSC3	Desmocollin 3	1.8400E-04
DTYMK	Deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	6.8094E-04
DUSP10	Dual specificity phosphatase 10	4.0726E-04
DUSP14	Dual specificity phosphatase 14	6.0299E-04
DUSP3	Dual specificity phosphatase 3 (vaccinia virus phosphatase VH1-related)	7.3491E-04
DUSP4	Dual specificity phosphatase 4	2.2061E-04
DUSP9	Dual specificity phosphatase 9	1.5101E-04
EDG1	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	8.2997E-05
EEF1E1	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1	6.1750E-05

Material Suplementario

EEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2	4.2683E-04
EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	3.7769E-04
EFNA1	Ephrin-A1	6.8948E-04
EGR2	Early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)	5.2026E-04
EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	9.5562E-04
EIF2C1	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 1	4.3935E-04
EIF3S2		3.8423E-04
EIF3S6		4.1135E-04
EIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B	1.4866E-04
EIF4EBP2	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	3.5349E-04
EML4	Echinoderm microtubule associated protein like 4	2.7597E-04
EMP3	Epithelial membrane protein 3	1.9439E-04
ENO1	Enolase 1, (alpha)	2.7178E-04
ENO2	Enolase 2 (gamma, neuronal)	1.9263E-04
ENTPD1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	4.9758E-04
EPHA3	EPH receptor A3	2.1654E-04
EPHB2	EPH receptor B2	5.2359E-04
ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	6.8094E-04
ERCC8	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 8	9.3863E-04
ERGIC1	Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1	5.6152E-04
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	6.1435E-04
ETFA	Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide (glutaric aciduria II)	5.6828E-05
ETFB	Electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	9.7626E-04
ETV6	Ets variant gene 6 (TEL oncogene)	3.0252E-04
EVI2A	Ecotropic viral integration site 2A	6.2702E-04
EXOC7	Exocyst complex component 7	5.2881E-04

Material Suplementario

EZH1	Enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila)	1.9439E-04
F8	Coagulation factor VIII, procoagulant component (hemophilia A)	7.3158E-04
F8A1	Coagulation factor VIII-associated (intronic transcript) 1	5.6831E-04
FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver	4.6516E-04
FABP4	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	4.6953E-04
FABP5	Fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	9.8825E-04
FAM122B	Family with sequence similarity 122B	7.0597E-05
FAM58A	Family with sequence similarity 58, member A	8.6662E-04
FAM70A	Family with sequence similarity 70, member A	2.9103E-04
FARSLA		1.4866E-04
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	5.3418E-04
FAT2	FAT tumor suppressor homolog 2 (Drosophila)	7.2865E-04
FBXO34	F-box protein 34	6.3337E-04
FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)	8.2331E-04
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	1.4444E-04
FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)	1.0680E-04
FCN1	Ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	4.9073E-04
FGB	Fibrinogen beta chain	6.9408E-04
FGF4	Fibroblast growth factor 4 (heparin secretory transforming protein 1, Kaposi sarcoma oncogene)	3.0252E-04
FGL2	Fibrinogen-like 2	3.3084E-04
FHL5	Four and a half LIM domains 5	7.8167E-04
FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	6.7275E-04
FKBP8	FK506 binding protein 8, 38kDa	1.4866E-04
FLJ11171	Hypothetical protein FLJ11171	8.7132E-04
FMNL1	Formin-like 1	6.8948E-04
FMOD	Fibromodulin	2.1029E-04

Material Suplementario

FOLH1	Folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1	5.6484E-04
FOXJ3	Forkhead box J3	6.0497E-04
FOXO1A		1.8400E-04
FST	Follistatin	7.4570E-05
FTSJ1	FtsJ homolog 1 (E. coli)	6.6968E-04
FUBP1	Far upstream element (FUSE) binding protein 1	3.5349E-04
FXYP1	FXYP domain containing ion transport regulator 1 (phospholemman)	1.6746E-04
GABARAP	GABA(A) receptor-associated protein	2.7802E-04
GAGE10	G antigen 10	1.8400E-04
GALE	UDP-galactose-4-epimerase	2.8628E-04
GAS7	Growth arrest-specific 7	2.4046E-04
GATA1	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)	7.9936E-04
GATA2	GATA binding protein 2	4.0726E-04
GBE1	Glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1 (glycogen branching enzyme, Andersen disease, glycogen storage disease type IV)	1.8179E-04
GBP1	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	2.0373E-04
GBP2	Guanylate binding protein 2, interferon-inducible	6.9408E-04
GCA	Grancalcin, EF-hand calcium binding protein	1.1416E-04
GDA	Guanine deaminase	3.1193E-04
GDF5	Growth differentiation factor 5	5.4107E-04
GIMAP6	GTPase, IMAP family member 6	3.2071E-04
GJA4	Gap junction protein, alpha 4, 37kDa	3.1553E-04
GLDC	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	9.5046E-04
GLE1L		1.8521E-04
GLG1	Golgi apparatus protein 1	1.5101E-04
GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1	1.0680E-04
GMNN	Geminin, DNA replication inhibitor	9.2788E-04

Material Suplementario

GNAS	GNAS complex locus	3.5259E-04
GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	3.0183E-04
GPNMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb	2.1029E-04
GPR98	G protein-coupled receptor 98	4.6818E-04
GPX2	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	1.4866E-04
GREM1	Gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	5.3173E-04
GSN	Gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	6.6925E-04
GSR	Glutathione reductase	1.9439E-04
GSTM5	Glutathione S-transferase M5	3.1813E-04
GTDC1	Glycosyltransferase-like domain containing 1	5.9682E-04
GTF2A2	General transcription factor IIA, 2, 12kDa	5.1529E-04
GUCY1A3	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	4.9073E-04
GUK1	Guanylate kinase 1	4.4230E-04
GYPA	Glycophorin A (MNS blood group)	2.1654E-04
HBA1	Hemoglobin, alpha 1	3.2572E-04
HDHD3	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 3	4.1135E-04
HEMGN	Hemogen	7.7938E-04
HERC2	Hect domain and RLD 2	9.1030E-04
HERC4	Hect domain and RLD 4	3.5349E-04
HHEX	Hematopoietically expressed homeobox	1.8237E-04
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	8.9315E-04
HIGD1A	HIG1 domain family, member 1A	6.8997E-04
HIST1H1C	Histone cluster 1, H1c	6.8332E-04
HLA-A	Major histocompatibility complex, class I, A	5.3418E-04
HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B	4.0786E-04
HLA-DMB	Major histocompatibility complex, class II, DM beta	2.6426E-04
HLA-DOA	Major histocompatibility complex, class II, DO alpha	3.2577E-04

Material Suplementario

<i>HLA-DPA1</i>	Major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	2.0673E-04
<i>HLA-DPB1</i>	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	3.5973E-05
<i>HLA-DQA1</i>	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	1.4095E-04
<i>HLA-DQB1</i>	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	7.1123E-04
<i>HLA-DRB1</i>	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	4.4456E-05
<i>HMBS</i>	Hydroxymethylbilane synthase	5.1529E-04
<i>HMGN1</i>	High-mobility group nucleosome binding domain 1	5.5783E-04
<i>HMMR</i>	Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	4.3889E-04
<i>HOP</i>		2.8146E-04
<i>HP</i>	Haptoglobin	6.3337E-04
<i>HS3ST1</i>	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	6.6936E-04
<i>HSPA9</i>	Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)	7.3510E-04
<i>HSPB2</i>	Heat shock 27kDa protein 2	6.6968E-04
<i>HSPC159</i>	Galectin-related protein	2.5623E-04
<i>HSPG2</i>	Heparan sulfate proteoglycan 2	7.6710E-04
<i>HTATIP</i>	HIV-1 Tat interacting protein, 60kDa	4.1135E-04
<i>IBRDC3</i>		6.6968E-04
<i>IFI30</i>	Interferon, gamma-inducible protein 30	5.0566E-04
<i>IFNGR1</i>	Interferon gamma receptor 1	4.2364E-04
<i>IFNGR2</i>	Interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)	4.4421E-04
<i>IGF2BP1</i>	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	1.6423E-04
<i>IGHA1</i>	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	4.6818E-04
<i>IGHG1</i>	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	4.2067E-04
<i>IL18R1</i>	Interleukin 18 receptor 1	6.3826E-04
<i>IL1R1</i>	Interleukin 1 receptor, type I	6.7117E-04
<i>IL2RB</i>	Interleukin 2 receptor, beta	6.6968E-04
<i>IL6ST</i>	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1.3385E-04

Material Suplementario

<i>IMPDH2</i>	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	3.4301E-05
<i>INHBB</i>	Inhibin, beta B	8.8627E-04
<i>INPPL1</i>	Inositol polyphosphate phosphatase-like 1	2.1139E-04
<i>INSIG1</i>	Insulin induced gene 1	7.0489E-04
<i>IPO8</i>	Importin 8	8.1359E-05
<i>IRF8</i>	Interferon regulatory factor 8	1.8237E-04
<i>ITGA3</i>	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	8.3704E-04
<i>ITGA4</i>	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	7.1123E-04
<i>ITGB1BP2</i>	Integrin beta 1 binding protein (melusin) 2	2.2327E-04
<i>ITGB2</i>	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	3.5038E-04
<i>ITGB6</i>	Integrin, beta 6	1.6937E-04
<i>ITIH3</i>	Inter-alpha (globulin) inhibitor H3	3.4301E-05
<i>ITSN1</i>	Intersectin 1 (SH3 domain protein)	4.9073E-04
<i>JMJD2A</i>	Jumonji domain containing 2A	7.6074E-04
<i>JUNB</i>	Jun B proto-oncogene	3.2800E-04
<i>KCNE3</i>	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	5.1584E-04
<i>KCNK6</i>	Potassium channel, subfamily K, member 6	6.9521E-04
<i>KIAA0408</i>		7.0671E-04
<i>KRT1</i>	Keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	7.0489E-04
<i>KRT10</i>	Keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	1.8179E-04
<i>KRT5</i>	Keratin 5 (epidermolysis bullosa simplex, Dowling-Meara/Kobner/Weber-Cockayne types)	1.8471E-04
<i>LAMA2</i>	Laminin, alpha 2 (merosin, congenital muscular dystrophy)	7.1544E-04
<i>LAMC1</i>	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)	2.7959E-04
<i>LAMP3</i>	Lysosomal-associated membrane protein 3	5.0608E-04
<i>LASS4</i>	LAG1 homolog, ceramide synthase 4	7.4737E-04
<i>LATS2</i>	LATS, large tumor suppressor, homolog 2 (Drosophila)	3.2071E-04

Material Suplementario

LDHA	Lactate dehydrogenase A	1.3498E-04
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	4.9073E-04
LFNG	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	3.7335E-04
LHFPL2	Lipoma HMGIC fusion partner-like 2	1.8179E-04
LHX3	LIM homeobox 3	1.5168E-04
LIMK2	LIM domain kinase 2	6.0299E-04
LMO4	LIM domain only 4	1.8179E-04
LOC285045	Hypothetical protein LOC285045	7.3474E-04
LOC286334		4.3414E-04
LOC340602	Similar to CG32656-PA	8.2331E-04
LOC391271	Hypothetical LOC391271	6.1750E-05
LOC401176	Hypothetical gene supported by BC043001	4.5214E-04
LOC643224	Similar to tubulin, beta 8	5.1275E-04
LOC644199	Similar to High mobility group protein B1 (High mobility group protein 1) (HMG-1) (Amphoterin) (Heparin-binding protein p30)	4.0726E-04
LOC645619	Similar to Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial (ATP-AMP transphosphorylase)	2.9749E-04
LOC646588	Hypothetical protein LOC646588	9.2540E-04
LOC646670	Similar to COMM domain containing 4	4.0726E-04
LOC653190		7.1309E-04
LOC727820	Hypothetical protein LOC727820	5.1275E-04
LRPAP1	Low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1	5.3045E-04
LRRC27	Leucine rich repeat containing 27	1.5101E-04
LTBP2	Latent transforming growth factor beta binding protein 2	4.5996E-04
LTF	Lactotransferrin	4.0726E-04
LYN	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	8.7132E-04
MAFB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	7.1219E-05
MAGEA10	Melanoma antigen family A, 10	4.4421E-04

Material Suplementario

MAGEA3	Melanoma antigen family A, 3	1.5940E-04
MAGEA4	Melanoma antigen family A, 4	3.3276E-04
MAGEB2	Melanoma antigen family B, 2	2.6543E-04
MAGEC2	Melanoma antigen family C, 2	1.8179E-04
MAGEH1	Melanoma antigen family H, 1	7.1324E-04
MAML2	Mastermind-like 2 (Drosophila)	5.6831E-04
MAN1A1	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1	1.5101E-04
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	8.2997E-05
MAP2K6	Mitogen-activated protein kinase kinase 6	9.6469E-04
MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	8.0167E-04
MARCKSL1	MARCKS-like 1	4.2355E-05
MCCC1	Methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)	6.8229E-04
MEF2A	Myocyte enhancer factor 2A	9.9757E-04
MEIS2	Meis homeobox 2	4.5996E-04
MFAP1	Microfibrillar-associated protein 1	7.3367E-04
MFGE8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein	5.6831E-04
MGC10433		7.9397E-04
MGC13379	HSPC244	8.7132E-04
MGC4172	Short-chain dehydrogenase/reductase	4.0726E-04
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A	6.3229E-04
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor	8.2997E-05
MKNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1	3.1193E-04
MLANA	Melan-A	8.2997E-05
MMP27	Matrix metalloproteinase 27	3.4686E-04
MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	1.8400E-04
MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	8.2967E-04
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	2.5623E-04

Material Suplementario

MNAT1	Menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (<i>Xenopus laevis</i>)	2.2061E-04
MRPL16	Mitochondrial ribosomal protein L16	1.9585E-04
MRPL28	Mitochondrial ribosomal protein L28	7.0458E-04
MRPS27	Mitochondrial ribosomal protein S27	7.2193E-05
MS4A6A	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	2.0626E-04
MSH5	MutS homolog 5 (<i>E. coli</i>)	6.6968E-04
MST1R	Macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)	3.1813E-04
MTAC2D1		5.5890E-04
MTCP1	Mature T-cell proliferation 1	8.2331E-04
MXRA5	Matrix-remodelling associated 5	5.4337E-05
MYADM	Myeloid-associated differentiation marker	3.5160E-04
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	5.1529E-04
NEDD4L	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	4.1917E-04
NEDD8	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8	6.6655E-04
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	5.7172E-04
NFKBIB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	8.5127E-04
NFKBIE	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	8.5127E-04
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	4.5223E-04
NINJ1	Ninjurin 1	1.8179E-04
NME3	Non-metastatic cells 3, protein expressed in	7.2732E-05
NMI	N-myc (and STAT) interactor	3.1189E-04
NOC3L	Nucleolar complex associated 3 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	3.5349E-04
NPPB	Natriuretic peptide precursor B	2.7597E-04
NR6A1	Nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	1.3385E-04
NRCAM	Neuronal cell adhesion molecule	1.8179E-04
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor	1.0917E-04
NSMAF	Neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor	3.1392E-04

Material Suplementario

<i>NSUN3</i>	NOL1/NOP2/Sun domain family, member 3	3.0252E-04
<i>NUAK1</i>	NUAK family, SNF1-like kinase, 1	9.1030E-04
<i>OAS2</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	4.3889E-04
<i>OCA2</i>	Oculocutaneous albinism II (pink-eye dilution homolog, mouse)	9.1250E-04
<i>OCRL</i>	Oculocerebrorenal syndrome of Lowe	1.6671E-04
<i>ODF2L</i>	Outer dense fiber of sperm tails 2-like	3.5466E-04
<i>OGDH</i>	Oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)	7.0597E-05
<i>OPTN</i>	Optineurin	7.4681E-04
<i>OTC</i>	Ornithine carbamoyltransferase	4.4421E-04
<i>PAH</i>	Phenylalanine hydroxylase	3.6245E-04
<i>PANK1</i>	Pantothenate kinase 1	5.4173E-04
<i>PAPOLG</i>	Poly(A) polymerase gamma	1.6801E-04
<i>PARP9</i>	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	4.9073E-04
<i>PBXIP1</i>	Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1	3.1176E-04
<i>PCDH17</i>	Protocadherin 17	1.1130E-04
<i>PCK1</i>	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	1.7151E-04
<i>PCSK9</i>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	6.1175E-04
<i>PDCD6IP</i>	Programmed cell death 6 interacting protein	8.8744E-04
<i>PDE2A</i>	Phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	7.2865E-04
<i>PECAM1</i>	Platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	2.2278E-04
<i>PECI</i>	Peroxisomal D3,D2-enoyl-CoA isomerase	6.7205E-04
<i>PEG10</i>	Paternally expressed 10	2.8313E-04
<i>PFKM</i>	Phosphofructokinase, muscle	6.7117E-04
<i>PGD</i>	Phosphogluconate dehydrogenase	8.8072E-05
<i>PGK1</i>	Phosphoglycerate kinase 1	2.7597E-04
<i>PHB</i>	Prohibitin	6.5307E-04
<i>PIK3CA</i>	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	6.0205E-04

Material Suplementario

PIM1	Pim-1 oncogene	4.3414E-04
PIP3-E	Phosphoinositide-binding protein PIP3-E	4.1135E-04
PJA2	Praja 2, RING-H2 motif containing	6.3826E-04
PKLR	Pyruvate kinase, liver and RBC	6.2577E-04
PKM2	Pyruvate kinase, muscle	6.7117E-04
PKN3	Protein kinase N3	9.0926E-04
PLA2G7	Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	1.4866E-04
PLAGL2	Pleiomorphic adenoma gene-like 2	4.5138E-04
PLCXD1	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1	1.1379E-04
PLD1	Phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	9.0727E-04
PLEK	Pleckstrin	1.0680E-04
PLEKHG1	Pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 1	4.6953E-04
PLVAP	Plasmalemma vesicle associated protein	2.9654E-04
PNN	Pinin, desmosome associated protein	7.9080E-04
POLA2	Polymerase (DNA directed), alpha 2 (70kD subunit)	2.7802E-04
POLDIP2	Polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2	5.7740E-04
POLE	Polymerase (DNA directed), epsilon	5.6831E-04
POLG2	Polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit	1.4444E-04
POLR1D	Polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa	3.6771E-05
POLR2C	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide C, 33kDa	5.4337E-05
POU3F2	POU class 3 homeobox 2	4.5996E-04
PPARD	Peroxisome proliferator-activated receptor delta	3.2071E-04
PPFIA1	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1	1.5101E-04
PPP1R15B	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15B	1.7624E-04
PPP2R2A	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, alpha isoform	8.5384E-04
PRDM2	PR domain containing 2, with ZNF domain	7.3398E-04

Material Suplementario

PRF1	Perforin 1 (pore forming protein)	8.5506E-04
PRKACA	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	5.3638E-04
PRKACG	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma	9.9057E-04
PRKAG2	Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit	3.8692E-04
PRKCA	Protein kinase C, alpha	4.9343E-04
PRKCH	Protein kinase C, eta	7.9304E-04
PRKCI	Protein kinase C, iota	6.6968E-04
PRKY	Protein kinase, Y-linked	2.9779E-04
PROM1	Prominin 1	4.5648E-04
PRPS1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	3.2071E-04
PRR5	Proline rich 5 (renal)	1.9515E-04
PRSS23	Protease, serine, 23	6.2579E-04
PSCD4	Pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 4	5.2598E-04
PSMA2	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	7.0458E-04
PSMD7	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7	1.7121E-04
PTP4A1	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	6.8264E-04
PTP4A3	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3	5.8256E-04
PTPRN2	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	1.8400E-04
PUM1	Pumilio homolog 1 (Drosophila)	4.6818E-04
RAB14	RAB14, member RAS oncogene family	4.4805E-04
RAB2		1.4444E-04
RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family	4.4555E-05
RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family	7.8528E-05
RAB6A	RAB6A, member RAS oncogene family	3.0252E-04
RAB8A	RAB8A, member RAS oncogene family	7.1123E-04
RABAC1	Rab acceptor 1 (prenylated)	7.6633E-04
RABGAP1	RAB GTPase activating protein 1	9.9879E-04

Material Suplementario

RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	9.7315E-04
RAD17	RAD17 homolog (S. pombe)	1.3385E-04
RAD51C	RAD51 homolog C (S. cerevisiae)	5.6484E-04
RANBP5	RAN binding protein 5	6.7746E-04
RAP1A	RAP1A, member of RAS oncogene family	1.8237E-04
RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family	5.1237E-04
RASAL1	RAS protein activator like 1 (GAP1 like)	6.7205E-04
RASGRP2	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)	1.8116E-04
RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1	4.6953E-04
RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	4.0442E-04
RBM39	RNA binding motif protein 39	1.3498E-04
RBP4	Retinol binding protein 4, plasma	5.3771E-04
RDBP	RD RNA binding protein	1.8237E-04
RELB	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	8.6495E-04
RFC2	Replication factor C (activator 1) 2, 40kDa	4.0442E-04
RFC5	Replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa	6.7205E-04
RGS1	Regulator of G-protein signaling 1	7.1302E-04
RHAG	Rh-associated glycoprotein	2.7880E-05
RHOBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	6.7620E-04
RHOT1	Ras homolog gene family, member T1	7.9952E-04
RNF111	Ring finger protein 111	4.9073E-04
RNF138	Ring finger protein 138	3.6792E-04
RNF149	Ring finger protein 149	7.3491E-04
RP5-821D11.2		3.5349E-04
RPA2	Replication protein A2, 32kDa	1.4866E-04
RPA3	Replication protein A3, 14kDa	2.6543E-04

Material Suplementario

RPL23A	Ribosomal protein L23a	7.0671E-04
RPL37	Ribosomal protein L37	2.7178E-04
RPS16	Ribosomal protein S16	2.9654E-04
RPS19	Ribosomal protein S19	5.8802E-05
RREB1	Ras responsive element binding protein 1	7.0597E-05
RRM1	Ribonucleotide reductase M1 polypeptide	2.1018E-04
RRM2	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	8.9315E-04
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	7.8391E-04
RSN		2.8313E-04
RSPRY1	Ring finger and SPRY domain containing 1	4.6712E-04
SACS	Spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (sacsin)	9.4116E-04
SAMD4B	Sterile alpha motif domain containing 4B	1.5101E-04
SCG3	Secretogranin III	8.0167E-04
SCGB2A2	Secretoglobin, family 2A, member 2	1.7624E-04
SCHIP1	Schwannomin interacting protein 1	2.8146E-04
SDCBP	Syndecan binding protein (syntenin)	3.0252E-04
SDCCAG3	Serologically defined colon cancer antigen 3	9.2655E-04
SEMA3A	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	4.6953E-04
SEPN1		1.7121E-04
SERINC3	Serine incorporator 3	8.4481E-04
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteínase, antitrypsin), member 1	9.4116E-04
SERPINA4	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteínase, antitrypsin), member 4	3.0244E-04
SERPINA5	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteínase, antitrypsin), member 5	3.6792E-04
SERPINA6	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteínase, antitrypsin), member 6	1.6119E-04
SERPINB2	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	1.8237E-04
SERPINC1	Serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1	3.5160E-04

Material Suplementario

SESN1	Sestrin 1	4.1135E-04
SF3A3	Splicing factor 3a, subunit 3, 60kDa	6.4780E-04
SFTPA2		1.7999E-04
SFTPD	Surfactant, pulmonary-associated protein D	2.2542E-04
SGK	Serum/glucocorticoid regulated kinase	1.5101E-04
SHC3	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3	5.4337E-05
SIRPA	Signal-regulatory protein alpha	1.7733E-04
SLC13A1	Solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 1	1.9664E-04
SLC15A3	Solute carrier family 15, member 3	7.4570E-05
SLC16A6	Solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)	5.2845E-05
SLC19A2	Solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2	1.5101E-04
SLC1A4	Solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	6.7275E-04
SLC25A1	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1	3.4301E-05
SLC39A9	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 9	8.7132E-04
SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	1.4444E-04
SNRPB	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	3.2071E-04
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	4.3833E-04
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	1.9263E-04
SP3	Sp3 transcription factor	4.6953E-04
SPATA9	Spermatogenesis associated 9	3.4436E-05
SPRR2G	Small proline-rich protein 2G	4.3935E-04
SPRY3	Sprouty homolog 3 (Drosophila)	6.0215E-04
SPSB1	SpIA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1	3.2577E-04
SS18	Synovial sarcoma translocation, chromosome 18	1.4871E-04
SSBP2	Single-stranded DNA binding protein 2	9.7626E-04
SST	Somatostatin	9.8825E-04

Material Suplementario

SSX4	Synovial sarcoma, X breakpoint 4	4.5917E-04
SSX5	Synovial sarcoma, X breakpoint 5	3.2071E-04
ST14	Suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)	1.8237E-04
STXBP1	Syntaxin binding protein 1	2.3987E-05
STXBP5	Syntaxin binding protein 5 (tomosyn)	4.3184E-04
SUPT5H	Suppressor of Ty 5 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	4.9758E-04
SYK	Spleen tyrosine kinase	7.8391E-04
SYNE1	Spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	2.6543E-04
TACSTD1	Tumor-associated calcium signal transducer 1	9.8825E-04
TAF5L	TAF5-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa	3.5208E-04
TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	3.9156E-04
TBC1D8	TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)	7.2494E-04
TBL1XR1	Transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	5.1584E-04
TCERG1	Transcription elongation regulator 1	3.1189E-04
TCF8		2.1139E-04
TEF	Thyrotrophic embryonic factor	3.0183E-04
TES	Testis derived transcript (3 LIM domains)	6.6748E-04
TFAP2C	Transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)	5.6484E-04
TFAP4	Transcription factor AP-4 (activating enhancer binding protein 4)	4.4555E-05
TFCP2	Transcription factor CP2	1.9585E-04
TFF1	Trefoil factor 1	7.9816E-04
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	1.7733E-04
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	3.7306E-04
TGM2	Transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	4.9343E-04
THBD	Thrombomodulin	2.4772E-05
TIAM2	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2	1.4329E-04

Material Suplementario

TINF2	TERF1 (TRF1)-interacting nuclear factor 2	2.8183E-04
TMED2	Transmembrane emp24 domain trafficking protein 2	4.6953E-04
TMEM132A	Transmembrane protein 132A	3.9593E-04
TMEM176B	Transmembrane protein 176B	6.0497E-04
TMEM97	Transmembrane protein 97	8.9315E-04
TMSB4X	Thymosin, beta 4, X-linked	3.5949E-04
TNC	Tenascin C (hexabrachion)	5.2558E-04
TncRNA	Trophoblast-derived noncoding RNA	6.4150E-04
TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	5.4337E-05
TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	6.4154E-04
TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	7.0458E-04
TOB2	Transducer of ERBB2, 2	8.2967E-04
TOM1L1	Target of myb1 (chicken)-like 1	5.1529E-04
TOP3B	Topoisomerase (DNA) III beta	9.8825E-04
TOX	Thymocyte selection-associated high mobility group box	3.5259E-04
TP53AP1	TP53 activated protein 1	8.2997E-05
TP53I11	Tumor protein p53 inducible protein 11	6.8478E-04
TP53I3	Tumor protein p53 inducible protein 3	5.4591E-04
TPD52	Tumor protein D52	4.5540E-04
TRA@	T cell receptor alpha locus	5.7748E-04
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	1.5101E-04
TRIM22	Tripartite motif-containing 22	3.4908E-04
TRIM26	Tripartite motif-containing 26	6.8265E-04
TRIM69	Tripartite motif-containing 69	3.5762E-04
TRSPAP1	TRNA selenocysteine associated protein 1	1.4866E-04
TSPAN13	Tetraspanin 13	3.2071E-04
TSPYL5	TSPY-like 5	7.8528E-05

Material Suplementario

TTF2	Transcription termination factor, RNA polymerase II	2.2542E-04
TUBB2B	Tubulin, beta 2B	3.1665E-04
TUBB3	Tubulin, beta 3	6.8997E-04
TUBG1	Tubulin, gamma 1	2.7178E-04
TWF2	Twinfilin, actin-binding protein, homolog 2 (Drosophila)	1.0680E-04
TXNRD1	Thioredoxin reductase 1	6.0212E-04
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	1.8400E-04
TYRP1	Tyrosinase-related protein 1	2.0721E-04
UBD	Ubiquitin D	9.2788E-04
UBL3	Ubiquitin-like 3	1.5101E-04
UCRC	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD)	4.0833E-04
UFC1	Ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1	1.8680E-04
UGT1A6	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6	2.9435E-04
USF2	Upstream transcription factor 2, c-fos interacting	7.0458E-04
USP12	Ubiquitin specific peptidase 12	1.4095E-04
VAMP3	Vesicle-associated membrane protein 3 (cellubrevin)	7.1544E-04
VDR	Vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	8.9015E-04
VKORC1	Vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1	1.6015E-04
VLDLR	Very low density lipoprotein receptor	4.1135E-04
VWF	Von Willebrand factor	1.8471E-04
WAC	WW domain containing adaptor with coiled-coil	4.9073E-04
WAPAL	Wings apart-like homolog (Drosophila)	7.7488E-04
WDR42A	WD repeat domain 42A	8.7132E-04
WDR72	WD repeat domain 72	2.9103E-04
WDR78	WD repeat domain 78	6.4390E-04
WNT2B	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B	3.3408E-04
YWHAH	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta	1.4095E-04

Material Suplementario

polypeptide

ZDHHC13	Zinc finger, DHHC-type containing 13	8.9315E-04
ZFYVE16	Zinc finger, FYVE domain containing 16	2.6858E-04
ZIC3	Zic family member 3 heterotaxy 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	4.5996E-04
ZNF160	Zinc finger protein 160	1.5695E-04
ZNF25	Zinc finger protein 25	4.0726E-04
ZNF263	Zinc finger protein 263	3.0252E-04
ZNF358	Zinc finger protein 358	4.0442E-04
ZNF491	Zinc finger protein 491	4.1917E-04
ZNF532	Zinc finger protein 532	1.4444E-04
ZNHIT3	Zinc finger, HIT type 3	6.2568E-04
ZXDC	ZXD family zinc finger C	1.5101E-04

Tabla suplementaria S3. 94 genes diferencialmente expresados en los tumores BRCA1 *ESR1*-negativos, corregidos por Bonferroni

Nombre (HUGO)	Descripción
<i>ABCC2</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2
<i>ABCC4</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4
<i>ADA</i>	Adenosine deaminase
<i>AGT</i>	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
<i>ALDH1A2</i>	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2
<i>APOH</i>	Apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)
<i>ASGR2</i>	Asialoglycoprotein receptor 2
<i>BCAT1</i>	Branched chain aminotransferase 1, cytosolic
<i>BNIP3L</i>	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
<i>BTA1</i>	BTA1 RNA polymerase II, B-TFIID transcription factor-associated, 170kDa (Mot1 homolog, <i>S. cerevisiae</i>)
<i>C14orf10</i>	
<i>C1orf74</i>	Chromosome 1 open reading frame 74
<i>C1S</i>	Complement component 1, s subcomponent
<i>CCL3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 3
<i>CD55</i>	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)
<i>CD74</i>	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
<i>CHD1</i>	Chromodomain helicase DNA binding protein 1
<i>COX15</i>	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)
<i>CPSF2</i>	Cleavage and polyadenylation specific factor 2, 100kDa
<i>CXCL9</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
<i>CYP51A1</i>	Cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1
<i>DAK</i>	Dihydroxyacetone kinase 2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
<i>DCT</i>	Dopachrome tautomerase (dopachrome delta-isomerase, tyrosine-related protein 2)
<i>DKFZP761M1511</i>	Hypothetical protein DKFZP761M1511

Material Suplementario

EDG1	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1
EEF1E1	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1
ENO3	Enolase 3 (beta, muscle)
ETFA	Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide (glutaric aciduria II)
ETV4	Ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)
FAM122B	Family with sequence similarity 122B
FBLN1	Fibulin 1
FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)
FGG	Fibrinogen gamma chain
FST	Follistatin
GCA	Grancalcin, EF-hand calcium binding protein
GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1
HLA-DPB1	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1
HLA-DRA	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha
HLA-DRB1	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
IMPDH2	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2
IPO8	Importin 8
ISGF3G	
ITGB7	Integrin, beta 7
ITIH3	Inter-alpha (globulin) inhibitor H3
KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
KIF2A	Kinesin heavy chain member 2A
LAMA1	Laminin, alpha 1
LOC391271	Hypothetical LOC391271
MAFB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAPKAPK2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2

Material Suplementario

MARCKSL1	MARCKS-like 1
MET	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
MLANA	Melan-A
MRPS27	Mitochondrial ribosomal protein S27
MXRA5	Matrix-remodelling associated 5
NME3	Non-metastatic cells 3, protein expressed in
NOTCH4	Notch homolog 4 (Drosophila)
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
NT5E	5'-nucleotidase, ecto (CD73)
OGDH	Oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)
PCDH17	Protocadherin 17
PGD	Phosphogluconate dehydrogenase
PLCXD1	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1
PLEK	Pleckstrin
POLR1D	Polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa
POLR2C	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide C, 33kDa
POSTN	Periostin, osteoblast specific factor
POU5F1	POU class 5 homeobox 1
RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family
RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family
RHAG	Rh-associated glycoprotein
RPS19	Ribosomal protein S19
RREB1	Ras responsive element binding protein 1
SHC3	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3
SILV	Silver homolog (mouse)
SLC15A3	Solute carrier family 15, member 3

<i>SLC16A6</i>	Solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)
<i>SLC25A1</i>	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1
<i>SLC2A3</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
<i>SMG7</i>	Smg-7 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)
<i>SPARCL1</i>	SPARC-like 1 (mast9, hevin)
<i>SPATA9</i>	Spermatogenesis associated 9
<i>STAT5A</i>	Signal transducer and activator of transcription 5A
<i>STAT5B</i>	Signal transducer and activator of transcription 5B
<i>STXBP1</i>	Syntaxin binding protein 1
<i>TFAP4</i>	Transcription factor AP-4 (activating enhancer binding protein 4)
<i>THBD</i>	Thrombomodulin
<i>TNFRSF10B</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
<i>TP53AP1</i>	TP53 activated protein 1
<i>TSPYL5</i>	TSPY-like 5
<i>TWF2</i>	Twinfilin, actin-binding protein, homolog 2 (Drosophila)
<i>TXNIP</i>	Thioredoxin interacting protein

Material Suplementario

Tabla suplementaria S4. Genes diferencialmente expresados entre los grupos BRCA-A y BRCA-B

Nombre (HUGO)	Descripción	FDR	Fold Change
ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	0.1079064	-3.814896
ADA	Adenosine deaminase	0.0764767	-4.463832
AFF4	AF4/FMR2 family, member 4	0.1062399	3.859414
AICDA	Activation-induced cytidine deaminase	0.1023465	3.936944
AK5	Adenylate kinase 5	0.0764767	4.466038
ALG2	Asparagine-linked glycosylation 2 homolog (<i>S. cerevisiae</i> , alpha-1,3-mannosyltransferase)	0.0833053	-4.323372
AMDHD1	Amidohydrolase domain containing 1	0.1055646	-3.873075
AP2M1	Adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	0.0949728	4.110856
ARF3	ADP-ribosylation factor 3	0.1040332	3.899809
ARFIP2	ADP-ribosylation factor interacting protein 2 (arfaptin 2)	0.1023465	3.974909
AUH	AU RNA binding protein/enoyl-Coenzyme A hydratase	0.0748331	4.517449
AVIL	Advillin	0.1023465	3.973159
BCAT2	Branched chain aminotransferase 2, mitochondrial	0.1040332	-3.906748
BRD4	Bromodomain containing 4	0.0876902	-4.231953
C13orf7	Chromosome 13 open reading frame 7	0.1040332	3.890252
C15orf15	Chromosome 15 open reading frame 15	0.0748331	4.604988
C2orf37	Chromosome 2 open reading frame 37	0.0833053	4.315478
CALR	Calreticulin	0.1040332	3.91575
CBARA1	Calcium binding atopy-related autoantigen 1	0.0748331	-4.616215
CCNG2	Cyclin G2	0.0748331	4.592795
CD34	CD34 molecule	0.08917	4.193976
CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	0.1040332	-3.887868
CDKL2	Cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)	0.0890663	4.207418
COL11A2	Collagen, type XI, alpha 2	0.0539835	5.286217

Material Suplementario

COPG2	Coatomer protein complex, subunit gamma 2	0.0748331	4.574808
CRIP1	Cysteine-rich protein 1 (intestinal)	0.0582299	-5.052083
CRYAB	Crystallin, alpha B	0.0766411	4.441608
CSF2RA	Colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	0.0748331	4.559798
CTBS	Chitinase, di-N-acetyl-	0.1023465	-3.981778
CTH	Cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	0.0833053	-4.325584
CYB5R3	Cytochrome b5 reductase 3	0.1040332	3.90808
CYP2A7	Cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 7	0.0275286	5.958886
DCAKD	Dephospho-CoA kinase domain containing	0.1040332	3.891744
DKFZP564O		0.0533289	5.333232
DKFZp761E		0.0974534	-4.043734
DLEU1	Deleted in lymphocytic leukemia, 1	0.0845872	-4.285216
DSC2	Desmocollin 2	0.0206601	6.33418
DUSP12	Dual specificity phosphatase 12	0.0206601	6.228419
DUSP6	Dual specificity phosphatase 6	0.1023465	3.949143
DYNC1H1	Dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1	0.0718909	-4.727195
EBP		0.089454	-4.178884
ELF2	E74-like factor 2 (ets domain transcription factor)	0.0742954	4.654828
ELL	Elongation factor RNA polymerase II	0.1088304	3.806394
ENG	Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)	0.0206601	6.408975
EPHB3	EPH receptor B3	0.0876902	4.229632
FER1L3	Fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)	0.0950525	-4.07648
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2	0.070443	4.790793
FLJ32810	Hypothetical protein FLJ32810	0.0206601	6.360957
FRS2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2	0.0742954	4.660885
FTSJ1	FtsJ homolog 1 (E. coli)	0.0890663	-4.213872

Material Suplementario

GHR	Growth hormone receptor	0.1023465	-4.006668
GLG1	Golgi apparatus protein 1	0.0582299	-5.084468
GLRX5	Glutaredoxin 5	0.1040332	-3.903654
GNG3	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3	0.0748331	4.532257
GNPDA1	Glucosamine-6-phosphate deaminase 1	0.1091064	-3.801179
GPR4	G protein-coupled receptor 4	0.1023465	3.969618
GRK4	G protein-coupled receptor kinase 4	0.0041409	8.463639
GRM7	Glutamate receptor, metabotropic 7	0.0748331	4.513033
GSPT1	G1 to S phase transition 1	0.0533289	-5.335919
GSTA2	Glutathione S-transferase A2	0.0833053	4.308646
GUF1	GUF1 GTPase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	0.0733579	-4.688186
HAO1	Hydroxyacid oxidase (glycolate oxidase) 1	0.0137326	-6.990612
HECTD1	HECT domain containing 1	0.0448876	-5.530808
HIST1H2AC	Histone cluster 1, H2ac	0.1062399	-3.85038
HIST1H4C	Histone cluster 1, H4c	0.1040332	-3.921708
HNRPH2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H')	0.070443	4.800865
HOXB2	Homeobox B2	0.0901203	-4.162174
HSPC159	Galectin-related protein	0.0950525	4.078626
IL11RA	Interleukin 11 receptor, alpha	0.1073145	3.833651
IL17RA	Interleukin 17 receptor A	0.1070147	3.839189
IPO9	Importin 9	0.070443	-4.858249
ITGAE	Integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)	0.0533289	-5.326649
KIAA0157	KIAA0157	0.1023465	-3.983614
KIAA1128	KIAA1128	0.0427705	-5.638009
KIAA1394	KIAA1394 protein	0.0748331	4.532933
KISS1R	KISS1 receptor	0.070443	4.844635

Material Suplementario

LEMD3	LEM domain containing 3	0.0582299	5.071304
LOC346887	Similar to solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 14	0.0206601	6.214677
LOC400986	Protein immuno-reactive with anti-PTH polyclonal antibodies	0.0803895	-4.367797
LOC653364	Similar to Heat-shock protein beta-1 (HspB1) (Heat shock 27 kDa protein) (HSP 27) (Stress-responsive protein 27) (SRP27) (Estrogen-regulated 24 kDa protein) (28 kDa heat shock protein)	0.0949728	-4.10295
LSM8	LSM8 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>)	0.08917	4.193551
LYPLA3	Lysophospholipase 3 (lysosomal phospholipase A2)	0.0895642	-4.171866
MAPKAPK2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	0.1023465	3.955407
MIB1	Mindbomb homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	0.0764767	4.456114
MRPL34	Mitochondrial ribosomal protein L34	0.0913197	-4.148667
MUS81	MUS81 endonuclease homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	0.0582299	-5.116473
MUSK	Muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase	0.0748331	4.588842
NAALADL2	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 2	0.1079064	3.817864
NDE1	NudE nuclear distribution gene E homolog 1 (<i>A. nidulans</i>)	0.0733579	-4.69172
NNAT	Neuronatin	0.1023465	3.950441
NONO	Non-POU domain containing, octamer-binding	0.1023465	3.958353
NOTCH2	Notch homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	0.1062399	3.847191
NRK	Nik related kinase	0.0950525	-4.087367
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	0.0876902	4.241045
NUP214	Nucleoporin 214kDa	0.0748331	-4.617501
NUP62	Nucleoporin 62kDa	0.0852556	-4.273529
OCA2	Oculocutaneous albinism II (pink-eye dilution homolog, mouse)	0.0206601	6.191938
PA2G4	Proliferation-associated 2G4, 38kDa	0.1055646	-3.87138
PCGF5	Polycomb group ring finger 5	0.0718909	-4.747983
PDCD5	Programmed cell death 5	0.0819286	-4.349087
PDXK	Pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	0.0043743	8.133241

Material Suplementario

PIK3R3	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (p55, gamma)	0.1023465	3.960116
PPP1CB	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	0.0448876	5.554793
PRDM4	PR domain containing 4	0.0951769	-4.062166
PRPS1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	0.0951769	4.063192
PRSS1	Protease, serine, 1 (trypsin 1)	0.0845872	-4.291659
RAB14	RAB14, member RAS oncogene family	0.094758	-4.122114
RAD52	RAD52 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	0.1023465	3.952227
REXO2	REX2, RNA exonuclease 2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	0.070443	4.782796
RFXAP	Regulatory factor X-associated protein	0.1079064	3.824194
RHBDF2	Rhomboid 5 homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	0.0876902	-4.236467
RPP21	Ribonuclease P/MRP 21kDa subunit	0.0766411	-4.436985
RPRM	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	0.0949728	4.105726
RSF1	Remodeling and spacing factor 1	0.0582299	-5.102088
S100A2	S100 calcium binding protein A2	0.0718909	4.739275
SAAL1	Serum amyloid A-like 1	0.070443	4.884014
SAPS1	SAPS domain family, member 1	0.1079064	-3.816724
SCP2	Sterol carrier protein 2	0.0803895	4.391894
SEC61B	Sec61 beta subunit	0.0539835	-5.261841
SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2	0.0041409	8.402178
SFRS11	Splicing factor, arginine/serine-rich 11	0.070443	-4.816392
SFRS4	Splicing factor, arginine/serine-rich 4	0.0950525	-4.086226
SFRS9	Splicing factor, arginine/serine-rich 9	0.0748331	-4.542641
SLTM	SAFB-like, transcription modulator	0.0137326	-7.043181
SNAP25	Synaptosomal-associated protein, 25kDa	0.0803895	-4.377514
SPRYD5	SPRY domain containing 5	0.0582299	5.141603
SPTLC1	Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1	0.1023465	3.947398
SQLE	Squalene epoxidase	0.0950525	-4.073904

Material Suplementario

SSBP3	Single stranded DNA binding protein 3	0.1062399	3.857553
STK24	Serine/threonine kinase 24 (STE20 homolog, yeast)	0.0748331	-4.506132
SYNC1	Syncoilin, intermediate filament 1	0.1023465	-3.937412
SYNJ2BP	Synaptojanin 2 binding protein	0.070443	-4.885891
TEF	Thyrotrophic embryonic factor	0.0803895	4.368307
TLX1	T-cell leukemia homeobox 1	0.1062399	-3.854981
TMEM23		0.0540763	5.234119
TP53I3	Tumor protein p53 inducible protein 3	0.070443	4.851879
UBE2M	Ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast)	0.0893625	4.185864
USP10	Ubiquitin specific peptidase 10	0.1023465	-3.938246
USP22	Ubiquitin specific peptidase 22	0.0206601	6.359767
WBP1	WW domain binding protein 1	0.0021516	9.884198
ZNF182	Zinc finger protein 182	0.0764767	4.479983
ZNF263	Zinc finger protein 263	0.0769369	4.426073

Tabla suplementaria S5. Genes diferencialmente expresados entre los grupos SPO-2 y BRCA-A

Nombre (HUGO)	Descripción
<i>ACTN2</i>	Actinin, alpha 2
<i>ALOX12</i>	Arachidonate 12-lipoxygenase
<i>ANKH</i>	Ankylosis, progressive homolog (mouse)
<i>ANKRD13C</i>	Ankyrin repeat domain 13C
<i>AOX1</i>	Aldehyde oxidase 1
<i>AQP6</i>	Aquaporin 6, kidney specific
<i>ARIH1</i>	Ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1 (Drosophila)
<i>ASTE1</i>	Asteroid homolog 1 (Drosophila)
<i>ATF7</i>	Activating transcription factor 7
<i>C12orf32</i>	Chromosome 12 open reading frame 32
<i>C12orf47</i>	Chromosome 12 open reading frame 47
<i>C14orf28</i>	Chromosome 14 open reading frame 28
<i>C14orf80</i>	Chromosome 14 open reading frame 80
<i>C1orf50</i>	Chromosome 1 open reading frame 50
<i>C6orf162</i>	Chromosome 6 open reading frame 162
<i>C7orf10</i>	Chromosome 7 open reading frame 10
<i>C8orf48</i>	Chromosome 8 open reading frame 48
<i>C9orf125</i>	Chromosome 9 open reading frame 125
<i>CBL</i>	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence
<i>CCNL1</i>	Cyclin L1
<i>CD163L1</i>	CD163 molecule-like 1
<i>CD33</i>	CD33 molecule
<i>CD70</i>	CD70 molecule
<i>CD97</i>	CD97 molecule
<i>CDH10</i>	Cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)

CDH18	Cadherin 18, type 2
CDKL1	Cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)
CEACAM4	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 4
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
CHCHD8	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 8
CHERP	Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein
CHRM2	Cholinergic receptor, muscarinic 2
CLASP1	Cytoplasmic linker associated protein 1
CLNS1A	Chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A
CNOT8	CCR4-NOT transcription complex, subunit 8
COX7A1	Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
CRSP3	
CTNBL1	Catenin, beta like 1
CYB5D2	Cytochrome b5 domain containing 2
CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)
DEFB119	Defensin, beta 119
DHODH	Dihydroorotate dehydrogenase
DHX9	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9
DLEU1	Deleted in lymphocytic leukemia, 1
DLEU2	Deleted in lymphocytic leukemia, 2
DMP1	Dentin matrix acidic phosphoprotein
DPAGT1	Dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminephosphotransferase 1 (GlcNAc-1-P transferase)
DRAP1	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)
ELL	Elongation factor RNA polymerase II
EPO	Erythropoietin

Material Suplementario

FAM125B	Family with sequence similarity 125, member B
FAM58A	Family with sequence similarity 58, member A
FANCG	Fanconi anemia, complementation group G
FANK1	Fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
FBXO11	F-box protein 11
FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
FLJ43663	Hypothetical protein FLJ43663
FLJ45455	FLJ45455 protein
FOXF2	Forkhead box F2
FUSIP1	FUS interacting protein (serine/arginine-rich) 1
GABRG2	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 2
GDF8	
GLYAT	Glycine-N-acyltransferase
GNG3	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3
GPR109B	G protein-coupled receptor 109B
GTF2E1	General transcription factor IIE, polypeptide 1, alpha 56kDa
GTPBP2	GTP binding protein 2
HAO1	Hydroxyacid oxidase (glycolate oxidase) 1
HERC2	Hect domain and RLD 2
HSPB7	Heat shock 27kDa protein family, member 7 (cardiovascular)
ICMT	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase
IGSF11	Immunoglobulin superfamily, member 11
IL4R	Interleukin 4 receptor
INHA	Inhibin, alpha
KCNA3	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3

KCNN2	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2
KIAA1394	KIAA1394 protein
KIAA1414	
KRT80	Keratin 80
LNPEP	Leucyl/cystinyl aminopeptidase
LOC154907	Hypothetical LOC154907
LOC285045	Hypothetical protein LOC285045
LOC440224	Similar to coxsackie virus and adenovirus receptor precursor
LOC55565	
LOC644199	Similar to High mobility group protein B1 (High mobility group protein 1) (HMG-1) (Amphoterin) (Heparin-binding protein p30)
LOC729070	Hypothetical protein LOC729070
LOC729725	Hypothetical protein LOC729725
MAGEB3	Melanoma antigen family B, 3
MAGEC1	Melanoma antigen family C, 1
MAPKAP1	Mitogen-activated protein kinase associated protein 1
MEF2B	
MEF2C	Myocyte enhancer factor 2C
MFSD7	Major facilitator superfamily domain containing 7
MRPL22	Mitochondrial ribosomal protein L22
MRPL30	Mitochondrial ribosomal protein L30
MSH4	MutS homolog 4 (E. coli)
MTHFD2L	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2-like
NAALADL2	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 2
NBPF15	Neuroblastoma breakpoint family, member 15
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
NELL1	NEL-like 1 (chicken)

Material Suplementario

<i>NFIL3</i>	Nuclear factor, interleukin 3 regulated
<i>NKX3-1</i>	NK3 homeobox 1
<i>OTC</i>	Ornithine carbamoyltransferase
<i>PAF1</i>	Paf1, RNA polymerase II associated factor, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
<i>PBEF1</i>	Pre-B-cell colony enhancing factor 1
<i>PCDH9</i>	Protocadherin 9
<i>PES1</i>	Pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish)
<i>PLA2G3</i>	Phospholipase A2, group III
<i>PLGLB1</i>	Plasminogen-like B1
<i>POGK</i>	Pogo transposable element with KRAB domain
<i>PPP4R1</i>	Protein phosphatase 4, regulatory subunit 1
<i>PSD</i>	Pleckstrin and Sec7 domain containing
<i>RAPH1</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1
<i>RARA</i>	Retinoic acid receptor, alpha
<i>RGPD4</i>	RANBP2-like and GRIP domain containing 4
<i>RIMS3</i>	Regulating synaptic membrane exocytosis 3
<i>RPAIN</i>	RPA interacting protein
<i>RTF1</i>	Rtf1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
<i>RYK</i>	RYK receptor-like tyrosine kinase
<i>SIX1</i>	SIX homeobox 1
<i>SLC12A6</i>	Solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 6
<i>SLC38A4</i>	Solute carrier family 38, member 4
<i>SMARCC1</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1
<i>SNAI2</i>	Snail homolog 2 (<i>Drosophila</i>)
<i>SNRPA</i>	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A
<i>SSX3</i>	Synovial sarcoma, X breakpoint 3
<i>ST3GAL2</i>	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2

STAMBP	STAM binding protein
SURF1	Surfeit 1
SYNC1	Syncoilin, intermediate filament 1
TACR1	Tachykinin receptor 1
TAF1B	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, B, 63kDa
TDRD9	Tudor domain containing 9
THOC1	THO complex 1
THRB	Thyroid hormone receptor, beta (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog 2, avian)
TIMP4	TIMP metalloproteinase inhibitor 4
TLL1	Tolloid-like 1
TMEM182	Transmembrane protein 182
TNFSF4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1, 34kDa)
TOR1AIP1	Torsin A interacting protein 1
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
TRHDE	Thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme
TSPYL1	TSPY-like 1
USH2A	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)
UXT	Ubiquitously-expressed transcript
VENTX	VENT homeobox homolog (Xenopus laevis)
WASF3	WAS protein family, member 3
WIT1	Wilms tumor upstream neighbor 1
WWP2	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
ZBTB40	Zinc finger and BTB domain containing 40
ZC3H13	Zinc finger CCCH-type containing 13
ZCCHC6	Zinc finger, CCHC domain containing 6
ZSCAN22	Zinc finger and SCAN domain containing 22

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

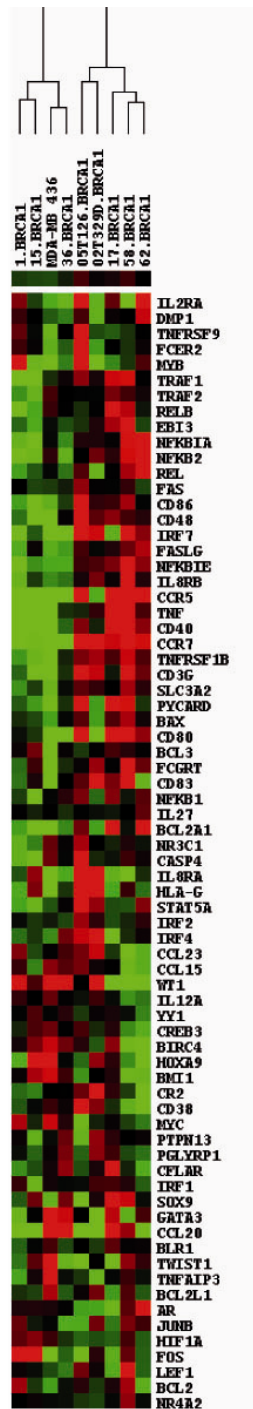


Figura suplementaria S1. Agrupamiento jerárquico no-supervisado de los tumores BRCA1 *ESR1*-negativos y de la línea celular MDA-MB 436, BRCA1-mutante, utilizando 72 genes dianas de NFkB relacionados con apoptosis y sistema inmune. Dos grupos son observados.

ARTÍCULO ORIGINADO DE LA TESIS

British Journal of Cancer (2009) 101, 1469–1480
 © 2009 Cancer Research UK All rights reserved 0007–0920/09 \$32.00
 www.bjancer.com



Gene expression profiling integrated into network modelling reveals heterogeneity in the mechanisms of BRCA1 tumorigenesis

R Fernández-Ramires¹, X Solé², L De Cecco^{3,4}, G Lloret⁵, A Cazorla⁶, N Bonifaci², MJ Garcia¹, T Caldés⁷, I Blanco⁵, M Gariboldi^{3,4}, MA Pierotti^{3,4}, MA Pujana^{8,2}, J Benitez¹ and A Osorio^{8,1}

¹Human Genetics Group Human Cancer Genetics Program, Spanish National Cancer Center (CNIO) and CIBERER, Melchor Fernández Almagro, 3, Madrid 28029, Spain; ²Biostatistics and Bioinformatics Unit, and Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, L'Hospitalet, Av. Gran Via s/n km, 2,7, Barcelona 08907, Spain; ³Fondazione Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy; ⁴Fondazione Istituto FIRC Oncologia Molecolare, Via Giacomo Venezian 1, Milan, Milano 20133, Italy; ⁵Genetic Counseling Unit, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, L'Hospitalet, Av. Gran Via s/n km, 2,7, Barcelona 08907, Spain; ⁶Department of Pathology, Fundación Jiménez Díaz, Avda. Reyes Católicos, 2–28040 Madrid, Spain; ⁷Clinical Oncology Laboratory, Hospital Clínico San Carlos, Profesor Martín Lagos s/n E-28040, Madrid, Spain

BACKGROUND: Gene expression profiling has distinguished sporadic breast tumour classes with genetic and clinical differences. Less is known about the molecular classification of familial breast tumours, which are generally considered to be less heterogeneous. Here, we describe molecular signatures that define BRCA1 subclasses depending on the expression of the gene encoding for oestrogen receptor, *ESR1*.

METHODS: For this purpose, we have used the Oncochip v2, a cancer-related cDNA microarray to analyze 14 BRCA1-associated breast tumours.

RESULTS: Signatures were found to be molecularly associated with different biological processes and transcriptional regulatory programs. The signature of *ESR1*-positive tumours was mainly linked to cell proliferation and regulated by ER, whereas the signature of *ESR1*-negative tumours was mainly linked to the immune response and possibly regulated by transcription factors of the REL/NFκB family. These signatures were then verified in an independent series of familial and sporadic breast tumours, which revealed a possible prognostic value for each subclass. Over-expression of immune response genes seems to be a common feature of ER-negative sporadic and familial breast cancer and may be associated with good prognosis. Interestingly, the *ESR1*-negative tumours were subdivided into two groups presenting slight differences in the magnitude of the expression of immune response transcripts and REL/NFκB transcription factors, which could be dependent on the type of BRCA1 germline mutation.

CONCLUSION: This study reveals the molecular complexity of BRCA1 breast tumours, which are found to display similarities to sporadic tumours, and suggests possible prognostic implications.

British Journal of Cancer (2009) 101, 1469–1480. doi:10.1038/sj.bjc.6605275 www.bjancer.com

© 2009 Cancer Research UK

Keywords: gene expression profiling; BRCA1-associated tumours; prognosis

Breast cancer is a complex disease, encompassed by different clinically and molecularly stratified entities. In 2000, Perou and colleagues demonstrated that tumour phenotypic diversity correlates with differences in global gene expression patterns, which in turn reflect aspects of the biological behaviour of the tumours (Perou *et al*, 2000). This study and subsequent ones (Sorlie *et al*, 2001; van't Veer *et al*, 2002; Bertucci *et al*, 2006) provide detailed analysis of correlations with histopathological and clinical characteristics.

The level of expression of the oestrogen receptor (ER) is a key feature that divides breast tumours into two main clusters. ER-positive tumours include the luminal A and luminal B subclasses showing different prognosis (Perou *et al*, 2000).

Tumours with very low or no detectable expression of ER can be classified into HER2/ErbB2-positive, normal breast-like and basal-like (Perou *et al*, 2000; Sorlie *et al*, 2001). The first subclass is characterised by over-expression of *ERBB2* and other genes at the 17q22 amplicon. Normal breast-like tumours show high heterogeneity, with expression of genes related to the adipose tissue and other nonepithelial cells (Sorlie *et al*, 2001). Finally, the basal-like subclass is known to be negative for HER2/ErbB2, ER and the progesterone receptor (PR), and characterised by the expression of genes from the basal epithelium with high frequency of *TP53* mutations (Sorlie *et al*, 2001; Foulkes *et al*, 2004; Bertucci *et al*, 2006; Turner and Reis-Filho, 2006; Yehiely *et al*, 2006; Adelaide *et al*, 2007; Jumppanen *et al*, 2007). Basal-like tumours account for up to 15% of all breast cancers and the clinical handling of this subclass is a major challenge, once they do not respond to conventional targeted therapies.

Similar features in familial breast cancer are less clearly understood, partially due to the fact that very few studies have been published regarding expression profiling of the corresponding breast tumours. This lack of information probably

*Correspondence: Dr A Osorio; E-mail: aosorio@cnio.es or Dr MA Pujana; E-mail: mapujana@concolgia.net
 Data deposition footnote: The data were deposited in the GEO database under the accession number [GSE12350]
 Received 27 February 2009; revised 17 July 2009; accepted 27 July 2009



lies in the difficulty to collect frozen tumours from hereditary breast cancer cases genetically characterised. This is also reflected in the small size of the series that have been published so far. In 2001, Hedenfalk *et al* (2001) examined a small series of tumours from patients with germline mutations in *BRCA1* or *BRCA2* genes and differentiated two groups within *BRCA1*. They suggested that the DNA repair and apoptosis pathways were altered in the *BRCA1* tumours and that, although most of these were ER negative, ER status alone was not sufficient to discriminate both classes. In a subsequent study, Hedenfalk *et al* (2003) proposed novel classes for the familial non-*BRCA1/BRCA2* breast tumours and a different expression profile to those of the *BRCA1*- and *BRCA2*-associated tumours reported earlier (Hedenfalk *et al*, 2003).

More recently, it has been suggested that most tumours arising in *BRCA1* mutation carriers display a basal-like phenotype, with the percentages reported ranging from 44 to almost 100% (Diaz *et al*, 2007; Melchor and Benitez, 2008). It is not yet known whether there are differences in the molecular or clinical characteristics within *BRCA1* or between *BRCA1* and sporadic basal-like tumours. Two recent expression profiling studies have revealed further stratification of the sporadic ER-negative breast tumours (Kreike *et al*, 2007; Teschendorff *et al*, 2007). Kreike *et al* (2007) reported that basal-like tumours can be divided into five different subclasses and linked the presence of lymphocytic infiltrate and central fibrotic zones to lower risk of metastasis. In addition, Teschendorff *et al* (2007) defined four ER-negative subgroups whose clinical outcomes differ according to the expression of genes of the immune response.

Here, we used expression profiling to classify the *BRCA1* breast tumours and applied an integrative approach to examine biological dependencies and differences. Tumours were initially segregated according to the expression of *ESR1* gene or the expression of basal markers. Detailed examination of the profiles of apparently uniform classes revealed molecular differences within both the *ESR1*-positive and *ESR1*-negative tumours. These subclasses were corroborated in an independent series of familial and sporadic breast tumours, which revealed possible prognostic value. We suggest that *BRCA1* breast tumours show a high degree of molecular complexity and define the wiring diagram of signalling pathways involved in their tumorigenesis.

MATERIALS AND METHODS

Tumoral tissues

Fourteen frozen tumours from patients harbouring germline mutations in *BRCA1* were used (Supplementary Table S4). Samples proceeded from CNIO (Madrid), Istituto Tumori (Milan), Hospital Clínico San Carlos (Madrid) and ICO (Barcelona). Patient selection and mutational analysis are described elsewhere (Diez *et al*, 2003; Manoukian *et al*, 2007). A tissue microarray containing an independent series of 15 *BRCA1* tumours previously classified as basal or luminal-like phenotype (Palacios *et al*, 2005) was used to analyse the CD133 (Prominin 1) and MMP7 (Matrix Metalloproteinase 7) proteins. Immunohistochemical staining was performed by the Labelled Streptavidin-Biotin method (Dako, Glostrup, Denmark) with a heat-induced antigen retrieval step. Immunofluorescence was performed with a fluorescence-labelled secondary antibody (Alexa 488 for MMP7 and Alexa 555 for CD133).

Evaluation of tumour samples

Frozen tumour samples were included in a polyvinyl matrix (OCT). A slice of each sample was stained with hematoxylin-eosin and examined by a pathologist to determine the amount of tumoral cells; those with a tumour content >70% were used for subsequent RNA extraction.

RNA extraction, cDNA labelling and hybridisation

Total RNA extraction was performed (TRIZOL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and mRNA was amplified from 5 µg of total RNA (SuperScript II, Invitrogen and Ambion, Austin, TX, USA). A new cDNA was synthesised from the amplified mRNA and labelled with Cy5. The same process was carried out with the Universal Human Reference RNA (Stratagene, La Jolla, CA, USA), which was labelled with Cy3. Hybridisation was performed onto the CNIO human OncoChip V2 following standard conditions (Tracey *et al*, 2002).

Quantitative RT-PCR

DNA-free total RNA was obtained from a set of 10 breast cancer cell lines including the *BRCA1*-mutant cell line MDA-MB-436 (previously hybridised onto the Oncochip V2). One microgram of RNA was reverse transcribed using MMLV retrotranscriptase (Invitrogen) and random hexamers. Quantitative PCR assays were set up in triplicate for the *BRCA1* target gene and two control genes (*BACT* and *MRPL19*). Assays were designed using the Roche Applied Science Universal Probe Library web site for *BRCA1* (probe 11) and *MRPL19* (probe 42). *BACT* primers and probe are described elsewhere. The relative expression of *BRCA1* was determined using the free access qBase software (Hellemans *et al*, 2007), which is based on a modification of the classic delta-delta Ct method that allows for PCR efficiency correction and multiple control gene normalisation.

Microarray data analyses

Two channel ratios (Cy5/Cy3) for each spot were generated and quantified using GenePix Pro 5.1 (Axon Instruments, Inc., Union City, CA, USA). Data were normalised with the print-tip loess method (Yang *et al*, 2002) and log₂-transformed values, and filtered using the PREPROCESSOR tool (Montaner *et al*, 2006). Differentially expressed genes were declared after applying a two-tail *t*-test with the *P*-values adjusted for the false discovery rate (FDR) using the Tibshirani and Efron approach (Tibshirani and Efron, 2002). Representation of Gene Ontology (GO) terms was examined using the Onto-Express tool (Khatiri *et al*, 2007), with the reference including all genes in the array that passed quality filters and with *P*-values calculated based on the hypergeometric distribution and corrected using the FDR approach. Unsupervised clustering was performed in the R programming language (82) using the Euclidean distance and Ward's minimum variance method, except in the analysis of basal markers, which was performed with the correlation and average-linkage clustering method. A bootstrapping resampling approach in the R library pvclust (Suzuki and Shimodaira, 2006) was applied to assess clustering robustness. Data from van't Veer *et al* (2002) were log₂-transformed and cross-mapped with our gene lists using Entrez gene identifiers manually curated for all possible probes matching each gene. Histopathological and clinical information was downloaded from the publication site.

Transcription factor and interactome analyses

Examination of predicted transcription factor binding sites was performed using the oPOSSUM tool (Ho Sui *et al*, 2005), with promoters defined as -2 kilobases (kb) to the start of transcription, and using JASPAR annotations with a matrix match threshold of 80%. Fisher's exact test was used to examine the results for over-representation and using the Bonferroni correction taking into account the number of motifs analysed ($n = 111$). Experimentally identified binding sites for ER and E2F1 were taken from the original publications or relevant databases (Carroll *et al*, 2006; Jin *et al*, 2006). We assigned ER *cis*-regulators to the closest known

gene locus (5' end) in the May 2004 version of the human genome in the UCSC Genome Browser. The human interactome network was built by combining three previously published data sets, which consist mainly of experimentally verified interactions. The data set based on the Human Protein Reference Database (Gandhi *et al*, 2006) contains compiled and filtered binary protein interactions from most currently available databases. High-confidence yeast two-hybrid interactions from Pujana *et al* (2007) and Stelzl *et al* (2005) were then incorporated, and orthology-based predictions and homodimers were excluded to avoid bias. Proteins with no assigned Entrez GeneID were also excluded from the analyses. Shortest distances were calculated using only the giant network component and the geodesic formulation given by Freeman (Stelzl *et al*, 2005) using the R programming language (82). Differences between distributions of shortest paths were assessed with the Mann-Whitney *U*-test and GO term representations evaluated with the Onto-Express tool (Khatri *et al*, 2007), taking as a reference the protein set of the giant network component.

RESULTS

ESR1-status or the basal-like phenotype as major classifiers

Unsupervised clustering of the 5570 genes that remained after data filtering (see Materials and Methods) stratified the whole series of 14 BRCA1 tumours into two main branches (Figure 1A). This clustering was clearly mediated by *ESR1* expression: one cluster (five samples, right branch) over-expressed this gene whereas the rest (nine samples, left branch) mostly showed very modest or undetectable *ESR1* expression.

Examination of the 'intrinsic gene list' (Perou *et al*, 2000; Hu *et al*, 2006), and an exhaustive review of the literature (Perou *et al*, 2000; Sorlie *et al*, 2003) identified a set of 55 established markers present in our platform that were subsequently used for classification (Figure 1B). Two main groups were identified, one over-expressing markers typically found in sporadic luminal tumours such as *GATA3*, *TFPI* and *SCUBE2* (right panel), and the other negative for *ESR1*, *ERBB2* and the PR gene (*PGR*) (triple negative) and over-expressing genes from the basal layer such as *CDH3*, *CRYAB* and *KRT5-17* (left panel). This clustering showed consistent results with the previous classification with the exception of sample #33 that shared characteristics of both basal and luminal classes. As the classification with the 55 markers was in agreement with the immunohistochemical data for this sample (ER and PGR positive, Supplementary Table S4) we decided to maintain it within the *ESR1*-positive class.

BRCA1 tumour subclasses and signatures

Using the set of 5570 genes that passed filtering criteria (see Materials and Methods for data quality evaluation), we examined differential expression within the BRCA1 classes relative to the common reference. Applying a FDR of 1 out of 1000, 212 genes were differentially expressed within the class of *ESR1*-positive tumours (hereafter, gene-set #1) and 670 genes differentially expressed within the class of *ESR1*-negative tumours (gene-set #2) (Supplementary Tables S1 and S2, respectively).

Biological differences between the two gene-sets were revealed by analysing GO term annotations (see Materials and Methods). Taking into account the number of genes annotated for each term and the 5570 genes, the top-ranked biological processes in gene-set #1 were transcription, DNA-dependent and cell cycle, whereas the top-ranked in gene-set #2 were the immune response and cell cycle. Consistent with the association with cell proliferation (Butt *et al*, 2007), response to oestrogen stimulus was found to be over-represented in gene-set #1 but not in gene-set #2. In addition,

analysis of functional genomic data of the ER-positive cell line MCF7 (Carroll *et al*, 2006) identified a higher than expected number of genes in gene-set #1 to be transcriptionally regulated by the ER signalling pathway. Thirty-three (15%) genes in this set showed significant transcriptional changes on ER signalling and chromatin immunoprecipitation assays identified a *cis*-ER-binding site in a further 60 (28%). Finally, the gene-set #2 also contained several tumour suppressors (*EPHA3* and *EPHB2*) and proto-oncogenes (*AKT1*, *AURKA*, *ETV6*, *MITF* and *PIK3CA*), which expands on the observed enrichment of the immune response and suggests that this gene-set has a critical role in breast tumorigenesis. Together, this analysis highlights candidate biological processes that are critical in BRCA1 tumorigenesis beyond the potential of cell proliferation.

Markers that differentiate *ESR1*-negative and *ESR1*-positive BRCA1 tumours

To identify markers that more strongly differentiate *ESR1*-based BRCA1 classes, we compared gene-sets #1 and #2 using a fold-change threshold ≥ 2 in absolute value (FDR $< 5\%$). A total of 31 genes met these criteria (Table 1) and, among these, two of the most differentially expressed, *CD133* and *MMP7*, were selected for evaluation in an independent series of BRCA1 tumours (see Materials and Methods). Immunohistochemical and immunofluorescence assays of both proteins strongly correlated with the gene expression results (Figure 2): *MMP7* showed strong staining in $\sim 80\%$ (9 out of 11) of the ER-negative tumours but in none of the ER-positive tumours (0 out of 4), and *CD133* showed strong staining in 90% of the ER-negative tumours (10 out of 11) but was completely absent from the four ER-positive tumours (P -values = 0.011 and 0.004, respectively).

Putative prognostic value of the immune response

The association between gene-set #2 and the immune response was narrowed down using child GO terms such as Cytokine and Chemokine Mediated Signalling Pathway or Lymphocyte Proliferation. Overall, 52 genes in gene-set #2 with annotations from these processes were identified and most were over-expressed in the *ESR1*-negative BRCA1 tumours. Next, using gene-set #2, an unsupervised clustering of these tumours identified two possible subclasses distinguished by the expression level of several transcripts in these processes (Figure 3A).

The expression level of immune response genes has recently been shown to provide prognostic value for sporadic ER-negative breast tumours (Teschendorff *et al*, 2007) and this biological process seems to be commonly present in breast cancer prognosis signatures (Reyal *et al*, 2008). Examination of gene-set #2 and the signature of Teschendorff *et al* (2007) identified 18 genes in common, which is higher than the number expected by chance (P -value $< 10^{-7}$). In agreement with this observation, differential expression of several genes in set #2 has also been associated with breast cancer metastasis, to the bone (*CX3CL1*, *FARSLA*, *FST*, *GBP2*, *HLADPA1*, *HLADPBI*, *HLADRBI*, *MITF*, *NEDD4L*, *SERPINA1* and *TGFBI*) (Kang *et al*, 2005) or to the lung (*ALDH3A1*, *COL1A1*, *EFEMP1*, *GSN*, *HLADPA1*, *HLADPBI*, *MAN1A1*, *PTPRN2* and *TNC*) (Minn *et al*, 2005). In both metastatic conditions, the number of genes in common with gene-set #2 is higher than randomly expected (P -values < 0.05). This suggests the putative association between gene-set #2 and BRCA1 prognosis. Although the immune response gene-set is differentially expressed in the same direction in all *ESR1*-negative BRCA1 tumours examined here, it can stratify tumours in at least two additional subclasses (Figure 3a and b) depending on the magnitude of the expression of specific genes (Supplementary Table S5). The transcript levels of genes that overlap with the good prognostic signature of sporadic ER-negative tumours were higher in class B.

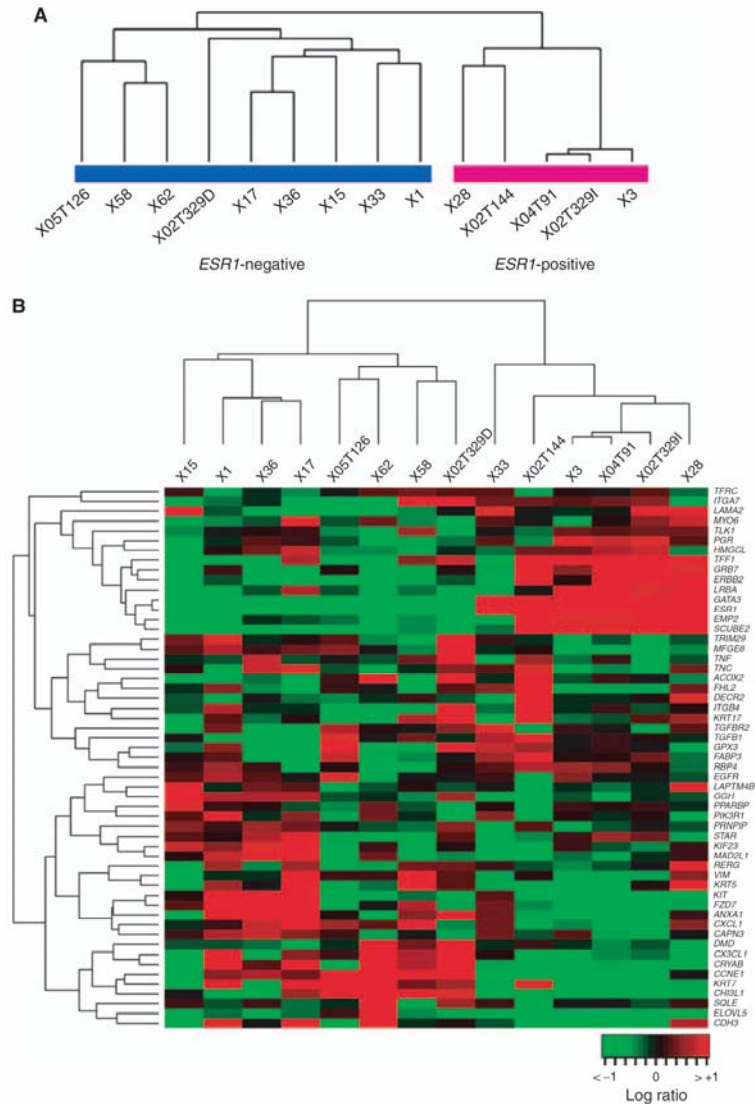


Figure 1 (A) Dendrogram resulting of unsupervised hierarchical clustering of the 14 BRCA1 tumours and 5570 genes that remained after data quality filtering. Two main clusters are observed mediated by ESR1 expression (left branch encompasses tumours over-expressing ESR1 and right branch those with modest or no detectable levels of ESR1). (B) Unsupervised hierarchical clustering of the 14 BRCA1 tumours using the transcript levels of 55 genes representing markers of the five distinct subclasses of sporadic breast tumours (Perou et al, 2000). The same clusters as in the previous analysis are observed except for sample #33.

Examination of independent series of ER-negative BRCA1 tumours

The observed association with the immune response and with metastasis genes indicated a possible prognostic value of the

expression profiles of gene-set #2. We then examined the profiles and their association with histopathological or clinical variables in an independent series of ER-negative BRCA1 tumours (van't Veer et al, 2002). Unsupervised clustering using genes differentially expressed in our series of ER-negative tumours with *Bonferroni*

Table 1 Description of the 31 genes that more strongly differentiate *ESR1*-based BRCA1 subclasses using a fold-change threshold higher or lower than 2 or -2, respectively, and a FDR lower than 5%

Gene name (HUGO)	Description	Chromosome	Start (bp)	End (bp)	Strand	Fold change	FDR P-value
<i>C10orf116</i>	Chromosome 10 open reading frame 116	10	88718168	88720646	+	3.77	6.4207E-04
<i>CD133</i>	Prominin 1	4	15578950	15694453	-	-2.70	1.5661E-02
<i>CRABP2</i>	Cellular retinoic acid binding protein 2	1	154936034	154942232	-	2.12	7.7835E-03
<i>ERBB3</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	12	54760159	54783395	+	2.13	1.0152E-05
<i>ESR1</i>	Estrogen receptor 1	6	152168512	152466099	+	4.25	4.4951E-04
<i>F2RL2</i>	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	5	75947064	75954996	-	2.12	8.3191E-03
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3	10	8136673	8157170	+	3.30	1.3560E-03
<i>GPR98</i>	G protein-coupled receptor 98	5	89945799	90495789	+	3.40	6.0975E-03
<i>HIST1H1C</i>	Histone cluster 1, H1c	6	26163894	26164678	-	2.49	1.6326E-03
<i>HSPB8</i>	Heat shock 22 kDa protein 8	12	118100978	118116933	+	2.86	4.4951E-04
<i>LAMP3</i>	Lysosomal-associated membrane protein 3	3	184322698	184363317	-	-2.29	9.6204E-03
<i>LDHB</i>	Lactate dehydrogenase B	12	21679543	21702043	+	-2.32	6.4207E-04
<i>LMO4</i>	LIM domain only 4	1	87566739	87587021	+	-2.42	1.3021E-03
<i>LOC124220</i>	Similar to common salivary protein 1	16	2820174	2822285	+	3.78	4.8845E-04
<i>LOC391271</i>	Hypothetical LOC391271	21	20719132	20720350	-	2.65	9.3351E-05
<i>MAML2</i>	Mastermind-like 2 (Drosophila)	11	95349407	95355511	-	-2.14	1.0648E-02
<i>MID1</i>	Midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	1	145841560	145848017	+	-2.07	2.1773E-02
<i>MMP7</i>	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	11	101896450	101906688	-	-2.85	7.1351E-03
<i>PRAME</i>	Prefentially expressed antigen in melanoma	22	21220124	21231696	-	-4.30	4.3286E-04
<i>PSAT1</i>	Phosphoserine aminotransferase 1	9	80101879	80134827	+	-2.11	3.2517E-03
<i>REEP5</i>	Receptor accessory protein 5	5	112239980	112285930	+	2.04	6.4207E-04
<i>RP5-860F19.3</i>	Early B-cell factor 4	20	2612040	2688754	+	2.02	8.3191E-03
<i>RTN4RL1</i>	Reticulon 4 receptor-like 1	17	1786540	1787865	-	2.28	6.4207E-04
<i>SCUBE2</i>	Signal peptide, CUB domain, EGF-like 2	11	8998511	9069731	-	4.13	3.3991E-05
<i>SUTRK6</i>	SLIT and NTRK-like family, member 6	13	85264923	85271484	-	3.57	6.4207E-04
<i>STARD10</i>	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 10	11	72143422	72182398	-	3.16	3.2803E-04
<i>TFE1</i>	Trefol factor 1	21	42655462	42659713	-	3.38	1.3021E-03
<i>TMEM16A</i>	Transmembrane protein 16A	11	69602056	69713281	+	2.24	6.1384E-03
<i>TNFRSF21</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	6	47307227	47385321	-	-2.07	1.6305E-03
<i>TSPAN13</i>	Tetraspanin 13	7	16785818	16789424	+	2.34	1.1854E-02
<i>UBD</i>	Ubiquitin D	6	29667268	29671562	-	-2.27	2.9004E-02

correction ($n = 94$) (Supplementary Table S3) classified tumours highly according to the presence of lymphocytic infiltrate, as described by van't Veer *et al*, 2002. This observation is consistent with the differential expression of immune response genes and highlighted those genes with greater expression differences in this condition (Figure 4). Tumour subclasses differed considerably in terms of presence/absence of angiogenesis, which leads us to speculate that these genes have a function in the prognosis of ER-negative BRCA1 breast cancer. Overall, the results for the independent series support the putative biological significance of the immune response in the molecular and clinical classification of BRCA1 tumours.

Examination of independent series of ER-positive tumours

The expression levels of transcripts represented in gene-set #1 (*ESR1*-positive BRCA1 tumours) were examined in an independent series of 56 sporadic ER-positive breast tumours (van't Veer *et al*, 2002). This analysis identified a group of tumours with good prognosis, almost all of which were of low grade and metastasis-free up to 5 years (Supplementary Figure S1). These good prognosis tumours were mainly characterised by over-expression of *ERBB3* and down-regulation of cell cycle-related genes such as *CCNA2* and *CCNB2*. Notably, *ERBB3* expression has recently been associated with favorable clinical outcome of invasive ductal carcinomas (Lee *et al*, 2007).

Transcriptional regulation of BRCA1 signatures and association with the type of germline mutation

To investigate the higher-order regulation of BRCA1 signatures we combined the analysis of predicted transcription factor binding sites with the examination of differential expression and profiles in our series. From the analyses of ER functional genomic data shown above, it was demonstrated that many genes in set #1 were regulated directly or indirectly by ER. Examination of JASPAR transcription factor motifs in the promoters of genes in set #2 indicated over-representation of predicted binding sites of C/EBP and RELA (*Bonferroni* corrected Fisher's exact test P -values < 0.05). Two transcription factors of this family present in our array, *NFKB2* and *RELB*, showed over-expression in *ESR1*-negative BRCA1 tumours with fold changes relative to *ESR1*-positive tumours ranging from 3.7 to 4.1, respectively (two-tailed t -test P -values < 0.05).

Consistent with these observations, the expression levels of *REL/NFKB* transcription factors classified our *ESR1*-negative BRCA1 tumours in the same way as observed for the complete gene-set #2, with two main subclasses (a and b) that differed in the magnitude of expression change of immune response genes (but not in the direction) (Figure 3B). Importantly, BRCA1 has been identified as interacting directly with RELA and, thus, activating *NFKB* target genes (Benezra *et al*, 2003). We then examined the association between expression profiles and BRCA1 mutation types in our series. All of the *ESR1*-negative BRCA1 tumours with low

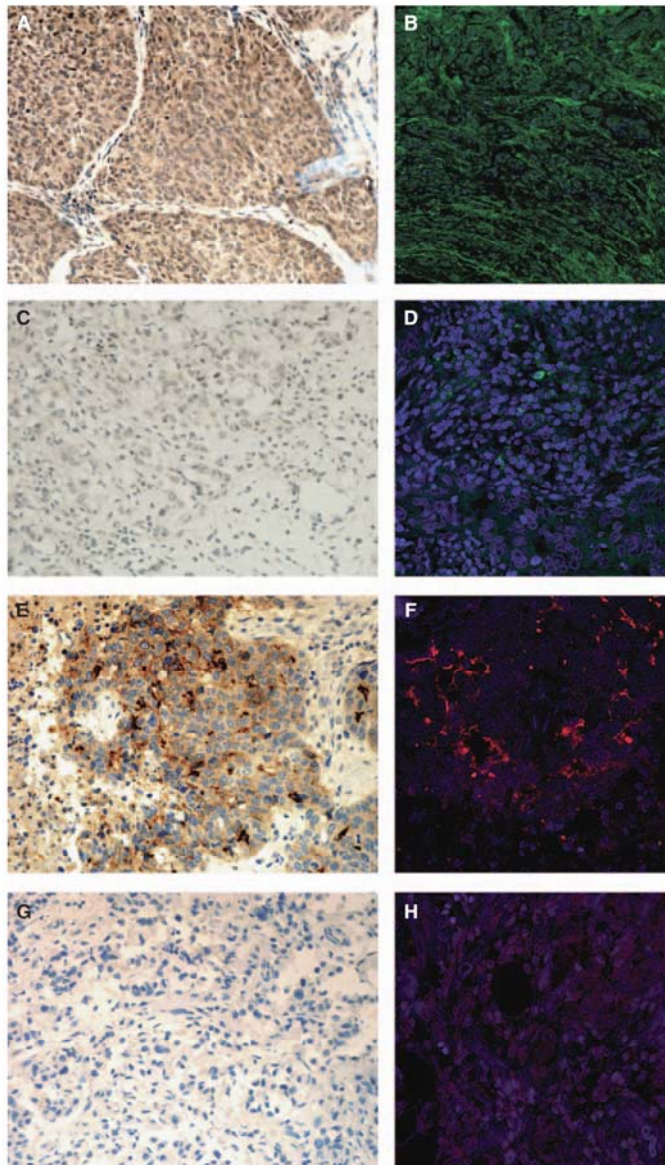


Figure 2 Validation through immunohistochemical (IHC) and immunofluorescence (IF) assays of the expression results obtained for the MMP7 and CD133 genes. (A and B) BRCA1 ER-negative tumour over-expressing MMP7. (C and D) BRCA1 ER-positive tumour lacking MMP7 expression. (E and F) BRCA1 ER-negative tumour over-expressing CD133. (G and H) BRCA1 ER-positive tumour lacking CD133 expression.

expression of *NFκB* originated from BRCA1 truncating mutations that probably led to a complete absence of the protein through the nonsense-mediated mRNA decay mechanism (NMD) (Supplementary Table S4) (Perrin-Vidoz et al, 2002). In contrast, three of the

five BRCA1 *ESR1*-negative tumours, which showed the highest levels of *NFκB2* and *RELB* expression, harboured missense mutations that might led to an aberrant but still present BRCA1 protein.

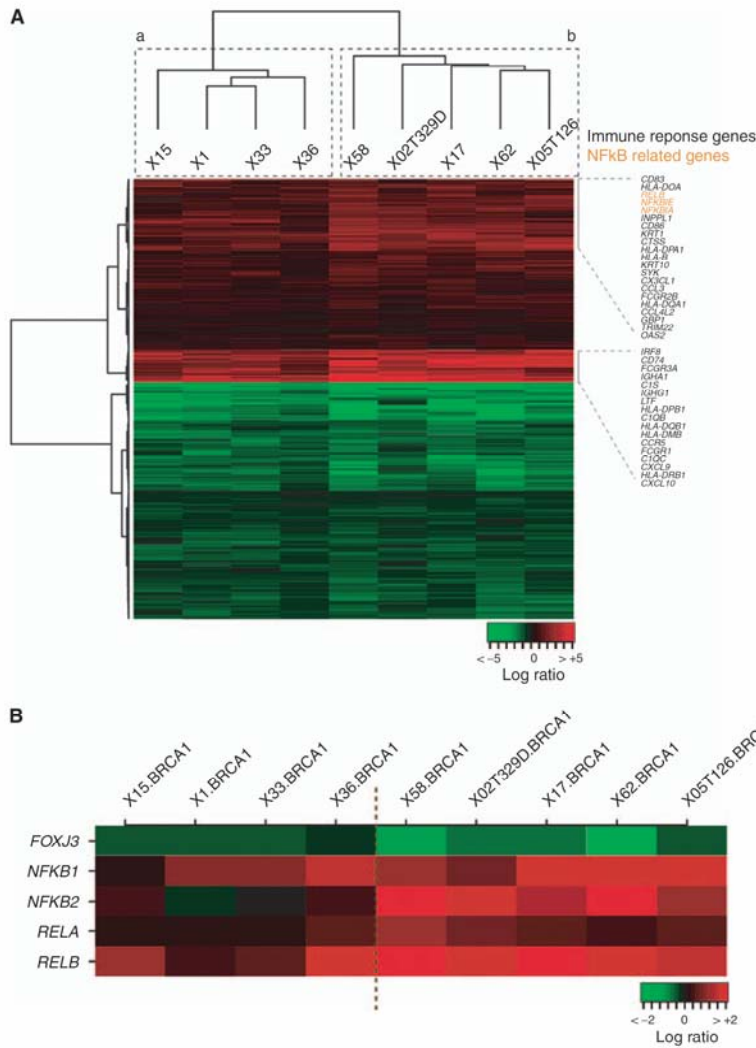


Figure 3 (A) Unsupervised hierarchical clustering of the nine ESRI-negative BRCA1 tumours using the gene-set #2. Two subgroup/class/clusters, **a** (left branch) and **b** (right branch), are observed, showing differences in the magnitude of expression of genes related to the immune response. (B) Unsupervised hierarchical clustering of the nine ESRI-negative BRCA1 tumours using transcription factor genes of the REL/NFκB family. The same subgroup/class/clusters (**a** and **b**) as those found using gene-set #2 are observed.

To evaluate these observations, we examined the expression levels of 72 NFκB target genes related to apoptosis and the immune system (<http://people.bu.edu/gilmore/NFκB/target/index.html>) in our ER-negative BRCA1 tumours and in the BRCA1-mutated cell line MDA-MB-436, showing very low levels of the BRCA1 transcript with respect to the BRCA1-mutated cell line HCC1937 (harbouring a mutation that is known not to trigger NMD) and other control breast cancer cell lines. Two clusters were again observed according to the expression of target genes, as described above, and MDA-MB-436 was classified within the cluster of

tumours showing low expression of NFκB targets (Supplementary Figure S2).

Higher-level study of BRCA1 signatures

To better understand BRCA1 signatures and their role in breast tumorigenesis, we examined them in the context of the network of human protein-protein interactions or interactome network. This analysis revealed that many proteins encoded by these signatures are included in a giant component with 235 nodes or proteins and

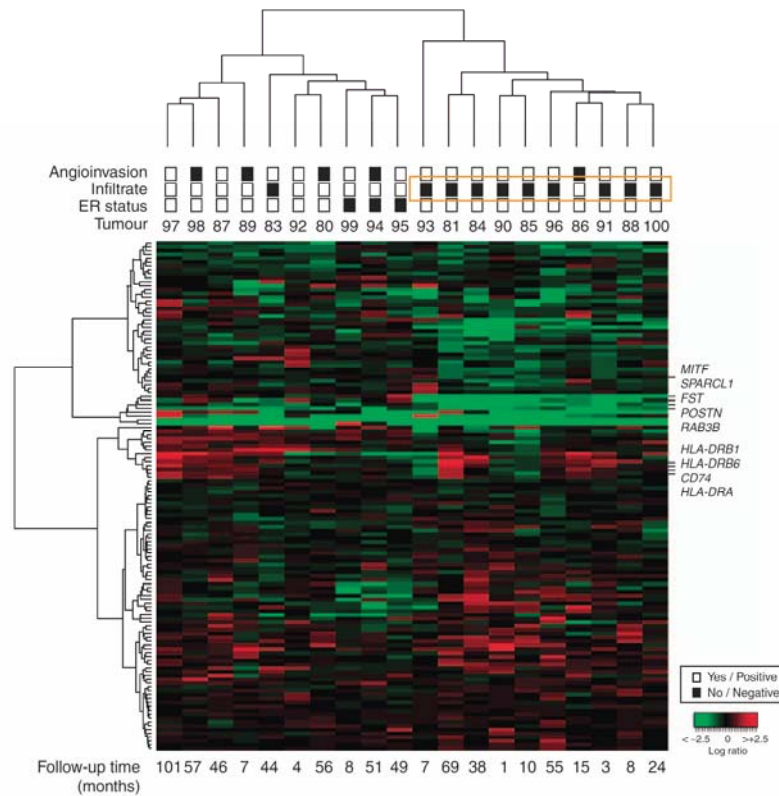


Figure 4 Unsupervised hierarchical clustering obtained with 94 genes differentially expressed in the ESRI-negative tumours, using the Bonferroni correction, in 18 BRCA1 and two BRCA2 (#99 and #94) tumours from the external series of van 't Veer et al (2002). Clustering of tumours according to the presence or not of lymphocytic infiltrate and angioinvasion is observed. Relevant genes of breast cancer metastasis and those that more strongly differentiate clusters are shown. Pathological characteristics are annotated as shown in the inset and follow-up times (months) are shown at the bottom. Expression values are represented as log₂ ratios.

532 edges or interactions (Figure 5), which suggests that the gene products of gene-sets #1 and #2 work in functionally related pathways or processes.

Functional relationships between proteins can be defined as direct interactions, complex memberships or relatively close connections in the interactome network. To determine the exact relationships between the proteins considered here, interactome paths were calculated between proteins encoded by gene-sets #1 and #2 and compared with the complete distribution of shortest paths in the giant component. The shortest paths identified between signatures were smaller than those in the giant component (Mann-Whitney *U*-test *P*-value < 0.001), which supports the proposed existence of functional and dynamical relationships between BRCA1 signatures.

To further examine the functional association between the signatures, we analysed the representation of GO biological process terms in their interactome network neighbourhoods (i.e. proteins that interact directly with each signature, but excluding proteins that belong to any signature). This analysis confirmed previously observed over-representation of certain

processes in differentially expressed genes: gene-set #1 showed significant over-representation of neighbours involved in the Steroid Hormone Receptor Signalling Pathway, the Cell Cycle and Cell Death, but not in the Immune Response; and gene-set #2 showed significant over-representation of all these processes except the Steroid Hormone Receptor Signalling Pathway (Table 2). These observations show the impact of gene expression changes on protein associations mediating BRCA1 tumorigenesis.

DISCUSSION

In this study, we analysed the expression profiling of a series of 14 BRCA1 tumours, which gave insights into the biological processes and molecular wiring diagrams that mediate tumorigenesis. Although the sample size is small, it is worth to note the difficulty of collecting frozen tumour samples from familial breast cancer cases genetically characterised. This is probably the cause of the very few studies published so far regarding the expression profiling of these tumours, all of them using sample sizes similar to ours (Hedenfalk

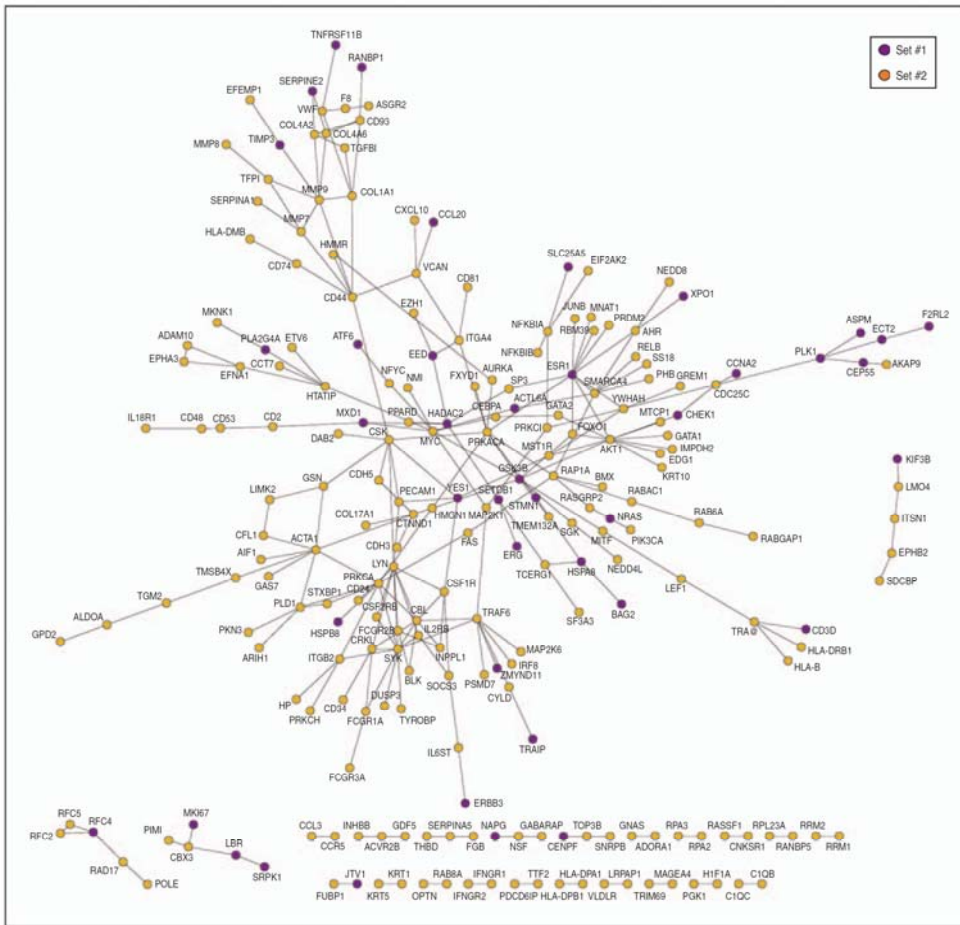


Figure 5 Interactome network of proteins encoded by the gene-sets #1 and #2 as shown in the inset.

Table 2 Over-represented GO terms in the direct or one-hop interactors of proteins encoded by the gene-sets #1 and #2

GO term	Gene-set #1 (n = 198) ^a Number of interactors (FDR P-value) ^b	Gene-set #2 (n = 632) ^a Number of interactors (FDR P-value) ^b
Cell cycle	159 (< 10 ⁻⁹)	267 (< 0.001)
Cell death	138 (< 10 ⁻⁹)	261 (< 0.001)
Immune response	Nonsignificant	191 (< 0.001)
Steroid hormone receptor signaling pathway	28 (< 10 ⁻¹⁰)	Nonsignificant

^aNumber of gene products in the interactome network. ^bTotal number of interactors and corresponding FDR-adjusted P-value for GO term over-representation.

et al, 2001; van't Veer *et al*, 2002). Sixty percent of the tumours analysed here showed low or no expression of *ESR1* or over-expressed genes typically found in basal-like tumours, whereas the remaining tumours showed over-expression of *ESR1* and a

nonbasal-like phenotype. The results are in agreement with other series in which the percentage of BRCA1 breast tumours showing a basal phenotype defined by immunohistochemical markers ranges from 44% to almost 100% (Diaz *et al*, 2007).



Signatures associated with BRCA1 tumours

In addition to the major classification mediated by *ESR1* or basal markers, this study reveals further complexity of BRCA1 tumours. Over-representation of transcription DNA-dependent and cell cycle-related genes and transcripts directly or indirectly regulated by ER was detected in genes differentially expressed in *ESR1*-positive BRCA1 tumours. As cell proliferation-related processes and the ER signalling pathway are known to have an important function in breast cancer prognosis (Yager and Davidson, 2006), we analysed the expression levels of gene-set #1 in an external series of 56 ER-positive sporadic breast tumours (van't Veer *et al*, 2002). Unsupervised analysis identified a subclass of tumours of which the majority did not show angiogenesis or metastases (Supplementary Figure S1). This subclass was characterised by under-expression of cell-cycle or proliferation-associated genes such as *CCNA2* and *CCNB2*. As stated above, these features could explain the less aggressive behaviour of these tumours. An interesting gene over-expressed in gene-set #1 was *ERBB3*. Recently, Lee *et al* (2007) used immunohistochemistry to analyse 378 sporadic invasive ductal carcinomas. They found an association between *ERBB3* expression and positive hormonal receptors status, and an inverse correlation with histological grade, which is consistent with our findings. Thus, *ERBB3* could be not only a predictor of good prognosis within ER-positive sporadic and familial breast cancer patients but also a putative therapeutic target for these tumours.

Analysis of genes differentially expressed in *ESR1*-negative BRCA1 tumours revealed over-representation of genes involved in the immune response and cell cycle. Teschendorff *et al* (2007) described five tumour subclasses within the ER-negative class that can be distinguished according to the patterns of four gene expression clusters associated with cell cycle, immune response, extracellular matrix and steroid hormone response. These clusters were related to clinical outcome, and an association was observed between good prognosis and over-expression of immune response genes, independently of the presence of lymphocytic infiltrate. In the same study, the authors analysed 18 BRCA1 tumours from van't Veer *et al* (2002) and found that they were most similar to the cell cycle-positive and immune response-positive subclass. In agreement with these findings, the two most commonly represented pathways in our *ESR1*-negative BRCA1 subclass were the immune response and the cell cycle. In addition, analysis of gene-set #2 in *ESR1*-negative tumours revealed two probable subclasses distinguished by differences in the magnitude of the expression change of immune response genes that may link to differences in prognosis. Additional research, however, in larger and independent series is needed to further elucidate this relationship.

Using a similar approach as for gene-set #1, we analysed gene-set #2 in the 18 BRCA1 tumours of van't Veer *et al* (2002), finding that the signature was able to classify the samples according to the presence of infiltrate and absence of angiogenesis (Figure 4). Lymphocytic infiltrate is known to be associated with good prognosis (Lee *et al*, 2006), and a recent study by Kreike *et al* (2007) focused on triple-negative sporadic breast tumours revealed that 5-year metastasis-free survival in patients with a moderate or large amount of lymphocytic infiltrate in their tumours was 88%, which was higher than for those with minimal or no lymphocytic infiltrate. In our case it was not possible to determine whether the signature could predict patient outcome independently of infiltrate status, due to the almost perfect correlation between the presence of infiltrate and absence of angiogenesis, but the same results in an independent series support the biological significance of the immune response in the classification of ER-negative BRCA1 tumours.

Two of the 31 most differentially expressed genes between the *ESR1*-negative and *ESR1*-positive BRCA1 tumours, *CD133* and *MMP7* (Table 1), were evaluated by immunohistochemistry and

immunofluorescence in an independent series of 15 BRCA1 tumours, previously classified as basal or luminal (Figure 2). There was good agreement between mRNA and protein levels for both genes (P -value = 0.011 and 0.004 for *MMP7* and *CD133*, respectively), supporting our results.

Involvement of NFκB in the regulation of BRCA1 signatures

We combined the prediction of transcription factor binding sites and the examination of differential expression to determine which transcription factors could be driving the signatures. The ER-negative BRCA1 profiles may be regulated by the NFκB complex. Over-expression of two genes from this family, *NFκB2* and *RELB*, was then observed consistent with motif predictions (Figure 3B). Nuclear Factor-κB is a ubiquitous transcription factor that coordinates several gene products such as cell adhesion molecules, chemokines, cytokines, growth factors and regulators of apoptosis (Chen *et al*, 1999). Over-expression of NFκB subunits *NFκB3* and *NFκB1* were found in a high percentage of breast tumours and are inversely correlated with ER-status (Wang *et al*, 2007), which is in agreement with our findings. Activation of the NFκB pathway has been mainly related to tumour promotion; however, negative effect on tumour development has also been reported, especially in epithelial cells that has led to the idea that NFκB can either promote or oppose tumour development (Karin, 2006).

In our series the over-expression of genes related to immune response is one of the intrinsic characteristics of *ESR1*-negative BRCA1 tumours. The expression levels of these genes can be used to stratify them into two different subgroup/class/clusters (A and B), which were classified according to the expression levels of *REL/NFκB* genes, and a high correlation was also observed with the expression of apoptosis genes regulated by them such as *PYCARD*, *BCL2A1*, *CASP4*, *TRAF1* and *TRAF2* and other NFκB target genes such as those involved in transcription and the immunological cascade (*CCR5*, *CD48*, *NFκB2* and *RELB*).

It has been suggested that BRCA1 acts as a co-activator of NFκB (Benezra *et al*, 2003). It is worth noting that all of the *ESR1*-negative BRCA1 tumours in group A, which show low expression of *NFκB*, harboured truncating mutations in the central portion of *BRCA1* that are thought to trigger the nonsense-mediated mRNA decay mechanism (Perrin-Vidoz *et al*, 2002) (Supplementary Table S4). Interestingly, the BRCA1 cell line MDA-MB-436, which showed lower levels of the *BRCA1* transcript than those found in control breast cancer cell lines measured by quantitative RT-PCR (data not shown), had the same pattern of NFκB-related gene expression as the *ESR1*-negative-A tumours. In contrast, 60% of the *ESR1*-negative tumours (group B), which show the highest expression of *NFκB2* and *RELB*, harboured missense mutations in *BRCA1*, which could produce aberrant proteins but conserving some activities such as the capacity to activate the NFκB machinery. Given the limited size of our series, whether these findings are stable and could be relevant to the prognosis of *BRCA1* mutation carriers depending on the activation of NFκB target genes should be further analysed in a larger sample set.

CONCLUSIONS

In summary, in this study we have established the gene expression profiling of a series of BRCA1 tumours and found that there is a further degree of heterogeneity beyond the main classification by the expression of *ESR1* and the presence or absence of a basal-like phenotype. We have identified specific signatures for *ESR1*-positive and *ESR1*-negative BRCA1 tumours, the latter characterised by the enrichment of immune response and cell-cycle genes, and have found that slight differences in the level of expression of the immune response stratify the ER-negative

BRCA1 tumours into two additional subgroups (A and B). NF- κ B could be a major driver responsible for the levels of both immune response and apoptotic genes in this tumour group/class/cluster.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank L Melchor, V Fernández, JM Rosa, A Barroso, F Fernández, D Megías, G Gómez, Immunohistochemistry and the Genomics Unit of the Spanish National Cancer Center for their support and for use of the facilities.

RFR is partially supported by the Biomedical Network Research Centre for Rare Diseases (CIBERER) (www.ciberer.es) and Marie

Curie Sixth Framework. NB and MAPujana are supported by The 'la Caixa' Foundation grant BM 05/254 and the Spanish Ministry of Health grant FIS 06/0545. MAP is a Ramón y Cajal Researcher with the Spanish Ministry of Education and Science and NB is supported by a predoctoral fellowship of the IDIBELL. TC was supported by Fundación Mutua Madrileña and ISCIII FIS 07/0359, RD6/0020/0021. AO and MG are supported by the Spanish Ministry of Health. This study was supported by *Asociación Española Contra el Cáncer* (AECC) and the Spanish Health Ministry FIS PI061090.

Supplementary Information accompanies the paper on British Journal of Cancer website (<http://www.nature.com/bjc>)

REFERENCES

- Adelaide J, Finetti P, Bekhouche I, Repellini L, Geneix J, Sircoulomb F, Charafe-Jauffret E, Cervera N, Desplans J, Parzy D, Schoenmakers E, Viens P, Jacquemier J, Birnbaum D, Bertucci F, Chaffanet M (2007) Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. *Cancer Res* **67**: 11565–11575
- Benezra M, Chevallerier N, Morrison DJ, MacLachlan TK, El-Deiry WS, Licht JD (2003) BRCA1 augments transcription by the NF- κ B transcription factor by binding to the Rel domain of the p65/RelA subunit. *J Biol Chem* **278**: 26333–26341
- Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Charafe-Jauffret E, Mamessier E, Adelaide J, Debono S, Houvenaeghel G, Maraninchi D, Viens P, Charpin C, Jacquemier J, Birnbaum D (2006) Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. *Cancer Res* **66**: 4636–4644
- Butt AJ, Sutherland RL, Musgrove EA (2007) Live or let die: oestrogen regulation of survival signalling in endocrine response. *Breast Cancer Res* **9**: 306
- Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoutte J, Brodsky AS, Keaton EK, Fertuck KC, Hall GF, Wang Q, Bekiranov S, Sementchenko V, Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, Liu XS, Brown M (2006) Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* **38**: 1289–1297
- Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM (1999) New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* **45**: 7–17
- Diaz LK, Cryns VL, Symmans WF, Sneige N (2007) Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol* **14**: 419–430
- Diez O, Osorio A, Duran M, Martinez-Ferrandis JJ, de la Hoya M, Salazar R, Vega A, Campos B, Rodriguez-Lopez R, Velasco E, Chaves J, Diaz-Rubio E, Jesus Cruz J, Torres M, Esteban E, Cervantes A, Alonso C, San Roman JM, Gonzalez-Sarmiento R, Miner C, Carracedo A, Eugenia Armengod M, Caldes T, Benitez J, Baiget M (2003) Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat* **22**: 301–312
- Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Begin LR, Hamel N, Goffin JR, Wong N, Trudel M, Kapusta L, Porter P, Akslen LA (2004) The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res* **64**: 830–835
- Gandhi TK, Zhong J, Mathivanan S, Karthick L, Chandrika KN, Mohan SS, Sharma S, Pinkert S, Nagaraju S, Periaswamy B, Mishra G, Nandakumar K, Shen B, Deshpande N, Nayak R, Sarker M, Boeke JD, Parmigiani G, Schultz J, Bader JS, Pandey A (2006) Analysis of the human protein interactome and comparison with yeast, worm and fly interaction datasets. *Nat Genet* **38**: 285–293
- Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi OP, Wilfond B, Borg A, Trent J, Raffeld M, Yakhini Z, Ben-Dor A, Dougherty E, Kononen J, Bubendorf L, Fehrle W, Pittaluga S, Gruvberger S, Loman N, Johannsson O, Olsson H, Sauter G (2001) Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* **344**: 539–548
- Hedenfalk I, Ringner M, Ben-Dor A, Yakhini Z, Chen Y, Chebil G, Ach R, Loman N, Olsson H, Meltzer P, Borg A, Trent J (2003) Molecular classification of familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 2532–2537
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**: R19
- Ho Sui SJ, Mortimer JR, Arenillas DJ, Brumm J, Walsh CJ, Kennedy BP, Wasserman WW (2005) oPOSSUM: identification of over-represented transcription factor binding sites in co-expressed genes. *Nucleic Acids Res* **33**: 3154–3164
- Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L, Nobel A, Parker J, Ewend MG, Sawyer LR, Wu J, Liu Y, Nanda R, Tretiakova M, Ruiz Orrico A, Dreher D, Palazzo JP, Perreard L, Nelson E, Mone M, Hansen H, Mullins M, Quackenbush JF, Ellis MJ, Olopade OI, Bernard PS, Perou CM (2006) The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* **7**: 96
- Jin VX, Rabinovich A, Squazzo SL, Green R, Farnham PJ (2006) A computational genomics approach to identify cis-regulatory modules from chromatin immunoprecipitation microarray data—a case study using E2F1. *Genome Res* **16**: 1585–1595
- Jumppanen M, Gruvberger-Saal S, Kauraniemi P, Tanner M, Bendahl PO, Lundin M, Krogh M, Kataja P, Borg A, Ferno M, Isola J (2007) Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. *Breast Cancer Res* **9**: R16
- Kang Y, He W, Tulley S, Gupta GP, Serganova I, Chen CR, Manova-Todorova K, Blasberg R, Gerald WL, Massague J (2005) Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 13909–13914
- Karin M (2006) Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* **441**: 431–436
- Khatiri P, Voichita C, Kattan K, Ansari N, Khatiri A, Georgescu C, Tarca AL, Draghici S (2007) Onto-Tools: new additions and improvements in 2006. *Nucleic Acids Res* **35**: W206–W211
- Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, van de Vijver MJ (2007) Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* **9**: R65
- Lee AH, Gillett CE, Ryder K, Fentiman IS, Miles DW, Millis RR (2006) Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. *Histopathology* **48**: 692–701
- Lee Y, Cho S, Seo JH, Shin BK, Kim HK, Kim I, Kim A (2007) Correlated expression of erbB-3 with hormone receptor expression and favorable clinical outcome in invasive ductal carcinomas of the breast. *Am J Clin Pathol* **128**: 1041–1049
- Manoukian S, Peissel B, Pensotti V, Barile M, Cortesi L, Stacchiotti S, Terenzianni M, Barbera F, Pasquini G, Frigerio S, Pierotti MA, Radice P, Della-Torre G (2007) Germline mutations of TP53 and BRCA2 genes in breast cancer/sarcoma families. *Eur J Cancer* **43**: 601–606
- Melchor L, Benitez J (2008) An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis* **29** (8): 1475–1482
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massague J (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* **436**: 518–524



- Montaner D, Tarraga J, Huerta-Cepas J, Burguet J, Vaquerizas JM, Conde L, Minguez P, Vera J, Mukherjee S, Valls J, Pujana MA, Alloza E, Herrero J, Al-Shahrour F, Dopazo J (2006) Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* **34**: W486–W491
- Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrio D, Barroso A, Rodriguez S, Cigudosa JC, Diez O, Alonso C, Lerma E, Dopazo J, Rivas C, Benitez J (2005) Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. *Breast Cancer Res Treat* **90**: 5–14
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**: 747–752
- Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S (2002) The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* **11**: 2805–2814
- Pujana MA, Han JD, Starita LM, Stevens KN, Tewari M, Ahn JS, Rennert G, Moreno V, Kirchhoff T, Gold B, Assmann V, Elshamy WM, Rual JF, Levine D, Rozek LS, Gelman RS, Gonsalus KC, Greenberg RA, Sobhian B, Bertin N, Venkatesan K, Ayivi-Guedehoussou N, Sole X, Hernandez P, Lazaro C, Nathanson KL, Weber BL, Cusick ME, Hill DE, Offit K, Livingston DM, Gruber SB, Parvin JD, Vidal M (2007) Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. *Nat Genet* **39**: 1338–1349
- Royal F, van Vliet MH, Armstrong NJ, Horlings HM, de Visser KE, Kok M, Teschendorff AE, Mook S, van 't Veer L, Caldas C, Salmon RJ, Vijver MJ, Wessels LF (2008) A comprehensive analysis of prognostic signatures reveals the high predictive capacity of the proliferation, immune response and RNA splicing modules in breast cancer. *Breast Cancer Res* **10**: R93
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10869–10874
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8418–8423
- Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, Timm J, Mintzlaff S, Abraham C, Bock N, Kietzmann S, Goedde A, Toksoz E, Droege A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H, Wanker EE (2005) A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**: 957–968
- Suzuki R, Shimodaira H (2006) Pvcclust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. *Bioinformatics* **22**: 1540–1542
- Teschendorff AE, Miremadi A, Pinder SE, Ellis IO, Caldas C (2007) An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol* **8**: R157
- Tibshirani RJ, Efron B (2002) Pre-validation and inference in microarrays. *Stat Appl Genet Mol Biol* **1**: Article1
- Tracey L, Villuendas R, Ortiz P, Dopazo A, Spiteri I, Lombardia L, Rodriguez-Peralto JL, Fernandez-Herrera J, Hernandez A, Fraga J, Dominguez O, Herrero J, Alonso MA, Dopazo J, Piris MA (2002) Identification of genes involved in resistance to interferon-alpha in cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol* **161**: 1825–1837
- Turner NC, Reis-Filho JS (2006) Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* **25**: 5846–5853
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**: 530–536
- Wang X, Belguise K, Kersual N, Kirsch KH, Mineva ND, Galtier F, Chalbos D, Sonenshein GE (2007) Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat Cell Biol* **9**: 470–478
- Yager JD, Davidson NE (2006) Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* **354**: 270–282
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15
- Yehiely F, Moyano JV, Evans JR, Nielsen TO, Cryns VL (2006) Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends Mol Med* **12**: 537–544

COLABORACIONES EN OTRAS PUBLICACIONES



Genetics and Molecular Biology, 28, 3, 469-474 (2005)
Copyright by the Brazilian Society of Genetics. Printed in Brazil
www.sbg.org.br

Research Article

Increased micronucleated cell frequency related to exposure to radiation emitted by computer cathode ray tube video display monitors

Karina Carbonari¹, Luciane Gonçalves¹, Daniela Roth², Patrick Moreira³, Ricardo Fernández³ and Maria da Graça Martino-Roth^{1,3}

¹*Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Zoologia e Genética, Pelotas, RS, Brazil.*

²*Monash University, Department of Pharmaceutical Biology and Pharmacology, Melbourne, Victoria, Australia.*

³*Universidade Católica de Pelotas, Escola de Medicina, Pelotas, RS, Brazil.*

Abstract

It is well recognized that electromagnetic fields can affect the biological functions of living organisms at both cellular and molecular level. The potential damaging effects of electromagnetic fields and very low frequency and extremely low frequency radiation emitted by computer cathode ray tube video display monitors (VDMs) has become a concern within the scientific community. We studied the effects of occupational exposure to VDMs in 10 males and 10 females occupationally exposed to VDMs and 20 unexposed control subjects matched for age and sex. Genetic damage was assessed by examining the frequency of micronuclei in exfoliated buccal cells and the frequency of other nuclear abnormalities such as binucleated and broken egg cells. Although there were no differences regarding binucleated cells between exposed and control individuals our analysis revealed a significantly higher frequency of micronuclei ($p < 0.001$) and broken egg cells ($p < 0.05$) in individuals exposed to VDMs as compared to unexposed. We also found that the differences between individuals exposed to VDMs were significantly related to the sex of the individuals and that there was an increase in skin, central nervous system and ocular disease in the exposed individuals. These preliminary results indicate that microcomputer workers exposed to VDMs are at risk of significant cytogenetic damage and should periodically undergo biological monitoring.

Key words: micronucleus test, mutagenicity, electromagnetic fields.

Received: October 25, 2004; Accepted: February 22, 2005.

Introduction

Constant advances in the electronics industry and the increasing use of electrical appliances have resulted in consumers being increasingly exposed to the effects of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMF). Concerns have been raised (Ivancsits *et al.*, 2002) about the possible health hazards of chronic exposure to extremely low frequency (ELF) and very low frequency (VLF) electromagnetic radiation from various appliances including computer cathode ray tube (CRT) video display monitors (VDMs). Over the past few decades several studies (Wertheimer, Leeper, 1979; Li and Theriault, 1997) have demonstrated that exposure to ELF-EMF may be related to an increased risk of certain types of cancer, including leukemia, central nervous system cancer, and lymphoma, although other studies (Verkasalo *et al.*, 1993; Schreiber *et al.*, 1993) have failed to find such association.

Sendo correspondência to Maria da Graça Martino-Roth. Rua Visconde de São Gabriel 131, Bairro Areal, 96077-260 Pelotas, RS, Brazil. E-mail: gmartino@brturbo.com.br.

Chromosomal mutation is a key event in carcinogenesis (Fenech, 2000) and the study of DNA damage at the chromosome level is an essential part of genetic toxicology. Micronuclei (MN) are acentric fragments or complete chromosomes which fail to attach to the mitotic spindle during cytokinesis and are normally excluded from the nuclei (Maluf and Erdtmann, 2000). The quantification of micronuclei by the micronucleus test (MT) is an important non-invasive cytogenetic method which is a good indicator of chromosome mutation (Majer *et al.*, 2001) and has been extensively used for monitoring populations exposed to known mutagens and carcinogens. The major advantages of the micronucleus test over other techniques are that it can be applied to interphase cells and does not require cell culture or the preparation metaphase cells, a further advantage being that because of the low cost of this test it is suitable for the large-scale screening of populations (Titenko-Holland *et al.*, 1994).

The major aim of our study was to use the presence of investigate a possible link between genotoxic effects and

microcomputer users occupationally exposed to CRT VDMs through the quantification of cells with micronucleus (MNC), binucleated (BNC) and broken egg (BEC) cells.

Material and Methods

Subjects

The study was carried out on 10 male and 10 female microcomputer users who were occupationally exposed to CRT VDMs and 20 control subjects matched for age and sex. At least five years of working was the criteria used for sample selection of the exposed individuals. To obtain necessary data on lifestyles and personal factors (age, working period, diets, etc.), all subjects were interviewed, according to the protocol published by the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (Carrano, 1988). The subjects were either Caucasian or mixed race Brazilians of African and Caucasian descent living in the city of Pelotas in the southern Brazilian state of Rio Grande do Sul. The exposed group worked principally as copy typists, word processor operators or computer programmers while the unexposed subjects were selected from the general population of the same city.

The effects of occupational exposure to VDMs were investigated by the micronucleus test applied in exfoliated buccal cells from the exposed and unexposed individuals.

Cytological preparations

The buccal mucosa of each individual tested was washed with distilled water and then swabbed with a wooden tongue depressor. Two coded slides were prepared for each individual by smearing the exfoliated buccal cells onto pre-cleaned slides. The smears were then air-dried, fixed with methanol, stained by the Feulgen reaction and counterstained with fast-green as described by Stich and Rosin (1982) and examined using bright-field microscopy. For each individual 2,000 cells were assessed for genetic damage by observing the frequency of micronucleated, binucleated and broken egg cells in exfoliated buccal cells and the frequency of. The number of cells assessed was selected to ensure an untruncated spontaneous dispersion of micronucleated, binucleated and broken egg cells.

Statistical analysis

Independent variables such as age, working period, ocular, skin, and central nervous system (CNS) diseases, theoretically expected to be associated with the occurrence of MN (dependent variables), were classified as qualitative (no parametrical). These non-parametric factors were analyzed between controls and exposed individuals by Mann-Whitney test, while the Student t-test was used for age and time comparisons. The frequencies of MNC, BNC and BEC between exposed and control groups were compared through Mann-Whitney U test. The association of inde-

pendent variables and the occurrence of MNC, BNC and BEC was analyzed by Mann-Whitney U test, and further evaluation, if necessary, performed by non-parametric Spearman rank correlation coefficient. The hypothesis was considered to be 5%.

Results

The main characteristics of the exposed and control subjects (average of age, working time, sex and ocular, skin and CNS diseases) are summarized in Table 1. None of the groups studied showed significant difference in age, period of work, ocular and CNS diseases, except for skin diseases found in a higher incidence (65%) in the exposed individuals ($p < 0.001$).

Table 2 shows the average numbers of MNC, BNC and BEC of both exposed and control individuals included in this investigation. Assessment of MN frequencies in exfoliated buccal cells revealed a significantly higher frequency of micronuclei ($p < 0.001$) in individuals exposed to VDMs (6.20 ± 4.44) compared to unexposed (2.05 ± 2.16). In the same way, we observed a significant difference ($p < 0.05$) in BEC frequency, between exposed workers (2.80 ± 2.50) and controls (1.40 ± 2.30). However, no statistically significant differences regarding BNC frequency between exposed (3.40 ± 3.89) and control individuals were observed (2.15 ± 2.54).

The number of cells (per 2,000 cells) with micronucleus, binucleated, and broken egg cells of each individual is showed in Figure 1. Within the control group, 35% showed no cells with micronucleus, and 40% of them showed only one to three MNC, resulting in mode zero. Six MNC was the maximum number found in non-exposed individuals. In contrast, in the exposed group, we found a variable distribution of cells with micronucleus, ranging from zero to 18, resulting in mode five. Similarly, the distribution of BEC was different between control and exposed

Table 1 - General characteristics of 10 male and 10 female workers occupationally exposed to cathode ray tube computer video display monitors (VDMs) as compared to unexposed control individuals matched for age and sex.

Characteristics of the subjects	Subjects	
	Exposed (n = 20)	Unexposed (n = 20)
Average age	37.75 \pm 8.62	38.0 \pm 8.84
Age range	24-49	24-50
Average time working with VDMs	14.45 \pm 7.44	11.7 \pm 8.29
Variation	5-25	1-28
Ocular disease present	10 (50%)	4 (20%)
Skin disease present	13 (65%)*	2 (10%)*
Central nervous system disease present	10 (50%)	5 (25%)

*High significant at $p < 0.001$, by the Mann-Whitney U test.

Table 2 - Cytological observations made on 10 males and 10 females occupationally exposed to cathode ray tube computer video display monitors (VDMs) as compared to unexposed control individuals matched for age and sex. We assessed 2,000 cells for each individual.

Cytological observation	Subjects	
	Exposed (n = 20)	Unexposed (n = 20)
Micronucleated cells		
Mean	6.20**	2.05**
Standard deviation	± 4.44	± 2.16
Minimum number	0	0
Maximum number	18	6
Binucleated cells		
Mean	3.40	2.15
Standard deviation	± 3.89	± 2.54
Minimum number	0	0
Maximum number	13	9
Broken egg cells		
Mean	2.80*	1.40*
Standard deviation	± 2.50	± 2.30
Minimum number	0	0
Maximum number	9	9

*Significant at $p < 0.05$ by the Mann-Whitney U test.
 **High significant at $p < 0.001$ by the Mann-Whitney test.

groups. While 90% of the controls showed zero to three BEC, resulting in multiple modes (zero and three), only 70% of the exposed individuals showed the same range of BEC. In contrast, the distribution of BNC found was similar between both groups, resulting in mode zero. Zero to three was the maximum number of BNC found in more than 50% of exposed and unexposed individuals.

Comparisons between independent variables age (within the following intervals: ≤ 35 and > 35 years), working time (≤ 10 and > 0 years) and the frequencies of MNC, BEC and BNC was investigated among exposed and controls. Our results suggest that there is no association between the age, working time, of subjects, and the number of MN and nuclear abnormalities (Table 3).

Among the exposed females the MNC, BEC and BNC frequency in the above cited intervals, did not differ ($n = 5$; 8.00 ± 4.64 , and $n = 5$; 8.80 ± 5.36). Among the exposed males, alike the females, in the same intervals, presented a small increase, however, not significant ($n = 3$; 2.00 ± 2.65 , and $n = 7$; 4.86 ± 2.73).

Exposed individuals presented an increased frequency of ocular (50%), skin (65%), and CNS (50%) diseases, however association between these diseases and the frequency of MNC, BNC and BEC was only obtained for binucleated cells among exposed individuals with ocular and CNS diseases ($p < 0.05$) (Table3).

The frequency of MNC, BNC and BEC between males and females was also compared, and, in both exposed

Table 3 - Cytological observations made on 10 males and 10 females occupationally exposed to cathode ray tube computer video display monitors (VDMs). We assessed 2,000 cells for each individual.

Exposed individuals	Cytological observations		
	Micronucleated cells (Mean ± SD)	Binucleated cells (Mean ± SD)	Broken egg cells (Mean ± SD)
Age (years)			
≤ 35 (n = 8)	5.75 ± 4.89	3.63 ± 3.62	2.13 ± 1.46
> 35 (n = 12)	6.50 ± 4.32	3.25 ± 1.46	3.25 ± 2.99
Number of years working with VDMs			
≤ 10 (n = 7)	4.57 ± 3.84	3.57 ± 3.91	2.00 ± 3.23
> 10 (n = 13)	7.08 ± 4.63	3.31 ± 4.03	3.23 ± 2.86
Ocular disease			
Present (n = 9)	7.67 ± 4.18	5.78 ± 3.83*	3.89 ± 3.14
Absent (n = 11)	5.00 ± 4.47	1.45 ± 2.72*	1.91 ± 1.45
Skin disease			
Present (n = 13)	6.23 ± 4.83	2.85 ± 2.48	3.69 ± 3.99
Absent (n = 7)	6.14 ± 3.98	2.71 ± 2.75	2.86 ± 3.93
Central nervous system disease			
Present (n = 10)	6.60 ± 4.30	5.10 ± 4.15*	3.80 ± 2.97
Absent (n = 10)	5.80 ± 4.78	1.70 ± 2.87*	1.80 ± 1.48
Sex			
Females (n = 10)	8.40 ± 4.77*	6.30 ± 3.56***	4.40 ± 2.32**
Males (n = 10)	4.00 ± 2.91*	0.50 ± 0.71***	1.20 ± 1.48**

*Significant at $p < 0.05$ by the Mann-Whitney U test.
 **Significant at $p < 0.01$ by the Mann-Whitney U test.
 ***Significant at $p < 0.001$ by the Mann-Whitney U test.

and control groups, the frequencies of MNC and nuclear abnormalities were significantly higher in females. Among the exposed group, females showed at least twice more MNC, BNC and BEC than males ($p < 0.05$), (Table 3). The Spearman correlation coefficient between MNC and sex was positive ($p = 0.029$).

Among the females and males, the exposed group showed more MNC than the control group ($p < 0.01$) (Table 4).

Based on the p-values estimated by Spearman rank coefficients, in our analysis sex was the main factor affecting MNC frequency in exfoliated cells.

Discussion

For many years scientists and engineers believed that electromagnetic fields of low frequency could not cause alterations in human cells. This hypothesis was based on the idea that EMF could not generate a sufficient amount of heat to increase the body temperature, not causing damage at the dna level (Lechter, 1991). However, data available in

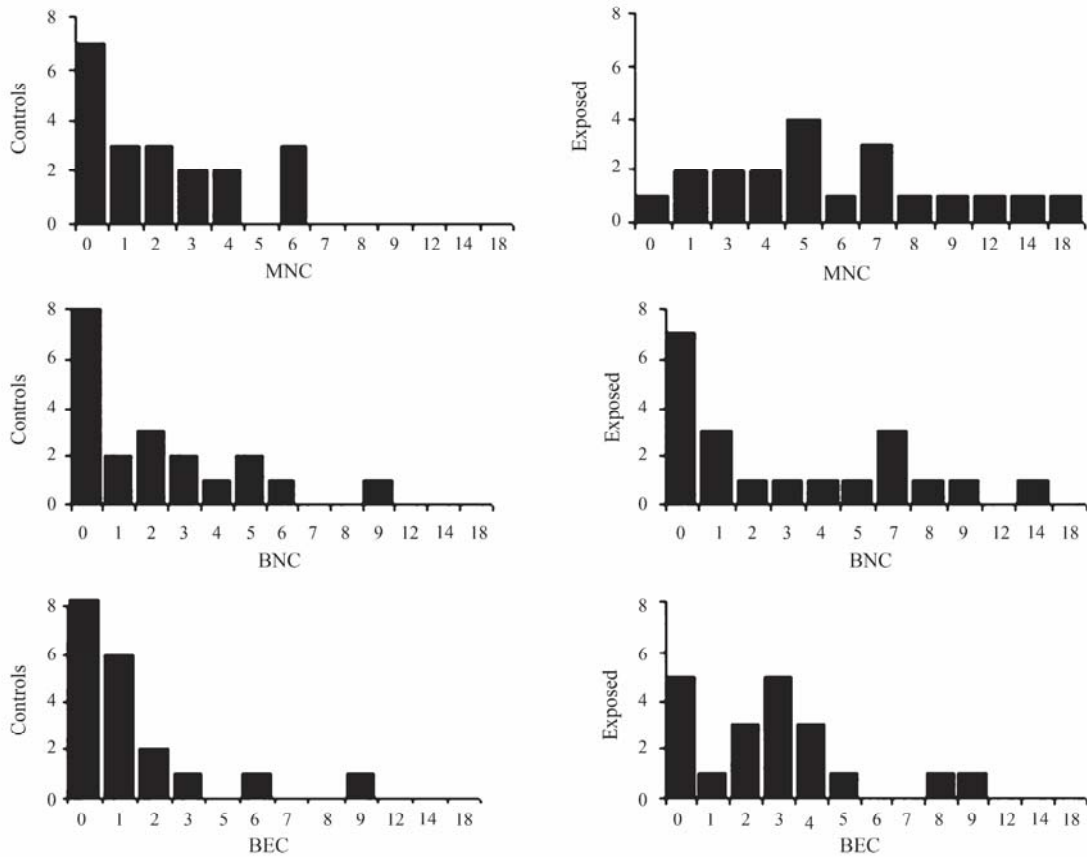


Figure 1 - Distribution of number of cells with micronuclei (MNC), binucleated (BNC) and broken egg (BEG) cells (2,000 cells per individual).

Table 4 - Cytological observations made on 10 males and 10 females occupationally exposed to cathode ray tube computer video display monitors (VDMs) as compared to unexposed control individuals matched for age and sex. We assessed 2,000 cells for each individual.

Individuals	Cytological observations		
	Micronucleated cells (Mean ± SD)	Binucleated cells (Mean ± SD)	Broken egg cells (Mean ± SD)
Females			
Exposed (n = 10)	8.40 ± 4.74*	6.30 ± 3.56	4.40 ± 2.32**
Unexposed (n = 10)	3.60 ± 1.90*	4.10 ± 2.23	1.90 ± 1.66**
Males			
Exposed (n = 10)	4.00 ± 2.91**	0.50 ± 0.71	1.20 ± 1.48
Unexposed (n = 10)	0.50 ± 0.97**	0.20 ± 0.42	1.0 ± 2.83

*Significant at $p < 0.05$ by the Mann-Whitney U test.

**Significant at $p < 0.01$ by the Mann-Whitney test.

the literature suggest that exposure to elf-emf directly causes genetic changes in biological systems (McCan *et al.*, 1993, 1998; Murphy *et al.*, 1993; Simko *et al.*, 1998a, b;

Repacholi and Greenebaum, 1999; Walleczek *et al.*, 1999). Furthermore, some studies suggest the hypothesis that EMF is not involved on the onset of the tumoral growth, but may be acting as a promoter or co-promoter in this process (Goodman and Shirley-Henderson, 1990).

The evidence that EMF could cause genotoxic effects in human cells can reinforce the relation between exposure to EMF and increased incidence of cancer in exposed individuals. Gangi and Johansson (1997) detected an increased incidence of skin and CNS alterations among microcomputer's workers. In their study, the workers reported to feel skin - and mucosa - related symptoms, such as pain, itch, heat sensation, erythema, papules, and pustules. The CNS symptoms were, *e.g.* dizziness, tiredness, and headache, the same symptoms caused by sunburn. Kisner and Fedeman (1998) reported that female workers exposed to VDM presented obstetric complications, besides skin, ocular, and CNS diseases. However, the authors conclude that the data reviewed were inconsistent or methodically flawed, and believed that continued research had to be carried out to further define and elucidate the risk of EMF produced by

video display terminals. In our study we also detected skin, ocular and CNS diseases among approximately 50% of the exposed group, maybe as a result of continual exposure to EMF emitted by microcomputer monitor. However, no association was found between these diseases and frequencies of MNC and BEC, and only frequency of BNC was related with ocular and CNS diseases within the exposed individuals

Significantly our results obtained from the investigation of micronucleus in exfoliated cells indicate that exposed individuals have a significant increased number of MNC. Exposed individuals showed three times more cells with micronucleus than control individuals. In the same way, the frequency of BEC among exposed individuals was two times higher than in the control group. Estécio and Silva (2002) also evaluated possible nuclear alterations in microcomputer's workers and found that exposed individuals had two times more chromosomal aberrations in cultured lymphocytes than control individuals, reinforcing the data obtained in our study.

Similarly, Ivancsits *et al.* (2002) showed that intermittent exposure to a 50Hz magnetic field causes a reproducible increase in DNA strand breaks in cultured human diploid fibroblasts. They evaluated the genotoxic effect of cultured fibroblasts from skin biopsy of healthy donors that were continuously exposed to ELF-EMF, through the comet assay, and obtained significant results. Although these findings suggest that the exposure to EMF increase the frequency of chromatic and/or chromosomal breaks, it is not clear yet the exactly molecular mechanism affected by this type of radiation.

Several hypotheses like induction of electric currents, increased free radical activity or acceleration of electron transfer in different enzymes and proteins have been proposed, but all of these hypotheses have been mostly speculative. Recent observations have shown that DNA can transfer electrons within its base pairs. These studies suggest that EMF may initiate transcription by generating repulsive forces causing chain separation at specific DNA sequences. As in the state of transcription the DNA presents itself as a vulnerable target to genotoxic influences, the on/off switching at intermittent ELF-EMF exposure may lead to DNA disruption, causing DNA strand breaks (Ivancsits *et al.*, 2002).

According to Estécio and Silva (2002) the chromatic aberrations could be a result of malfunction of enzymes that duplicate and repair DNA, leading to alterations on the DNA strand recently polymerized. Despite of the molecular mechanism the EMF leads to chromosomal destabilization. Thus, individuals who have this destabilization could present cells with high frequency of mutations, chromosomal aberrations, micronucleus, and increased risk of cancer growth than individuals with stable genome.

Several reports have described an association between chronological aging and aneuploidy. The chromosomes most frequently lost are the X chromosome in females and Y chromosome in males. The autosomes may be lost at the same frequency as the sex chromosomes, but these events should lead to death as they contain genes required for cell survival. As lagging chromosomes and fragments can be incorporated into a MN and the increase in aneuploidy occur according to the age, this factor should be correlated with the increase in MN formation (Burkvic *et al.*, 2001). In contrast, our results suggest that there is no association between the individual's age and the frequency of MNC, BNC, and BEC among microcomputer's workers. However, when this factor was analyzed among male workers, it was observed a slight increase of MNC and nuclear abnormalities in older workers, although this result was not statistically significant.

In the same way, analysis of MNC, BNC and BEC frequencies after different working times showed a small, not significant increase among the exposed group on the longest working time (< 10 years).

Particularly evident is the increment observed in women with respect to men. In females it was observed significant higher frequencies of MNC, BNC, and BEC than in males, and the Spearman correlation coefficients between MNC and sex were positive ($p = 0,029$). In agreement with our data, some reports in this area have been shown similar results. Burkvic *et al.*, 2001 demonstrated that there are 22% more sexual chromosomes lost in females than in males, confirming that females cells are more sensitive to action of genotoxic agents. Both the preferential involvement of sex chromosomes in somatic aneuploidy in women and the relation between malsegregation of X chromosomes and age are well documented. However, the molecular mechanisms underlying instability of sex chromosomes in females are not fully elucidated yet. Studies have demonstrated the high susceptibility of sex chromosomes to be lost at mitosis, as revealed by the high incidence of micronucleated X-positive lymphocytes in female donors. Further investigation by *in situ* hybridization of cytokinesis-blocked lymphocytes using a X chromosome's centromere probe, demonstrated that both, chromosomal loss and non-disjunction, contribute to the malsegregation of sex chromosomes of the females (Zijno *et al.*, 1996).

Different physiological parameters, such as menstrual cycle, estrogen levels, and oral contraceptives may affect the frequency of sister chromatid exchange (SCE) (Ghosh and Ghosh, 1988; Joseph-Lerner *et al.*, 1993), but in our investigation we did not take in consideration neither estrogen levels nor oral contraceptive assumption.

To conclude, our preliminar results strong suggest that microcomputer's workers, exposed to EMF presented an increased frequency of cells with micronuclei, probably due to the genotoxic action of EMF, which they are exposed to at work, and these findings are straightly related to the

sex of the individuals. Finally, extensive studies and standardized tests to evaluate biological damage at different levels are recommended to public agencies concerned with environmental quality and public health. Genotoxic evaluation is a necessary measure to ensure environmental quality and occupational health, as is the workers orientation to increase awareness and decrease the risk for serious disease caused by computer cathode ray tube video display monitors radiation.

Acknowledgements

The authors are very grateful to Abilio Novack Alves, technical assistant of the Laboratório de Genética of the UCPel, Álvaro Moreira Martins and Vilma Ruas da Silva, technical assistants of the Departamento de Zoologia e Genética of the UFPel, and the 40 workers who spontaneously took part in this study. This research was supported by the Universidade Católica de Pelotas and the Universidade Federal de Pelotas.

References

- Bukvic N, Gentile M, Susca F, Fanelli M, Serio G, Buonadonna L, Capurso A and Guanti G (2001) Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: A study including 16 centenarians. *Mutat Res* 498:159-167.
- Carrano AV (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. ICPEMC – International Commission For Protection Against Environmental Mutagens And Carcinogens. Publication n. 14. *Mutat Res* 204:379-406.
- Estécio MRH and Silva AE (2002) Chromosome abnormalities caused by computer video display monitor's radiation. *Rev Saúde Pública* 36:330-336.
- Fenech M (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Fundam Molec Mechan Mut* 455:81-95.
- Gangi S and Johansson O (1997) Skin changes in "screen dermatitis" versus classical UV - And ionizing irradiation-related damage - Similarities and differences. *Exp Dermatol* 6:283-91.
- Ghosh R and Ghosh PK (1988) Sister chromatid exchanges in the lymphocytes of control women, pregnant women and women taking oral contraceptives effects of cell culture temperature. *Mutat Res* 12:179-183.
- Goodman R and Shirley-Henderson A (1990) Exposure of cells to extremely low-frequency electromagnetic fields: Relationship to malignancy? *Cancer Cells* 2:355-9.
- Ivancsits S, Diem E, Pilger A, Rüiger HW and Jahn O (2002) Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Muta Res* 519:1-13.
- Joseph-Lerner N, Fejgin M, Ben-Nun I, Leguin C and Armiel A (1993) The correlation between the frequency of sister chromatid exchange and human reproductive hormones. *Mutat Res* 300:247-252.
- Kisner RS and Federman DG (1998) Video display terminals: Risk of electromagnetic radiation. *Southern Med J* 91:12-16.
- Lechter GS (1991) A radiação eletromagnética. *PC Mag Brás* 12:44-54.
- Li CY and Theriault RS (1997) Residential exposure to 60 Hz magnetic fields and adult cancers in Taiwan. *Epidemiol* 8:25-30.
- Majer BJ, Laky B, Knasmüller S and Kassie F (2001) Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res* 489:147-172.
- Maluf SW and Erdtmann B (2000) Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 471:21-27.
- McCann J, Dietrich F, Rafferty C and Martin AO (1993) A critical review of genotoxic potential of electric and magnetic fields. *Mutat Res* 297:61-95.
- McCann J, Dietrich F and Rafferty C (1998) The genotoxic potential of electric and magnetic fields: An update. *Mutat Res* 411:45-86.
- Murphy JC, Kaden DA, Warren J and Sivak A (1993) Power frequency electric and magnetic fields: A review of genetic toxicology. *Mutat Res* 296:221-240.
- Repacholi MH and Greenebaum B (1999) Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: Health effects and research needs. *Bioelectromagnetics* 20:133-160.
- Schreibner GH, Swaen GMH, Meijers JMM, Slangen JJM and Sturmans F (1993) Cancer mortality and residence near electricity transmission equipment: A retrospective cohort study. *Int J Epidemiol* 22:9-15.
- Simko M, Kriehuber R and Lange S (1998a) Micronucleus formation in human amnion cells after exposure to 50 Hz MF applied horizontally and vertically. *Mutat Res* 418:101-111.
- Simko M, Kriehuber R, Weiss DG and Luben RA (1998b) Effects of 50 Hz EMF exposure on micronucleus formation and apoptosis in transformed and nontransformed human cell lines. *Bioelectromagnetics* 19:85-91.
- Stich HF and Rosin MP (1982) Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer Let* 22:241-253.
- Titenko-Holland N, Moore LE and Smith MT (1994) Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutat Res* 312:39-50.
- Verkasalo PK, Pukkala E, Hongisto MY, Valjus JE, Järvinen PJ, Heikkilä KV and Koskenvuo M (1993) Risk of cancer in Finnish children living close to power lines. *Br Med J* 307:895-899.
- Walleczek J, Shiu EC and Hahn GM (1999) Increase in radiation-induced HPRT gene mutation frequency after nonthermal exposure to non-ionizing 60 Hz electromagnetic fields. *Radiat Res* 151:489-497.
- Wertheimer N and Leeper E (1979) Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol* 109:273-284.
- Zijno A, Leopardi P, Marcon F and Crebelli R (1996) Sex chromosome loss and non-disjunction in women: Analysis of chromosomal segregation in binucleated lymphocytes. *Chromosoma* 104:461-467.

Associate Editor: Catarina S. Takahashi

Freqüência das malformações múltiplas em recém-nascidos na Cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, e fatores sócio-demográficos associados

Frequency of multiple neonatal malformations in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, and associated socio-demographic factors

Martha Lopes Schuch de Castro ¹
Cristiane de Jesus da Cunha ¹
Patrick Botelho Moreira ¹
Ricardo Ramires Fernández ¹
Gilberto Lima Garcias ^{1,2}
Maria da Graça Martino-Röth ¹

Abstract

This study aimed to estimate the frequency and to correlate the possible causal agents and monitor the occurrence of multiple neonatal malformations in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. The study included all births from 1990 to 2002 in the local maternity hospitals with birth weight > 500g. Each newborn presenting a malformation (case) was assigned a live matched neonate (control) without any malformation and of the same sex. A database was established by filling out the ECLAMC – MONITOR forms, 1982 edition, tabulated with SPSS. Statistical analysis used Student t and χ^2 . During the study period, 71,500 children were born, of whom 0.11% presented multiple malformations. Significant results were found for birth weight, twin births, parents' ethnic background, paternal age, and number of previous abortions and stillbirths. In Pelotas, the proportion of newborns with malformations during the study period was 1.37%. Of these, 8.1% presented multiple malformations, predominantly in females and in births occurring during the winter.

Abnormalities; Risk Factors; Infant Newborn

Introdução

As malformações congênitas constituem alterações de estrutura, função ou metabolismo presentes ao nascer, que resultam em anomalias físicas ou mentais, podendo ou não ser simples ou múltiplas e de maior ou menor importância clínica. Cerca de 2 a 3% dos recém-nascidos são portadores de uma ou mais malformações congênitas, sendo responsáveis por 20% da mortalidade neonatal e 30 a 50% da mortalidade perinatal nos países desenvolvidos ¹.

Malformações secundárias simples estão presentes em cerca de 14% dos recém-nascidos, e ao redor de 90% das crianças com três ou mais malformações secundárias também apresentam um ou mais defeitos importantes. Dos nascidos com malformações congênitas clinicamente significativas, 0,7% é portador de malformações múltiplas, sendo que a maioria morre na infância. Somente 40% desses têm o diagnóstico de uma síndrome conhecida. O diagnóstico correto da anomalia específica constitui condição imprescindível para o prognóstico e para a elaboração de um plano de tratamento da criança afetada, assim como para o aconselhamento genético dos pais ².

As malformações múltiplas podem ser decorrentes de cromossomopatias (6,1%), de mutações gênicas que obedecem a padrões de herança mendeliana (7,5%), de origem multifatorial (20% dos casos), ou de origem ambiental

¹ Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Brasil.

² Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Correspondência

M. L. S. Castro
Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Católica de Pelotas.
Rua Gonçalves Chaves 3645, apto. 204, Pelotas, RS 96015-560, Brasil.
marthals@terra.com.br

(6,5%). Contudo, o percentual de malformações congênitas em que não se identifica a etiologia está em torno dos 60%. As anomalias múltiplas podem ser, ainda, derivadas de um único evento malformativo primário ou de um determinado fator mecânico, denominada seqüência. Ocorrem ainda em estruturas de localização anatômicas distintas e distantes entre si, que se repetem em dois ou mais indivíduos, denominada associação. Portanto, uma associação é a ocorrência não causal, em um ou mais indivíduos, de anomalias múltiplas não reconhecidas como um defeito de campo, uma seqüência ou uma síndrome. Quando se caracterizam por um grupo de sintomas, associação de sinais e sintomas que se relacionam com situações de desordens específicas e inespecíficas, são denominadas síndromes ³.

Nas populações humanas em geral, muitos são os casos de malformações congênitas, cada qual apresentando características próprias quanto à incidência, influência genética, gravidade e morbidade associadas. Diversas vezes, essas anomalias apresentam-se combinadas, verificando-se comprometimento em diversos sistemas do organismo do recém-nascido, o que determina a importância de identificar tais associações, sua incidência, bem como sua etiologia.

Neste estudo, as associações entre duas ou mais malformações são tratadas por malformações múltiplas.

Material e métodos

O presente projeto teve seu início em 1990 e, desde então, vem sendo realizado com todos os nascimentos nos berçários de todos os hospitais de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil (Beneficência Portuguesa, Hospital São Francisco de Paula, Hospital Escola da FAU, Santa Casa de Misericórdia de Pelotas e Hospital Miguel Piltcher), com aprovação dos comitês de ética dos mesmos, segundo metodologia descrita no *Manual Operacional ECLAMC-MONITOR* do Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC – <http://eclamc.ioc.fiocruz.br/>).

Neste estudo, retrospectivo e do tipo caso-controle, de base secundária, todos os recém-nascidos foram examinados por pediatras, segundo protocolo de cada maternidade. Um segundo exame foi feito por acadêmicos dos cursos de medicina da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e da Universidade Católica de Pelotas (UCPel), especialmente treinados para a detecção de anomalias congênitas. Os recém-

nascidos portadores de malformação foram re-examinados por especialistas do projeto.

Para os recém-nascidos com malformações (caso) tomou-se um neonato vivo, controle pareado a ele, não malformado e de igual sexo que nasceu no mesmo hospital imediatamente depois do recém-nascido malformado.

Para a formação do banco de dados foram tomados todos os dados obtidos, entre 1º de janeiro de 1990 e 31 de dezembro de 2002, por meio do preenchimento dos formulários modelo do ECLAMC, codificados e, posteriormente, tabulados pelo programa SPSS for Windows, versão 10.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Foram analisadas a frequência dos recém-nascidos com malformações múltiplas, bem como a sua relação com fatores maternos e do próprio recém-nascido, por intermédio do teste *t* de Student e do χ^2 ; em que serão considerados significativos os valores estatísticos com coeficiente de significância $p \leq 0,05$.

Foram considerados todos os nascimentos, vivos ou mortos, de 500g ou mais de peso, ocorridos no hospital a partir de seu ingresso no programa. Não se consideraram os nascimentos ocorridos fora do hospital e que posteriormente ingressaram no setor de neonatologia. Todos os recém-nascidos, vivos ou mortos, foram examinados clinicamente, em busca de malformações, e esta observação se estendeu até sua alta hospitalar.

Na definição e descrição das malformações, julgou-se malformação toda a alteração morfológica, interna ou externa, clinicamente diagnosticável, com um aceitável grau de certeza antes da alta hospitalar, em todo recém-nascido.

Resultados e discussão

Em Pelotas, nesses 13 anos de avaliação, nasceram 71.500 crianças, dentre as quais 980 foram malformados (1,37%), dessas, 78 (8,1%) recém-nascidos apresentavam malformações múltiplas. Não são facilmente encontrados na literatura estudos que avaliem de modo similar recém-nascidos multimalformados; entretanto, Asindi et al. ⁴, em sua avaliação realizada na Arábia Saudita, também encontraram frequência semelhante, de 8,8% de crianças com associações de múltiplas anomalias.

Foram verificadas várias associações entre as malformações, sendo mais frequentes as que envolviam anomalias craniofaciais e membros (11%), anomalias geniturinárias e membros (3,1%), e diferentes alterações nos membros (3,1%). Em seu estudo, Stoll et al. ⁵ encontraram, ainda, que houve uma predominância

de deficiências de membros do lado esquerdo quando havia uma associação com defeitos genitais graves. Assim como verificaram que anomalias de membros eram mais frequentemente unilaterais do que bilaterais, quando associadas à gastrosquise ou a defeitos de esqueleto axial. De outra forma, associações envolvendo lábio leporino, com ou sem palato fendido, ou micrognatia, eram bilaterais. Evans et al.⁶ encontraram valores estatísticos indicando associação de malformações múltiplas associadas e defeitos de membros. Rosano et al.⁷ encontraram uma ocorrência maior na associação de defeitos pré-axiais de membros com microtia, atresia esofágica, atresia anorretal, defeitos cardíacos, disgenesia unilateral dos rins, assim como, alguns defeitos de esqueleto axial e defeitos pós-axiais com hipospádia, além de outros.

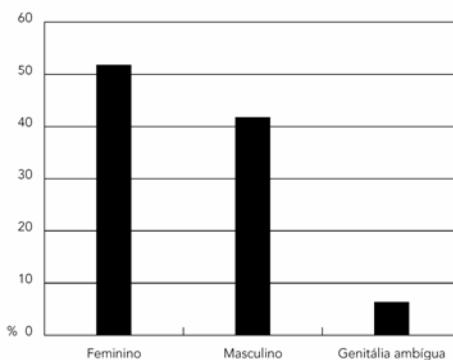
A distribuição de gênero, neste trabalho, entre as 79 crianças foi de 41 (51,9%) de meninas, 33 (41,8%) de meninos (razão de 1,2:1) e 4 (5,1%) de recém-nascidos com genitália ambígua, não se observando diferenças estatisticamente significativas no sexo dos afetados (Figura 1). Asindi et al.⁵ encontraram uma frequência maior de meninos, com uma razão sexual de 1,2 menino:1 menina.

Segundo alguns pesquisadores, como Vrijheid et al.⁸, e que também é de conhecimento geral, muitos são os fatores que podem aumentar o risco, ou atuarem como pré-disponentes para o nascimento de um recém-nascido malformado. Devido a esse fato, foram analisados neste trabalho, características e condições do recém-nascido, bem como maternas, com a finalidade de avaliar a contribuição ou a relação dessas variáveis com os recém-nascidos com malformações múltiplas. Na Tabela 1, estão contidas as características e fatores dos recém-nascidos com malformações múltiplas comparadas as dos recém-nascidos controles.

Verificou-se que os recém-nascidos com malformações múltiplas apresentaram baixo peso ao nascer (37,9%), em maior número do que os recém-nascidos controles (4,9%), com $p < 0,001$, e essa mesma diferença foi encontrada com relação à média dos pesos. A frequência de nascidos mortos foi bem mais alta entre os recém-nascidos com malformações múltiplas, 12,7% do que entre os controles, 3,3%. Também se apresentou altamente significativo estatisticamente o percentual de óbitos hospitalares entre os malformados (27,8%), quando comparado aos controles (1,6%), confirmando que as malformações congênitas são uma das principais causas de mortalidade perinatal. Observou-se que a gemelaridade foi um fator

Figura 1

Frequência do sexo entre os recém-nascidos com malformações múltiplas na Cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.



importante, pois houve 6,3% de gestações gemelares entre os recém-nascidos com malformações múltiplas, enquanto que entre os recém-nascidos controles não ocorreu nenhum caso.

Entre o grupo de recém-nascido com malformações múltiplas, 25,3% apresentavam outros casos de malformações na família, enquanto 16,4% ocorriam entre os recém-nascidos controles. Esse resultado demonstra um fator familiar importante, no qual pode estar envolvida a predisposição genética ou multifatorial dessas anomalias. Czeizel et al.⁹ descrevem vários casos de diagnóstico familiar de malformações nos pais, nos casos de recém-nascidos com malformações de membros.

Embora alguns autores citem o número de gesta como um fator de risco para anomalias congênitas⁸, neste estudo não foram encontradas diferenças significativas, uma vez que somente na primeira gesta ocorreu um maior número de malformados em relação ao controle.

Analisando-se a etnia dos antepassados dos recém-nascidos com malformações múltiplas, verificou-se que entre esses, ocorreu uma frequência maior de negróides (12,7%) do que entre os recém-nascidos controles (9,8%), e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A frequência das anomalias congênitas pode variar em diferentes populações, de acordo com a área geográfica e também com a origem étnica¹⁰.

A sazonalidade é um fator importante para alguns tipos de malformações como, por exemplo, os defeitos de fechamento do tubo neural.

Tabela 1

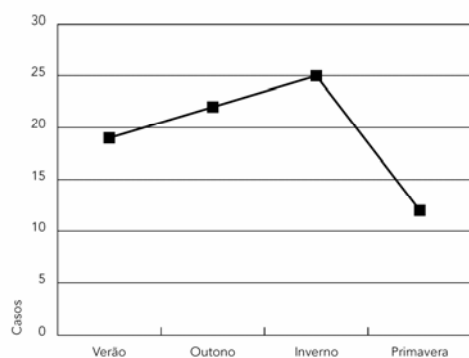
Dados demográficos dos recém-nascidos com malformações múltiplas e seus controles.

Variável	Casos (n = 78)	Controles (n = 61)	p-valor
Peso ao nascer			
Baixo (< 2.500g)	30 (37,9%)	3 (4,9%)	< 0,001
Normal (> 2.500g)	37 (46,8%)	56 (91,8%)	
Média (g)	2.571,04 (± 926,71)	3.178,47(± 469,92)	
Gemelaridade			
Gravidez gemelar	5 (6, 3%)	0	0,06
Gravidez singular	73 (92,4%)	58 (95,1%)	
Nascimento			
Vivo	68 (86,1%)	58 (95,1%)	0,07
Morto	10 (12,7%)	2 (3,3%)	
Malformado na família			
Sim	20 (25,3%)	10 (16,4%)	< 0,05
Não	46 (58,2%)	50 (82,0%)	
Gesta			
1	26 (32,9%)	15 (24,6%)	0,24
2	19 (24,1%)	19 (31,1%)	
3	7 (8,9%)	12 (19,7%)	
> 4	18 (22,8%)	13 (21,3%)	
Etnia dos antepassados			
Caucasóide	53 (84,1%)	59 (89,1%)	< 0,05
Negróide	10 (12,7%)	6 (9,8%)	

Dados analisados pelo teste χ^2 e t Student (média).

Figura 2

Sazonalidade dos casos com malformações múltiplas na Cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.



Porém, para os recém-nascidos com malformações múltiplas da Cidade de Pelotas, não se detectaram diferenças significativas com relação à época do ano em que nasceram, apenas aconteceu um decréscimo na primavera (15,2%), enquanto nas demais estações a frequência variou entre 24,1% e 31,6%, conforme apresentado na Figura 2.

Como a etiologia das anomalias congênitas permanece em grande parte desconhecida, faz-se necessário investigar fatores de risco relativos a dados maternos e paternos, como estilo de vida, idade, paridade e escolaridade, entre outros⁸. Nos dados demográficos dos pais analisados (Tabela 2), como idade paterna, consanguinidade, local de moradia – rural ou urbana –, doenças agudas maternas durante o primeiro trimestre de gravidez, doenças crônicas maternas, uso de medicamentos pela mãe e escolaridade materna, não se perceberam diferenças estatísticas significativas entre casos e controles, demonstrando que esses fatores não

Tabela 2

Dados demográficos dos pais dos recém-nascidos com malformações múltiplas e dos recém-nascidos controles.

Variáveis	Casos (n = 79)	Controles (n = 61)	p-valor
Idade materna (anos)			
< 20	15 (19,0%)	7 (11,5%)	0,44
20-34	51 (64,6)	41 (67,2%)	
≥ 35	10 (12,7%)	10 (16,4%)	
Média	26,57±6,99	27,09±7,39	0,06
Idade paterna (anos)			
< 20	1 (1,3%)	4 (6,6%)	0,05
20-40	68 (86,1%)	42 (68,9%)	
≥ 41	6 (7,6%)	11 (18,0%)	
Média	30,41±7,36	31,67±9,58	0,39
Escolaridade materna			
Baixa	51 (64,6%)	44 (72,1%)	0,67
Média	13 (16,5%)	15 (24,6%)	
Alta	4 (5,1%)	2 (3,3%)	
Local de moradia			
Rural	6 (7,6%)	1 (1,6%)	0,18
Urbana	68 (86,1%)	58 (95,1%)	
Doença aguda materna			
Sim	42 (53,2%)	28 (45,9%)	0,16
Não	34 (43,0%)	33 (54,1%)	
Doença crônica materna			
Sim	13 (16,5%)	5 (8,2%)	0,25
Não	60 (75,9%)	53 (86,9%)	
Uso de medicamentos pela mãe			
Sim	66 (83,5%)	43 (70,5%)	0,12
Não	11 (13,9%)	17 (27,9%)	
Abortos prévios			
Sim	12 (15,2%)	1 (1,6%)	< 0,02
Não	58 (73,4%)	58 (95,1%)	
Natimortos prévios			
Sim	12 (15,2%)	4 (6,5%)	0,05
Não	58 (73,4%)	56 (91,8%)	

Dados analisados pelo teste χ^2 e t Student (média).

influíram no nascimento dos recém-nascidos com malformações múltiplas, que fizeram parte deste estudo. Czeizel et al.⁹ encontraram diferenças significativas entre o nível de escolaridade dos pais dos recém-nascidos com malformações isoladas congênicas radiais e tibiais.

Entretanto, a ocorrência de abortos prévios entre as mães dos recém-nascidos com malformações múltiplas (15,2%) foi estatisticamente maior ($p < 0,02$) do que entre as mães dos re-

cém-nascidos controles (1,6%). Assim como, também foi significativamente maior ($p = 0,05$) a ocorrência de natimortos prévios para as mães dos recém-nascidos com malformações múltiplas (15,2%) do que para as mães dos recém-nascidos controles (6,5%), reforçando o fato de que há uma forte predisposição familiar para as malformações múltiplas.

Quanto à idade materna, apenas na faixa de mães mais jovens (< 20 anos) se observou uma

freqüência maior de malformações múltiplas (19%) em relação aos controles (11,5%), nas demais faixas etárias maternas não se observaram diferenças. Este resultado pode estar relacionado à situação de imaturidade materna, indicando condições de estilo de vida e outros fatores ambientais ¹¹.

Conclusões

Na Cidade de Pelotas, a ocorrência de recém-nascidos que apresentavam malformações ao nascer, no período do estudo, foi de 1,37%. Dentro desta, a freqüência de recém-nascidos com malformações múltiplas é de 8,1%, predominantemente no sexo feminino (51,9%), sendo menor nos nascimentos ocorridos na primavera (15,2%). Entre o grupo de recém-nascidos com malformações múltiplas, 25,3% apre-

sentavam outros casos de malformações na família, enquanto 16,4% ocorriam entre os recém-nascidos controles. Tal resultado demonstra um fator familiar importante, em que pode estar envolvida a predisposição genética ou multifatorial dessas anomalias.

Um grande número de anomalias congênicas ainda é de etiologia desconhecida, especialmente aquelas com tão amplo espectro, como as que foram avaliadas neste estudo. Todavia, procurou-se realizar uma análise o mais ampla possível, relacionando um grande número de fatores de risco às malformações múltiplas. Mais estudos são, no entanto, necessários, mas este já servirá de base para os futuros trabalhos relacionados às anomalias múltiplas, em Pelotas, tentando buscar, sempre, um melhor entendimento dessas alterações, para com isso, orientar e poder realizar trabalhos de prevenção junto à população.

Resumo

Este estudo visa determinar a freqüência, correlacionar possíveis agentes causais e monitorizar a ocorrência de malformações múltiplas na população de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Abrange todos os nascimentos ocorridos entre 1990 e 2002 nas maternidades de Pelotas, com peso superior a 500g. Para cada recém-nascido malformado (caso), tomou-se um neonato vivo (controle), pareado a ele, sem malformação e de igual sexo. Formou-se um banco de dados mediante o preenchimento dos formulários-modelo ECLAMC – MONITOR edição 1982, que foram tabulados pelo programa SPSS. Para a análise estatística, utilizou-se o Teste t de Student e χ^2 . No período em estudo nasceram 71.500 crianças. Dentre essas, 0,11% recém-nascidos apresentaram malformações múltiplas. Foram encontrados resultados significativos para o peso, gemelaridade e nascimento, a etnia dos antepassados, a idade paterna, o número de abortos e natimortos prévios. Em Pelotas, a ocorrência de recém-nascidos que apresentavam malformações ao nascer, no período do estudo, foi de 1,37%. A freqüência de recém-nascidos com malformações múltiplas é de 8,1%, predominantemente no sexo feminino e nos nascimentos ocorridos no inverno.

Malformações; Fatores de Risco; Recém-nascido

Colaboradores

M. L. S. Castro, C. J. Cunha, P. B. Moreira e R. R. Fernández realizaram a monitoração e a revisão dos exames dos recém-nascidos e escreveram o artigo. G. L. Garcias e M. G. Martino-Röth revisaram o texto do artigo.

Referências

1. Belmonte PL, Sfendrych RL, Sanchez RC, Isfer EV. Ultra-sonografia obstétrica morfológica. *Rev Bras Med Gin Obstet* 1996; 7:328-36.
2. Jones LK. Padrões reconhecíveis de malformações congênitas. São Paulo: Editora Manole; 1998.
3. Mustacchi Z, Peres S. Genética baseada em evidências – síndromes e heranças. São Paulo: CID Editora; 2000.
4. Asindi AA, Al Hifzi I, Bassuni WA. Major congenital malformations among Saudi infants admitted to Asir Central Hospital. *Ann Saudi Med* 1997; 2:250-3.
5. Stoll C, Rossano A, Botto LD, Erickson D, Houry MJ, Olney RS, et al. On the symmetry of limb deficiencies among children with multiple congenital anomalies. *Ann Genet* 2001; 44:19-24.
6. Evans JA, Vitez M, Czeizel A. Congenital abnormalities associated with limb deficiency defects: a population study based on cases from the Hungarian Congenital Malformation Registry (1975-1984). *Am J Med Genet* 1994; 49:52-66.
7. Rosano A, Botto LD, Olney RS, Houry MJ, Ritvoenen A, Goujard J, et al. Limb defects associated with major congenital anomalies: clinical and epidemiological study from the International Clearinghouse Birth Defects Monitoring Systems. *Med Genet* 2000; 93:110-6.
8. Vrijheid M, Dolk H, Stone D, Abramshy L, Alberman E, Scott JES. Socioeconomic inequalities in risk of congenital anomaly. *Arch Dis Child* 2000; 82:349-52.
9. Czeizel AE, Vitez M, Kodaj I, Lenz W. A family study on isolated congenital radial and tibial deficiencies in Hungary, 1975-1984. *Clin Genet* 1993; 44:32-6.
10. Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 2002; 61:248-56.
11. Al-Saddon I, Hassan GG, Yacoub AA-H, Altoma E. Depleted uranium and health of people in Basrah: epidemiological evidence. Incidence and pattern of congenital anomalies among births in Basrah during the period 1990-2000. http://www.iraq.be/ned/archief/Depleted%20Uranium_bezstanden/ (acessado em 21/Mar/2003).

Recebido em 12/Nov/2004

Versão final reapresentada em 25/Jul/2005

Aprovado em 27/Jul/2005

GRUPO DE GENÉTICA HUMANA DEL CNIO



DIRECTOR DEL PROGRAMA DE GENÉTICA DEL CÁNCER HUMANO

Javier Benítez

INVESTIGADORES PREDOCTORALES

Lara P. Fernández

Lorenzo Melchor

Ricardo Ramires

Bárbara Rivera

Juan M. Rosa

Marta Kamieniak

Eva Sánchez

Laura P. Saucedo

Miljana Tanic

Magdalena B. Zajac

POST MIR

Iván Muñoz

INVESTIGADORES

María J. García

Beatriz Martínez

Ana Osorio

Miguel Urioste

TÉCNICOS

Alicia Barroso

María V. Fernández

Fátima Mercadillo

Fernando Fernández

M^a Carmen González