



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio de variantes genéticas recurrentes y priorización de variantes de significado clínico desconocido asociadas al Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario en familias de la Región de Murcia

Dña. Laura Rosado Jiménez
2022

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO



TESIS DOCTORAL

Estudio de variantes genéticas recurrentes y priorización de variantes de significado clínico desconocido asociadas al Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario en familias de la Región de Murcia

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

Laura Rosado Jiménez

Bajo la dirección de los doctores:

M^a Desamparados Sarabia Meseguer

Francisco Ruiz Espejo

José Luis Alonso Romero

2022

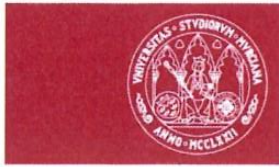


UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. M^a Desamparados Sarabia Meseguer, Doctora de Universidad del Área de Bioquímica Clínica en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular “B” e Inmunología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de variantes genéticas recurrentes y priorización de variantes de significado clínico desconocido asociadas al Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario en familias de la Región de Murcia”, realizada por D^a. Laura Rosado Jiménez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de septiembre de 2022

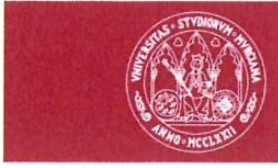


UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Francisco Ruiz Espejo, Doctor de Universidad del Área de Bioquímica Clínica en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular “B” e Inmunología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de variantes genéticas recurrentes y priorización de variantes de significado clínico desconocido asociadas al Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario en familias de la Región de Murcia”, realizada por D^a. Laura Rosado Jiménez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de septiembre de 2022



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. José Luis Alonso Romero, Profesor Titular de Universidad del Área de Medicina en el Departamento de Medicina Interna, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de variantes genéticas recurrentes y priorización de variantes de significado clínico desconocido asociadas al Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario en familias de la Región de Murcia”, realizada por D^a. Laura Rosado Jiménez, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de septiembre de 2022

*Cuando deseas algo con mucha fuerza,
el universo conspira para que realices tu deseo.*

Paulo Coelho

A mis padres

A mi hermano

A Estefan

Agradecimientos

*A mis directores,
Amparo Sarabia, Paco Ruiz y José Luis Alonso, por brindarme esta gran oportunidad.
Gracias por vuestra confianza en mí, por vuestra dedicación y apoyo durante este proyecto.
Eternamente agradecida, sin vosotros no hubiese sido posible.*

*A mis chicas del Laboratorio de Genómica,
Ángeles, Geles y Patry, por contagiar la alegría cada día en el laboratorio.
Gracias por cuidarme y por ayudarme con mis experimentos.*

*A las Unidades de Asesoramiento Genético del Hospital Clínico Universitario
Virgen de la Arrixaca y del Hospital General Universitario Morales Meseguer,
por sus aportaciones y colaboración en el desarrollo de esta tesis.
Y a todos los pacientes que han ofrecido su participación en este estudio.*

*A todos los miembros del Laboratorio de Oncología Molecular
del Hospital Clínico San Carlos de Madrid por convertir mi breve rotación
en una experiencia tan productiva para el desarrollo de esta tesis.*

*A todo el personal del Servicio de Análisis Clínicos,
porque gracias a vosotros he crecido personal y profesionalmente durante mi
residencia. En especial a Teresa y Luisa, por vuestro cariño y por estar siempre que os
he necesitado. Y a Pepe, por su apoyo y disposición como jefe de servicio.*

*A mis compañeros de residencia,
Vero, Curro y Laura por vuestra cariñosa acogida y por todos los recuerdos
compartidos. A María, por ser la luz en la segunda etapa de la residencia.
Marta, Younes y Ángeles.
Gracias a todos por la ayuda que me habéis prestado para completar esta tesis.*

*A Ana,
por tu amistad y por tus ánimos durante todo este tiempo.*

*A Lourdes,
por tus buenos consejos y por ser un apoyo fundamental durante mi estancia en Murcia.
Me siento muy afortunada de haberte conocido.*

*A mi gente de Madrid,
por comprender mi ausencia durante esta etapa. Gracias por animarme y
apoyarme en esta andadura.*

*A mi familia,
A Borja, Tere y Robert por los momentos de desconexión junto a vosotros.
A mis abuelos, por ayudarme en cada aspecto de mi vida desde el cielo.*

*A mis padres,
por dedicar su vida a ofrecer la mejor educación y toda la felicidad del mundo a sus hijos.
Gracias por vuestro amor, por ayudarme y apoyarme en todo.
En especial a ti mamá, por estar siempre.*

*A mi hermano,
por ser mi referente en la vida y aportar sensatez a mis momentos de locura.
Gracias por cada segundo que me regalas, eres mi debilidad.*

*A Estefan,
por ser el mejor compañero de vida y caminar junto a mi iluminándome siempre en los
momentos más difíciles. Gracias por tu apoyo incondicional y quererme tanto.*

*En definitiva, a todos los que me habéis ayudado a lograr este
proyecto. Gracias de corazón.*

*La Doctoranda es beneficiaria de una beca post-residencia otorgada por la
Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC)*

Índice

<i>Abreviaturas</i>	25
<i>Índice de figuras</i>	27
<i>Índice de tablas</i>	31
<i>I. Introducción</i>	33
1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA Y OVARIO	35
2. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y FACTORES DE RIESGO.....	37
3. HEREDABILIDAD Y ARQUITECTURA GENÉTICA SUBYACENTE	38
4. GENÉTICA DEL CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO	40
4.1. PRINCIPALES GENES DE SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA: BRCA1/2	40
4.1.1. Estructura y función.....	40
4.1.2. Expresión génica	43
4.1.3. Fenotipo asociado.....	43
4.1.4. Variantes genéticas.....	44
4.2. NUEVOS GENES DE SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA	45
4.3. SUSCEPTIBILIDAD POLIGÉNICA AL CÁNCER DE MAMA Y OVARIO.....	46
5. SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO.....	48
5.1. EVOLUCIÓN DEL ESTUDIO GENÉTICO DEL SCMOH.....	48
5.2. CONSEJO GENÉTICO EN CÁNCER HEREDITARIO	49
5.2.1. Asesoramiento genético pre-análisis	49
5.2.2. Estudio genético del SCMOH	49
5.2.3. Asesoramiento genético post-análisis.....	51
6. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS.....	52
6.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE VARIANTES GENÉTICAS	52
6.2. CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS.....	52
6.2.1. Evidencias basadas en la secuencia del ADN	52
6.2.2. Evidencias asociadas a variables clínico-moleculares	54
6.2.3. Evidencias derivadas de estudios funcionales.....	55
6.3. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE VARIANTES GENÉTICAS.....	60
7. VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO.....	63
7.1. PRIORIZACIÓN DE VUS.....	63

7.2. ASESORAMIENTO GENÉTICO DE VUS	64
8. ESPECTRO MUTACIONAL DEL SCMOH	65
8.1. VARIANTES GENÉTICAS CON EFECTO FUNDADOR	65
8.2. VARIANTES GENÉTICAS RECURRENTEES	65
8.3. ESPECTRO MUTACIONAL DEL SCMOH EN POBLACIÓN MUNDIAL	66
8.4. ESPECTRO MUTACIONAL DEL SCMOH EN POBLACIÓN ESPAÑOLA	73
II. Hipótesis y objetivos.....	75
1. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	77
2. OBJETIVOS	79
III. Metodología	81
1. ESTUDIO GENÉTICO DE SCMOH EN LA REGIÓN DE MURCIA.....	83
1.1. SELECCIÓN DE FAMILIAS DE ALTO RIESGO	83
1.2. SELECCIÓN DE PACIENTES Y REGISTRO DE DATOS CLÍNICOS.....	84
1.3. ANÁLISIS GENÉTICO.....	85
1.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	86
2. ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL	87
2.1. ANÁLISIS DE PREVALENCIA DE VARIANTES PATOGÉNICAS	87
2.2. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES EN MUTACIONES FUNDADORAS.....	88
2.2.1. Identificación de los marcadores microsatélites	88
2.2.2. Microsatélites seleccionados para la variante c.1918C>T (<i>BRCA1</i>)	89
2.2.3. Microsatélites seleccionados para la delección del exón2 (<i>BRCA2</i>).....	90
2.2.4. Microsatélites seleccionados para la variante c.8251_8254del (<i>ATM</i>)	91
2.2.5. Procedimiento empleado para los análisis de haplotipo.....	92
2.2.6. Cálculo de generaciones de las mutaciones fundadoras.....	93
2.3. VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO	94
2.3.1. Criterios de priorización de VUS	94
2.3.2. RT-PCR en variantes priorizadas espliceogénicas.....	96
a) Selección de mensajeros: transcritos de referencia	97
b) Diseño de <i>primers</i> específicos	98
c) Extracción y purificación de ARN	98
d) Síntesis de ADN complementario: RT-PCR.....	99

e) PCR de amplificación	100
f) Electroforesis en gel de agarosa	101
g) Análisis de fragmentos por electroforesis capilar	101
h) Secuenciación Sanger	102
i) Interpretación de los eventos de <i>splicing</i> alternativo	103
2.3.3. Seguimiento de los portadores de VUS priorizadas	105
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	105
IV. Resultados.....	107
1. ESPECTRO MUTACIONAL DEL SCMOH EN LA REGIÓN DE MURCIA	109
1.1. ESTUDIO DE PREVALENCIA DE VARIANTES RECURRENTES	110
1.2. ESTUDIO DE VARIANTES PATOGENICAS DE PROCEDENCIA AFRICANA	127
1.2.1. Análisis de <i>splicing</i> de la variante c.8488-1_8489delinsTCCATTACA.....	128
1.3. ESTUDIO DE MUTACIONES FUNDADORAS	130
2. ESTUDIO DE VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO.....	148
2.1. RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO	148
2.2. PRIORIZACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO	149
2.3. VARIANTES PRIORIZADAS SUSCEPTIBLES DE <i>SPLICING</i> ABERRANTE	160
2.3.1. Análisis de <i>splicing</i> de la variante c.3402+3A>C en <i>ATM</i>	160
2.3.2. Análisis de <i>splicing</i> de la variante c.320-5T>A en <i>CHEK2</i>	162
2.3.3. Análisis de <i>splicing</i> de la variante c.1008G>A en <i>CHEK2</i>	163
V. Discusión	165
1. ESPECTRO MUTACIONAL DEL SCMOH EN LA REGIÓN DE MURCIA	167
2. PRIORIZACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO.....	180
3. PERSPECTIVAS FUTURAS EN EL ESTUDIO GENÉTICO DEL SCMOH	186
VI. Conclusiones	187
VII. Anexos	191
VIII. Bibliografía.....	219

Abreviaturas

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i> (Colegio Americano de Genética Médica y Genómica)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMP	Asociación de Patología Molecular
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BIC	<i>Breast Cancer Information Core</i> (Núcleo de Información de cáncer de mama)
BCCR	<i>Breast Cancer Cluster Region</i> (región asociada a cáncer de mama)
BOADICEA	<i>Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm</i> (Algoritmo de incidencia de cáncer de mama/ovario y estimación de portadores)
BRCA+	Portadores de variantes genéticas en <i>BRCA1/2</i>
BRCA1+	Portadores de variantes genéticas en <i>BRCA1</i>
BRCA2+	Portadores de variantes genéticas en <i>BRCA2</i>
dNTPs	Dinucleótidos trifosfato
GWAS	<i>Genome-wide associations scans</i> (Estudios de asociación del genoma completo)
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i> (Base de datos de Mutaciones Génicas Humanas)
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i> (Sociedad de la Variación del Genoma Humano)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer)
IVS	<i>Intervening sequence</i> (secuencias intermedias no codificantes)
LGD	Laboratorio de Genómica
LOVD	<i>Leiden Open Variation Database</i>
LGR	<i>Large Genomic Rearrangements</i> (grandes reordenamientos genómicos)
MAF	Frecuencia menor alélica

MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> (Amplificación de sonda dependiente de ligadura multiplex)
MMR	<i>Mismatch repair</i> (reparación del desajuste)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para la Información en Biotecnología)
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i> (Red Nacional Integral de Cáncer)
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Secuenciación Nueva Generación)
NMD	<i>Nonsense-Mediated Decay</i> (Degradación mediada por mutaciones terminadoras)
nt	nucleótidos
OCCR	<i>Ovarian Cancer Cluster Region</i> (región asociada a cáncer de ovario)
PARP	PoliADP-ribosa polimerasa
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRS	<i>Polygenic Risk Score</i> (score de riesgo poligénico)
RR	Riesgo relativo
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SCMOH	Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (polimorfismo de un solo nucleótido)
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i> (variante de un solo nucleótido)
STR	<i>Short Tandem Repeats</i> (repeticiones cortas en tándem)
Ta	Temperatura <i>annealing</i> o de anillamiento
Tm	Temperatura <i>melting</i> o de fusión
VUS	<i>Variant of Uncertain Significance</i> (variante de significado clínico desconocido)

Índice de figuras

Figura 1. Incidencia de cáncer por sexo a nivel mundial en 2020. Fuente de datos: GLOBOCAN 2020, IARC Global Cancer Observatory	36
Figura 2. Mortalidad por cáncer en población femenina en 2020. Fuente de datos: GLOBOCAN 2020, IARC Global Cancer Observatory	36
Figura 3. Genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario.....	39
Figura 4. Dominios funcionales de las proteínas BRCA1/2	41
Figura 5. Reparación del ADN por recombinación homóloga	42
Figura 6. Clusters BCCR y OCCR asociados a genes BRCA1 y BRCA2	44
Figura 7. Heredabilidad estimada en cáncer de mama y ovario	47
Figura 8. Posibles cambios moleculares en la secuencia del ADN	53
Figura 9. Configuración <i>trans/cis</i> de dos variantes genéticas	55
Figura 10. Proceso de maduración del ARN mensajero.....	57
Figura 11. Secuencias básicas de <i>splicing</i>	58
Figura 12. Elementos reguladores del <i>splicing</i>	58
Figura 13. Secuencias consenso de reconocimiento de intrón por parte del esplicesoma.....	59
Figura 14. Estructura exónica y secuencias repetitivas de los genes BRCA1 y BRCA2	71
Figura 15. Evolución cronológica de la metodología empleada en diagnóstico molecular del SCMOH.....	86
Figura 16. Localización de los marcadores microsatélites empleados con respecto al gen BRCA1.....	89
Figura 17. Localización de los marcadores microsatélites empleados con respecto al gen BRCA2.....	90
Figura 18. Localización de los marcadores microsatélites empleados con respecto al gen ATM.....	91
Figura 19. Programa empleado en la reacción de amplificación	92
Figura 20. Patrón de picos obtenido en el análisis de microsatélites	93
Figura 21. Algoritmo empleado para la priorización de variantes de significado incierto.....	96
Figura 22. Protocolo establecido para estudio de VUS susceptibles de <i>splicing</i> alternativo o aberrante. ...	97
Figura 23. Protocolo de purificación automatizada con el sistema PAXgene Blood RNA.....	99
Figura 24. Programa empleado en la reacción de amplificación	100
Figura 25. Programa empleado en la reacción de secuenciación	103

Figura 26. Distribución por genes de las variantes patogénicas y probablemente patogénicas.....	109
Figura 27. Distribución de las variantes patogénicas recurrentes y fundadoras en el gen <i>BRCA1</i>	110
Figura 28. Distribución de las variantes patogénicas recurrentes y fundadoras en el gen <i>BRCA2</i>	110
Figura 29. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.68_69del	113
Figura 30. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.68_69del	114
Figura 31. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.212+1G>A.....	116
Figura 32. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.212+1G>A	116
Figura 33. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.5123C>A	118
Figura 34. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.5123C>A.....	119
Figura 35. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.3264dup	121
Figura 36. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.3264dup	121
Figura 37. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.3455T>G	123
Figura 38. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.3455T>G.....	124
Figura 39. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.9117G>A.....	126
Figura 40. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.9117G>A	127
Figura 41. Análisis de <i>splicing</i> de la variante c.8488-1_8489delinsTCCATTACA.....	130
Figura 42. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.1918C>T	132
Figura 43. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.1918C>T	133
Figura 44. Patrón de picos obtenidos en el análisis de microsatélites de la variante c.1918C>T	134
Figura 45. Distancia comprendida entre el marcador recombinante y el gen <i>BRCA1</i>	135
Figura 46. Caracterización molecular de la deleción del exón 2	137
Figura 47. Árbol genealógico de una familia portadora de la deleción del exón 2	137
Figura 48. Origen geográfico de las familias portadoras de la deleción del exón 2	139
Figura 49. Patrón de picos obtenidos en el análisis de microsatélites de la deleción del exón 2	140
Figura 50. Distancia comprendida entre el marcador recombinante y el gen <i>BRCA2</i>	141
Figura 51. Representación de la variante c.8251_8254del junto a los dominios de la proteína ATM.....	142
Figura 52. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.8251_8254del	143
Figura 53. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.8251_8254del.....	144
Figura 54. Patrón de picos obtenidos en el análisis de microsatélites de la variante c.8251_8254del	146

Figura 55. Haplotipo de los portadores de la variante c.8251_8254del.....	147
Figura 56. Distancia comprendida entre los marcadores recombinantes y el gen <i>ATM</i>	147
Figura 57. Distribución por genes de las variantes de significado clínico incierto	148
Figura 58. Distribución por genes de las variantes de significado clínico desconocido priorizadas	149
Figura 59. Análisis de <i>splicing</i> de la variante c.3402+3A>C	161
Figura 60. Árbol genealógico de la familia portadora de la variante c.3402+3A>C	161
Figura 61. Análisis de <i>splicing</i> de la variante c.320-5T>A	162
Figura 62. Análisis de <i>splicing</i> de la variante c.1008G>A	163
Figura 63. Prevalencia de variantes patogénicas asociada al SCMOH	167
Figura 64. Mapa representativo de variantes patogénicas recurrentes y fundadoras <i>BRCA1/BRCA2</i>	174
Figura 65. Representación geográfica de los haplotipos de las familias portadoras de c.8251_8254del ..	178
Figura 66. Evolución del algoritmo de clasificación de variantes genéticas obtenidas en los estudios de secuenciación masiva en el Laboratorio de Genómica	181
Figura 67. Resumen de las variantes patogénicas, VUS priorizadas y VUS no priorizadas	183

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación clínica de variantes genéticas y su traslación a la clínica	60
Tabla 2. Criterios de patogenicidad para clasificar las variantes genéticas.....	61
Tabla 3. Criterios de benignidad para clasificar las variantes genéticas	62
Tabla 4. Reglas de combinación de criterios para clasificar variantes genéticas.	62
Tabla 5. Variantes patogénicas <i>BRCA1/2</i> recurrentes a nivel mundial por región geográfica	67
Tabla 6. Variantes patogénicas <i>BRCA1/2</i> recurrentes a nivel mundial por grupo racial/etnia.....	68
Tabla 7. Variantes <i>BRCA1</i> con potencial efecto fundador en diversas poblaciones europeas.....	70
Tabla 8. Variantes <i>BRCA2</i> con potencial efecto fundador en diversas poblaciones europeas.....	71
Tabla 9. Perfil mutacional de variantes genéticas recurrentes en población española.....	73
Tabla 10. Evolución de los criterios aplicados por los oncólogos para el estudio genético del SCMOH.	84
Tabla 11. Cebadores empleados en el análisis de haplotipo de la variante c.1918C>T.....	89
Tabla 12. Cebadores empleados en el análisis de haplotipo de la delección del exón 2	90
Tabla 13. Cebadores empleados en el análisis de haplotipo de la variante c.8251_8254de	91
Tabla 14. Mezcla de la reacción de amplificación.....	92
Tabla 15. Recursos disponibles <i>in silico</i> para la interpretación de variantes.....	94
Tabla 16. Transcritos de referencia seleccionados para los genes estudiados	97
Tabla 17. Secuencia de <i>primers</i> específicos diseñados para estudios <i>splicing</i>	98
Tabla 18. Mezcla de la reacción RT-PCR	99
Tabla 19. Mezcla de la reacción de amplificación.....	100
Tabla 20. Mezcla de la reacción de secuenciación.....	102
Tabla 21. Variantes patogénicas recurrentes <i>BRCA1/2</i> en la Región de Murcia.....	111
Tabla 22. Variantes patogénicas recurrentes <i>BRCA1/2</i> en población del norte de África.....	111
Tabla 23. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.68_69del	113
Tabla 24. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.212+1G>A	115
Tabla 25. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.5123C>A.....	118
Tabla 26. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.3264dup.....	120
Tabla 27. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.3455T>G.....	122

Tabla 28. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.9117G>A	125
Tabla 29. Variantes patogénicas recurrentes en familias de procedencia norteafricana.....	128
Tabla 30. Fenotipo asociado a los portadores de la variante genética c.1918C>T	132
Tabla 31. Haplotipos obtenidos en los portadores de la variante c.1918C>T	135
Tabla 32. Fenotipo de los portadores de la delección del exón 2.....	138
Tabla 33. Haplotipos obtenidos en los portadores de la delección del exón 2.....	140
Tabla 34. Fenotipo asociado a los portadores de la variante c.8251_8254del	144
Tabla 35. Reclasificación de las variantes de significado clínico desconocido obtenidas del estudio genético mediante el análisis de los genes <i>BRCA1/2</i>	154
Tabla 36. Reclasificación de las variantes de significado clínico desconocido obtenidas del estudio genético con panel de genes a los pacientes con resultado no informativo.....	157
Tabla 37. Variantes de significado clínico desconocido priorizadas.....	159
Tabla 38. Correlación genotipo-fenotipo de las variantes patogénicas recurrentes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> detectadas en portadores de la Región de Murcia.....	171

I. Introducción

1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA Y OVARIO

En la actualidad, el número de casos de cáncer diagnosticados a nivel mundial ha aumentado a causa del crecimiento y envejecimiento poblacional, la exposición a factores de riesgo y, en algunos tipos de cáncer como los de mama, cérvix, próstata o colorrectal, gracias al desarrollo de programas de detección precoz.

Los datos actualizados por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) reflejan un cambio de tendencia en la epidemiología del cáncer al situar en primera posición al cáncer de mama como el tumor más diagnosticado (11.7%) a nivel mundial durante el año 2020 (1), representando el 24.5% de la incidencia global en mujeres (**Figura 1**).

En España, el cáncer de mama ha supuesto un total de 32.953 nuevos casos diagnosticados en 2020 según estimaciones de la Red Española de Registros de Cáncer (2). Este cáncer, considerado el más prevalente en población femenina con un total de 516.827 casos en España, es responsable de la primera causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial (15.5%) y la segunda en nuestro país (14.6%) (**Figura 2**).

Por otro lado, el cáncer de ovario es el tercer tumor ginecológico más frecuente a nivel mundial, representando un 3.4% de la incidencia global en mujeres (**Figura 1**) y un 4.7% de las muertes por cáncer en población femenina (**Figura 2**).

En España, el cáncer de ovario ha supuesto un total de 3.645 nuevos casos diagnosticados en 2020 según estimaciones de la Red Española de Registros de Cáncer (2). La ausencia de un método de cribado poblacional que permita su detección precoz implica, en la mayoría de los casos, su diagnóstico en estadios avanzados de la enfermedad. A pesar de los notables avances en el conocimiento de la biología molecular y el tratamiento, sigue siendo el tumor ginecológico más letal y la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres en nuestro país (**Figura 2**) (3).

Por último, es conveniente destacar que los datos estimados y publicados en los últimos estudios epidemiológicos sobre el cáncer, pueden verse alterados debido a que los programas de cribado poblacional y las posibilidades diagnósticas del sistema sanitario han sido afectados por la pandemia COVID-19 (4) .

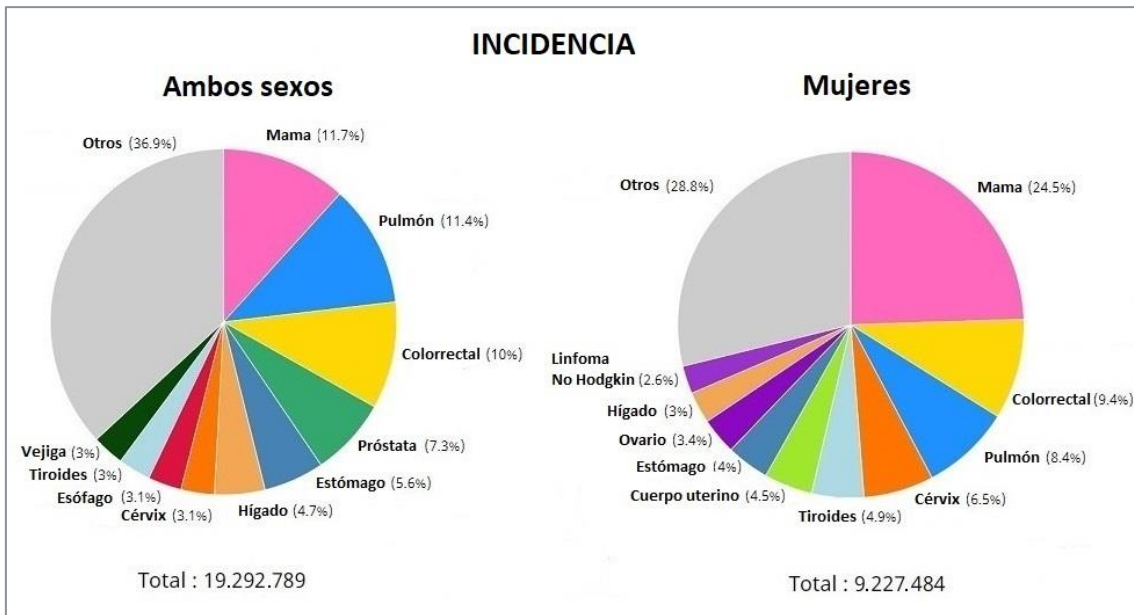


Figura 1. Incidencia de cáncer por sexo a nivel mundial en 2020. Cifras estimadas por GLOBOCAN 2020, IARC Global Cancer Observatory (5)

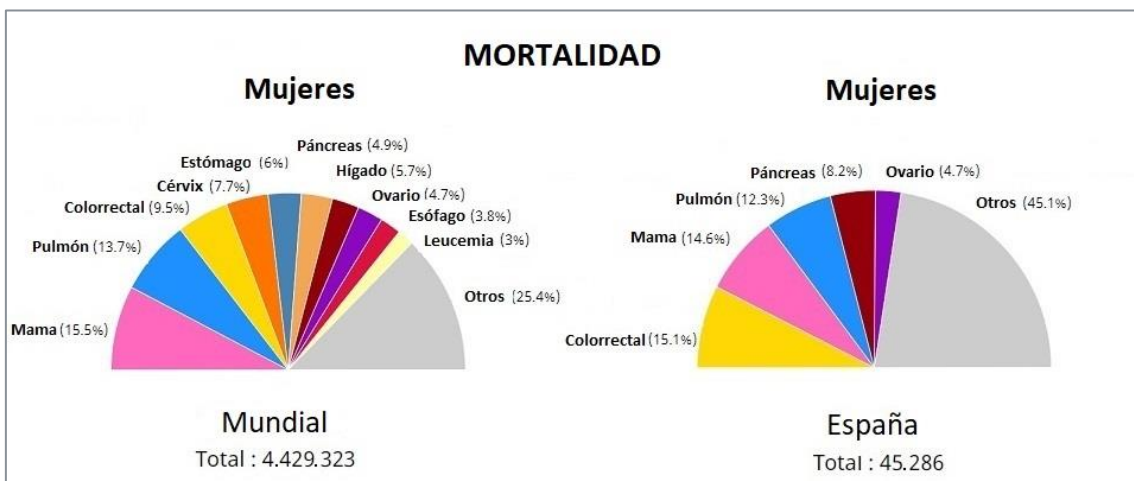


Figura 2. Mortalidad por cáncer en población femenina en 2020. Cifras estimadas en el mundo y en España por GLOBOCAN 2020, IARC Global Cancer Observatory (5)

2. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y FACTORES DE RIESGO

La carcinogénesis se trata de un proceso evolutivo impulsado por la selección natural actuando sobre mutaciones somáticas preexistentes adquiridas de forma estocástica (6). Sin embargo, se conoce que individuos genéticamente predispuestos presentan un riesgo superior a la población general en el desarrollo de tumores, lo que parece implicar un componente de susceptibilidad genética al cáncer (7).

No obstante, a pesar de la importante carga genética en el desarrollo de tumores, su etiología es multifactorial y depende de múltiples componentes no genéticos, capaces de alterar la predisposición de cada sujeto a desarrollar la enfermedad, generando diferencias de expresividad y penetrancia entre individuos. Diversos estudios epidemiológicos han identificado múltiples factores implicados en su patogénesis como modificadores del riesgo asociado al cáncer de mama y ovario (8,9):

- * Factores biológicos como el sexo o la edad, justificados por el papel fundamental que juegan las hormonas femeninas (ováricas y esteroideas) en el desarrollo del cáncer de mama y ovario, pueden ser considerados los principales factores de riesgo involucrados en el origen y evolución de la enfermedad.
- * Factores vinculados al estilo de vida como inactividad física, hormonoterapia, patrones dietéticos relacionados con sobrepeso u obesidad y consumo de alcohol y/o tabaco, son considerados elementos potencialmente modificables asociados a un mayor riesgo de carcinogénesis.
- * Factores medioambientales como la exposición a radiaciones o agentes carcinógenos (físicos, químicos, biológicos, ocupacionales).
- * Factores condicionantes de la mama como la alta densidad mamográfica o la existencia de un carcinoma primario se asocian a un mayor riesgo de cáncer o una mayor predisposición de cáncer de mama contralateral, respectivamente.
- * Por último, existen factores que influyen en el riesgo acumulado de desarrollar eventos carcinogénicos como la edad temprana de diagnóstico, los antecedentes personales previos de cáncer y los antecedentes familiares (número y grado de parentesco de los miembros de la familia afectados).

3. HEREDABILIDAD Y ARQUITECTURA GENÉTICA SUBYACENTE

En genética, la heredabilidad hace referencia a la carga genética asociada a un fenotipo y se define como la proporción de la variabilidad fenotípica atribuible a la variabilidad genotípica en una población. De esta forma, una heredabilidad de 0 equivale a ausencia de componente genético, mientras que una heredabilidad de 1 equivale a un fenotipo determinado únicamente por factores genéticos. De acuerdo con un estudio realizado por Lichtenstein y colaboradores (10), la heredabilidad del cáncer de mama y ovario comprende valores de 0.27 y 0.22, respectivamente.

Desde el punto de vista de la traslación a la clínica, mucho más relevante que el valor absoluto de la heredabilidad del cáncer, es la arquitectura genética subyacente a dicha heredabilidad. Este concepto se define como el número total de *loci* implicados en el desarrollo de una enfermedad, la frecuencia poblacional y el riesgo asociado a cada *locus* y las interacciones genéticas entre ellos.

La compleja arquitectura genética subyacente a la heredabilidad del cáncer de mama y ovario se suele dividir en 3 componentes principales:

- * Genes donde se detectan variantes genéticas muy raras en la población pero asociadas a un riesgo relativo elevado.
- * Genes donde se localizan variantes genéticas relativamente raras asociadas a estimaciones de riesgo relativo intermedio.
- * Genes donde se ubican variantes genéticas comunes en la población asociadas a un riesgo relativo bajo.

Este concepto se representa de forma simplificada en la **Figura 3** al agrupar los genes de alta y moderada penetrancia en un único componente definido por genes donde se localizan variantes raras o muy raras de riesgo elevado e intermedio. La frecuencia mutacional en estos genes es muy baja en la población, no obstante presentan una evidente contribución a la heredabilidad del cáncer de mama y ovario. Por otro lado, se representa un grupo de variantes frecuentes en la población pero asociadas a un riesgo bajo de cáncer, identificadas mediante estudios de asociación del genoma completo (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*).

No obstante, resulta conveniente destacar otro aspecto relevante de la arquitectura genética subyacente del cáncer. La tendencia consiste en asociar genes con niveles de riesgo, pero lo cierto es que el riesgo realmente es conferido por variantes genéticas concretas, por lo que diferentes variantes en un mismo gen pueden asociarse con niveles de riesgo muy diversos (11). De esta forma, en genes denominados de alta penetrancia como *BRCA1* y *BRCA2*, se han identificado variantes genéticas de riesgo intermedio (*BRCA1* R1699Q) (12) o de bajo riesgo (*BRCA2* K3326X) (13).

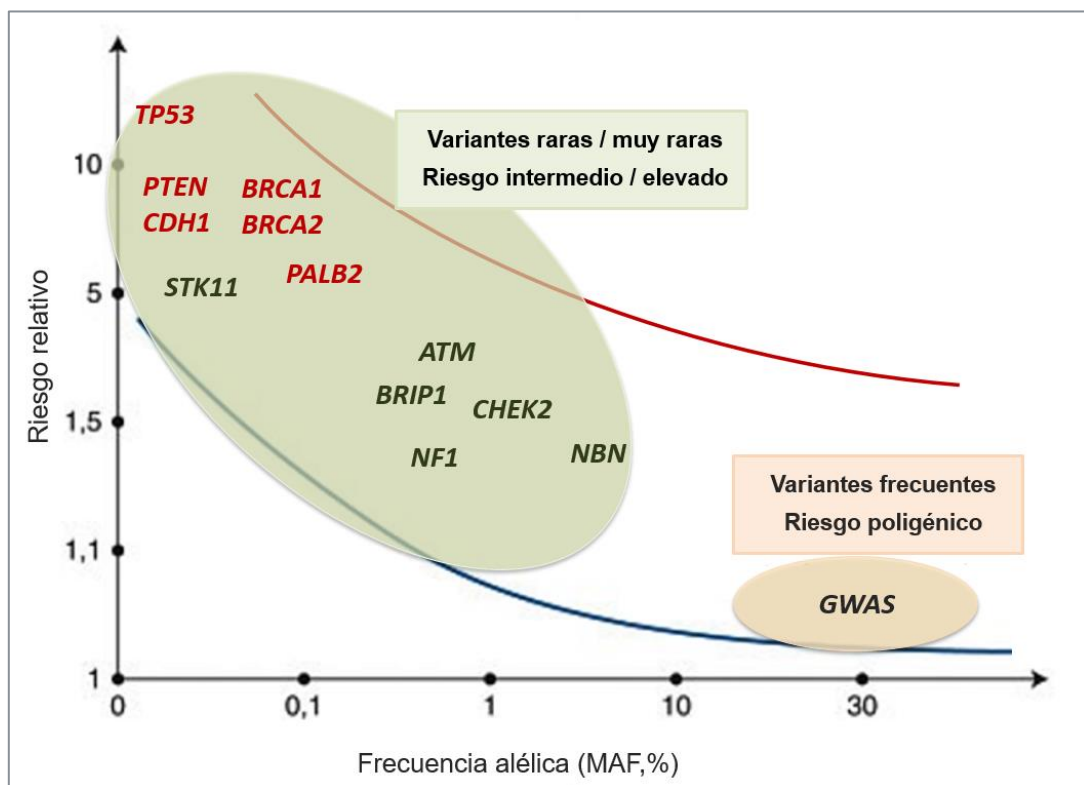


Figura 3. Arquitectura genética subyacente en cáncer de mama y ovario: genes de susceptibilidad en función de frecuencia alélica y riesgo relativo. GWAS: *Genome-Wide Association Studies*. Figura adaptada de Vande Perre P y col. (14)

4. GENÉTICA DEL CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO

El cáncer se considera una enfermedad genética esporádica, excepcionalmente hereditaria. Aproximadamente, el 7% de los tumores mamarios y el 11-15% de los tumores epiteliales de ovario se consideran de tipo hereditario asociados a mutaciones germinales en genes de susceptibilidad al cáncer (15).

Hasta hace unos años sólo se planteaba el estudio de los genes *BRCA1* y *BRCA2* (*breast cancer susceptibility genes*) al ser considerados los principales genes responsables de la predisposición hereditaria asociada a este tipo de tumores. Sin embargo, los avances científicos relacionados con el estudio genético del cáncer de mama y ovario hereditario han permitido conocer nuevos genes de penetrancia variable y accionabilidad clínica demostrada para este tipo de tumores, además de otros genes cuya validez clínica todavía se encuentra en fase de investigación. La aparición de nuevas tecnologías de secuenciación masiva y la reciente incorporación de paneles genéticos a la rutina diagnóstica han supuesto un gran avance en el estudio genético del cáncer hereditario.

Por último, la aceptación de la teoría poligénica tiene por objetivo el desarrollo y aplicación en la práctica clínica de un modelo de susceptibilidad poligénica combinado con factores no genéticos que permita estimar el riesgo individual de desarrollar cáncer.

4.1. PRINCIPALES GENES DE SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA: *BRCA1/2*

4.1.1. Estructura y función

El gen *BRCA1* (OMIM: 113705), descubierto en 1994 por Mary-Claire King y colaboradores, se localiza en la región cromosómica 17q21.31. El transcrito de referencia LRG_292t1 (NM_007294.4/ENST00000357654.9) contiene 23 exones con una secuencia codificante repartida en 22 exones que se traduce en una proteína (NP_009225.1) de 1863 aminoácidos con varios dominios funcionales representados en la **Figura 4** (16,17). En la región amino-terminal, el dominio RING *finger* es responsable de la unión de *BRCA1* con su proteína homóloga *BARD1* (*BRCA1 Associated RING Domain 1*) para formar el complejo E3 ubiquitina ligasa necesario para la regulación de la reparación homóloga del DNA. En la región carboxilo-terminal, los dominios BRCT intervienen en el reconocimiento y unión de fosfopéptidos de otras proteínas (Abraxas,

BACH1, CtIP) que participan en la cascada de señalización en la reparación homóloga. Además, contiene una región central constituida por una señal de localización nuclear (NLS), regiones susceptibles de fosforilación y activación por ATM y CHK2, un dominio *coiled-coil* mediante el cual se une a PALB2 y una zona de interacción con proteínas que participan en diversos procesos celulares como proteínas de reparación Rad50 y Rad51, factores de transcripción c-Myc y reguladores del ciclo celular.

El gen *BRCA2* (OMIM: 600185), descubierto en 1995 por Wooster y colaboradores, se localiza en la región cromosómica 13q13.1. El transcrito de referencia LRG_293t1 (NM_000059.4/ENST00000380152.8) contiene 27 exones con una secuencia codificante formada por 26 exones que se traduce en una proteína (NP_000050.3) de 3418 aminoácidos, la cual actúa de forma específica en la reparación del ADN mediante recombinación homóloga. En la estructura de la proteína BRCA2 destaca un dominio en el extremo amino-terminal que interacciona con la proteína PALB2 (*Partner And Localizer of BRCA2*), un dominio de repeticiones BRC de unión directa a la recombinasa RAD51 y un complejo formado por un dominio helicoidal, tres dominios *oligonucleotide binding* (OB) y un *dominio tower* (T) que permite la unión al ADN monocatenario y bicatenario. Por último, el extremo carboxilo-terminal contiene una señal de localización nuclear (NLS) y un sitio de fosforilación por CDK2, que también es un punto de unión a RAD51 (Figura 4) (18,19).

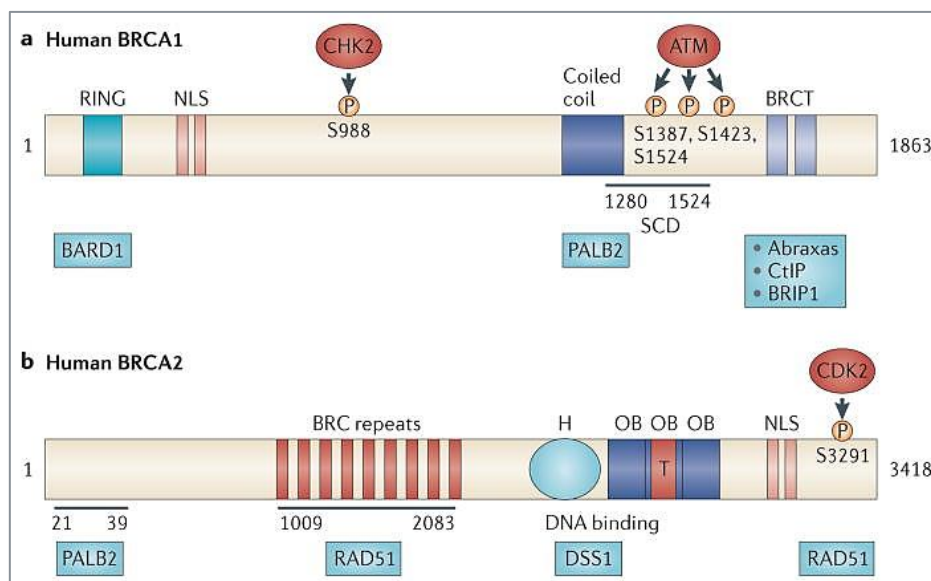


Figura 4. Dominios funcionales de las proteínas BRCA1/2 y asociación con otras proteínas que intervienen en la vía de reparación de daño celular (20)

BRCA1 y *BRCA2* son genes supresores de tumores implicados en la reparación de DNA mediante recombinación homóloga, esenciales para mantener la estabilidad genómica celular (21). Sin embargo, las proteínas codificadas por ambos genes realizan sus efectos en diferentes puntos de la cadena de reparación pero trabajan de forma conjunta para preservar la integridad del genoma humano. *BRCA1* es una proteína pleiotrópica de la respuesta al daño celular que funciona tanto en la activación del punto control como en el mecanismo de reparación del ADN, mientras que *BRCA2* es un mediador del mecanismo central de la recombinación homóloga. (Figura 5) La inactividad de ambas proteínas funcionales desencadenaría un proceso defectivo que en último término, podría generar una mayor predisposición al desarrollo de tumores.

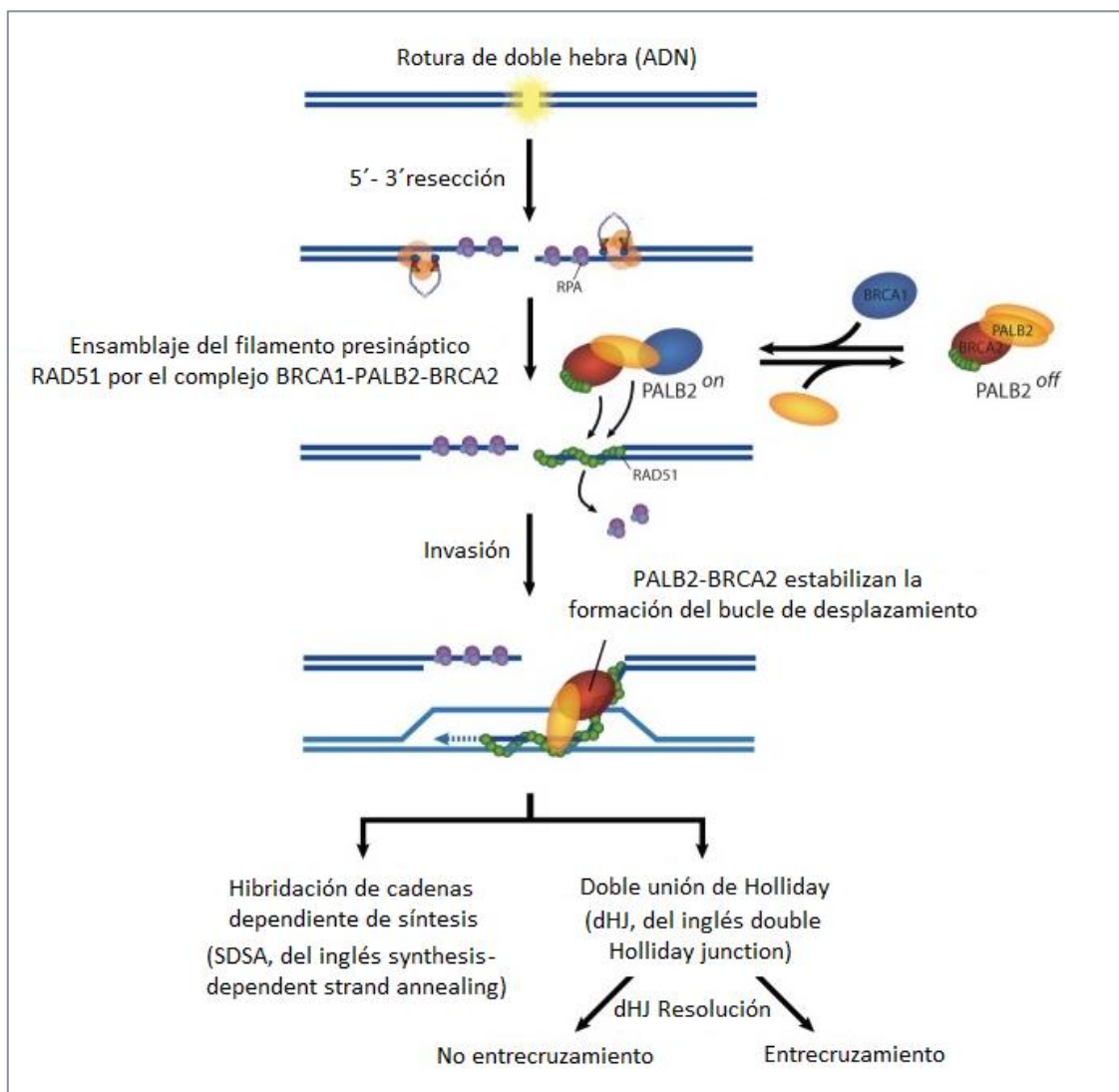


Figura 5. Modelo de acción colaborativa entre *BRCA1*, *BRCA2* y *PALB2* en la ruta de reparación del ADN por recombinación homóloga. Figura adaptada de Buisson R y col. (22)

4.1.2. Expresión génica

Las variantes genéticas en los genes *BRCA* implicadas en carcinogénesis muestran tropismo selectivo por el tejido mamario y ovárico. Existen varias hipótesis para explicar la especificidad tumoral restringida a estos tejidos que justificarían su elevada susceptibilidad al cáncer (23):

- * Existencia de algún factor de “supervivencia” específico en estos tejidos y sujeto a fuertes señales de crecimiento por estimulación hormonal.
- * Reparación del ADN en tejido mamario y ovárico mediada especialmente por los mecanismos estimulados por *BRCA1/2*, mientras que otros tejidos dispongan de otros mecanismos compensatorios.
- * Pérdida de heterocigosidad en *BRCA1/2* que implica la inactivación de estos genes supresores de tumores y conduce al desarrollo de carcinogénesis de forma selectiva en estos tejidos.

4.1.3. Fenotipo asociado

El cáncer de mama presenta diferencias más significativas en sus características fenotípicas respecto al cáncer de ovario que muestra un perfil fenotípico predominante.

Los carcinomas mamarios asociados a mutaciones en *BRCA1* presentan un perfil histológico dominante de tipo ductal invasivo de alto grado e índice de proliferación elevado. Se caracterizan por una expresión negativa de receptores hormonales y HER2 (subtipo molecular triple negativo), y alta expresión para marcadores mioepiteliales tales como citoqueratinas 5, 6, 14 y 17, EGFR, entre otros. En contraste, los carcinomas de mama con mutación *BRCA2* presentan un perfil más heterogéneo indistinguible de los tumores esporádicos o del resto de carcinomas asociados a mutaciones en otros genes. Al igual que la mayoría de los tumores *BRCA1* son de tipo ductal infiltrante sin embargo, predomina el fenotipo luminal con positividad de receptores hormonales y negatividad para HER2 (24).

El fenotipo predominante del carcinoma de ovario en portadoras *BRCA* suele ser de tipo seroso de alto grado con índice mitótico elevado, infiltración linfocítica y atipia citológica (24).

4.1.4. Variantes genéticas

En la base de datos *BRCA Exchange* [acceso en julio 2022, <https://brcaexchange.org/>] se han registrado 68825 variantes genéticas distribuidas a lo largo de toda la secuencia codificante de ambos genes y en las regiones intrónicas flanqueantes. Esta cifra refleja la complejidad que supone el estudio de *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, la predisposición al desarrollo de cáncer de mama y ovario parece estar relacionada con el tipo y la ubicación de estas variantes por la presencia de *clusters* en ambos genes: *Breast Cancer Cluster Region* (BCCR) y *Ovarian Cancer Cluster Region* (OCCR) ilustrados en la **Figura 6**. De este modo, la existencia de variantes genéticas en estas regiones se asocia con un mayor riesgo de desarrollo de tumores de mama y de ovario, respectivamente.

En la base de datos *Breast Cancer Information Core* (BIC) [acceso en julio 2022, <https://www.research.nhgri.nih.gov/bic/>] la mayoría de las variantes patogénicas descritas en ambos genes son de tipo *frameshift*, cambios de un solo nucleótido (SNV, *single nucleotide variant*) o secuencias intermedias no codificantes (IVS, *intervening sequence*). También se han identificado con menor frecuencia reordenamientos genómicos, siendo más frecuentes en *BRCA1* que en *BRCA2* (25).

Además de las variantes claramente deletéreas, se identifican numerosas variantes de significado clínico desconocido, mayoritariamente *missense*, y múltiples polimorfismos, encontrados con relativa frecuencia en la población.

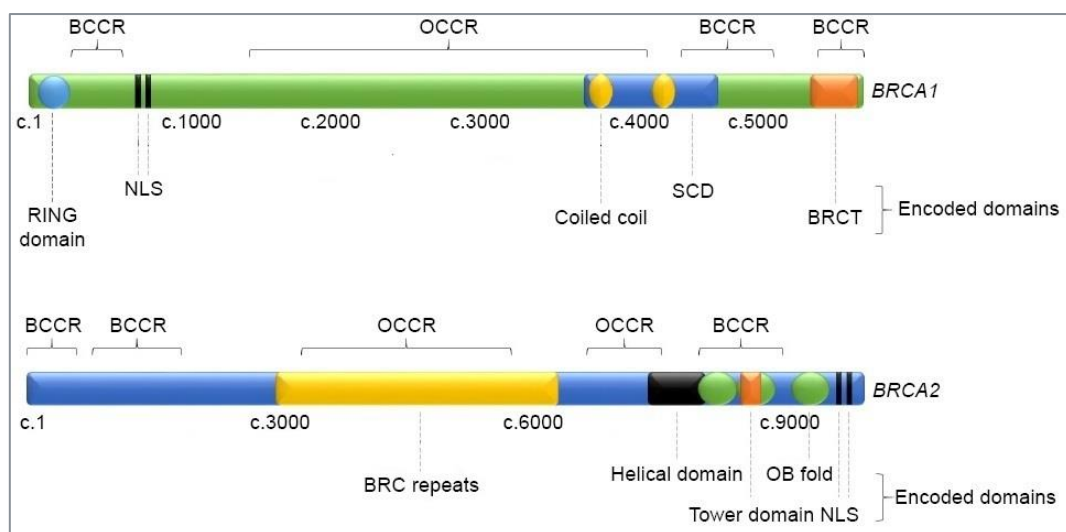


Figura 6. Esquema de los *clusters* BCCR (*Breast Cancer Cluster Region*) y OCCR (*Ovarian Cancer Cluster Region*) asociados a genes *BRCA1* y *BRCA2*. Figura adaptada de Hollis RL y col. (26)

4.2. NUEVOS GENES DE SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA

La etiología del cáncer de mama y ovario hereditario se ha ido modificando con el paso del tiempo al descubrir nuevos genes de alta y moderada penetrancia que aunque presentan frecuencias poblacionales muy bajas, se asocian de forma evidente con una mayor predisposición al desarrollo de cáncer hereditario (27,28).

A continuación, se resumen las características más significativas de los principales genes de interés relacionados con un aumento de riesgo de cáncer de mama y ovario (29):

Genes de alta penetrancia

- * *TP53* relacionado con el síndrome de Li-Fraumeni caracterizado por un aumento marcado de riesgo de cáncer de mama y otros (sarcomas, leucemias, etc.) (30).
- * *PTEN* responsable del síndrome de Cowden, trastorno caracterizado por la presencia de hamartomas (tumores no cancerosos) y asociado a elevada predisposición de neoplasias malignas (mama, endometrio, tiroides, etc.) (31).
- * *CDH1* vinculado a un tumor epitelial infrecuente del estómago (cáncer gástrico difuso hereditario) y a un riesgo elevado de cáncer de mama (32,33).
- * *STK11* relacionado con el síndrome de Peutz-Jeghers asociado a poliposis gastrointestinal y con un mayor riesgo de cáncer de mama (34,35).

Genes de moderada penetrancia

- * Mutaciones bialélicas en *ATM* producen una enfermedad de herencia autosómica recesiva conocida como ataxia-telangiectasia, caracterizada por ataxia cerebelar progresiva, telangiectasia, enfermedades inmunes y predisposición a cáncer (sobre todo linfomas y leucemia) (36,37). Sin embargo, mutaciones monoalélicas se asocian con una mayor predisposición al desarrollo de carcinoma mamario y otro tipo de tumores (38).
- * Genes con accionabilidad clínica demostrada para el cáncer de mama (*PALB2*, *CHEK2*, *NBN*, *NF1*) y cáncer de ovario (*BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*, genes *mismatch repair (MMR)*, *EPCAM*) (39).

4.3. SUSCEPTIBILIDAD POLIGÉNICA AL CÁNCER DE MAMA Y OVARIO

En el cáncer de mama y ovario hereditario existe un porcentaje de casos que no se justifican por mutaciones en los genes conocidos de alta o moderada penetrancia. Esto manifiesta que una proporción significativa de la predisposición hereditaria a estos tumores, se explica a partir de un modelo de susceptibilidad poligénica que representa el efecto multiplicativo de variantes genéticas relativamente frecuentes en la población y asociadas a un riesgo relativo bajo de desarrollar la enfermedad (Figura 7).

Consideraciones del modelo poligénico

El modelo poligénico establece que para determinar con precisión la susceptibilidad poligénica al cáncer es necesario identificar todos los *loci* implicados en el desarrollo de una enfermedad y conocer en detalle la arquitectura genética subyacente.

Los estudios pangénómicos de asociación GWAS han permitido la identificación de múltiples *loci* donde se localizan variantes genéticas, habitualmente polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*), relativamente frecuentes en la población pero asociadas con un riesgo bajo de desarrollar cáncer. La utilidad clínica es muy limitada si se consideran los SNPs de forma individual. Sin embargo, su combinación en un modelo poligénico incrementa potencialmente el riesgo de carcinogénesis. El riesgo genético conferido por un conjunto de SNPs asociadas a una enfermedad puede ser calculado mediante un score de riesgo poligénico (PRS, *polygenic risk score*) que establece el nivel de susceptibilidad poligénica y, en combinación con otros factores genéticos y no genéticos, permiten estimar el riesgo individual de desarrollar cáncer.

En relación a los últimos estudios reportados sobre la susceptibilidad poligénica relacionada con el cáncer hereditario, se han definido PRS con capacidad de estratificar el riesgo de cáncer de mama (40) y ovario (41).

Modelos de predicción de riesgo de cáncer

En la actualidad existen diversos algoritmos predictivos que permiten estimar de forma individualizada el riesgo futuro de desarrollar cáncer. La validación clínica de modelos computacionales optimizados que permitan predecir la susceptibilidad hereditaria al

cáncer puede ser muy útil en un contexto de cribado poblacional para detectar aquellas pacientes de alto riesgo candidatas a pruebas genéticas. Este enfoque creciente permite avanzar en los objetivos de la medicina de precisión, cuya finalidad es beneficiarse de los avances científicos para mejorar las opciones de diagnóstico precoz y tratamiento personalizado del cáncer (42,43).

En consecuencia, se ha desarrollado un modelo de predicción de riesgo de cáncer de mama y ovario denominado BOADICEA (*Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm*) que incorpora el componente poligénico en combinación con otros factores genéticos y no genéticos: antecedentes personales y familiares, datos demográficos, datos epidemiológicos, estilo de vida, factores hormonales, perfil fenotípico del tumor, características específicas asociadas al cáncer de mama (densidad mamográfica) y ovario (endometriosis) y variantes patogénicas en genes de susceptibilidad al cáncer de mama (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2* y *ATM*) y ovario (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*). En relación al componente poligénico, este modelo ha incorporado un PRS basado en 313 SNPs que explica el 20% de la varianza poligénica del cáncer de mama y un PRS definido por 36 SNPs que representa el 5% de la varianza poligénica del cáncer de ovario epitelial (44,45).

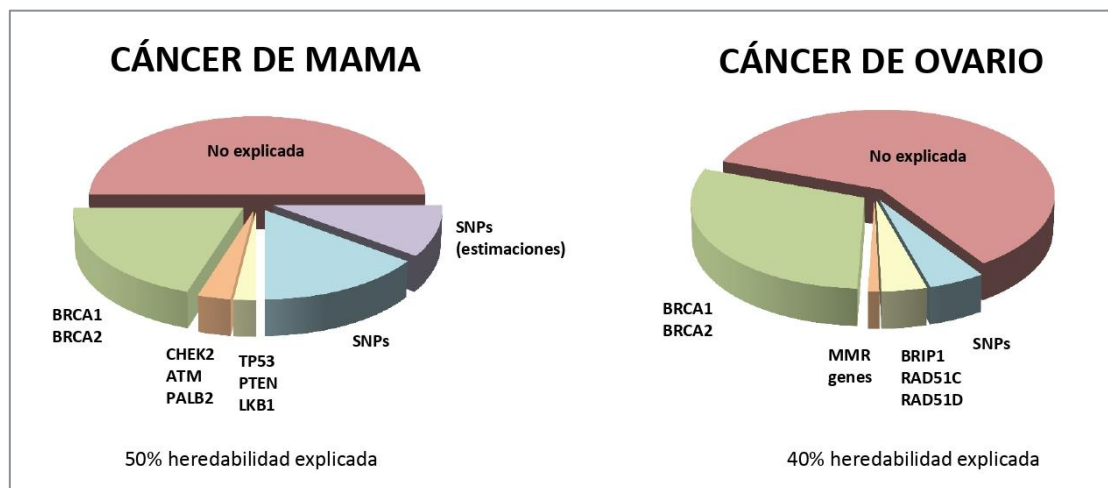


Figura 7. Heredabilidad estimada en cáncer de mama y ovario. En el cáncer de mama, resulta destacable la contribución colectiva de los SNPs conocidos (señalados en azul) y SNPs pendientes de identificación (señalados en morado), similar a la relevante contribución de *BRCA1* y *BRCA2* ($\approx 20\%$). En el cáncer de ovario la contribución de ambos genes es incluso mayor ($\approx 30\%$) sin embargo, la contribución colectiva de los SNPs es muy pequeña. Probablemente, esto último sea debido a que los estudios GWAS realizados en cáncer de ovario aún no han tenido suficiente potencia estadística. Figura adaptada de Bahcall O (46)

5. SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO

El Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (SCMOH) es el síndrome de predisposición hereditaria más prevalente en la población que se caracteriza por conferir susceptibilidad genética al desarrollo de estos tumores y suele acompañarse de una aparición temprana de la enfermedad, tendencia a la bilateralidad, ocurrencia de cáncer de mama en varones, agregación familiar y, en menor medida, asociación con otro tipo de tumores como el de próstata y páncreas, entre otros.

5.1. EVOLUCIÓN DEL ESTUDIO GENÉTICO DEL SCMOH

El SCMOH presenta un patrón de herencia autosómica dominante en genes de susceptibilidad al cáncer y su riesgo está principalmente vinculado a mutaciones germinales en los genes de alta penetrancia *BRCA1* y *BRCA2*. Ambos genes fueron identificados en los años 90 mediante estudios de ligamiento genético y clonación posicional en familias con múltiples casos de cáncer de mama y ovario (47,48). A pesar de los numerosos estudios realizados, no se ha conseguido identificar ningún otro gen de alta penetrancia implicado exclusivamente en este síndrome hereditario.

Sin embargo, la expansión de nuevas tecnologías como la secuenciación masiva ha ampliado el espectro mutacional del SCMOH con el descubrimiento de nuevos genes que presentan una implicación significativa en la predisposición hereditaria al cáncer de mama y ovario, lo que justifica su inclusión en el estudio molecular del SCMOH. (49)

La aplicación de secuenciación masiva de nueva generación (NGS, *next generation sequencing*) ha impulsado el diseño de paneles genéticos que permiten el análisis de múltiples genes relacionados con este síndrome hereditario. Este cambio de paradigma ha supuesto una revolución de gran utilidad en el diagnóstico molecular del SCMOH pero a su vez, la interpretación de los resultados obtenidos puede suponer un importante desafío para los genetistas debido al incremento significativo de nuevos genes analizados y del número de variantes genéticas de significado clínico desconocido detectadas de forma frecuente mediante este tipo de estudios genéticos.

5.2. CONSEJO GENÉTICO EN CÁNCER HEREDITARIO

El Consejo Genético se define como el proceso de asesoramiento que ayuda a comprender los aspectos genéticos de una enfermedad hereditaria. El proceso completo debe incluir un asesoramiento pre y post-análisis que permita a los profesionales ofrecer información detallada del estudio genético, además de adecuar las necesidades médicas, psicológicas y familiares de los pacientes con riesgo incrementado de desarrollar cáncer hereditario (50,51).

5.2.1. Asesoramiento genético pre-análisis

En la consulta de asesoramiento genético pre-análisis, se debe realizar un estudio de la historia personal y familiar de los pacientes mediante la elaboración de árboles genealógicos para identificar aquellas familias de alto riesgo de cáncer hereditario a las que se ofrece la posibilidad de realizar un estudio genético en base a los criterios establecidos por las diferentes sociedades científicas y a las predicciones aportadas por los modelos computacionales de riesgo. Los especialistas deben proporcionar información sobre la utilidad clínica del análisis genético y las limitaciones asociadas al mismo, además de explicar los posibles resultados esperados incluyendo los hallazgos incidentales y las implicaciones relevantes ligadas a la realización de pruebas genéticas. Es indispensable que el paciente firme un consentimiento informado autorizando la realización del estudio genético que asegure la comprensión de la información recibida.

5.2.2. Estudio genético del SCMOH

Fundamento biológico del estudio genético

En familias con criterios clínicos de alto riesgo de cáncer de mama y ovario hereditario, el diagnóstico molecular permite conocer la base genética de esta enfermedad hereditaria con el objetivo de ofrecer un asesoramiento genético adecuado, además de implementar medidas preventivas y reductoras de riesgo en sujetos portadores de variantes deletéreas. Del mismo modo, facilita la posibilidad de aplicar estrategias de tratamiento y terapia neoadyuvante a pacientes diagnosticados de cáncer.

Tipos de estudio genético según su finalidad

A. Estudio diagnóstico del caso índice:

Este tipo de estudios se realizan en pacientes denominados caso índice o probando y consiste en un análisis pormenorizado de aquellos genes que pueden estar implicados en la predisposición hereditaria al SCMOH. El probando idóneo debe ser siempre preferiblemente afecto y, a ser posible, el miembro de la familia que presente un fenotipo tumoral más compatible con predisposición hereditaria y menor edad de diagnóstico. A continuación se detallan los posibles resultados:

* Test informativo:

Estudio genético concluyente en el que se detecta una variante patogénica o probablemente patogénica que constituye un potencial riesgo familiar de la patología indicada con implicaciones hereditarias. Este resultado permite concretar el riesgo de desarrollar cáncer de acuerdo a las estimaciones existentes para así, establecer las medidas de prevención y terapéuticas necesarias en los sujetos portadores, además de ofrecer un adecuado asesoramiento genético en el contexto familiar.

* Test no informativo:

Estudio genético no concluyente en el que no existe ninguna variante que de forma evidente nos permita explicar el síndrome hereditario. Se distinguen dos posibilidades:

- * No se ha detectado ninguna variante patogénica o probablemente patogénica y, por lo tanto, no se puede confirmar ni descartar que la enfermedad.
- * Se ha encontrado una variante de significado clínico desconocido y no se puede asegurar que sea la responsable de la situación clínica del paciente.

Ante resultados no informativos, se debe comprobar si se ha empleado la tecnología de estudio adecuada o valorar si procede la ampliación del estudio a otros genes de predisposición hereditaria. También debe tenerse en cuenta que la prevalencia del cáncer de mama en la población general es alta y, por lo tanto, en el seno de algunas familias con cáncer hereditario existen mujeres con cáncer de mama esporádico (fenocopias), que en caso de ser seleccionadas para el análisis emitirán un resultado negativo. En estos casos será necesario verificar si puede haber otro probando más indicado en la familia para realizar el estudio.

B. Estudio predictivo de riesgo en familiares:

En familias en las que se ha detectado en el probando una variante patogénica o probablemente patogénica en línea germinal relacionada con el cáncer de mama y ovario hereditario, se plantea realizar el estudio genético dirigido a detectar dicha mutación específica en familiares. Presenta dos posibles resultados informativos:

- * **Verdadero positivo:** familiar portador de dicha variante genética.
- * **Verdadero negativo:** familiar no portador de dicha variante genética.

A los portadores de dicha variante se les atribuirá un riesgo de desarrollar cáncer de acuerdo con las estimaciones existentes, y a los no portadores se les atribuirá un riesgo similar a la población general.

5.2.3. Asesoramiento genético post-análisis

En la consulta de asesoramiento genético post-análisis se comunican los resultados del estudio genético explicando de forma clara las implicaciones personales y familiares asociadas al desarrollo de cáncer hereditario. En consecuencia, se debe proporcionar el apoyo psicológico necesario y valorar la ampliación del estudio y asesoramiento genético en familiares. Además se deben implementar planes de seguimiento en familias de alto riesgo, recomendaciones preventivas y reductoras de riesgo, pautas sobre manejo clínico y terapéutico de los pacientes y, si fuese necesario, se debe ofrecer asesoramiento en contexto reproductivo.

6. CARACTERIZACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS

El objetivo de los profesionales de laboratorio se centra en la correcta interpretación clínica-biológica de las variantes genéticas para que los clínicos puedan ofrecer un asesoramiento genético adecuado. A continuación, se describen los principales recursos disponibles para caracterizar las variantes detectadas en un estudio genético.

6.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE VARIANTES GENÉTICAS

Lo más probable tras realizar un análisis genético es que la inmensa mayoría de las variantes detectadas hayan sido previamente descritas. Para realizar dicha comprobación y consultar la información relativa a la interpretación clínica-biológica de las variantes genéticas descritas, existen diversas bases de datos genéticas como *LOVD (Leiden Open Variation Database)*, *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*, *HGMD (Human Gene Mutation Database)* o *Ensembl*.

6.2. CRITERIOS DE INTERPRETACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS

La clasificación de las variantes genéticas de nueva descripción es un proceso complejo que se fundamenta en el apoyo de diferentes líneas de evidencia científica que deben ser valoradas de forma adecuada por especialistas del laboratorio para obtener su correcta interpretación.

6.2.1. Evidencias basadas en la secuencia del ADN

La naturaleza de una variante y su localización en la secuencia génica aportan una información relevante en la interpretación de su significado clínico. Su caracterización molecular permite catalogar las variantes en función de su efecto sobre la estructura del gen o la funcionalidad de la proteína (**Figura 8**):

- * **Inserciones o deleciones:** adición o pérdida de uno o varios nucleótidos en la secuencia de ADN. Si el número de nucleótidos agregados o perdidos no es múltiplo de tres, se altera el marco de lectura dando lugar a la aparición de un codón de parada prematura (variante *frameshift*). También existen inserciones o deleciones de mayor amplitud denominadas grandes reordenamientos genómicos.

- * **Inversiones:** se trata de una modificación estructural en el que uno o varios nucleótidos cambian de sentido dentro de la secuencia.
- * **Duplicaciones:** se trata de un cambio estructural en el que un fragmento de nucleótidos se repite junto a la secuencia de ADN original.
- * **Cambios de un solo nucleótido (SNV, *single nucleotide variant*):** sustitución de un nucleótido de la secuencia original por otro distinto. Esto puede tener como consecuencia que el cambio no altere la secuencia de aminoácidos (variante sinónima o *synonymous*), que se produzca un cambio de aminoácido (variante con cambio de sentido o *missense*) o que se introduzca un codón de parada prematuro UAG, UGA o UAA (variante sin sentido o *nonsense*).
- * **Variantes espliceogénicas:** variantes localizadas en los puntos de corte y empalme de exones que pueden alterar el proceso de eliminación de intrones (*splicing*), causando la pérdida parcial o total de exones o la inserción de secuencias intrónicas en el transcrito generado.

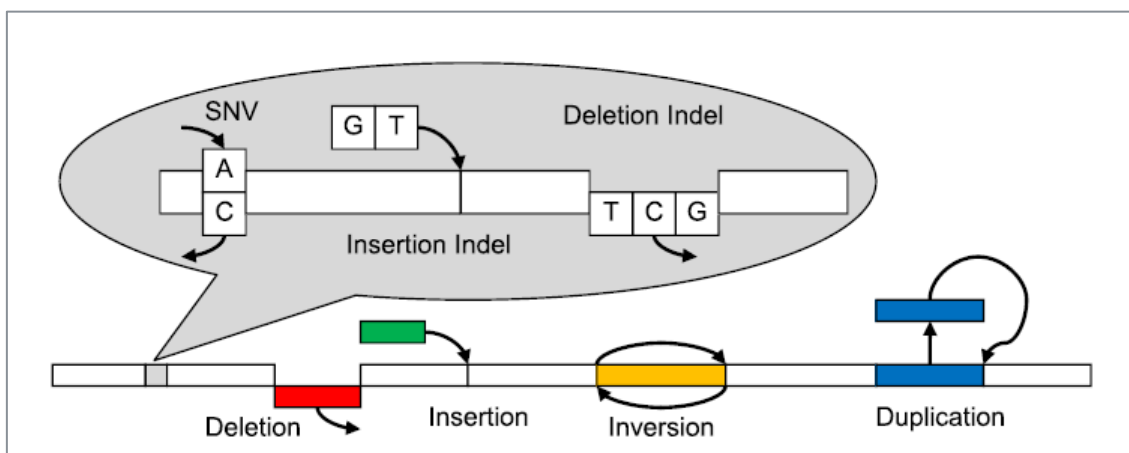


Figura 8. Resumen de posibles cambios moleculares en la secuencia del ADN: deleciones, inserciones, inversiones, duplicaciones, SNV, indels (52)

De esta forma, existen variantes de tipo *frameshift*, *nonsense* o localizadas en sitios canónicos de *splicing* que truncan el dominio funcional de la proteína y presentan una alta probabilidad de ser patogénicas mientras que el efecto de variantes de tipo *missense* o intrónicas resulta más difícil de predecir.

6.2.2. Evidencias asociadas a variables clínico-moleculares

* Frecuencia alélica

La frecuencia alélica de una población control representa un dato consistente en la interpretación de una variante genética. De esta forma, el término mutación se refiere a variantes muy poco comunes con una frecuencia alélica $<1\%$, mientras que polimorfismo hace referencia a variaciones con frecuencias poblacionales $>1\%$. Esta información puede consultarse en diversas bases de datos poblacionales que orientan sobre la patogenicidad de las variantes genéticas, como *dbSNP*, *1000 Genomes Project* o *ExAC*, entre otras. Es importante destacar que en estos repositorios existen variantes patogénicas que presentan frecuencias elevadas en poblaciones específicas. Esto es debido a un posible efecto fundador o que se trate de un punto caliente de mutación (*hot spots*).

* Características fenotípicas

La correlación genotipo-fenotipo puede resultar muy destacada en algunos síndromes hereditarios. La información clínica puede considerarse sustancial en la evaluación de la patogenicidad de una variante genética puesto que existen casos con una clara asociación entre dicha variante y el perfil fenotípico del tumor. De esta forma, existen síndromes que presentan una penetrancia casi completa con fenotipos muy característicos en portadores mientras que otros de menor penetrancia, como el SCMOH, se relacionan con características fenotípicas menos específicas.

* Estudios de cosegregación

Un estudio de cosegregación consiste en analizar la variante detectada en otros miembros de la familia (afectados y no afectados). Si la variante está presente en los familiares afectados y ausente en los no afectados, se podría relacionar la segregación de dicha variante con la enfermedad. Sin embargo, la aplicación de este estudio en la interpretación de variantes presenta dificultades debido principalmente a la penetrancia incompleta de algunos síndromes hereditarios, la posibilidad de fenocopias o a la imposibilidad de analizar un número significativo de familiares.

* Co-ocurrencia en cis/trans

En algunos síndromes de cáncer hereditario, la inactivación de las dos copias del gen responsable de la enfermedad causa letalidad embrionaria. Estudios experimentales relacionados con el SCMOH han demostrado que la afectación de ambos alelos de genes *BRCA1* y *BRCA2* es letal. Por este motivo se supuso que no existían individuos portadores de mutaciones bialélicas en estos genes. Sin embargo, se han descrito portadores bialélicos de variantes patogénicas asociados a enfermedades con un fenotipo más agresivo como son la anemia de Fanconi (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* y *RAD51D*) (53) o la ataxia telangiectasia (*ATM*) (38).

Por tanto, se puede asumir que en ausencia de fenotipos extremos, si la variante a estudio se encuentra en el alelo distinto (*trans*) a otra variante previamente clasificada como patogénica, existe una evidencia muy fuerte en contra de la patogenicidad de la variante sin clasificar. Por otro lado, si la variante a estudio se encuentra en el mismo alelo (*cis*) respecto a otra variante previamente clasificada como patogénica, no nos permitiría clasificar la variante a estudio como no patogénica, porque en este caso el individuo sería portador de una copia normal del gen (Figura 9).

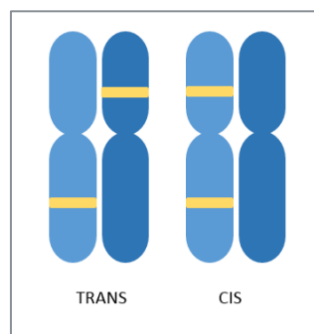


Figura 9. Configuración *trans/cis* de dos variantes genéticas (representadas en color amarillo)

6.2.3. Evidencias derivadas de estudios funcionales

* Predicciones *in silico*

Con el objetivo de predecir el posible potencial patogénico de las variantes no descritas en las bases de datos, existe una amplia variedad de herramientas *in silico* que, mediante modelos de predicción de patogenicidad, permiten traducir el impacto biológico de las variantes genéticas.

Los programas de predicción *in silico* se pueden englobar en dos grupos:

- * Predictores del efecto funcional o estructural en la proteína resultante (*PolyPhen2*, *SIFT*, *MutationTaster*, *Align-GVGD*, *Grantham*) o predictores del grado de conservación filogenética (*GERP*, *SiPhy*, *PhyloP*).
- * Predictores del efecto en el *splicing* (*MaxEntScan*, *NNSplice*, *Human Splicing Finder*, *GeneSplicer*).

Estas plataformas se integran en los principales *softwares* bioinformáticos *Alamut Visual*, *VarSome* o *REVEL* como soporte de apoyo para la priorización e interpretación de variantes genéticas. No obstante, el valor de los sistemas de predicción *in silico* debe ser considerado con precaución debido a la moderada sensibilidad y especificidad de estas herramientas computacionales, siendo recomendable utilizar una combinación de diferentes programas para observar su grado de coincidencia y aumentar significativamente la precisión de las predicciones.

* Estudios funcionales *in vitro*

Los estudios funcionales son una herramienta poderosa que permite evaluar de forma experimental el impacto de una variante genética a diferentes niveles moleculares:

* Estudios funcionales a nivel de la proteína

Permite evaluar la patogenicidad de las variantes genéticas observando su efecto a nivel de la proteína para conocer el impacto sobre su funcionalidad (pérdida de dominios esenciales para su correcto funcionamiento) o en la expresión génica.

* Estudios funcionales a nivel del RNA

Los estudios funcionales que determinan el impacto de las variantes a nivel del ARN mensajero mediante un análisis experimental *in vitro* con técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) permite determinar la naturaleza exacta de la alteración genética y evaluar su efecto en el proceso de *splicing*, además de interpretar correctamente el significado clínico de las variantes y distinguirlas de transcritos alternativos naturales.

Procesamiento del ARN mensajero

El dogma central de la biología molecular es un concepto que ilustra el flujo unidireccional de información genética desde el ADN a la proteína (54). Con el paso del tiempo, comenzó a destacar la relevancia del ARN como elemento indispensable en la expresión génica (55). Esta teoría permitió describir el gen como un fragmento de ADN constituido por exones (secuencia codificante) e intrones (secuencia no codificante), además de definir el concepto de “*splicing*” como proceso de formación del ARN maduro mediante la eliminación de los intrones (56). Posteriormente, surgió la consideración del *splicing* alternativo (57), el cual permite a partir de un pre-ARNm producir distintos ARN maduros (isoformas), aumentando así la diversidad proteica (58). El *splicing* alternativo no sólo supone un incremento en la complejidad del transcriptoma, también refleja una posible regulación de la expresión tejido específica que sugiere una estrecha relación fenotípica de las distintas isoformas generadas (59).

El *splicing* es un proceso bioquímico caracterizado por la escisión de intrones y el empalme de exones para conformar un RNA maduro. Para ello, un complejo ribonucleoprotéico denominado espliceosoma interacciona con el pre-ARNm, reconoce las secuencias intrónicas y cataliza la doble reacción de transesterificación para unir las secuencias exónicas flanqueantes de forma secuencial (Figura 10).

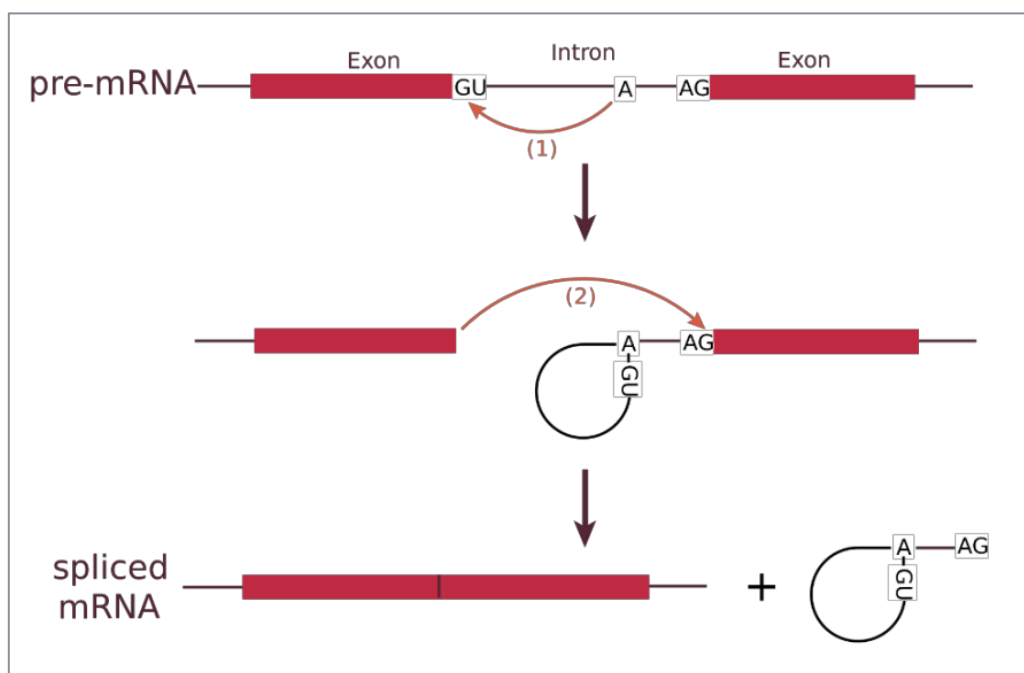


Figura 10. Proceso de maduración del ARN mensajero (60)

El pre-ARNm contiene secuencias básicas necesarias para el reconocimiento de los extremos del intrón por parte del espliceosoma, a través de pequeñas secuencias intrónicas: el sitio de *splicing* 5' o donador y el sitio de *splicing* 3' o aceptor, punto de ramificación y tramo rico en pirimidinas (Figura 11).

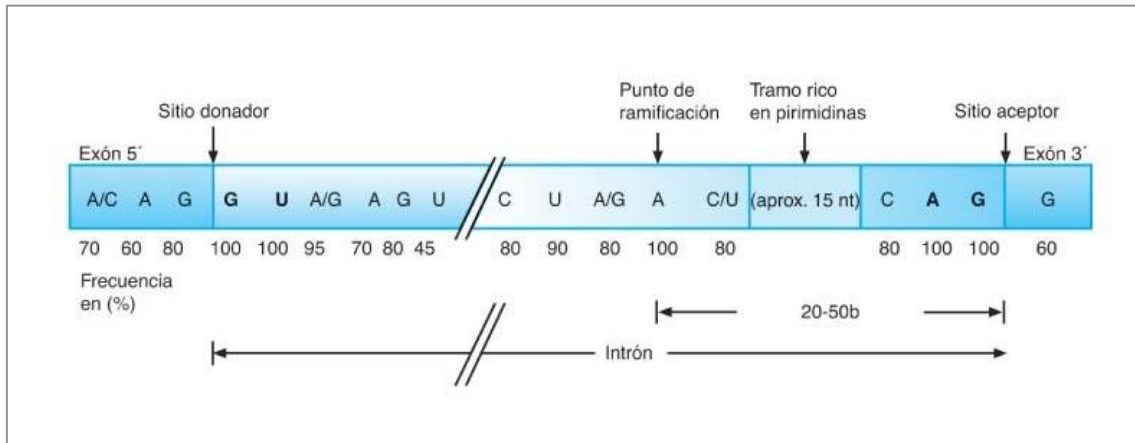


Figura 11. Secuencias básicas de *splicing*: sitio donador y aceptor situados en los límites exón-intrón, punto de ramificación y tramo rico en pirimidinas (61)

Además de estos sitios canónicos, existen otro tipo de secuencias reguladoras del *splicing* que interactúan con el espliceosoma, regulando positiva o negativamente su actividad (Figura 12) (62).

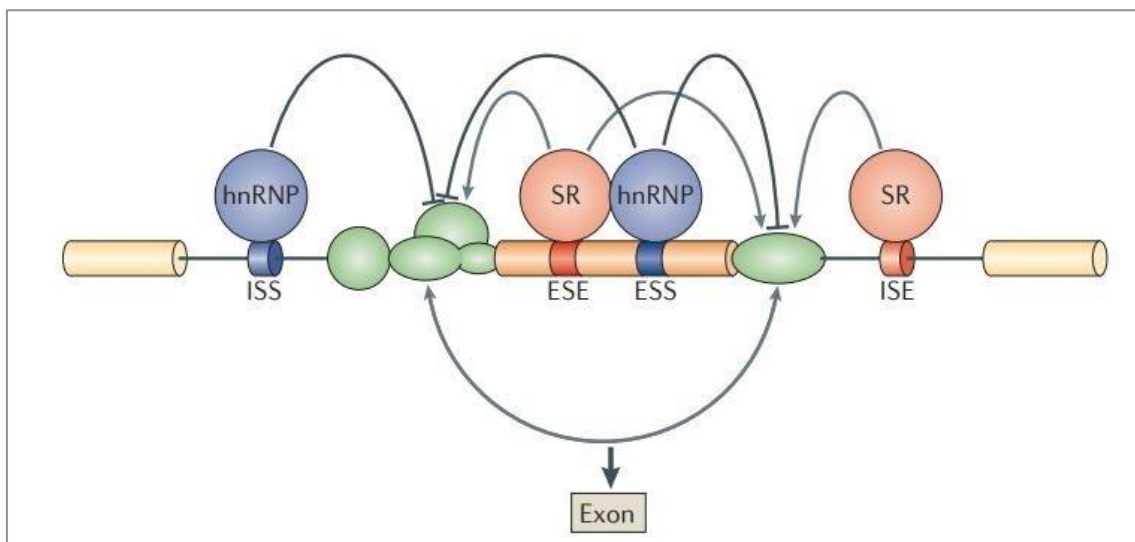


Figura 12. Elementos reguladores del *splicing*. Las secuencias potenciadoras (ESE e ISE, representadas en color rojo) estimulan el proceso mientras que las secuencias silenciadoras (ISS y ESS, ilustradas en color azul) lo inhiben. Figura adaptada de Kornblihtt AR y col. (63)

6.3. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE VARIANTES GENÉTICAS

La clasificación de las variantes genéticas se puede realizar desde el punto de vista molecular, en función de cómo afecta el cambio a la estructura del gen o de la proteína; o bien desde el punto de vista clínico, según la implicación que dicha variante tenga en el desarrollo de una determinada enfermedad.

En los laboratorios diagnóstico genético existe un problema notable de falta de estandarización en la interpretación clínica y clasificación de variantes reportadas en los estudios genéticos que puede repercutir en el posterior asesoramiento genético.

Con la finalidad de sistematizar este proceso, sociedades científicas como el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG), la Asociación de Patología Molecular (AMP) y el Colegio de Patólogos Americanos (CAP) han publicado una guía consenso de clasificación clínica en base a las recomendaciones propuestas por un panel de expertos de la IARC (66), que establecen unos criterios de clasificación con distintos grados de evidencia de patogenicidad (Tabla 2) y de benignidad (Tabla 3). La combinación de dichos criterios (Tabla 4) permite clasificar clínicamente las variantes en cinco categorías representadas en la Tabla 1 (67).

Clase de variante	Definición cualitativa	Probabilidad de patogenicidad	Pruebas genéticas	Recomendaciones clínicas
1	No Patogénica	<0,001	No realizar estudios predictivos en familiares	Asesoramiento en base a los antecedentes familiares y a otros factores de riesgo
2	Probablemente no patogénica	0,001-0,049	No realizar estudios predictivos en familiares	Asesoramiento en base a los antecedentes familiares y a otros factores de riesgo
3	Desconocida	0,05-0,949	No realizar estudios predictivo en familiares	Asesoramiento en base a los antecedentes familiares y a otros factores de riesgo
4	Probablemente patogénica	0,95-0,99	Test genético predictivo en familiares	Seguimiento y/o profilaxis a individuos de alto riesgo
5	Patogénica	> 0.99	Test genético predictivo en familiares	Seguimiento y/o profilaxis a individuos de alto riesgo

Tabla 1. Modelo de clasificación clínica de variantes genéticas y su traslación a la clínica. Adaptada de Lindor y colaboradores (68)

Evidencia	Categoría
Muy fuerte	<p>PVS1: variante nula (sin sentido, con alteración del marco de lectura, se alteran ± 1 sitios de <i>splicing</i>, codón de inicio, deleción de uno o varios exones) en un gen en el que la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad.</p> <p>Advertencias:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Atención a los genes en los que la pérdida de función no es un mecanismo conocido de enfermedad. - Precaución a la hora de interpretar las variantes con pérdida de función en el extremo 3' o al final del gen. - Atención en las variantes de <i>splicing</i> que predicen la pérdida de un exón pero que dejan intacta el resto de la proteína. - Precaución cuando haya presencia de múltiples transcritos.
Fuerte	<p>PS1: El mismo cambio de aminoácido ha sido establecido como variante patogénica independientemente del cambio de nucleótido.</p> <p>Advertencia: precaución con los cambios que afectan el <i>splicing</i> en lugar de un cambio a nivel proteico.</p> <p>PS2: Variante <i>de novo</i> en una paciente con la enfermedad pero sin historia familiar (se debe confirmar tanto la maternidad como la paternidad).</p> <p>PS3: Estudios funcionales <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> bien establecidos que apoyen el efecto dañino en el gen o su producto.</p> <p>PS4: La prevalencia de la variante en individuos afectados está incrementada significativamente al compararla con la prevalencia en los controles.</p>
Moderado	<p>PM1: Localizado en un punto caliente mutacional y/o un dominio funcional bien establecido.</p> <p>PM2: ausente en controles en el proyecto 1000 Genomas, <i>Exome Sequencing Project</i> o <i>Exome Aggregation Consortium</i>.</p> <p>Advertencia: los datos poblacionales para inserciones/deleciones pueden ser poco adecuados si se obtienen por secuenciación de nueva generación.</p> <p>PM3: para enfermedades recesivas, detectada en <i>trans</i> con una variante patogénica.</p> <p>PM4: la longitud de la proteína cambia como resultado de inserción/deleción en zonas no repetidas o por variantes con pérdida del codón de parada.</p> <p>PM5: Nueva variante de tipo <i>missense</i> en el mismo residuo donde un cambio <i>missense</i> distinto se ha definido como patogénico.</p> <p>PM6: La variante se asume como <i>de novo</i>, pero sin confirmación de la paternidad y maternidad.</p>
Secundario	<p>PP1: Cosegregación de la variante con la enfermedad en varios familiares afectados en un gen relacionado con la enfermedad.</p> <p>PP2: Variante <i>missense</i> en un gen con una baja tasa de variantes <i>missense</i> benignas y en el que las variantes tipo <i>missense</i> son un mecanismo común de enfermedad.</p> <p>PP3: Varias líneas de evidencia computacional apoyan un efecto deletéreo en un gen o su producto.</p> <p>Advertencia: dado que muchos algoritmos <i>in silico</i> usan la misma entrada o parecidas cada algoritmo no debe contabilizarse como un criterio independiente.</p> <p>PP4: El fenotipo del paciente o la historia familiar es altamente específica para una enfermedad con una única etiología genética.</p> <p>PP5: Fuentes reconocidas informaron de manera reciente dicha variante como patogénica, pero no hay evidencia disponible para que el laboratorio realice una evaluación independiente.</p>

Tabla 2. Criterios de patogenicidad para clasificar las variantes genéticas

Evidencia	Categoría
Independiente	BA1: La frecuencia alélica es >5% en el proyecto 1000 genomas, Exome Sequencing Project o en el Exome Aggregation Consortium.
Fuerte	<p>BS1: La frecuencia alélica es mayor que la esperada para dicha enfermedad.</p> <p>BS2: Se ha observado en adultos sanos para enfermedades recesivas (en homocigosis), dominantes (en heterocigosis) o ligadas al cromosoma X (en hemicigosis) para las que se espera una penetrancia completa temprana.</p> <p>BS3: Estudios funcionales <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> muestran que no se produce un efecto dañino en la función de la proteína o <i>splicing</i>.</p> <p>BS4: Ausencia de segregación en miembros afectados de una familia.</p> <p>Advertencia: la presencia de fenocopias en fenotipos comunes puede simular una ausencia de segregación entre individuos afectos. Además, puede haber familias con más de una variante patogénica que contribuyan a una enfermedad de herencia autosómica dominante, lo que también puede confundir sobre una aparente ausencia de segregación.</p>
Secundario	<p>BP1: Variante missense en un gen en el que las variantes truncadas son las que principalmente causan enfermedad.</p> <p>BP2: Se observa en trans con una variante patogénica en una enfermedad dominante de penetrancia completa o se observa en cis con una variante patogénica en una enfermedad con cualquier tipo de herencia.</p> <p>BP3: Inserciones/deleciones en regiones repetitivas sin función conocida.</p> <p>BP4: Múltiples líneas de evidencia computacional sugieren que no se altera el gen ni su producto (conservación, evolución, impacto en el <i>splicing</i>, etc.)</p> <p>BP5: Variante hallada en un individuo con base molecular alternativa para la enfermedad.</p> <p>BP6: Fuentes de confianza clasifican la variante como benigna, pero no hay evidencia disponible para realizar una evaluación independiente.</p> <p>BP7: Variante sinónima para la cual los algoritmos de predicción del <i>splicing</i> predicen que no se alteran los sitios consenso ni se crea un nuevo sitio de <i>splicing</i> y no se trata de un nucleótido altamente conservado.</p>

Tabla 3. Criterios de benignidad para clasificar las variantes genéticas

Patogénica	<ul style="list-style-type: none"> (i) Muy fuerte (PVS1) y <ul style="list-style-type: none"> a) ≥1 Fuerte (PS1-PS4) o b) 2 Moderados (PM1-PM6) o c) 1 Moderado (PM1-PM6) y un Secundario (PP1-PP5) o d) ≥2 Secundarios (PP1-PP5) (ii) ≥2 Fuertes (PS1-PS4) o (iii) 1 Fuerte (PS1-PS4) y <ul style="list-style-type: none"> a) ≥3 Moderados (PM1-PM6) o b) 2 Moderados (PM1-PM6) y ≥2 Secundarios o c) 1 Moderado (PM1-PM6) y ≥4 Secundarios
Probablemente patogénica	<ul style="list-style-type: none"> (i) Muy fuerte (PVS1) y 1 Moderado (PM1-PM6) o (ii) 1 Fuerte (PS1-PS4) y 1-2 Moderado (PM1-PM6) o (iii) 1 Fuerte (PS1-PS4) y ≥2 Secundarios (PP1-PP5) o (iv) ≥3 Moderados (PM1-PM6) o (v) 2 Moderados (PM1-PM6) y ≥2 Secundarios (PP1-PP5) (vi) 1 Moderado (PM1-PM6) y ≥4 Secundarios (PP1-PP5)
Benigna	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Independiente (BA1) o (ii) ≥2 Fuertes (BS1-BS4)
Probablemente benigna	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 Fuerte (BS1-BS4) y 1 Secundario (BP1-BP7) o (ii) ≥ Secundarios (BP1-BP7)
Significado clínico desconocido	<ul style="list-style-type: none"> (i) No se cumplen los criterios mencionados anteriormente (ii) Los criterios de benignidad y patogenicidad son contradictorios

Tabla 4. Reglas de combinación de criterios para clasificar variantes genéticas

7. VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO

Una variante de significado clínico incierto (VUS, *variant of uncertain significance*) se define como una alteración en la secuencia genética que no presenta una asociación definida con el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Las VUS detectadas en los estudios genéticos se consideran resultados no deseados en las pruebas genéticas. El hallazgo de estas variantes, tanto las que se detectan en genes con una conocida implicación en la enfermedad como aquellas que se encuentran en genes para los que su relación con la misma es solo potencial, resulta compatible con resultados no informativos y además, añade un alto grado de incertidumbre diagnóstica y complicaciones adicionales en el asesoramiento genético (69) .

El tránsito de los test genéticos *BRCA* a los paneles de genes ha aumentado de forma drástica el número de las VUS detectadas, lo que supone un importante problema asociado al diagnóstico molecular del SCMOH. Por esta razón, resulta necesario establecer criterios de priorización para identificar aquellas variantes que presenten mayor probabilidad de estar asociadas a un riesgo incrementado de cáncer hereditario (70). En consecuencia, se ha acuñado el concepto de VUS priorizada, que hace referencia a aquellas variantes susceptibles de patogenicidad en las que sería recomendable realizar un estudio más completo para determinar su efecto clínico y posible implicación en el SCMOH de forma prioritaria con respecto al resto de VUS (71).

7.1. PRIORIZACIÓN DE VUS

La priorización de VUS debe realizarse en base a la accionabilidad clínica de los genes y a la estimación derivada de la aplicación de algoritmos de predicción de patogenicidad.

* Genes clínicamente accionables

La accionabilidad clínica se define como la capacidad de contribuir de forma favorable en la atención médica del paciente y de los familiares de acuerdo a las guías clínicas actuales. Este concepto se restringe a los portadores de variantes patogénicas en genes de riesgo establecido, sobre los cuales existe la evidencia probada de establecer estrategias de prevención o medidas en el manejo clínico del paciente con el objetivo de prevenir o evitar el desarrollo de cáncer (71).

* Algoritmos de predicción de patogenicidad

El diseño de los algoritmos de predicción de patogenicidad se fundamenta en criterios basados en información obtenida de diversas fuentes y herramientas bioinformáticas que orientan sobre la patogenicidad de las variantes genéticas:

- * Bases de datos poblacionales (*dbSNP*, *1000 Genomes Project* o *ExAC*)
- * Bases de datos genéticos y clínicos (*ClinVar*)
- * Bases de datos bibliográficos (*PubMed*, *LitVar* o *Varsome*)
- * Predictores *in silico* (*PolyPhen2*, *SIFT*, *MutationTaster*, *Align-GVGD*, *Grantham*, *MaxEntScan*, *NNSplice*, *Human Splicing Finder*, *GeneSplicer*)

La priorización de variantes permite optimizar la realización de estudios complementarios (análisis de cosegregación familiar, estudios de casos-controles o ensayos funcionales) en aquellas VUS con mayor potencial patogénico con el fin de dilucidar su significado clínico permitiendo así, su correcta interpretación y clasificación.

7.2. ASESORAMIENTO GENÉTICO DE VUS

El hallazgo de VUS es un aspecto relevante en el proceso del asesoramiento genético que exige un adecuado manejo debido a sus implicaciones éticas y psicológicas.

Un panel internacional de expertos ha establecido una declaración Europea de consenso publicada recientemente en la que se recomienda informar las VUS halladas en *BRCA1/2* y en otros genes, principalmente en aquellos con riesgo relativo alto. No obstante, puntualiza que esta información no debe considerarse para la toma de decisiones clínicas ni para estudios predictivos en familiares (72).

De forma periódica, se debe realizar una revisión prospectiva de las VUS puesto que es posible que el avance en el conocimiento científico sobre la interpretación de variantes genéticas permita en un futuro su clasificación. En este contexto, se recomienda realizar un seguimiento de los portadores de VUS y, en caso de reclasificación, se debe remitir de nuevo a consulta para informar de la interpretación actualizada de dichas variantes y su posible implicación clínica.

8. ESPECTRO MUTACIONAL DEL SCMOH

En población general, la prevalencia de mutaciones germinales en los principales genes de predisposición genética se estima en 0,11-0,32% para *BRCA1* y 0,12-0,69% para *BRCA2*. Sin embargo, las variaciones en el tipo y la frecuencia de determinadas variantes genéticas resultan muy significativas en la población, pudiendo reflejar la existencia de mutaciones recurrentes y fundadoras en regiones geográficas concretas o grupos raciales/étnicos.

8.1. VARIANTES GENÉTICAS CON EFECTO FUNDADOR

En el ámbito de la predisposición a cáncer, se define como efecto fundador a la pérdida de variación genética que ocurre cuando se crea una nueva población a partir de un pequeño número de individuos que no son genéticamente representativos de la población de la que proceden (73). Este concepto explicaría la diferencia de frecuencia mutacional en un determinado gen de riesgo entre distintas poblaciones, siendo en algunos casos muy significativa, pudiendo revelar la presencia de mutaciones fundadoras en poblaciones específicas. Sin embargo, es posible encontrar una mutación fundadora en localizaciones geográficas distintas debido a un posible evento migratorio de parte de la población.

Las mutaciones fundadoras aparecen en individuos de una población concreta y tras generaciones sucesivas con un cierto grado de endogamia, aumentan su presencia en la población, incluso pasando a ser altamente recurrentes.

8.2. VARIANTES GENÉTICAS RECURRENTE

Las variantes genéticas recurrentes son aquellas observadas de forma repetida en diversas familias de una población determinada. Para que una variante recurrente pueda ser considerada como fundadora se debe asociar mediante análisis de microsatélites a un haplotipo común en los portadores de dicha mutación. Es importante destacar que existen variantes recurrentes que no representan mutaciones fundadoras como sucede con aquellas localizadas en los puntos calientes de mutación o “hot spots”, regiones del genoma asociadas a una mayor frecuencia mutacional.

La identificación de este tipo de variantes genéticas mediante estudios de prevalencia permite conocer el perfil mutacional asociado a una población concreta para así, diseñar el tipo de estudio genético más eficiente en cada grupo poblacional y ofrecer un asesoramiento genético especializado. De esta forma, en comunidades geográficas, cultural o religiosamente aisladas en las que el espectro mutacional se limita a determinadas mutaciones recurrentes y/o fundadoras, se considera conveniente desarrollar estrategias de primera línea enfocadas al estudio genético del cáncer hereditario. Este enfoque se traduce en el genotipado dirigido en poblaciones específicas, como sucede en población judía ashkenazi o islandesa en las que el profundo efecto fundador de ciertas mutaciones justifica prácticamente la totalidad de los casos de cáncer de mama y ovario hereditario. Por el contrario, en aquellas regiones geográficas o etnias caracterizadas por una elevada diversidad genética, es necesario implementar pruebas genéticas más amplias y completas que permitan identificar el mayor número de variantes genéticas implicadas en dicho síndrome hereditario.

8.3. ESPECTRO MUTACIONAL DEL SCMOH EN POBLACIÓN MUNDIAL

VARIANTES PATOGENICAS RECURRENTE

Rebbeck y colaboradores han facilitado una descripción global de la prevalencia y espectro mutacional de los principales genes de predisposición genética *BRCA1/2* en base a los datos obtenidos del Consorcio de Investigadores de Modificadores de *BRCA1/2* (CIMBA, *Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2*) (74). El artículo publicado recientemente, incluye información sobre perfiles mutacionales de todas las regiones del mundo. No obstante, destaca que la mayoría del tamaño muestral proviene de población caucásica procedente de Europa y América del Norte. Esta consideración evidencia que la representación de espectros mutacionales sobre todo en países subdesarrollados, pueda verse subestimada debido a la limitación de recursos destinados a la realización de pruebas genéticas. A continuación, se muestran las variantes genéticas *BRCA1* y *BRCA2* más frecuentes a nivel mundial agrupadas por origen geográfico (Tabla 5) y por grupo racial/etnia (Tabla 6).

	Ranking	América del Norte	África	Asia	América Central/Sur	Europa	Australia
BRCA1	1	c.68_69del(26%)	c.2641G > T(26%)	c.68_69del(47%)	c.3331_3334del (20%)	c.5266dup(17%)	c.68_69del(10%)
	2	c.5266dup(13%)	c.5266dup(10%)	c.5266dup(14%)	c.5266dup(16%)	c.181T > G(7%)	c.5266dup(8%)
	3	c.181T > G(3%)	c.1374del(6%)	c.390C > A(2%)	c.68_69del(9%)	c.68_69del(4%)	c.4065_4068del(4%)
	4	c.4327C > T(2%)	c.68_69del(6%)	c.5496_5506delinsA (2%)	c.5123C > A(8%)	c.4035del(2%)	c.3756_3759del(4%)
	5	c.4065_4068del(1%)	c.3228_3229del(6%)	c.5503C > T(1%)	c.211A > G(5%)	c.1687C > T(2%)	c.5503C > T(3%)
	6	c.3756_3759del(1%)	c.303T > G(6%)	c.2934T > G(1%)	c.181T > G(3%)	c.4065_4068del(2%)	c.4186-?_4357+?dup(3%)
	7	c.213-11T > G(1%)	c.4838_4839insC (3%)	c.3770_3771del(1%)	c.548-?_4183+8?del(3%)	c.3481_3491del(1%)	c.4327C > T(2%)
	8	c.1687C > T(1%)	c.3268C > T(3%)	c.2726dup(1%)	c.1687C > T(2%)	c.2475del(1%)	c.5278-?_5592+?del (2%)
	9	c.4186-?_4357+?dup(1%)	c.1504_1508del(3%)	c.470_471del(1%)	c.135-?_441+?del(2%)	c.3756_3759del(1%)	c.70_80del(2%)
	10	c.1175_1214del(1%)	c.191G > A(3%)	c.922_924delinsT(1%)	c.5030_5033del (2%)	c.3770_3704del(1%)	c.1961del(2%)
Familias		4,669	69	1,100	271	11,748	581
Variantes genéticas		654	30	187	75	1282	173
BRCA2	1	c.5946del(23%)	c.7934del(47%)	c.5946del(34%)	c.2808_2811del (11%)	c.6275_6276del(2%)	c.5946del(5%)
	2	c.2808_2811del(3%)	c.5946del(4%)	c.7480C > T(4%)	c.5946del(9%)	c.5946del(2%)	c.6275_6276del(2%)
	3	c.8537_8538del(2%)	c.1310_1313del(2%)	c.3109C > T(3%)	c.2T > G(2%)	c.2808_2811del(2%)	c.7977-1G > C(1%)
	4	c.1813dup(2%)	c.6944_6947del(1%)	c.3744_3747del(2%)	c.156_157insAlu (2%)	c.771_775del(1%)	c.5682C > G(1%)
	5	c.6275_6276del(2%)	c.8817_8820del(1%)	c.1399A > T(2%)	c.6037A > T(2%)	c.3847_3848del(1%)	c.3847_3848del(1%)
	6	c.3847_3848del(3%)	c.5213_5216del(1%)	c.5576_5579del(2%)	c.6405_6409del(3%)	c.1813dup(1%)	c.2808_2811del(1%)
	7	c.658_659del(2%)	c.6535_6536insA (1%)	c.2808_2811del(1%)	c.5645C > G(1%)	c.5682C > G(1%)	c.755_758del(1%)
	8	c.9382C > T(1%)	c.774_775del(1%)	c.262_263del(1%)	c.658_659del(1%)	c.1310_1313del(1%)	c.4478_4481del(1%)
	9	c.3264dup(1%)	c.6393del(1%)	c.8537_8538del(1%)	c.7180A > T(1%)	c.5645C > A(1%)	c.8297del(1%)
	10	c.55073dup(1%)	c.5042_5043del(1%)	c.7878G > A(1%)	c.5851_5854del (1%)	c.9026_9030del(1%)	c.250C > T(1%)
Familias		3,375	170	976	222	10,175	1,047
Variantes genéticas		660	27	187	58	1,315	179

Tabla 5. Variantes patogénicas BRCA1/2 recurrentes a nivel mundial agrupadas por región geográfica. Adaptada de Rebbeck y col. (74)

	Ranking	Caucásica	Afroamericana	Asiática	Hispana/Latina	Judía	Otras
BRCA1	1	c.5266dup(17%)	c.815_824dup(16%)	c.390C > A(4%)	c.68_69del(12%)	c.68_69del(72%)	c.5266dup(12%)
	2	c.181T > G (6%)	c.5324T > G (7%)	c.5496_5506delinsA (3%)	c.3331_3334del(10%)	c.5266dup(24%)	c.68_69del(17%)
	3	c.68_69del(6%)	c.5177_5180del(5%)	c.470_471del(3%)	c.5123C > A(9%)	c.3756_3759del (0.3%)	c.181T > G(5%)
	4	c.4035del(2%)	c.4357+1G > A(5%)	c.5503C > T(2%)	c.548-?_4185+?del(7%)	c.1757del(0.3%)	c.5333-36_5406+400del(3%)
	5	c.4065_4068del(2%)	c.190T > G(3%)	c.922_924delinsT(2%)	c.211A > G(5%)	c.2934T > G(0.2%)	c.3481_3491del(2%)
	6	c.3756_3759del(2%)	c.68_69del(3%)	c.68_69del(2%)	c.815_824del(3%)	c.5503C > T(0.1%)	c.1687C > T (2%)
	7	c.1687C > T(2%)	c.5467+1G > A(3%)	c.3770_3771del(2%)	c.2433del(3%)	c.4185+1G > T(0.1%)	c.4065_4068del(2%)
	8	c.4327C > T(2%)	c.182G > A(3%)	c.2635G > T(2%)	c.1960A > T(3%)	c.4689C > G(0.1%)	c.5277+1G > A (2%)
	9	c.2475del(2%)	c.5251C > T(2%)	c.2726dup(2%)	c.3029_3030del(3%)	c.3770_3771del (0.1%)	c.2685_2686del(68%)
	10	c.4186-?_4357+?dup(1%)	c.4484G > T(2%)	c.3627dup(2%)	c.4327C > T(2%)	c.4936del(0.1%)	c.4327C > T(1%)
Familias		11,258	174	550	408	1,852	4,583
Variantes genéticas		1,206	77	240	104	56	765
BRCA2	1	c.5946del(5%)	c.2808_2811del(6%)	c.7480C > T(8%)	c.3264dup(17%)	c.5946del(94%)	c.5946del(5%)
	2	c.6275_6276del(3%)	c.4552del(6%)	c.3109C > T(6%)	c.2808_2811del(9%)	c.3847_3848del (0.4%)	c.6275_6276del(4%)
	3	c.2808_2811del(3%)	c.9382C > T(5%)	c.3744_3747del(4%)	c.145G > T(5%)	c.1754del(0.4%)	c.2808_2811del(3%)
	4	c.771_775del(2%)	c.1310_1313del(4%)	c.1399A > T(3%)	c.9026_9030del(3%)	c.9382C > T(0.3%)	c.1813dup(3%)
	5	c.3847_3848del(2%)	c.5616_5620del(4%)	c.5576_5579del(3%)	c.658_659del(3%)	c.5621_5624del (0.2%)	c.5645C > A(2%)
	6	c.5682C > G(2%)	c.6405_6409del(3%)	c.2808_2811del(2%)	c.5542del(3%)	c.2808_2811del (0.2%)	c.1310_1313del(2%)
	7	c.1813dup(2%)	c.658_659del(3%)	c.7878G > A(2%)	c.3922G > T(3%)	c.4829_4830del (0.2%)	c.3847_3848del(2%)
	8	c.8537_8538del(1%)	c.2957_2958insG(2%)	c.262_263del(2%)	c.1813dup(2%)	c.5238del(0.2%)	c.5682C > G(1%)
	9	c.658_659del(1%)	c.7024C > T(2%)	c.7133C > G(1%)	c.9699_9702del(2%)	c.9207T > A(0.1%)	c.9672dup(1%)
	10	c.7934del(1%)	c.6531_6534del(2%)	c.5164_5165del(1%)	c.6275_6276del(2%)	c.3264dup(0.1%)	c.658_659del(1%)
Familias		7,156	125	538	207	990	2,551
Variantes genéticas		1,242	77	248	91	44	753

Tabla 6. Variantes patogénicas BRCA1/2 recurrentes a nivel mundial agrupadas por grupo racial/etnia. Adaptada de Rebbeck y col. (74)

A pesar de que existe cierta diversidad genética en función del área geográfica, los datos revelan que las variantes genéticas más comunes en todas las regiones del mundo fueron las conocidas como mutaciones fundadoras en judíos ashkenazi: c.68_69del (BIC: 185delAG), c.5266dup (BIC: 5382insC) en *BRCA1* y c.5946del (BIC: 6174delT) en *BRCA2*. Su prevalencia mundial es fruto de la coexistencia histórica de diversas poblaciones debido a los acontecimientos demográficos y movimientos migratorios surgidos con el paso del tiempo. No obstante, es importante considerar que pueda existir un sesgo importante que sobreestime en cierta manera los datos relacionados con estas variantes genéticas como consecuencia del uso de paneles genéticos dirigidos a la detección de mutaciones específicas en población ashkenazi.

Por otra parte, la distribución mundial de las variantes genéticas por raza/etnia refleja una variación sustancial en el tipo de mutación y la frecuencia dependiendo de la población de estudio. La mayoría de las variantes recurrentes reportadas se observan únicamente en un grupo racial/etnia (particularmente en afroamericanos, asiáticos e hispanos), lo que hace suponer la existencia de potenciales mutaciones fundadoras.

No obstante, se observan variantes recurrentes en *BRCA1* que comparten distintas poblaciones: c.3756_3759del en caucásicos y judíos; c.5503C>T y c.3770_3771del en asiáticos y judíos; c.815_824dup en afroamericanos e hispanos.

Respecto a *BRCA2*, c.2808_2811del fue encontrada en todas las razas/etnias mientras que c.3264dup fue observada en hispanos y judíos; c.3847_3848del en caucásicos y judíos; c.6275_6276del en caucásicos e hispanos; c.658_659del en caucásicos, afroamericanos e hispanos; c.9382C>T en afroamericanos y judíos.

MUTACIONES FUNDADORAS

La prevalencia asociada a variantes genéticas específicas resulta muy significativa en determinadas regiones geográficas o etnias, pudiendo reflejar la existencia de mutaciones fundadoras que comparten un ancestro común. Con el transcurso del tiempo, se ha demostrado la presencia de mutaciones fundadoras asociadas a los genes de alta penetrancia *BRCA1/2* en poblaciones concretas.

El ejemplo más conocido de efecto fundador es el descrito en población judía ashkenazi, en la que existen tres de las mutaciones fundadoras mejor caracterizadas que presentan una frecuencia más elevada respecto a la población general: c.68_69del (0,96-1,14%) y c.5266dup (0,13-0,28%) en *BRCA1* y c.5946del (0,6-1,52%) en *BRCA2* (75). Estas variantes genéticas representan el 98-99% de las mutaciones identificadas en población de origen judío ashkenazi. Estos datos reflejan la importancia de incluir la particularidad de pertenecer a una progenie portadora de mutaciones fundadoras entre los criterios de selección de pacientes candidatos a pruebas genéticas enfocadas al diagnóstico molecular de cáncer de mama y ovario hereditario (39).

También resulta interesante destacar la existencia de mutaciones específicas en diversas poblaciones europeas (Tablas 7 y 8), que constituyen un probado efecto fundador al demostrar la presencia de un ancestro común mediante un análisis de haplotipos. El carácter fundacional asociado a estas mutaciones nos ayuda a comprender la “genética de poblaciones”.

Población	HGVS	BIC	Referencias
Belga	c.212+3A>G	IVS5+3A>G	Claes K y col. (76)
Británica (Reino Unido)	c.2681_2682del	2800delAA	Liede A y col. (77)
Británica (Irlanda)	c.427G>T	546G>T	McDevitt TM y col. (78)
Europa Central	c.181T>G	300T>G	Janavičius R y col. (79)
Europa Central	c.4035del	4154delA	Ozolina S y col. (80)
Finlandesa	c.4096+3A>G	IVS11+3A>G	Sarantaus L y col. (81)
Francesa	c.3481_3491del	3600del11	Muller D y col. (82)
Francesa	c.5128G>T	5247G>T	Muller D y col. (82)
Griega	c.5212G>A	5331G>A	Anagnostopoulos T y col. (83)
Holandesa	c.2685_2686del	2804delAA	Peelen T y col. (84)
Inuit (Groenlandia)	c.115T>G	-	Hansen TV y col. (85)
Italiana (Toscana)	c.1380dup	1499insA	Marroni F y col. (86)
Italiana (Toscana)	c.3228_3229del	3347delAG	Papi L y col. (87)
Italiana (Toscana)	c.3285delA	3404delA	Papi L y col. (87)
Italiana (Toscana)	c.5062_5064del	V1688del	Malacrida S y col. (88)
Italiana (Sur)	c.4964_4982del	5083del19	Baudi F y col. (89) Russo A y col. (90)
Italiana (Sicilia)	c.4724del	4843delC	Russo A y col. (90)
Noruega	c.697_698del	816delGT	Möller P y col. (91)
Noruega	c.1016dup	1135insA	Möller P y col. (91)
Noruega	c.1156del	1675delA	Möller P y col. (91)
Noruega	c.3228_3229del	3347delAG	Möller P y col. (91)
Sueca	c.3048_3052dup	3171ins5	Einbeigi Z y col. (92)

Tabla 7. Variantes *BRCA1* con potencial efecto fundador en diversas poblaciones europeas

Población	HGVS	BIC	Referencias
Chipriota	c.8756del	8984delG	Loizidou M y col. (93) Hadjisavvas A y col. (94)
Eslovena	c.7806-2A>G	IVS16-2A>G	Krajc M y col. (95)
Europa del Norte	c.6275_6276del	6503delTT	Neuhausen y col. (96)
Finlandesa	c.7480C>T	7708C>T	Sarantaus L y col. (81)
Finlandesa	c.8327T>G	8555T>G	Sarantaus L y col. (81)
Finlandesa	c.9117+1G>A	IVS23+1G>A	Sarantaus L y col. (81)
Holandesa	c.5351dup	5579insA	Zeegers MP y col. (97)
Italiana (Cerdeña)	c.8537_8538del	8765delAG	Pisano M y col. (98) Palomba G y col. (99)
Italiana (Cerdeña)	c.3950_3952delTAGinsAT	-	Monne M y col. (100) Palomba G y col. (101)
Islandesa	c.771_775del	999del5	Thorlacius S y col. (102)

Tabla 8. Variantes *BRCA2* con potencial efecto fundador en diversas poblaciones europeas

REORDENAMIENTOS GENÓMICOS CON EFECTO FUNDADOR

Los grandes reordenamientos genómicos (LGRs, del inglés *Large Genomic Rearrangements*) representan una proporción sustancial del espectro de variantes patogénicas en *BRCA1*, siendo significativamente inferior en *BRCA2* (25). Esta disparidad parece estar relacionada con la mayor presencia de secuencias repetitivas Alu en *BRCA1*, involucradas en los reordenamientos a través de la recombinación homóloga y no homóloga de los cromosomas (Figura 14) (103).

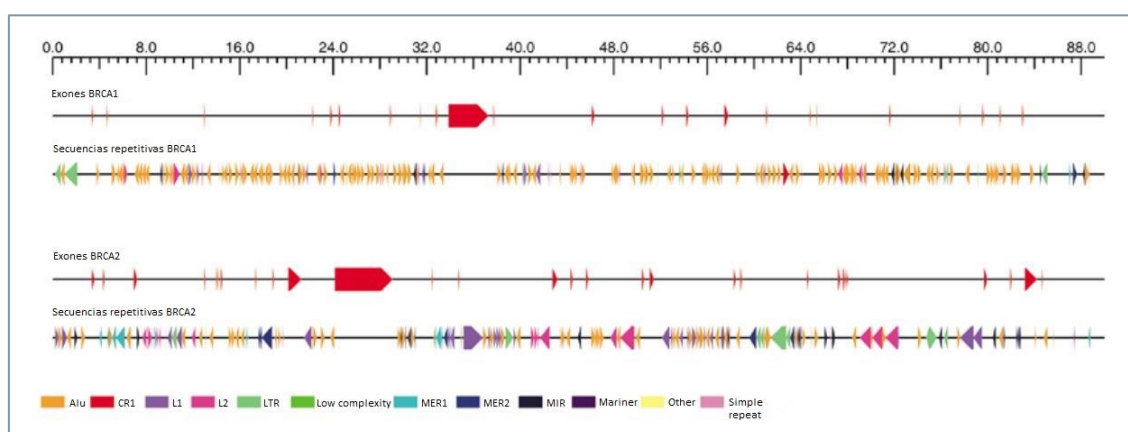


Figura 14. Estructura exónica y secuencias repetitivas de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. La distribución de las secuencias repetitivas en *BRCA2* incluye un 42% de secuencias *Alu* y un 5% de secuencias repetitivas no *Alu*. La distribución de las secuencias repetitivas en *BRCA2* comprende un 20% de secuencias *Alu* y un 27% de secuencias repetitivas no *Alu*. Figura adaptada de Welch PL y King MC (103)

A continuación, se describen los reordenamientos genómicos más significativos como consecuencia del profundo efecto fundador observado en diversas poblaciones:

- * La duplicación de 6 kb del exón 13 (L78833:g.44369_50449dup, *BRCA1*) reportada como una mutación fundadora de origen celta, ha sido ampliamente distribuida hacia diversas poblaciones relacionadas históricamente con Gran Bretaña (104).
- * La eliminación de 3,8 kb en el exón 13 (L78833:g.44513_48347del, *BRCA1*) o la deleción de 510 pb en el exón 22 (L78833:g.79505_80014del, *BRCA1*) explica la alta proporción de reordenamientos genómicos en población holandesa (105).
- * La deleción de los exones 3-16 (NC_000017.9:g.8655_55240del46586, *BRCA1*) se corresponde con el reordenamiento genómico más representativo en población danesa (106).
- * Las deleciones de 3.2 kb en el exón 20 (L78833:g.71618_74863, *BRCA1*), 4.4 kb en el exón 24 (L78833:g.82651_87079del, *BRCA1*) y ~11 kb en los exones 23-24 (NG_005095.2:g.169527_180579del11052, *BRCA1*) representan los grandes reordenamientos genómicos característicos de población griega (107,108).
- * La deleción de 3.1 kb en el exón 17 (L78833:g.58530_61209del2680, *BRCA1*) destaca como mutación fundadora alemana y, presumiblemente en población caucásica (109).
- * La deleción de los exones 1-17 (NC_000017.9:g.208928_289423del80496, *BRCA1*) y exones 5-14 (L78833:g.21716_53298del31583, *BRCA1*), ambas reportadas como alteraciones genéticas relevantes en la República Checa (110).
- * La deleción de los exones 9-12 (L78833:g.29624_44280del, *BRCA1*) como primera mutación fundadora en población hispana de ascendencia mexicana (111,112).

Como se puede observar, la contribución de los reordenamientos genómicos al espectro mutacional es significativamente superior en *BRCA1* y la mayoría residen en población europea. El efecto fundador probado en los grupos poblacionales definidos justifica la alta prevalencia de los reordenamientos genómicos en *BRCA1* descrita a nivel mundial. No obstante, cabe destacar la mutación fundadora c.156_157insAlu en *BRCA2* distinguida en población portuguesa, que representa el reordenamiento genómico más frecuente reportado en *BRCA2* (113).

8.4. ESPECTRO MUTACIONAL DEL SCMOH EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

VARIANTES PATOGENICAS RECURRENTE

El espectro mutacional de *BRCA1/2* muestra una variación considerable en las diferentes subpoblaciones españolas. No obstante, destaca un espectro de variantes patogénicas recurrentes en familias españolas con SCMOH (Tabla 9).

<i>BRCA1</i>		<i>BRCA2</i>	
HGVS	BIC	HGVS	BIC
c.211A>G	R71G	c.3264dup	3492insT
c.68_69del	185delAG	c.2808_2811del	3034del4
c.5123C>A	5242C>A	c.9026_9030del	9254del5
c.3770_3771del	3889delAG	c.6275_6276del	6503delTT
c.3331_3334del	3450del4	c.9018C>A	Y3006X

Tabla 9. Perfil mutacional de variantes genéticas recurrentes en población española (74)

En relación a *BRCA1*, c.211A>G representa la variante genética más prevalente en población española (especialmente en el noroeste de España) seguida de c.68_69del y c.5123C>A, ambas relacionadas con la presencia histórica de los judíos (sefardíes) en la península Ibérica por lo que se encuentran ampliamente distribuidas por todo el territorio nacional. A continuación, se posicionan c.3770_3771del y c.3331_3334del entre las variantes patogénicas reportadas de forma recurrente en población española. Respecto a la variante c.3331_3334del, el análisis de haplotipos realizado en portadores hispanos apunta que esta mutación ancestral fue originada en la península ibérica y posteriormente, propagada durante la colonización hacia Latinoamérica.

Con respecto a *BRCA2*, c.2808_2811del y c.6275_6276del se encuentran ampliamente distribuidas por diferentes subpoblaciones españolas. La diversidad de haplotipos relacionados con la variante c.2808_2811del, sugiere que posiblemente presente múltiples orígenes independientes. Sin embargo, el análisis de haplotipo realizado sobre la variante c.6275_6276del, reportada en diversas poblaciones del mundo, estima su origen en Europa del Norte (96). Por el contrario, las variantes genéticas c.3264dup, c.9026_9030del y c.9018C>A destacan de forma recurrente en la región mediterránea.

MUTACIONES FUNDADORAS

Con el transcurso del tiempo se ha probado la existencia de mutaciones ancestrales originarias en determinadas regiones geográficas de España:

- * c.211A>G (BIC: R71G, *BRCA1*) en el noroeste de España (114).
- * c.6629_6630del (BIC: 6857delAA, *BRCA2*) y c.9026_9030del (BIC: 9254del5, *BRCA2*) en el noreste de la península (115,116).
- * c.5153-1G>A (BIC:5272-1G>A, *BRCA1*), c.5146_5149del (BIC:5374delTATG, *BRCA2*) c.5116_5119del (BIC:5344delAATA, *BRCA2*) y c.9310_9311del (BIC: 9538delAA, *BRCA2*) en la región central de la península (Castilla y León) (117,118).
- * c.5720_5723del (BIC: 5946delCTCT, *BRCA2*) y c.9018C>A (BIC: Y3006X, *BRCA2*) en el sur de España (119).
- * Deleción de exones 3-5 (L78833: g.8097_22733del, *BRCA1*) representa el primer reordenamiento genómico con efecto fundador en población española procedente de la región mediterránea (120).
- * Deleción de exón 2 (NG_012772.1:g.5670_6155delinsATA, *BRCA2*) caracterizado como posible reordenamiento genómico con efecto fundador en nuestro país (121).

La haplotipificación ha constatado el carácter fundacional de dichas variantes genéticas al demostrar la presencia de un ancestro común de origen español. Por otro lado, se han identificado otras variantes genéticas recurrentes en determinadas regiones españolas, sugestivas de presentar un efecto fundador pero no se han caracterizado como mutaciones fundadoras probadas mediante análisis de haplotipos:

- * c.2901_2902dup en *BRCA1* (BIC:3020dupTC) y c.4030_4035delinsC en *BRCA2* (BIC: 4258_4263delAATGATinsC), ambas reportadas en dos áreas geográficas muy concretas del norte de España (Asturias) (122).
- * c.6024dupG en *BRCA2* (BIC: 6252insG) en el suroeste de Navarra (123).

Debido a los movimientos coloniales y migratorios acontecidos a lo largo de la historia, algunas de estas variantes genéticas recurrentes y mutaciones fundadoras de origen español se han extendido hacia otras regiones del mundo.

II. Hipótesis y objetivos

1. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La moderación de los criterios de inclusión propuestos por la SEOM para la realización de pruebas genéticas en aquellos pacientes con alto riesgo de cáncer de mama y ovario hereditario, junto con la mayor capacidad asistencial de las consultas médicas de Oncología, ha derivado en la Región de Murcia en un incremento considerable del número de estudios genéticos realizados en nuestro laboratorio. Como consecuencia de esto, se estima obtener un amplio espectro mutacional de variantes clínicamente relevantes asociadas a los principales genes de susceptibilidad genética *BRCA1/2* y a otros genes de accionabilidad clínica demostrada para el cáncer de mama y ovario. No obstante, es probable que las variantes genéticas recurrentes descritas en estudios previos por nuestro grupo de investigación sigan teniendo una importante representación en esta región, siendo de gran utilidad la caracterización fenotípica de los pacientes portadores de las mismas. Con respecto a las mutaciones con efecto fundador, también descritas en estudios previos, cabe esperar que sean de reciente aparición, haciéndose necesaria su confirmación mediante el análisis de haplotipos. Por último, debido a que la Región de Murcia es una zona de destino migratorio de población de origen norteafricano, esperamos encontrar variantes patogénicas en los genes de estudio que hayan sido descritas en la citada zona geográfica.

El desarrollo de este proyecto va a permitir una visión detallada del espectro mutacional mediante el estudio de prevalencia de las variantes patogénicas más recurrentes relacionadas con el SCMOH descritas en la Región de Murcia, además de evidenciar la existencia de mutaciones que presenten un efecto fundador en familias de nuestra población de estudio. El conocimiento de estas mutaciones específicas, permitirá establecer relaciones fenotípicas y realizar una comparativa con otros estudios científicos reportados en relación al cáncer de mama y ovario hereditario para obtener una visión global y conocer las particularidades asociadas a nuestra región de estudio.

Por otro lado, la aparición de nuevas tecnologías de secuenciación masiva y la reciente incorporación de paneles relacionados con el estudio genético del cáncer de mama y ovario hereditario han permitido aumentar el rendimiento diagnóstico de familias relacionadas con este síndrome hereditario. Sin embargo, su implementación en el

laboratorio clínico continúa siendo un importante desafío debido al incremento significativo de nuevos genes analizados y del número de variantes genéticas de significado clínico desconocido detectadas que se traducen en resultados no informativos al no poder concluir la relevancia clínica de estas variantes causando un importante problema en el asesoramiento genético. Esta situación plantea la necesidad de optimizar los recursos disponibles por parte de los laboratorios clínicos y de las consultas de asesoramiento genético, con respecto al estudio pormenorizado de este tipo de variantes sin clasificar y comunicación de resultados al paciente, respectivamente. Es por esto que la utilización de un algoritmo de priorización de variantes genéticas, puede suponer una mejora en la práctica asistencial permitiendo así, realizar estudios adicionales únicamente en aquellas variantes priorizadas con el fin de conocer su posible implicación en el cáncer de mama y ovario hereditario. Asimismo, es previsible que la estrategia definida en la presente tesis doctoral basada en el análisis *in vitro* de las variantes priorizadas susceptibles de *splicing* alternativo o aberrante en genes clínicamente accionables, consiga aportar información relevante para su clasificación, reduciendo de forma significativa la incertidumbre asociada a estas variantes, permitiendo así obtener estudios genéticos concluyentes.

En definitiva, los resultados y conclusiones obtenidas con el desarrollo de este trabajo pueden aportar información relevante sobre las variantes genéticas estudiadas para la práctica asistencial e investigadora relacionada con el SCMOH, permitiendo a los profesionales del laboratorio y a los oncólogos ofrecer un asesoramiento genético adecuado a familias portadoras.

2. OBJETIVOS

Objetivos principales

- * Descripción del espectro mutacional de variantes patogénicas recurrentes y mutaciones fundadoras relacionadas con el SCMOH en la Región de Murcia.
- * Diseño de un algoritmo de predicción de patogenicidad optimizado para la priorización de las variantes de significado clínico desconocido.

Objetivos específicos

- * Estudio de prevalencia y descripción de las variantes patogénicas recurrentes asociadas al SCMOH en familias de la Región de Murcia.
- * Comparativa de prevalencia mutacional y correlación genotipo-fenotipo con otros estudios realizados a nivel nacional e internacional.
- * Análisis de haplotipos para estudiar las variantes genéticas con posible efecto fundador en la Región de Murcia.
- * Aplicación de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) en el estudio funcional de las variantes priorizadas susceptibles de alterar el patrón de *splicing* constitutivo.

III. Metodología

1. ESTUDIO GENÉTICO DE SCMOH EN LA REGIÓN DE MURCIA

1.1. SELECCIÓN DE FAMILIAS DE ALTO RIESGO

Las familias que cumplían criterios de alto riesgo de SCMOH fueron seleccionadas en las consultas de Asesoramiento Genético de la Región de Murcia, pertenecientes a los Servicios de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y del Hospital General Universitario Morales Meseguer.

La **Tabla 10** muestra la evolución de los diferentes criterios aplicados por los oncólogos para la indicación del estudio genético en línea germinal del SCMOH, fundamentados principalmente en los antecedentes personales y familiares.

A. Criterios establecidos por la SEOM para estudio genético de *BRCA1* y *BRCA2* (15).

Criterios independientes de la historia familiar
Mujeres con cáncer de mama y cáncer de ovario sincrónico o metacrónico
Diagnóstico de CM a los 35 años o antes (40 años si se trata de una familia con menos de dos mujeres que sigan vivas a la edad de 45 años en cada rama de la familia)
CM bilateral (el primero diagnosticado a los 40 años o antes)
CM triple negativo diagnosticado a los 50 años o antes.
Diagnóstico de CO de alto grado epitelial no mucinoso (o de las trompas de Falopio o cáncer peritoneal primario).
2 o más familiares de primer grado con cualquiera de las siguientes combinaciones
Cáncer de mama bilateral y otro cáncer antes de los 50 años
Cáncer de mama en el varón
Cáncer de mama y cáncer de ovario
Dos casos de cáncer de mama diagnosticados antes de los 50 años
3 o más familiares directos de la misma rama familiar con cáncer de mama y / o cáncer de ovario

B. Criterios de inclusión consensuados por el Comité de Asesoramiento Genético de la Región de Murcia para el estudio genético del SCMOH mediante panel de genes.

Análisis genético para <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> no informativo más alguno de los siguientes criterios que tienen en cuenta la historia familiar de cáncer
Tres o más individuos de dos generaciones distintas que están afectados por cáncer de mama u ovario. Al menos dos individuos deben haber sido diagnosticados antes de los 50 años o uno antes de los 40.
Dos o más individuos han sido diagnosticados de cáncer de mama u ovario antes de los 35 años
Un caso de cáncer de mama en el varón y otro de mama u ovario antes de los 50 años.
Un caso de ovario antes de los 35 años y un caso de cáncer de mama antes de los 50 años en un familiar de primer grado.
Análisis genético para <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> no informativo más alguno de los siguientes criterios que tienen en cuenta la historia personal de cáncer
Diagnóstico de cáncer de mama y ovario en la misma paciente, siempre y cuando uno sea diagnosticado antes de los 50 años.
Un único individuo ha sido diagnosticado de cáncer de mama u ovario antes de los 25 años.

- C. Criterios actuales establecidos por la SEOM para la selección de pacientes de alto riesgo candidatos al estudio genético del SCMOH (39).

Criterios independientes de la historia familiar
Mujeres con cáncer de mama y cáncer de ovario sincrónico o metacrónico.
Cáncer de mama ≤ 40 años
Cáncer de mama bilateral (el primero diagnosticado ≤ 40 años)
Cáncer de mama triple negativo diagnosticado ≤ 60 años.
Diagnóstico de cáncer de ovario de alto grado epitelial no mucinoso (o de las trompas de Falopio o cáncer peritoneal primario).
Ascendencia con mutaciones fundadoras
Mutación somática BRCA detectada en cualquier tipo de tumor con una frecuencia alélica $> 30\%$ (si se conoce)
Pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 negativo elegibles para considerar la terapia con inhibidores de PARP
2 o más familiares de primer grado con cualquier combinación de las siguientes características de alto riesgo
Cáncer de mama bilateral y otro cáncer antes de los 60 años
Cáncer de mama < 50 años y cáncer de próstata o páncreas < 60 años
Cáncer de mama en el varón
Cáncer de mama y cáncer de ovario
Dos casos de cáncer de mama diagnosticados antes de los 50 años.
3 o más familiares directos con cáncer de mama (al menos una premenopáusica) y / o cáncer de ovario y / o cáncer de páncreas o cáncer de próstata de Gleason alto (≥ 7)

Tabla 10. Evolución de los criterios aplicados por los oncólogos para el estudio genético del SCMOH

Los criterios recomendados por la SEOM se han ido moderando con el paso del tiempo, por lo que se considera que todas las familias estudiadas cumplen los criterios vigentes implantados por esta sociedad científica sanitaria.

1.2. SELECCIÓN DE PACIENTES Y REGISTRO DE DATOS CLÍNICOS

Los pacientes incluidos en la presente tesis doctoral pertenecen al periodo comprendido entre abril del 2007 y abril del 2022. A continuación, se detallan los datos clínicos registrados de la historia oncológica de los pacientes seleccionados:

- * Tipo de cáncer
- * Edad de diagnóstico
- * Histología del cáncer
- * Inmunohistoquímica de los cánceres de mama: receptores estrogénicos, receptores Her-2/neu (HER) y clasificación molecular.

En los casos de cáncer de mama bilateral se registraron los datos clínico-patológicos del primer tumor y del cáncer contralateral.

Esta información fue recogida de la historia clínica informatizada de los pacientes del Hospital Clínico Virgen de la Arrixaca mediante el programa SELENE®, así como de la plataforma AGORA® para los pacientes del Hospital General Morales Meseguer. En las familias de mayor antigüedad fue necesario revisar datos clínicos en formato papel almacenados en el archivo del Laboratorio de Genómica. Lamentablemente, algunos datos no pudieron ser recopilados por ausencia de información en la fuente consultada.

1.3. ANÁLISIS GENÉTICO

Las pruebas genéticas incluidas en el ámbito asistencial y en proyectos de investigación en relación al estudio genético del SCMOH en la Región de Murcia se realizaron en el Laboratorio de Genómica del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, considerado centro de referencia en la citada región.

* Estudio diagnóstico de casos índice:

El estudio genético del SCMOH de los casos índice seleccionados se realizó según la metodología ilustrada en la **Figura 15** que muestra la evolución cronológica del diagnóstico molecular de este síndrome hereditario comprendida desde el análisis de los genes *BRCA1* y *BRCA2* hasta la secuenciación masiva de un panel que incluye los genes clínicamente accionables (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *STK11*, *PTEN*, *CDH1*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *NBN*, *NF1*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*) recomendados por la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN v.3.2019).

Tras la realización del análisis genético, las variantes genéticas detectadas se clasificaron siguiendo los criterios de consenso recomendados por ACMG con ayuda de bases de datos y fuentes bibliográficas disponibles. Aquellas variantes genéticas clasificadas como patogénicas o probablemente patogénicas se validaron mediante secuenciación Sanger (alteraciones genéticas puntuales) o MLPA (del inglés, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* enfocada al análisis de grandes reordenamientos).

* Estudio predictivo de riesgo en familiares:

En aquellas familias en las que se confirmó en el probando una variante deletérea en línea germinal vinculada al SCMOH, se recomendó extender el estudio genético dirigido a detectar dicha mutación específica en familiares.

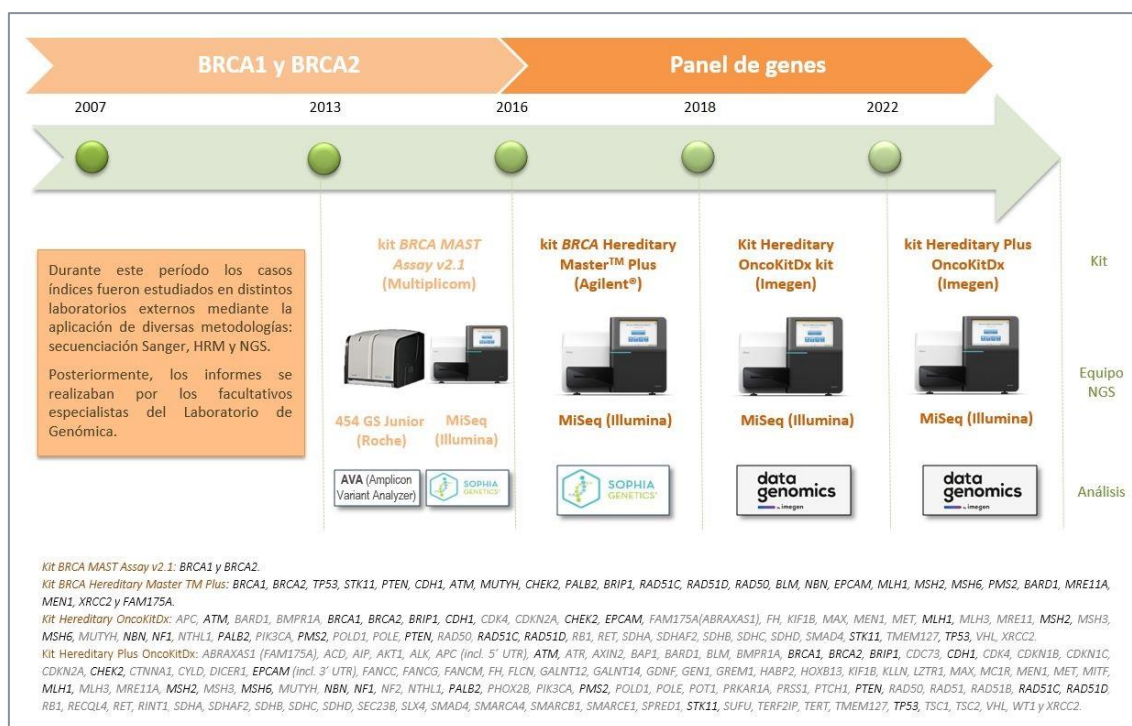


Figura 15. Evolución cronológica de la metodología empleada en el diagnóstico molecular del SCMOH. En negrita se destacan los genes seleccionados para el estudio bioinformático asistencial (Kit Hereditary OncoKitDx y Kit Hereditary Plus OncoKitDx) de acuerdo a las recomendaciones de la NCCN v3.2019

1.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El proyecto de investigación actual ha sido valorado y autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (Anexo A).

Por último, mencionar que todos los pacientes fueron debidamente informados de la naturaleza y propósito del estudio genético y firmaron su conformidad para la realización de pruebas genéticas con fines asistenciales y de investigación traslacional relacionados con el cáncer hereditario (Anexo B).

2. ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL

De forma paralela, a lo largo de toda la experiencia profesional desarrollada en el Laboratorio de Genómica se ha promovido la realización de otras actividades dirigidas al crecimiento del conocimiento científico relacionado con el SCMOH. En consecuencia, la presente tesis doctoral se ha focalizado en avanzar en el proceso de priorización de las VUS recopiladas en la práctica asistencial, concretamente en aquellas variantes susceptibles de *splicing* alternativo, y en conocer el espectro mutacional de variantes recurrentes y fundadoras relacionadas con el SCMOH en la Región de Murcia.

2.1. ANÁLISIS DE PREVALENCIA DE VARIANTES PATOGÉNICAS

El análisis de prevalencia diseñado para conocer el perfil mutacional del SCMOH en la Región de Murcia ha permitido identificar y estudiar aquellas variantes patogénicas detectadas de forma recurrente en el estudio genético del SCMOH en familias de la Región de Murcia.

A continuación, se detalla el protocolo establecido para la realización de dicho estudio:

1. Selección de variantes patogénicas que presentaron una elevada prevalencia en familias de la citada región, estableciendo como valor mínimo para la representación de nuestra población de estudio, un total de 10 familias por variante estudiada que correspondan a un porcentaje superior al 5% de la población portadora *BRCA1/BRCA2*.
2. Revisión de la información relativa a la interpretación molecular y clínica de las variantes genéticas seleccionadas mediante consulta en diferentes bases de datos como *ClinVar*, *dbSNP* y *Ensembl*, entre otras.
3. Correlación genotipo-fenotipo de las variantes seleccionadas en función de la edad del diagnóstico del tumor, procedencia geográfica, tipo de cáncer diagnosticado y sus características histopatológicas e inmunohistoquímicas.

4. Estudio comparativo de prevalencia mutacional y correlación genotipo-fenotipo de las variantes seleccionadas respecto a otros estudios nacionales e internacionales relacionados con el cáncer de mama y ovario hereditario.
5. Análisis de haplotipos con marcadores microsatélites para estudiar el posible efecto fundador de mutaciones recurrentes descritas en la Región de Murcia.

2.2. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES EN MUTACIONES FUNDADORAS

En la presente tesis doctoral, la técnica de microsatélites se ha empleado para realizar el estudio de tres posibles mutaciones fundadoras en familias aparentemente no relacionadas entre sí, que fueron portadoras de alguna de estas variantes genéticas.

De forma paralela, la técnica diseñada para cada una de las variantes fue realizada en 20 muestras control procedentes de una genoteca disponible en el laboratorio (pacientes seleccionados de diferentes áreas de la Región de Murcia sin aparente relación de parentesco que no cumplieran los criterios establecidos por la SEOM) con el fin de demostrar que el haplotipo común no se encontraba en población control, así como para estimar la antigüedad de dichas variantes.

2.2.1. Identificación de los marcadores microsatélites

Los microsatélites o repeticiones cortas en tándem (STR por sus acrónimos en inglés *Short Tandem Repeats*) se definen como pequeñas secuencias de ADN repetidas de forma consecutiva en el genoma. Estos marcadores genéticos se emplean en los estudios de haplotipo para demostrar la existencia de un efecto fundador en familias portadoras de una misma variante que comparten un ancestro común.

El navegador genómico *Ensembl* con ayuda de la base de datos *USCS* (<http://genome.ucsc.edu/>) permite conocer las posiciones de los microsatélites polimórficos y explorar en sus extremos las regiones flanqueantes altamente conservadas en busca de las secuencias de cebadores de amplificación.

2.2.2. Microsatélites seleccionados para la variante c.1918C>T (*BRCA1*)

Para realizar el análisis de haplotipo de la variante c.1918C>T se seleccionaron los microsatélites localizados en el cromosoma 17q21.31: M1 (D17S855), M2 (17-3858), M3 (D17S1326) y M4 (17-3930). Las secuencias de los cebadores empleados y el tamaño de los alelos de los marcadores polimórficos de *BRCA1* utilizados para construir los haplotipos se reflejan en la **Tabla 11** mientras que las posiciones de los marcadores en el cromosoma se representan en la **Figura 16**. La información referente a M2 y M4 fue obtenida de un trabajo publicado por Sagi y colaboradores (124).

MARCADORES MICROSATÉLITES EN <i>BRCA1</i>					
Marcador		Cebador <i>forward</i>	Cebador <i>reverse</i>	Ta (°C)	Tamaño (pb)
M1	D17S855	[6FAM] GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG	ACACAGACTTGTCTACTGCC	58	139-152
M2	17-3858	[6FAM] CATTGCTGTCCCTACCCACAC	AGAACAATGCAAATTGAAGCAATGA	58	127-134
M3	D17S1326	[6FAM] CAGCTGATATTCACAGGACT	AGAGCAAACTCCATCTCAAACA	58	89-108
M4	17-3930	[6FAM] ATCTTGCCTAATCCAGGGTCACAAG	CAAATGGTGCTGGAATAGTTGGA	57	286-298

Tabla 11. Secuencias de los cebadores empleados en el análisis de haplotipo de la variante c.1918C>T en *BRCA1* (Los cebadores *forward* se marcaron con el fluoróforo FAM para su empleo en el análisis de fragmentos). Ta: temperatura *annealing* o de anillamiento, pb: pares de bases

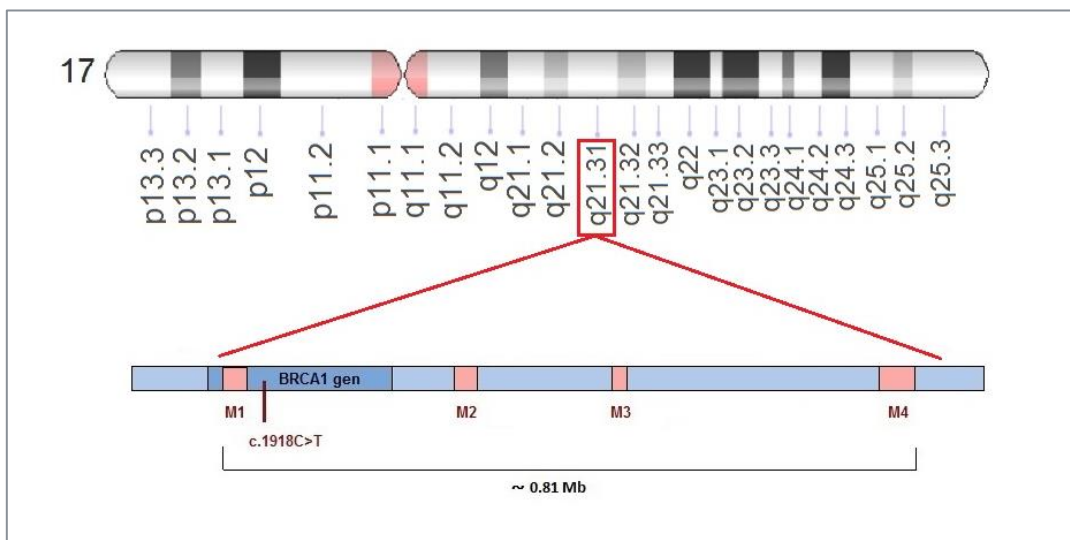


Figura 16. Localización de los marcadores microsatélites empleados con respecto al gen *BRCA1*

2.2.3. Microsatélites seleccionados para la deleción del exón2 (*BRCA2*)

Para realizar el análisis de haplotipo de la deleción del exón 2 se seleccionaron los microsatélites localizados en el cromosoma 13q13-14 (Figure 1): M1 (D13S260), M2 (D13S1493) y M3 (D13S153) obtenidos del trabajo publicado por Ruiz de Garibay y colaboradores (121). Las secuencias de los cebadores empleados y el tamaño de los alelos de los marcadores polimórficos de *BRCA2* utilizados para construir los haplotipos se reflejan en la **Tabla 12** mientras que las posiciones de los marcadores en el cromosoma se representan en la **Figura 17**.

MARCADORES MICROSATÉLITES EN <i>BRCA2</i>					
Marcador		Cebador <i>forward</i>	Cebador <i>reverse</i>	Ta (°C)	Tamaño (pb)
M1	D13S260	[6FAM] AGATATTGTCTCCGTTCCATGA	CCCAGATATAAGGACCTGGCTA	57	158 - 173
M2	D13S1493	[6FAM] ACCTGTTGTATGGCAGCAGT	GGTTGACTCTTTCCCAACT	57	223 - 248
M3	D13S153	[6FAM] AGCATTGTTTCATGTTGGTG	CAGCAGTGAAGGTCTAAGCC	58	212 - 236

Tabla 12. Secuencias de los cebadores empleados en el análisis de haplotipo de la deleción del exón 2 en *BRCA2* (Los cebadores *forward* se marcaron con el fluoróforo FAM para su empleo en el análisis de fragmentos) Ta: temperatura *annealing* o de anillamiento, pb: pares de bases

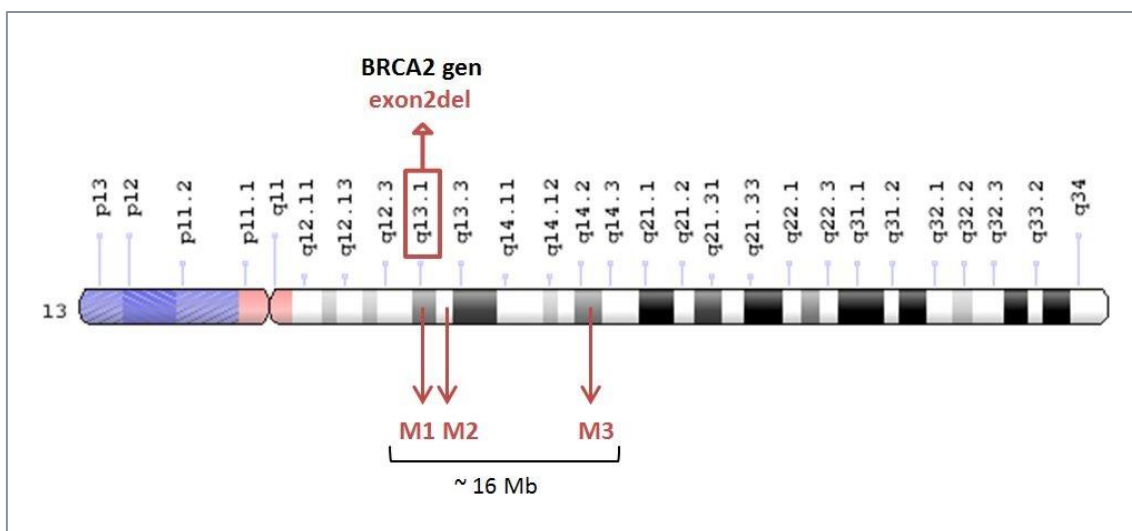


Figura 17. Localización de los marcadores microsatélites empleados con respecto al gen *BRCA2*

2.2.4. Microsatélites seleccionados para la variante c.8251_8254del (*ATM*)

Para realizar el análisis de haplotipo de la variante c.8251_8254del se seleccionaron los microsatélites localizados en el cromosoma 11q14-23: M1 (D11S4078), M2 (D11S1391), M3 (D11S1781), M4 (D11S1390), M5 (D11S4176) y M6 (D11S4197). Las secuencias de los cebadores empleados y el tamaño de los alelos de los marcadores polimórficos de *ATM* utilizados para construir los haplotipos se reflejan en la **Tabla 13** mientras que las posiciones de los marcadores en el cromosoma se representan en la **Figura 18**.

MARCADORES MICROSATÉLITES EN <i>ATM</i>					
Marcador		Cebador <i>forward</i>	Cebador <i>reverse</i>	Ta (°C)	Tamaño (pb)
M1	D11S4078	[6FAM] AGGCTAACCAGCCAACATT	CGGGCTATAAACTCAAGTCTC	61	135-159
M2	D11S1391	[6FAM] TGCATGCATACATACATACATA	CATCCATCCCTCTGTCTCTG	55	158-178
M3	D11S1781	[6FAM] AGCTGTTCTTGTCACAGGAGAG	ACAAATTGTCAGTGCCCC	55	243-251
M4	D11S1390	[6FAM] GGGTGGAAATCCTTCAGAATT	AAATATTACGGGCTTGAC	57	145-165
M5	D11S4176	[6FAM] AGACTCTCTCGCTCAGGG	GGGTAGCACTCCAGGTT	62	224-254
M6	D11S4197	[6FAM] TGAGGTCAATGTTGGTTTC	TAGTAGAATTCATAGGTTCTGTGG	57	227-271

Tabla 13. Secuencias de los cebadores empleados en el análisis de haplotipo de la variante c.8251_8254del en *ATM* (Los cebadores *forward* se marcaron con el fluoróforo FAM para su empleo en el análisis de fragmentos) Ta: temperatura *annealing* o de anillamiento, pb: pares de bases

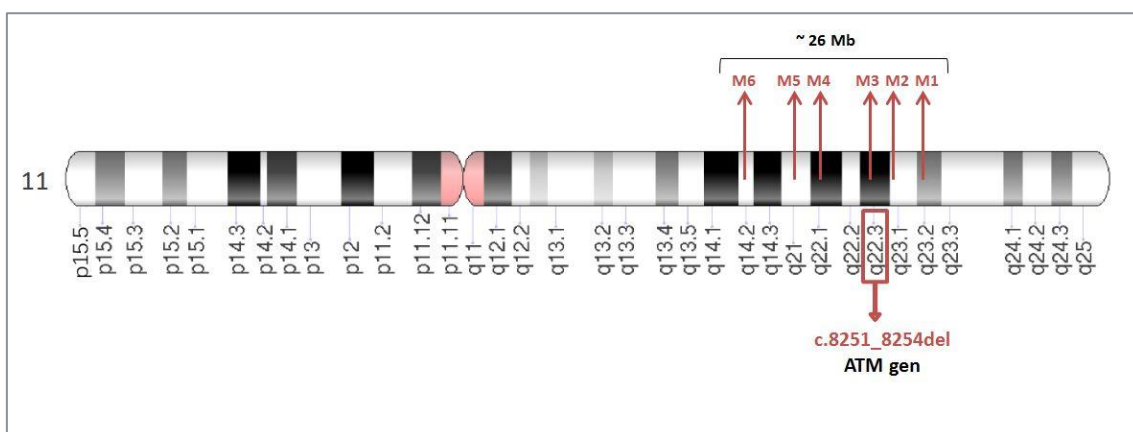


Figura 18. Localización de los marcadores microsatélites empleados con respecto al gen *ATM*

2.2.5. Procedimiento empleado para los análisis de haplotipo

Todos los marcadores se amplificaron mediante PCR utilizando un kit de PCR de microsatélites *Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen)*. La PCR de amplificación empleada en el análisis de microsatélites se realizó en el termociclador *Veriti HID 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems)* de acuerdo a las condiciones especificadas en la **Tabla 14** y al programa esquematizado en la **Figura 19**.

PCR microsatélites	Volumen (μL)
H ₂ O	2
Master mix	6,25
Cebador F +R (2 μM)	1,25
Q-solution	2,5
ADN (25 ng/μL)	0,5

Tabla 14. Mezcla de la reacción de amplificación (Volumen total 12,5 μL) F: forward, R: reverse

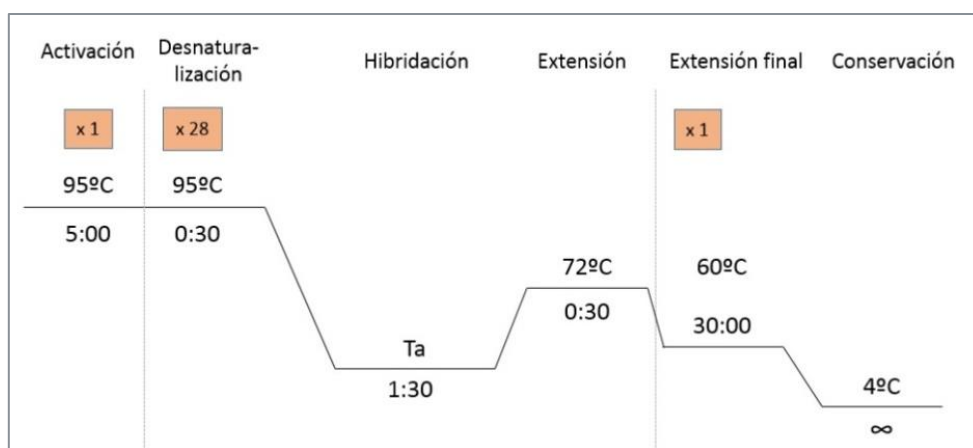


Figura 19. Programa empleado en la reacción de amplificación. Ta: temperatura de anillamiento.

Tras la amplificación, se llevó a cabo la electroforesis capilar en el analizador ABI3130 mediante análisis de fragmentos. Para ello se mezcló 1μl del producto de amplificación con 12 μl de formamida Hi-Di y 0.5 μl del marcador de tamaños LIZ-500 (*Gene Scan-500 LIZ Size Standard*) y se desnaturizó durante 5 minutos a 95°.

Los datos obtenidos tras la electroforesis capilar se analizaron en el *software Gene Mapper v 4.0* facilitado por *Applied Biosystems*. Cada microsatélite se representa mediante dos fragmentos amplificados, siendo uno de procedencia materna y otro paterna mientras que los picos naranjas pertenecen al estándar de tamaño LIZ-500

(Figura 20). En el caso de individuos homocigotos, se obtiene un único fragmento amplificado. De esta forma, al conocer el tamaño de los fragmentos amplificados de ambos alelos, se pueden determinar los haplotipos de cada individuo.

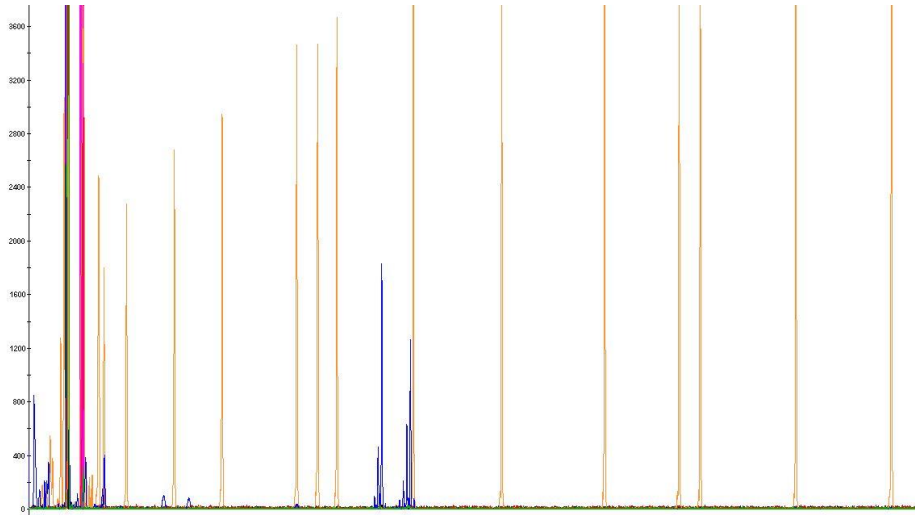


Figura 20. Patrón de picos obtenido en el análisis de microsatélites. Se observan dos picos azules que se corresponden con los tamaños de los dos fragmentos amplificados (alelo paterno y materno)

2.2.6. Cálculo de generaciones de las mutaciones fundadoras

Para realizar el cálculo de generaciones y estimar la antigüedad de las variantes estudiadas, se utilizó la ecuación desarrollada por Machado y colaboradores (125): $G = \log \delta / \log(1 - \theta)$. δ hace referencia a la medida del desequilibrio de ligamiento entre la variante y cada uno de los marcadores más cercanos y se calcula a partir de la prevalencia del alelo entre los afectados (P_d) y la prevalencia del alelo entre los alelos control (P_n) mediante la fórmula $\delta = (P_d - P_n) / (1 - P_n)$. Por otro lado, θ representa la fracción de recombinación entre el marcador y el gen, calculada a partir de las distancias entre los marcadores y el gen obtenidas a partir de la base de datos *Ensembl*.

2.3. VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO

2.3.1. Criterios de priorización de VUS

Las VUS detectadas en los estudios genéticos deben ser consideradas para derivación a estudios de investigación con el objetivo de definir su impacto funcional. La priorización de VUS pretende identificar aquellas variantes con potencial efecto deletéreo, en las que resulta recomendable realizar estudios adicionales para así, poder determinar su efecto clínico y posible implicación en el SCMOH de forma prioritaria con respecto al resto de las VUS. El proceso de priorización debe establecerse en función de la accionabilidad clínica de los genes, así como de la predicción estimada por las herramientas bioinformáticas utilizadas (Tabla 15) y la información consultada en las fuentes bibliográficas disponibles.

Bases de datos de variantes genéticas	<i>ClinVar</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
	<i>dbSNP</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
	<i>HGMD</i>	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
	<i>LOVD</i>	http://www.lovd.nl/3.0/home
	<i>LitVar</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar
Programas predictivos <i>in silico</i>		
Predicción de impacto de proteína	<i>PolyPhen-2</i>	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
	<i>SIFT</i>	https://sift.bii.a-star.edu.sg/
	<i>MutationTaster</i>	http://www.mutationtaster.org/
	<i>Align-GVGD</i>	http://agvgd.hci.utah.edu
Predicción del grado de conservación filogenética	<i>GERP</i>	Integrado en <i>VarSome</i>
	<i>SiPhy</i>	Integrado en <i>VarSome</i>
	<i>PhyloP</i>	Integrado en <i>VarSome</i>
Predicción sobre el <i>splicing</i>	<i>GeneSplicer</i>	https://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml
	<i>Human Splice Finder</i>	https://www.genomnis.com/access-hsf
	<i>NNSplice</i>	https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
	<i>MaxEntScan</i>	http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html
Frecuencia poblacional	<i>Proyecto 1000 genomas</i>	https://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers
	<i>gnomAD</i>	https://gnomad.broadinstitute.org/
Software de apoyo a decisiones	<i>Varsome</i>	https://varsome.com
	<i>InterVar</i>	http://wintervar.wglab.org/

Tabla 15. Resumen de los principales recursos disponibles *in silico* para la interpretación de variantes

En el Laboratorio de Genómica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca se ha diseñado un algoritmo de priorización de VUS (**Figura 21**) basado en un conjunto de criterios adoptados de un compendio de publicaciones actualizadas sobre predicción de patogenicidad de variantes genéticas (126–131), tomando como referencia un algoritmo previamente desarrollado por Bonache y colaboradores (71).

Este modelo de priorización de variantes genéticas ha permitido seleccionar aquellas VUS halladas en genes con accionabilidad clínica demostrada para el cáncer de mama y ovario (*BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, CDH1, STK11, PALB2, ATM, CHEK2, NBN, NF1, BRIP1, RAD51C, RAD51D, MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, EPCAM*) (29) que cumplan al menos uno de los siguientes criterios:

- * Variantes intrónicas situadas en el borde exón-intrón (± 10 pb) o exónicas con predicción de *splicing* aberrante en las plataformas *in silico* (*SpliceSiteFinder, MaxEntScan, NNSplice* y *GeneSplicer*) incluidas en *Varsome* y *Alamut* (132).
- * Variantes exónicas con una puntuación ≥ 0.7 en REVEL score (*Rare Exome Variant Ensemble Learner*). Este método permite predecir la patogenicidad de variantes de tipo *missense* en base a una combinación de herramientas bioinformáticas: *MutPred, FATHMM, VEST, PolyPhen, SIFT, PROVEAN, MutationAssesor, Mutation Taster, LRT, GERP, SiPhy, phyloP* y *phastCons*.

La puntuación seleccionada como umbral para discriminar la predicción entre benignidad y patogenicidad fue de 0.7, mostrando una sensibilidad de 0.5786 y una especificidad de 0.9556 (128).

- * Aquellas variantes con elevada probabilidad de ser deletéreas según las fuentes bibliográficas disponibles en *LitVar, PubMed* y *Varsome*.

La presente tesis doctoral se centra en el estudio de variantes priorizadas susceptibles de *splicing* alternativo en genes clínicamente accionables. La estrategia diseñada consiste en el análisis *in vitro* de las variantes priorizadas empleando muestras de ARN de portadores y controles mediante RT-PCR seguida de electroforesis capilar (RT-PCR/EC) y/o secuenciación Sanger (RT-PCR/Sanger) de los productos generados.

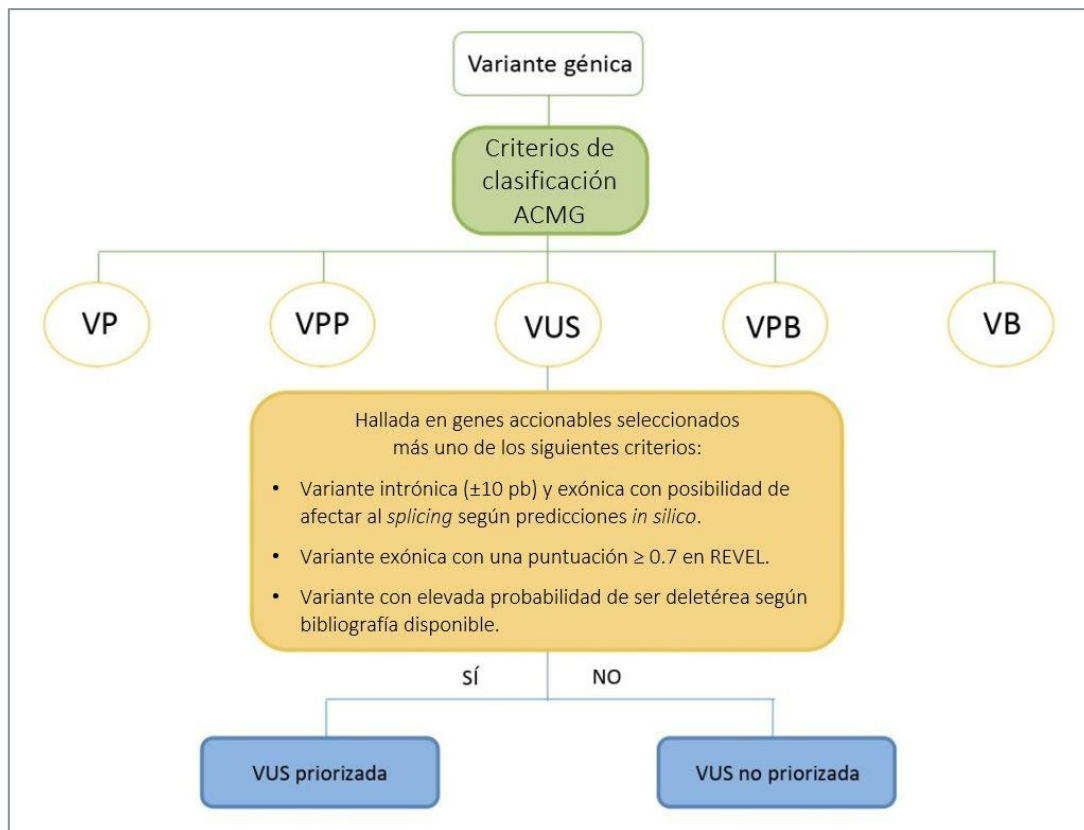


Figura 21. Algoritmo empleado para la priorización de variantes de significado incierto. VP: variante patogénica, VPP: variante probablemente patogénica, VUS: variante de significado clínico desconocido, VPB: variante probablemente benigna, VB: variante benigna, pb: pares de bases

2.3.2. RT-PCR en variantes priorizadas espliceogénicas

La RT-PCR es una técnica molecular empleada para obtener ADN complementario (ADNc) a partir de ARN, que puede ser fácilmente adaptada para identificar el efecto de variantes susceptibles de *splicing* alternativo en las secuencias transcritas.

Esta técnica requiere un primer paso de extracción automática y posterior purificación del RNA. A continuación, se realiza el proceso de retrotranscripción que consiste en la conversión enzimática del contenido genético a ADNc de cadena simple mediante una ADN polimerasa dependiente de ARN llamada transcriptasa inversa o reversa y, posterior amplificación de la región de interés con *primers* específicos. Por último, los productos amplificados en las RT-PCR se procesan mediante análisis de fragmentos por electroforesis capilar y/o secuenciación Sanger para demostrar y caracterizar los eventos de *splicing* con relevancia clínica en genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario hereditario (Figura 22).

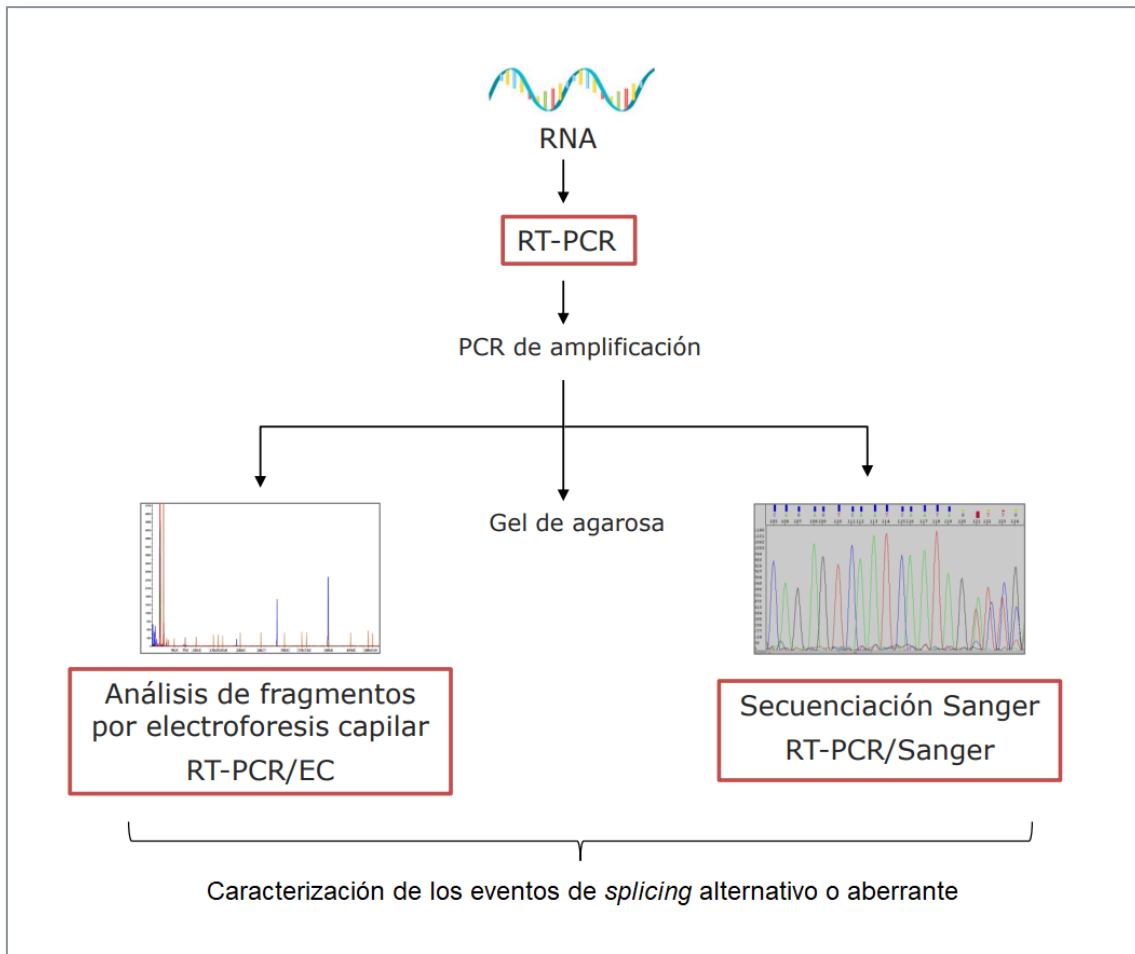


Figura 22. Protocolo establecido para el estudio de VUS susceptibles de *splicing* alternativo o aberrante

a) Selección de mensajeros: transcritos de referencia

Para caracterizar e interpretar las alteraciones de *splicing* constitutivo inducidas por determinadas variantes genéticas es indispensable definir previamente un mensajero de referencia para los genes implicados, que no necesariamente se corresponde con el transcrito de mayor relevancia biológica. Para ello, se requiere consultar la información disponible en las bases de datos científicas *ClinVar* o *Ensembl* (Tabla 16).

<i>Locus Reference Genomic</i>	RefSeq	<i>Ensembl</i>
<i>BRCA2</i> (LRG_293t1)	NM_000059.4	ENST00000380152.8
<i>ATM</i> (LRG_135t1)	NM_000051.4	ENST00000675843.1
<i>CHEK2</i> (LRG_302t1)	NM_007194.4	ENST00000404276.6

Tabla 16. Transcritos de referencia seleccionados para los genes estudiados

b) Diseño de *primers* específicos

Los *primers* específicos empleados en los estudios de *splicing* han sido diseñados con *Primer3Plus* y comprobados con *BLAST* (Tabla 17). Estas herramientas bioinformáticas permiten garantizar una amplificación correcta y específica en base a un conjunto de factores: temperatura de fusión, contenido de GC y autocomplementariedad.

Gen	Variante (HGVS)	Exón	Tm (°C)	Cebador	Tamaño del amplicón (pb)
BRCA2	c.8488-1_8489del insTCCATTACA	19F	63.8	[6FAM] CATCGCTTTTCAGTGATGGA	366
		22R	54.3	CTCTTAAGTCTCTTCACTG	
ATM	c.3402+3A>C	21F	63.3	[6FAM] ACTTTGCTTGAGGCTGATCC	401
		24R	63.1	TTCACAGATTTACACAGGGCA	
CHEK2	c.1008G>A	6F	64.5	[6FAM] GCAGACCCAGCTCTCAATGT	401
		11R	67.0	ACAAGAAGTTCAGGCGCAA	

Tabla 17. Secuencia de *primers* específicos (*forward* y *reverse*) diseñados para estudios *splicing*. Tm: temperatura de fusión o *melting*. Los cebadores *forward* han sido marcados con fluoróforo FAM con el fin de poder utilizarlos en el análisis de fragmentos por electroforesis capilar. En algunos casos, se han utilizado cebadores *forward* sin marcar para su empleo en reacciones de secuenciación Sanger

c) Extracción y purificación de ARN

El kit *PAXgene Blood RNA (Qiagen)* está diseñado para la extracción y purificación de ARN intracelular a partir de sangre periférica en el sistema *QIAcube*, de acuerdo al protocolo automatizado especificado por el fabricante.

El procedimiento requiere la extracción de 2,5 ml de sangre periférica preservada en tubos *PAXgene Blood RNA* que garanticen su conservación y estabilidad. La muestra extraída se debe incubar a temperatura ambiente durante al menos 2 horas para garantizar una lisis completa de las células sanguíneas. Por el contrario, si el tubo *PAXgene Blood RNA* se ha conservado en refrigeración o congelación tras la extracción de la muestra, se debe estabilizar primero a temperatura ambiente y a continuación, mantener a esa temperatura durante 2 horas antes de comenzar el procedimiento.

Posteriormente, el protocolo de purificación automatizada permite la obtención de ARN en condiciones de calidad y cantidad óptimas (Figura 23). La cuantificación de la concentración y de la pureza del ARN extraído se obtiene mediante espectrofotometría utilizando un equipo *NanoDrop 1000 system (Thermo Scientific)*.

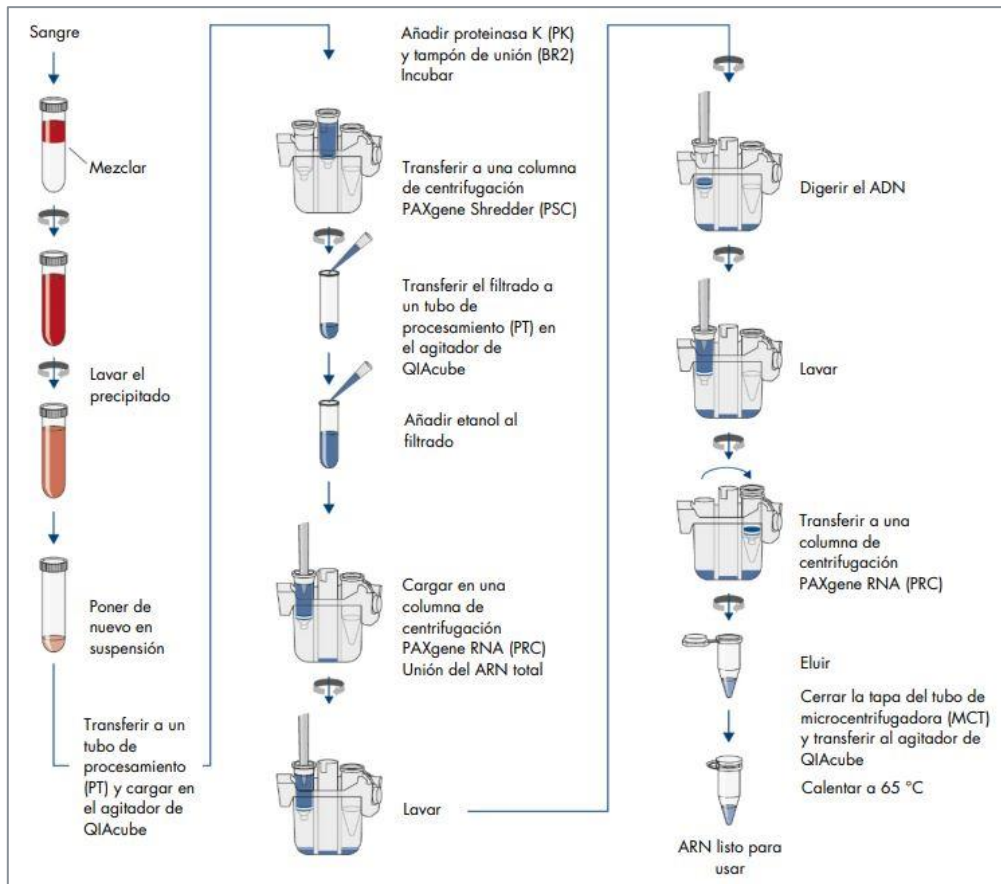


Figura 23. Protocolo de purificación automatizada con el sistema PAXgene Blood RNA (133)

d) Síntesis de ADN complementario: RT-PCR

El ADNc se obtiene por retrotranscripción utilizando el Kit *PrimeScript RT Reagent (Perfect Real Time)* de *TAKARA Biotechnologies* y posterior amplificación de la región de interés con *primers* específicos. La reacción de retrotranscripción (Tabla 18) se realizó en el termociclador *Veriti HID 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems)* siguiendo el programa establecido por el fabricante: extensión de 15' a 37°C, seguida de inactivación de la retrotranscriptasa a 85°C durante 5''.

Reactivos	Volumen (µL)
Buffer 5X PrimeScript	4
Random 6 mers (100µM)	2
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1
RNA	*
dH2O (libre de RNAsas)	*

Tabla 18. Mezcla de la reacción RT-PCR (Volumen final 20 µL) *El volumen dependerá de la concentración del RNA de partida (El kit permite una cantidad máxima de 1µg de RNA por reacción)

e) PCR de amplificación

A continuación, se amplificaron las regiones de interés del ADNc mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el termociclador *Veriti HID 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems)* de acuerdo a las condiciones especificadas en la **Tabla 19** y al programa detallado en la **Figura 24**.

Reactivos	Volumen (μL)
H ₂ O	10,875
Buffer (5x)	5
dNTPs (2mM)	2,5
Cl ₂ Mg (25 mM)	2
<i>Primer forward + reverse</i> (10 μM)	1+1
Taq (5 U/μl)	0,125
ADNc	2,5

Tabla 19. Mezcla de la reacción de amplificación (Volumen total 25 μL). Los *primers forward* deben ir marcados con fluoróforo FAM para su posterior utilización en el análisis de fragmentos

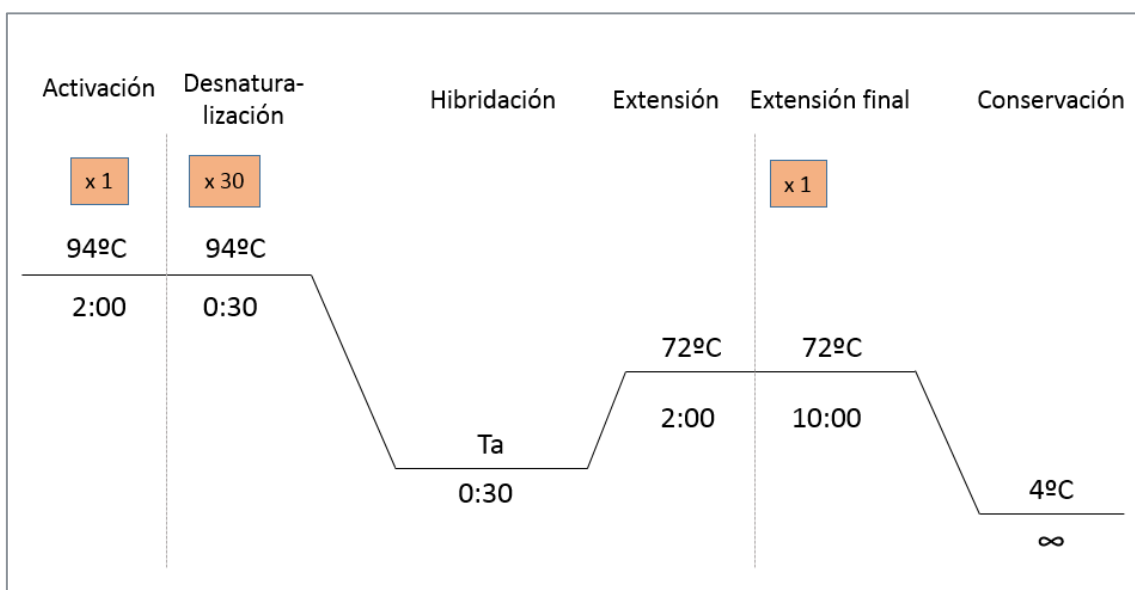


Figura 24. Programa empleado en la reacción de amplificación. Ta: temperatura de anillamiento. En todos los experimentos realizados, la técnica ha sido optimizada mediante modificaciones de la temperatura de anillamiento para obtener una amplificación preferencial de los transcritos específicos

f) Electroforesis en gel de agarosa

Para verificar la correcta amplificación de los fragmentos de interés, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2% con tampón TBE 1x (Tris 89mM-ácido bórico 89mM-EDTA 2mM a pH 8.4 de *Bio-Rad*) utilizando para el revelado GelRed (0.1 μ l GelRed/1 μ l gel) (*GelRed Nucleic Acid Gel Satín*, 10000X en agua de *Biotium*), una solución de tinción fluorescente de ácido nucleico. Se debe cargar aproximadamente 4 μ l de producto amplificado junto con 2 μ l de tampón de carga (0.25% (W/V) azul de bromofenol, 0.25 (W/V) cianol xileno, 30% (V/V) de glicerol en agua). Como marcador de peso molecular de referencia se empleó *BenchTop 100 bp DNA ladder* (*Promega*). Las condiciones estándar de electroforesis aplicadas para comprobar la correcta amplificación de las muestras fueron 90 voltios durante 60 minutos. En determinados casos, ha sido necesario modificar dichas condiciones de electroforesis (voltaje/tiempo de inyección) para la visualización de los transcritos de interés. Para el revelado se utilizó el sistema *T: Genius* de *Syngene* de captación de imágenes.

g) Análisis de fragmentos por electroforesis capilar

Tras la comprobación en agarosa, la electroforesis capilar ha permitido analizar con elevada resolución ($\pm 1,2$ nt) y alta sensibilidad los fragmentos generados en las RT-PCRs. Esta técnica se realizó en el secuenciador ABI3130 de cuatro capilares de 50 cm rellenos con polímero POP-7 (*Applied Biosystems*). Para ello, se cargaron 5 μ L del producto amplificado en las RT-PCRs y una mezcla formada por 30 μ l de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*) y 0,5 μ l de marcador LIZ 500 (*Gene Scan-500 LIZ Size Standard*) en una placa de 96 pocillos adaptada para el secuenciador (*MicroAmpTM. Optical 96-Well Reaction Plate*). Posteriormente, se incubó la placa en el termociclador *Veriti HID 96-Well ThermalCycler* (*Applied Biosystems*) a 86 $^{\circ}$ durante 3 minutos para someter las muestras a un proceso de desnaturalización e introducirlas en el secuenciador. Las condiciones electroforéticas empleadas fueron 60 minutos de carrera y 60 $^{\circ}$ C de temperatura. Los resultados obtenidos se analizaron con el *software Gene Mapper v 4.0* facilitado por *Applied Biosystems*, que representa los datos de forma visual en electroferogramas, donde las abscisas representan el tamaño de los fragmentos en nucleótidos y las ordenadas la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias.

h) Secuenciación Sanger

Existen determinados casos en los que se ha requerido la demostración de los eventos de *splicing* mediante secuenciación Sanger. A continuación, se detalla el protocolo:

1. Reacción de amplificación en el termociclador *Veriti HID 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems)* a partir de la muestra obtenida de ADNc de acuerdo a las condiciones establecidas en el *apartado 3.2.5*. Es conveniente destacar que en este caso, se deben utilizar los *primers* sin marcar con fluoróforo (**Tabla 17**) para no interferir en el proceso de secuenciación.
2. Purificación de los amplicones mediante un método enzimático, con el kit *Exosap-It*. Este kit incluye dos enzimas, la exonucleasa I, que elimina las cadenas simples de ADN residuales que se puedan formar en la PCR o restos de cebadores y una fosfatasa alcalina que elimina los restos de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP). Para ello, se mezclan 5 μ L del producto amplificado con 2 μ L de *Exosap-It*, se incuba 15' a 37°C y seguidamente 15' a 80°C en el termociclador *Veriti HID 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems)* para inactivar la enzima.
3. Reacción de secuenciación en el termociclador *Veriti HID 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems)* empleando la química del agente *BigDye Terminator* de acuerdo a las condiciones especificadas en la **Tabla 20** y al programa detallado en la **Figura 25**.
4. Purificación mediante un sistema de filtración en columnas de gel *Performa® DTR (EdgeBio)* que permite una excelente recuperación del producto de secuenciación eliminando los restos de dNTPs sobrantes y posibles impurezas.

Reactivos	Volumen (μ L)
H ₂ O	0,75
Buffer (10x)	1,75
Big Dye	0,5
<i>Primer F + R</i> (3.2 μ M)	0,5
Amplicón purificado	1,5

Tabla 20. Mezcla de la reacción de secuenciación (Volumen total 5 μ L) F: *forward*, R: *reverse*

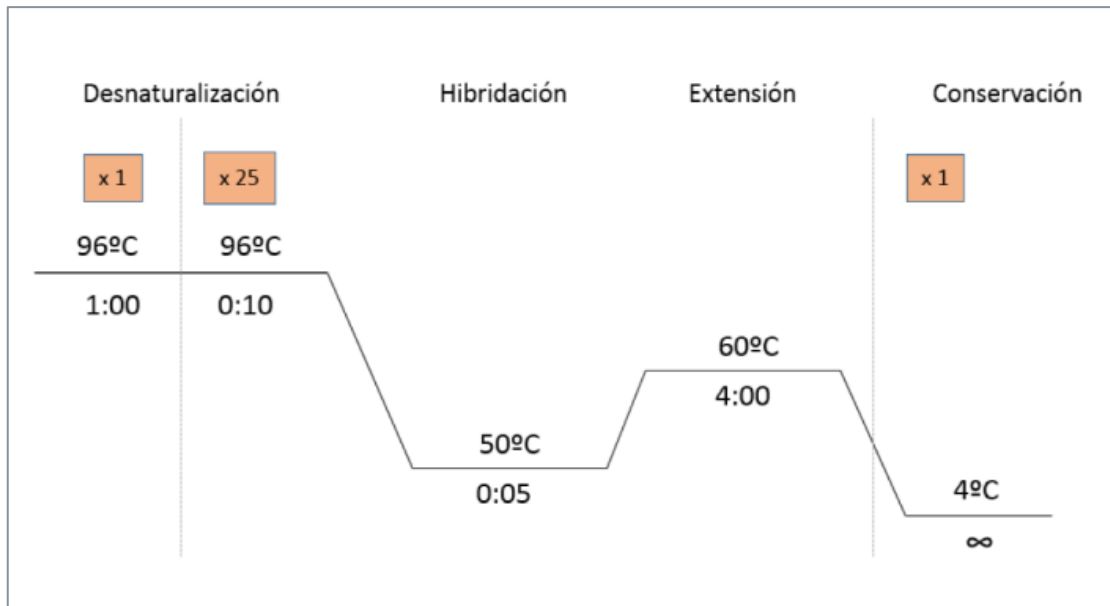


Figura 25. Programa empleado en la reacción de secuenciación

5. Desnaturalización de la doble hebra de ADN mediante la adicción de 10 μ L de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*) al producto eluido y traspaso de las muestras purificadas a una placa de 96 pocillos adaptada para el secuenciador (*MicroAmp™. Optical 96-Well Reaction Plate. Applied Biosystems*).
6. Análisis de las muestras en el secuenciador ABI3130 de cuatro capilares de 50 cm rellenos con polímero POP-7 (*Applied Biosystems*). Las condiciones electroforéticas empleadas fueron 45 minutos de carrera y 60°C de temperatura.
7. Visualización de los patrones electroforéticos con el *software Sequencing Analysis* facilitado por *Applied Biosystems*.

i) Interpretación de los eventos de *splicing* alternativo

Para la caracterización de variantes genéticas susceptibles de *splicing* alternativo se interpretaron los resultados obtenidos de RT-PCR analizados mediante electroforesis capilar y/o secuenciación Sanger y se realizaron las correspondientes anotaciones biológicas y funcionales de los eventos de *splicing* observados.

Anotaciones basadas en datos de electroforesis capilar:

Para interpretar los resultados obtenidos por RT-PCR/EC, se debe comparar la diferencia de tamaño entre el pico correspondiente al mensajero de referencia y los distintos picos adicionales. Posteriormente, se analiza si esa diferencia de tamaño es compatible con alguna de las siguientes posibilidades:

1. Representación de isoformas naturales de expresión muy minoritaria.
2. Eventos de *splicing* alternativo. La presencia de potenciales donadores GT y aceptores AG en la secuencia genómica de referencia, podría conducir a la activación de otro punto alternativo de *splicing* (sitio críptico). Esta hipótesis nos permite predecir la identidad de posibles mensajeros adicionales.
3. Transcritos aberrantes inducidos por la presencia de alguna variante genética.
4. Picos detectados que no tienen una interpretación obvia en términos de *splicing* y no se encuentra explicación plausible para explicar el tamaño de los mismos.
5. Representación de artefactos metodológicos.

Anotaciones basadas en datos de secuenciación Sanger:

En determinados casos en los que resulta necesaria la comprobación de los eventos de *splicing* mediante secuenciación Sanger, existe la posibilidad de poder secuenciar la variante de interés para evaluar el impacto de la misma en el proceso de *splicing* en pacientes portadores. El análisis de los productos de RT-PCR mediante tecnología Sanger permite comparar la secuencia obtenida con la secuencia de referencia para estudiar aquellas variantes que producen alteración del patrón de *splicing*.

Esta metodología permite determinar la naturaleza exacta de alteraciones genéticas que interfieren en la definición del exón, afectando a los sitios 5' y 3' de *splicing* o a las secuencias silenciadoras (ESS o ESI) o potenciadoras (ESE o ISE), lo que resulta en eventos de *splicing* alternativo o aberrante a través de la exclusión de un exón (*exon skipping*), retención de secuencias intrónicas o activación de sitios crípticos.

Del mismo modo, en los casos en los que resulte necesaria la demostración de la expresión bialélica, se debe analizar mediante secuenciación Sanger un SNP informativo (heterocigoto en localización exónica).

La demostración de la expresión bialélica se requiere cuando haya que probar que una variante no afecta al *splicing* pero además, hay que demostrar que el ensayo está capturando la expresión del alelo portador de la variante puesto que existen situaciones en las que el alelo de la variante podría producir mensajeros muy inestables que se degradan y no detectamos, o mensajeros con retenciones intrónicas muy amplias que no son amplificadas en nuestras condiciones experimentales.

2.3.3. Seguimiento de los portadores de VUS priorizadas

Los portadores de VUS priorizadas fueron incluidos en un proceso de seguimiento que permite realizar una reevaluación de las variantes genéticas y posibilita, en caso de necesidad, el contacto con los pacientes y/o sus familiares.

En base a los resultados obtenidos en los estudios complementarios de VUS priorizadas, aquellas variantes que presentaron evidencia de patogenicidad fueron reclasificadas y debidamente notificadas mediante un adecuado asesoramiento genético a los portadores de dichas variantes.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de estadística descriptiva e inferencial de las variables de estudio se realizó utilizando el software SPSS v.27. Las condiciones de aplicación del tratamiento estadístico se verificaron previa realización del mismo.

- * Para el análisis descriptivo de las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión mientras que las variables cualitativas se representaron a través de tablas de frecuencia absoluta y relativa.
- * El contraste de hipótesis para comparar variables cualitativas se realizó mediante el test exacto de Fisher o el test de Chi cuadrado de Pearson según requerimientos del número de casos. Las diferencias serán consideradas significativas cuando el valor "*p*" asociado a la prueba estadística de contraste sea menor a 0,05.

IV. Resultados

1. ESPECTRO MUTACIONAL DEL SCMOH EN LA REGIÓN DE MURCIA

Tras el estudio genético del SCMOH realizado en las 2928 familias seleccionadas en base a los criterios establecidos por la SEOM y por el Comité de Asesoramiento Genético de la Región de Murcia, se registraron un total de 421 familias portadoras de 170 variantes patogénicas o probablemente patogénicas en genes clínicamente accionables. La distribución por genes se representa en la **Figura 26**. Destaca que, la tasa mutacional más significativa de variantes clínicamente relevantes, se corresponde con los principales genes de susceptibilidad genética *BRCA1/2*, seguida de un porcentaje relevante en genes de alta y moderada penetrancia que presentan una evidente contribución a la heredabilidad del cáncer de mama y ovario (*ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1* y *TP53*). Por tanto, el rendimiento diagnóstico obtenido para variantes patogénicas y probablemente patogénicas en genes clínicamente accionables fue del 14,38% en las familias estudiadas.

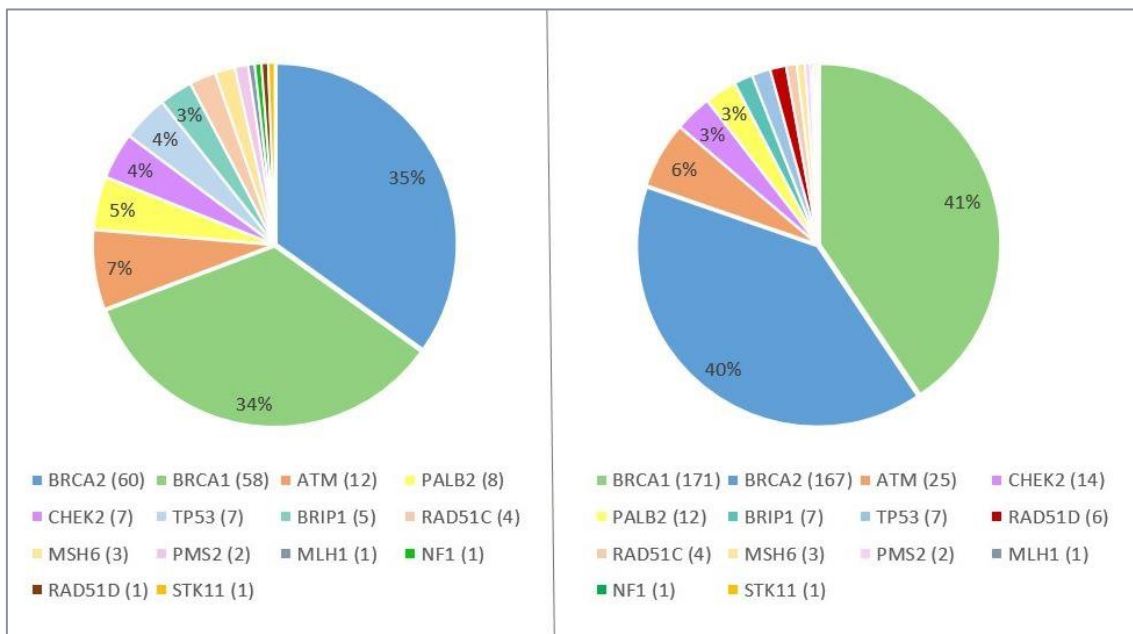


Figura 26. Distribución por genes de las variantes patogénicas (VP) y probablemente patogénicas (VPP). La imagen de la izquierda representa las VP/VPP detectadas en cada gen mientras que la imagen de la derecha muestra las familias portadoras de VP/VPP por gen, indicando respectivamente entre paréntesis el número total de VP/VPP y de familias portadoras de VP/VPP correspondientes a cada uno de los genes

1.1. ESTUDIO DE PREVALENCIA DE VARIANTES RECURRENTE

El estudio de prevalencia del SCMOH realizado en la presente tesis doctoral ha permitido identificar las variantes patogénicas recurrentes y mutaciones fundadoras, principalmente asociadas a los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Figura 27 y 28), presentes en la Región de Murcia (Tabla 21) y población norteafricana residente en la citada región debido a su importante representación en esta Comunidad Autónoma (Tabla 22).

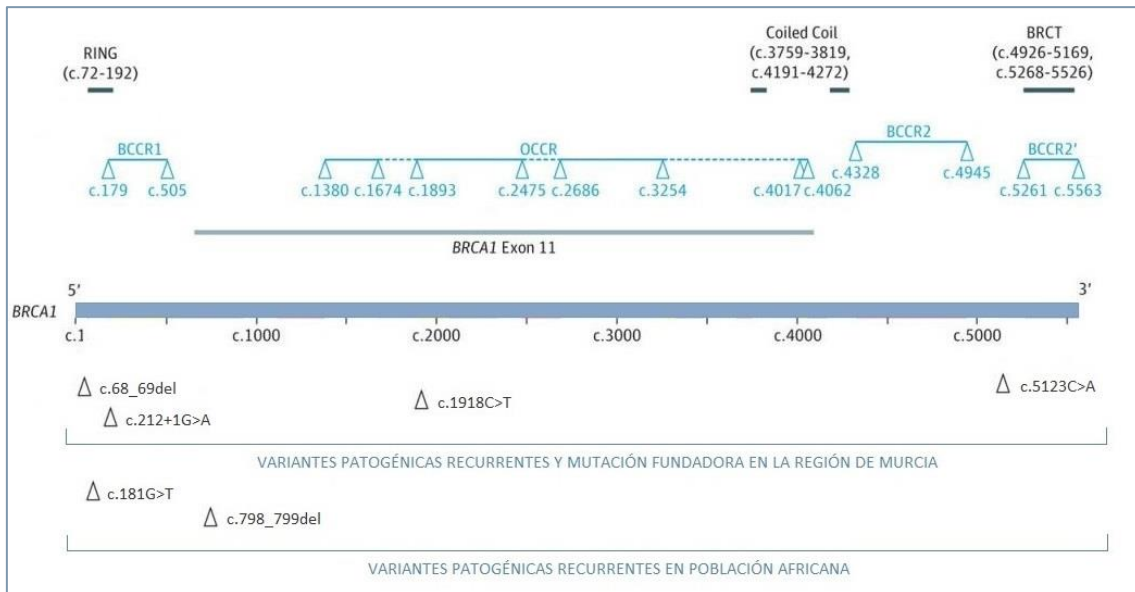


Figura 27. Distribución de las variantes patogénicas recurrentes y fundadoras en el gen *BRCA1* junto a los dominios funcionales (dominio RING, *coiled-coil*, BRCT) y regiones *BCCR/OCCR*

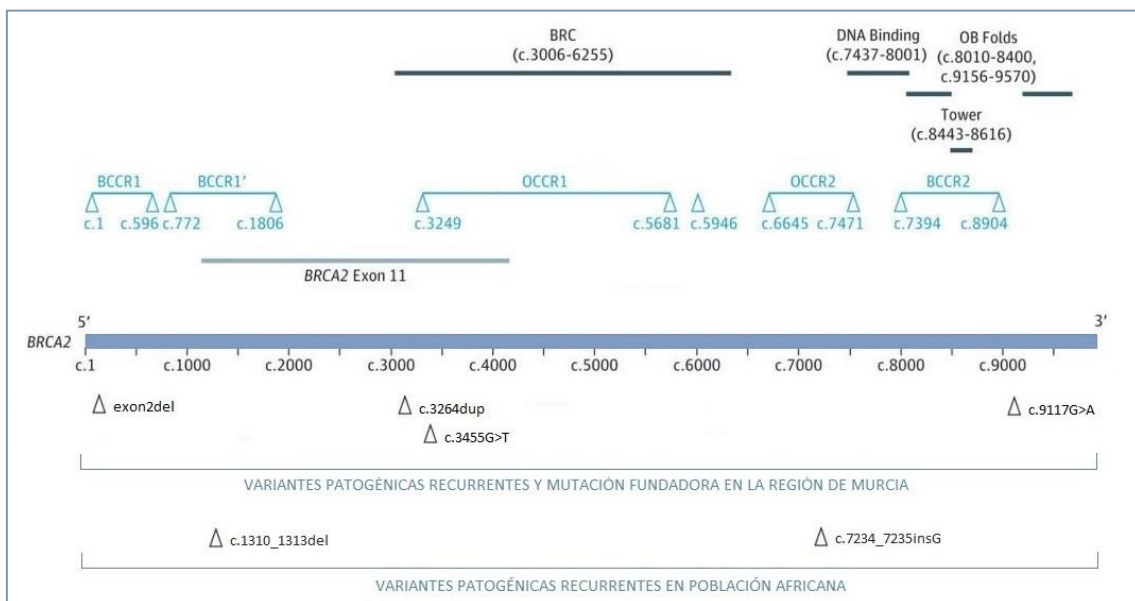


Figura 28. Distribución de las variantes patogénicas recurrentes y fundadoras en el gen *BRCA2* junto a los dominios funcionales (dominios BRC, helicoidal, *oligonucleotide binding* y tower) y regiones *BCCR/OCCR*

GEN	Exón/ Intrón	HGVS (ADNc)*	HGVS (proteína)*	refSNP	ClinVar	ACMG	Tipo de variante	Nº familias	Fenotipo predominante	Edad mediana (rango)	
										CM	CO
BRCA1	2	c.68_69del	p.Glu23ValfsTer17	rs80357914	VP*	PVS1, PM1, PP5	<i>frameshift</i>	23	CM: DI TN	43 (23-63)	57 (14-75)
	IN4-5	c.212+1G>A	p.Phe46_Arg71del p.Cys64X	rs80358042	VP*	PVS1, PS3, PM2, PP3+PP5	<i>intrónica</i>	16	CM: DI TN	41 (28-70)	50 (36-71)
	10	c.1918C>T	p.Gln640Ter	rs886039981	VP*	PVS1, PM2, PP5	<i>nonsense</i>	9	CM: DI TN	42 (21-64)	48 (47-60)
	17	c.5123C>A	p.Ala1708Glu	rs28897696	VP*	PS3, PM1, PP3+PP5	<i>missense</i>	12	CM: DI TN	40 (32-58)	56 (47-60)
BRCA2	2	exon2del	Sin traducción/ p.Met1_Lys123del	-	VP	PVS1, PS3, PM2, PP5	<i>LRG</i>	12	CM: DI LA	43 (27-81)	71 (67-75)
	11	c.3264dup	p.Gln1089SerfsTer10	rs80359380	VP*	PVS1, PM2, PP5	<i>frameshift</i>	10	CM: DI LA	52 (36-70)	57 (56-58)
	11	c.3455T>G	p.Leu1152Ter	rs80358593	VP*	PVS1, PM2, PP5	<i>nonsense</i>	12	CM: DI LA	49 (31-72)	50 (44-56)
	23	c.9117G>A	p.Pro3039=	rs28897756	VP	PS3, PM2, PP3+PP5	<i>synonymous</i>	16	CM: DI LA	47 (35-72)	63 (49-75)
ATM	56	c.8251_8254del	p.Thr2751fs	rs786202120	VP	PVS1, PM2, PP5	<i>frameshift</i>	8	CM: DI LA	48 (33-90)	58

Tabla 21. Variantes patogénicas recurrentes y mutaciones fundadoras *BRCA1/2* en la Región de Murcia

GEN	Intrón/exón	HGVS (ADNc)*	HGVS (proteína)*	refSNP	ClinVar	ACMG	Tipo de variante	Nº familias	Fenotipo predominante	Edad mediana CM (rango)
BRCA1	4	c.181T>G	p.Cys61Gly	rs28897672	VP*	PM1+PM5, PP5+PP3	<i>missense</i>	4	CM: DI TN	48 (33-64)
	10	c.798_799del	p.Ser267LysfsTer19	rs80357724	VP*	PVS1, PM2, PP5	<i>frameshift</i>	3	CM: DI TN	36 (31-39)
BRCA2	10	c.1310_1313del	p.Lys437IlefsTer22	rs80359277	VP*	PVS1, PM2, PP5	<i>frameshift</i>	4	CM: DI LA/B	34 (32-41)
	14	c.7234_7235insG	p.Thr2412SerfsTer2	rs397507906	VP*	PVS1, PM2, PP5	<i>frameshift</i>	3	CM: DI LA	43 (32-49)

Tabla 22. Variantes patogénicas recurrentes *BRCA1/2* en población del norte de África

Nomenclatura HGVS: *BRCA1* LGR_292t1 (NCBI RefSeq NM_007294.4) y *BRCA2* LRG_293t1 (NCBI RefSeq NM_000059.4)

VP: variante patogénica, VP*: VP revisada por panel de expertos, CM: cáncer de mama, DI: ductal invasivo, TN: triple negativo, LA/B: luminal A/B

A continuación, se ha realizado una revisión bibliográfica y un estudio del análisis mutacional, descripción y localización geográfica de las familias portadoras de cada variante genética, así como una correlación genotipo-fenotipo global de todas ellas.

BRCA1: c.68_69del

Esta variante genética ha resultado ser la más recurrente en nuestra población de estudio, con un total de 23 familias afectadas (6,8% de las familias BRCA+ y 13,4% de las familias BRCA1+).

a) Caracterización molecular y clínica de la variante

Variante genética de tipo *frameshift* que deleciona dos bases nucleotídicas (AG) en el exón 2 del gen *BRCA1*, lo que produce un desfase en el marco de lectura que genera un codón de parada prematuro (p.Glu23ValfsTer17). Se predice que esta alteración origina una proteína truncada no funcional con pérdida de los dominios fundamentales (dominio RING, *coiled-coil*, BRCT y región de unión al ADN).

De acuerdo a los criterios de la ACMG, ha sido clasificada en las bases de datos como patogénica (PP5) al tratarse de una variante nula en un gen en el cual la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad (PVS1) y estar localizada en un punto caliente mutacional (PM1).

b) Fenotipo de las familias portadoras

La información fenotípica detallada de los portadores de la variante c.68_69del se puede consultar en el **Anexo C1**. El perfil fenotípico predominante de las familias portadoras de esta deleción fue cáncer de mama unilateral de tipo ductal invasivo y subtipo molecular triple negativo. Resulta destacable la presencia de 6 casos de carcinoma de mama bilateral, resultando únicamente uno de ellos sincrónicos. En su mayoría, la histopatología e inmunohistoquímica de los pacientes afectados de cáncer de mama bilateral han mostrado resultados coincidentes en el tumor contralateral. En relación a otros tipos de cáncer, esta variante ha presentado una evidente asociación con tumores de tipo ginecológico, entre los que ha destacado el cáncer de ovario de tipo seroso. La edad mediana de aparición de cáncer de mama en portadores fue de 43 años, con un rango de edad entre 23 y 63 años mientras que en los casos afectados de

cáncer de ovario, la edad mediana de diagnóstico fue de 57 años, con un rango entre los 14 y 75 años (Tabla 23).

CÁNCER DE MAMA				
Casos (%)	Edad mediana (rango)	CM Bilateral (%)	Subtipo histológico*	Subtipo molecular*
23 (70%)	43 (23-63)	6 (26%)	Ductal invasivo (23/29)	Luminal A (5/29) Triple negativo (19/29)
OTROS TIPOS DE CÁNCER				
Tipo de cáncer	Casos (%)	Edad mediana (rango)		
Ovario	8 (24%)	57 (14-75)		
Cérvix	1 (3%)	56		
Endometrio ϕ	1 (3%)	52		
Melanoma	1 (3%)	61		
Portadores afectados: 33 (39%)				
Total de portadores: 84				
Familias portadoras: 23				

* Casos de cáncer de mama bilateral contabilizados como eventos independientes

ϕ Co-afectación de cáncer de mama y endometrio en portador

Tabla 23. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.68_69del

c) Árbol genealógico representativo de las familias portadoras

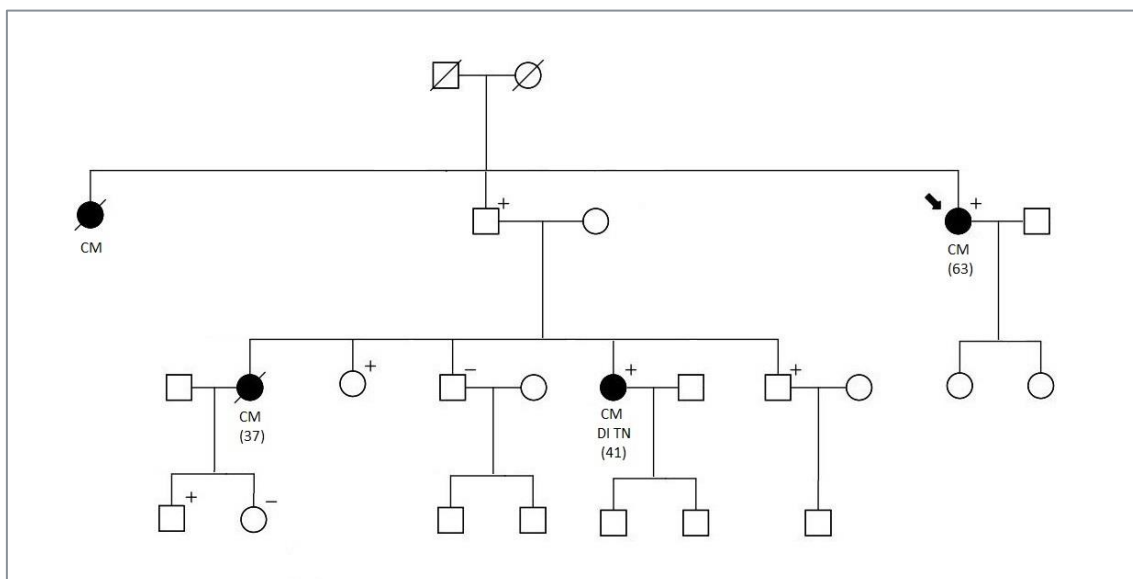


Figura 29. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.68_69del

CM: cáncer de mama, DI: ductal invasivo, TN: triple negativo

d) Procedencia geográfica de las familias portadoras

Las familias portadoras de la variante genética c.68_69del muestran una procedencia geográfica heterogénea en la Región de Murcia, reflejando una distribución preferente en la comarca de la Huerta de Murcia (Figura 30).



Figura 30. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.68_69del
(Los círculos rojos engloban el número de familias en cada área geográfica)

BRCA1: c.212+1G>A

Esta variante genética ha sido descrita como una de las más frecuentes en nuestra población de estudio, con un total de 16 familias afectadas (4,7% de las familias *BRCA+* y 9,4% de las familias *BRCA1+*).

a) Caracterización molecular y clínica de la variante

Variante espliceogénica localizada en la primera posición del intrón 4-5 del gen *BRCA1* (IVS5+1G>A) que afecta a la secuencia consenso donadora implicada en el proceso de *splicing*. Estudios funcionales con minigenes híbridos y RT-PCR en linfocitos han evidenciado dos posibles efectos de esta variante genética en el procesamiento del ARN mensajero: la formación de un empalme aberrante con omisión del exón 4 y síntesis de una proteína truncada con pérdida funcional del dominio *RING finger* (p.Phe46_Arg71del) o una maduración alternativa del ARN mensajero mediante la activación de un sitio de empalme crítico con pérdida de 22 nucleótidos aguas arriba que se traduce en la síntesis de una proteína truncada (p.Cys64X) (134).

De acuerdo a los criterios de la ACMG, ha sido clasificada en las bases de datos como patogénica (PP5) al tratarse de una variante nula en un gen en el cual la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad (PVS1), ausente en controles en los diferentes estudios poblacionales (PM2) y cuyo efecto deletéreo es apoyado por estudios funcionales *in vitro* (PS3) y por varias líneas de evidencia computacional (PP3).

b) Fenotipo de las familias portadoras

La información fenotípica detallada de los portadores de la variante c.212+1G>A se puede consultar en el **Anexo C2**. En las familias portadoras de esta variante genética, el fenotipo predominante fue carcinoma de mama unilateral de tipo ductal invasivo y subtipo molecular triple negativo. Destaca la presencia de 5 portadores afectados por tumores de mama y ovario, siendo dos de ellos sincrónicos. Por lo que respecta a otros tipos de cáncer, se ha observado una fuerte asociación de esta variante con el carcinoma de ovario de tipo seroso. La edad mediana de aparición de cáncer de mama en portadores es de 41 años, con un rango de edad entre 28 y 70 años mientras que en los casos afectados de cáncer de ovario, la edad mediana de diagnóstico fue de 50 años, con un rango entre los 36 y 71 años (**Tabla 24**).

CÁNCER DE MAMA				
Casos (%)	Edad mediana (rango)	CM Bilateral (%)	Subtipo histológico*	Subtipo molecular*
19 (65%)	41 (28-70)	2 (10%)	Ductal invasivo (18/21)	Luminal A (5/21) Luminal B (2/21) Triple negativo (11/21)
OTROS TIPOS DE CÁNCER				
Tipo de cáncer	Casos (%)	Edad mediana (rango)		
Ovario [♠]	12 (41%)	50 (36-71)		
Vejiga	1 (3%)	54		
Colon	1 (3%)	64		
Próstata	1 (3%)	57		
Portadores afectados: 29 (37%)				
Total de portadores: 78				
Familias portadoras: 16				

* Casos de cáncer de mama bilateral contabilizados como eventos independientes

[♠] Co-afectación de cáncer de mama y ovario en portadores

Tabla 24. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.212+1G>A

c) Árbol genealógico representativo de las familias portadoras

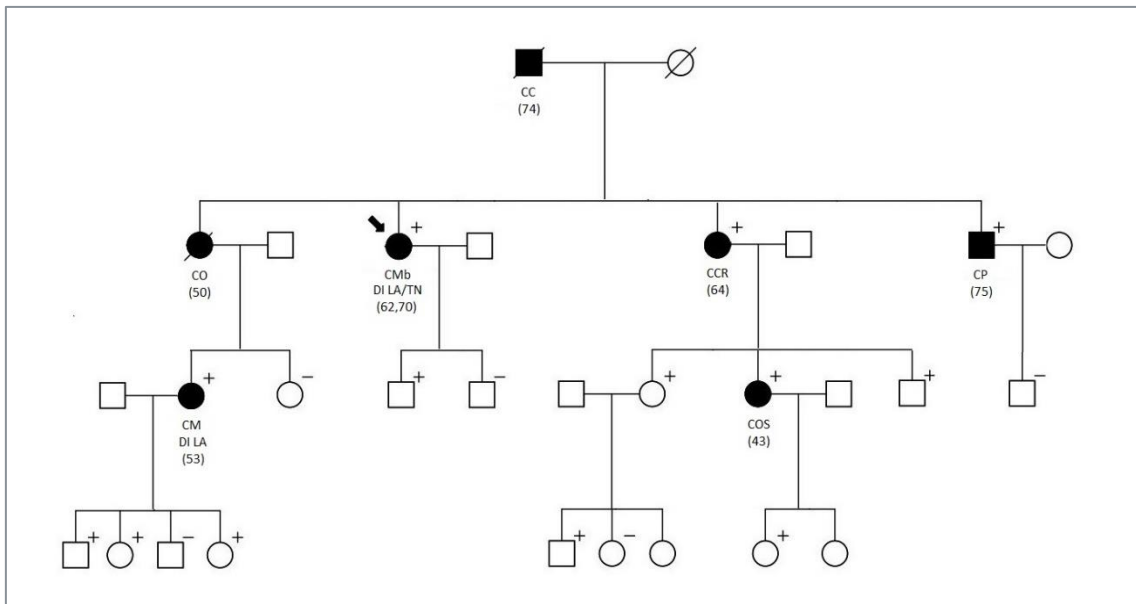


Figura 31. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.212+1G>A. CC: cáncer de cabeza y cuello, CCR: cáncer colorrectal, CP: cáncer de próstata, CO: cáncer de ovario, COS: cáncer de ovario seroso, CM: cáncer de mama, CMB: CM bilateral, DI: ductal invasivo, LA: luminal A, TN: triple negativo

d) Procedencia geográfica de las familias portadoras

Las familias portadoras de la variante c.212+1G>A provienen en su mayoría en los municipios de Cehegín y Bullas pertenecientes a la Comarca del Noroeste (Figura 32).



Figura 32. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.212+1G>A (Los círculos rojos engloban el número de familias en cada área geográfica)

BRCA1: c.5123C>A

Variante genética caracterizada por su elevada prevalencia en nuestra población de estudio, con un total de 12 familias afectadas (3,6% de las familias *BRCA+* y 7% de las familias *BRCA1+*).

a) Caracterización molecular y clínica de la variante

Variante genética de tipo *missense* localizada en el exón 17 del gen *BRCA1* que implica la sustitución de un nucleótido (GCG>GAG) y reemplaza el residuo de alanina altamente conservado por glutámico en la posición 1708 de la proteína (p.Ala1708Glu). Este cambio genera un impacto deletéreo en la estructura y función del dominio BRCT1, que resulta esencial para la actividad supresora de tumores de la proteína *BRCA1*.

De forma paralela, estudios funcionales de RT-PCR en linfocitos han evidenciado que esta variante se asocia con una delección del exón 17 durante el proceso de *splicing*, correlacionándose con una mayor interacción de los represores de empalme hnRNP A1 y hnRNP H/F al exón mutado (135). Por tanto, la patogenicidad asociada a dicha variante probablemente se explica en base a un doble mecanismo, inactivación proteica y *splicing* aberrante, que afecta a la expresión génica de la proteína *BRCA1* (134).

De acuerdo a los criterios de la ACMG, ha sido clasificada en las bases de datos como patogénica (PP5), localizada en un punto caliente mutacional en el que la mayoría de las variantes halladas son patogénicas (PM1) y cuyo efecto deletéreo es apoyado por estudios funcionales *in vitro* (PS3) y por varias líneas de evidencia computacional (PP3).

b) Fenotipo de las familias portadoras

La información fenotípica detallada de los portadores de la variante c.5123C>A se puede consultar en el **Anexo C3**. El fenotipo predominante de las familias portadoras de esta variante genética fue carcinoma de mama unilateral de tipo ductal invasivo y subtipo molecular triple negativo. Resulta destacable la presencia de 5 casos de carcinoma de mama bilateral, resultando únicamente uno de ellos sincrónicos. En su mayoría, la histopatología e inmunohistoquímica de los pacientes afectados de cáncer de mama bilateral han mostrado resultados coincidentes en el tumor contralateral.

La edad mediana de aparición de cáncer de mama en portadores es de 40 años, con un rango de edad entre 32 y 58 años mientras que en los casos afectados de cáncer de ovario, la mediana de edad de diagnóstico fue de 56 años, con un rango entre los 47 y 60 años (Tabla 25).

CÁNCER DE MAMA				
Casos (%)	Edad mediana (rango)	CM Bilateral (%)	Subtipo histológico*	Subtipo molecular*
17 (81%)	40 (32-58)	5 (29%)	Ductal invasivo (18/22)	Luminal A (4/22) Luminal B (1/22) Triple negativo (17/22)
OTROS TIPOS DE CÁNCER				
Tipo de cáncer	Casos (%)	Edad mediana (rango)		
Ovario ^ϕ	4 (19%)	56 (47-60)		
Gástrico	1 (5%)	64		
Portadores afectados: 21 (28%)				
Total de portadores: 76				
Familias portadoras: 12				

* Casos de cáncer de mama bilateral contabilizados como eventos independientes

^ϕ Co-afectación de cáncer de mama y ovario en portador

Tabla 25. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.5123C>A

c) Árbol genealógico representativo de las familias portadoras

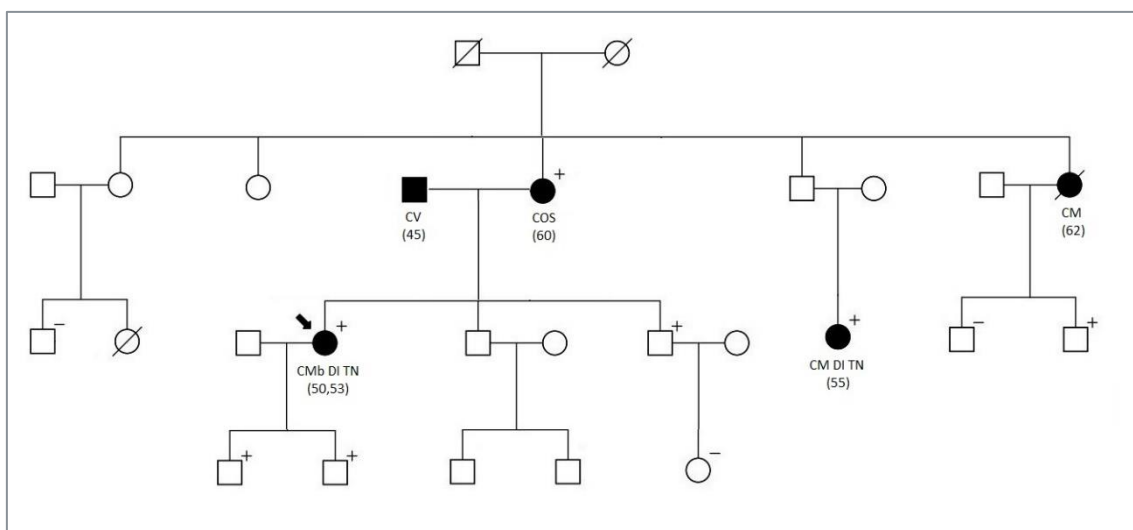


Figura 33. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.5123C>A CV: cáncer de vejiga, COS: cáncer de ovario seroso, CM: cáncer de mama, CMb: CM bilateral, DI: ductal invasivo, TN: triple negativo

d) Procedencia geográfica de las familias portadoras

Las familias portadoras de la variante genética c.5123C>A pertenecen a la zona este de la Región de Murcia y provienen principalmente de la comarca del Altiplano y de la comarca del Campo de Cartagena (Figura 34). De forma excepcional, una de las familias estudiadas presenta su procedencia en Almansa, municipio de la provincia de Albacete (Castilla-La Mancha).

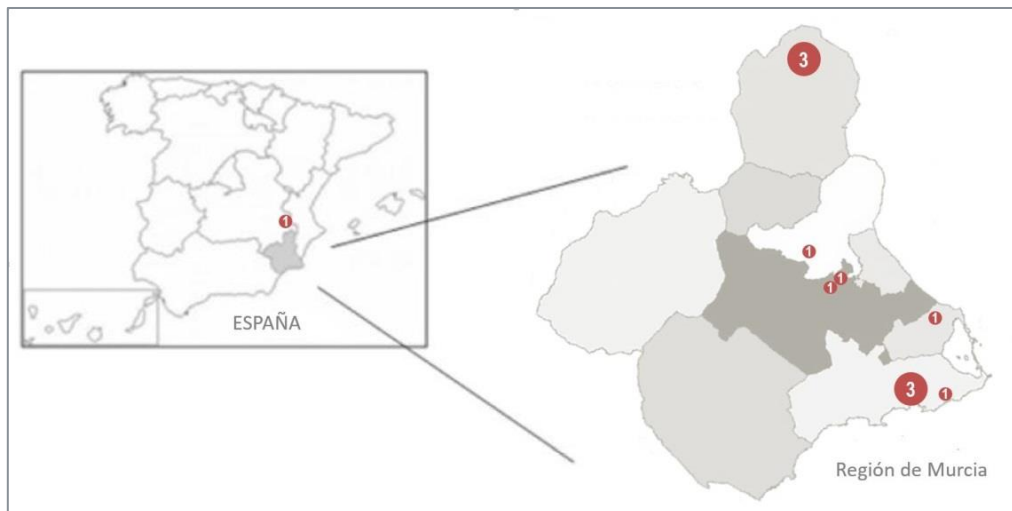


Figura 34. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.5123C>A
(Los círculos rojos engloban el número de familias en cada área geográfica)

BRCA2: c.3264dup

Variante genética recurrente en nuestra población de estudio, con un total de 10 familias afectadas (3% de los portadores *BRCA+* y 6% de los portadores *BRCA2+*).

a) Caracterización molecular y clínica de la variante

Variante genética de tipo *frameshift* localizada en el exón 11 del gen *BRCA2* que consiste en una duplicación de timina y el consiguiente cambio del aminoácido glutamina por serina en la posición 1089 de la proteína *BRCA2* (p.Gln1089fs), generándose un codón de parada prematuro que se traduce en la síntesis de una proteína truncada con pérdida del dominio de repeticiones BRC de unión directa a la recombinasa *RAD51* y del complejo formado por el dominio helicoidal, los dominios *oligonucleotide binding* (OB) y el dominio *tower* (T) esenciales para su actividad biológica.

De acuerdo a los criterios de la ACMG, ha sido clasificada en las bases de datos como patogénica (PP5) al tratarse de una variante nula en un gen en el cual la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad (PVS1) y estar ausente en controles en los diferentes estudios poblacionales (PM2).

b) Fenotipo de las familias portadoras

La información fenotípica detallada de los portadores de la variante c.3264dup se puede consultar en el **Anexo C4**. En las familias portadoras de esta variante genética, el fenotipo predominante fue carcinoma de mama unilateral de tipo ductal invasivo y subtipo molecular luminal A (caracterizado por la positividad para los receptores hormonales y negatividad para la expresión de HER2). Destaca la presencia de un caso de carcinoma mamario en un portador varón diagnosticado a los 65 años. La edad mediana de aparición de cáncer de mama en portadores es de 52 años, con un rango de edad entre 36 y 70 años mientras que en los casos afectados de cáncer de ovario de tipo seroso, la edad mediana de diagnóstico fue de 57 años, con un rango entre los 56 y 58 años (Tabla 26).

CÁNCER DE MAMA				
Casos (%)	Edad mediana (rango)	CM Bilateral (%)	Subtipo histológico*	Subtipo molecular*
11 (85%)	52 (36-70)	1 (9%)	Ductal invasivo (9/12)	Luminal A (8/12)
				Luminal B (2/12)
				Triple negativo (1/12)
OTROS TIPOS DE CÁNCER				
Tipo de cáncer	Casos (%)	Edad mediana (rango)		
Ovario	2 (15%)	57 (56-58)		
Leucemia ^φ	1 (8%)	65		
Portadores afectados: 13 (32%)				
Total de portadores: 41				
Familias portadoras: 10				

* Casos de cáncer de mama bilateral contabilizados como eventos independientes

^φ Co-afectación de cáncer de mama y leucemia en portador

Tabla 26. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.3264dup

c) Árbol genealógico representativo de las familias portadoras

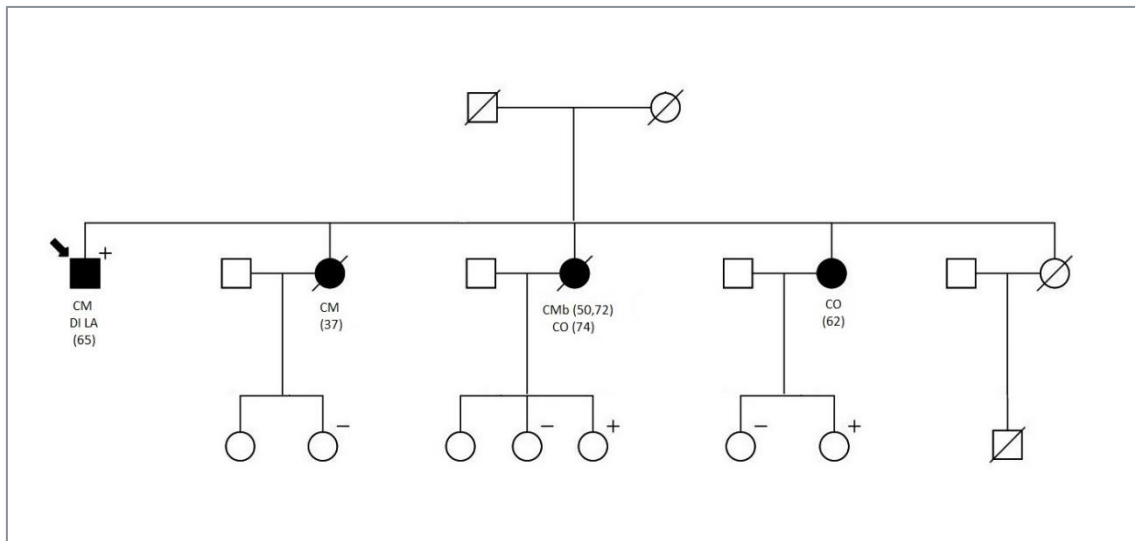


Figura 35. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.3264dup

CM: cáncer de mama, CMb: CM bilateral, DI: ductal invasivo, LA: luminal A, CO: cáncer de ovario

d) Procedencia geográfica de las familias portadoras

Las familias portadoras de la variante genética c.3264dup muestran una procedencia geográfica heterogénea en la Región de Murcia (Figura 36).



Figura 36. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.3264dup

(Los círculos rojos engloban el número de familias en cada área geográfica)

BRCA2: c.3455T>G

Variante genética caracterizada por su elevada prevalencia en nuestra población de estudio, con un total de 12 familias afectadas (3,6% de los portadores *BRCA+* y 7,2% de los portadores *BRCA2+*).

a) Caracterización molecular y clínica de la variante

Variante genética de tipo *nonsense* localizada en el exón 11 del gen *BRCA2* que implica una sustitución de timina por guanina (TTA>TGA) generando un codón de parada prematuro que se traduce en la síntesis de una proteína truncada (p.Leu1152Ter) con pérdida de los dominios esenciales para su actividad biológica.

De acuerdo a los criterios de la ACMG, ha sido clasificada en las bases de datos como patogénica (PP5) al tratarse de una variante nula en un gen en el cual la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad (PVS1) y estar ausente en controles en los diferentes estudios poblacionales (PM2).

b) Fenotipo de las familias portadoras

CÁNCER DE MAMA				
Casos (%)	Edad mediana (rango)	CM Bilateral (%)	Subtipo histológico*	Subtipo molecular*
11 (52%)	49 (31-72)	1 (9%)	Ductal invasivo (9/12)	Luminal A (8/12)
				Triple negativo (4/12)
OTROS TIPOS DE CÁNCER				
Tipo de cáncer	Casos (%)	Edad mediana (rango)		
Ovario	5 (24%)	50 (44-56)		
Colon	2 (9%)	75 (73-78)		
Endocrino	1 (5%)	81		
Próstata	1 (5%)	50		
Endometrio	1 (5%)	73		
Portadores afectados: 21 (51%)				
Total de portadores: 41				
Familias portadoras: 12				

* Casos de cáncer de mama bilateral contabilizados como eventos independientes

Tabla 27. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.3455T>G

La información fenotípica detallada de los portadores de la variante c.3455T>G se puede consultar en el **Anexo C5**. En las familias portadoras de esta variante genética, el fenotipo predominante fue carcinoma de mama unilateral de tipo ductal invasivo y subtipo molecular luminal A (caracterizado por la positividad para los receptores hormonales y negatividad para la expresión de HER2). Destaca un caso de cáncer de mama en un portador varón diagnosticado a los 72 años. La edad mediana de aparición de cáncer de mama en portadores es de 49 años, con un rango de edad entre 31 y 72 años mientras que en los casos afectados de cáncer de ovario, la edad mediana de diagnóstico es de 50 años, con un rango entre los 44 y 56 años (**Tabla 27**).

c) Árbol genealógico representativo de las familias portadoras

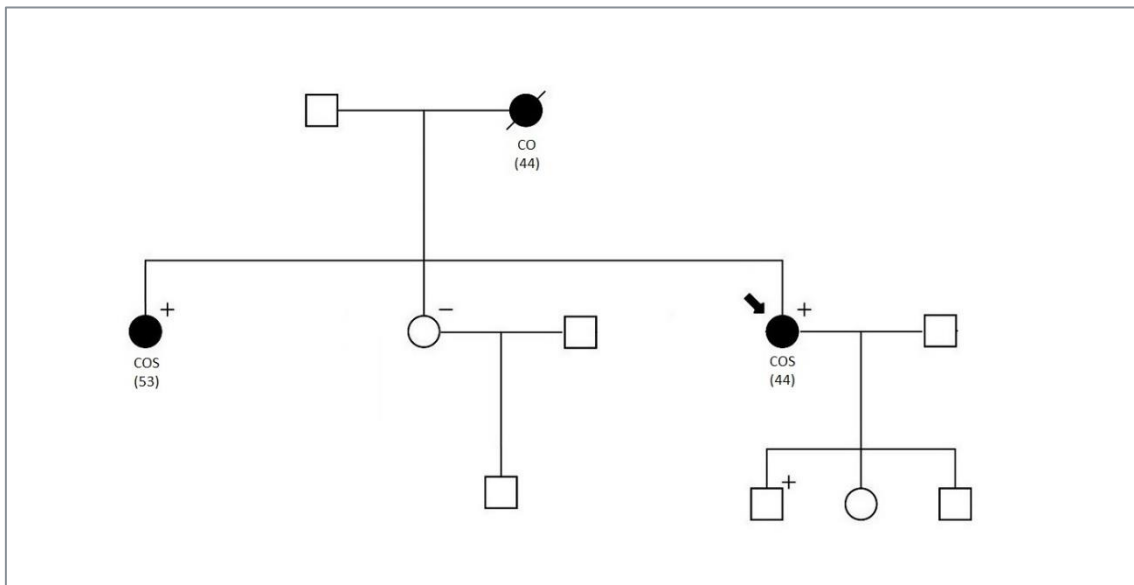


Figura 37. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.3455T>G

CO: cáncer de ovario, COS: cáncer de ovario seroso

d) Procedencia geográfica de las familias portadoras

Las familias portadoras de la variante c.3455T>G proceden en su mayoría de la zona sureste de la Región de Murcia, principalmente de la comarca del Campo de Cartagena (**Figura 38**).

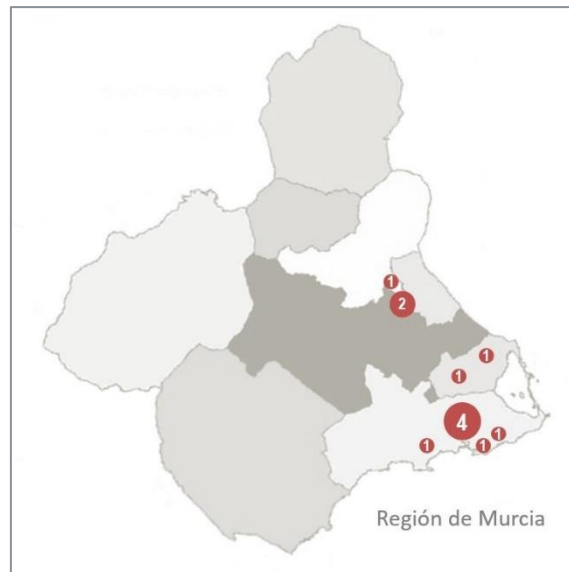


Figura 38. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.3455T>G
(Los círculos rojos engloban el número de familias en cada área geográfica)

BRCA2: c.9117G>A

Esta variante genética ha sido descrita como una de las más frecuentes en nuestra población de estudio, con un total de 16 familias afectadas (4,7% de los portadores BRCA+ y 9,6% de los portadores BRCA2+).

a) Caracterización molecular y clínica de la variante

Variante genética de tipo *synonymous* que implica un cambio de nucleótido (CCG>CCA) en la última posición del exón 23 del gen BRCA2 pero mantiene la secuencia de aminoácidos codificada por la proteína (p.Pro3039=).

Sin embargo, la posición del nucleótido implicado colinda con un sitio canónico de *splicing* lo que sugiere en los análisis predictivos *in silico* que podría afectar a este proceso y alterar la funcionalidad de la proteína resultante. Los resultados de los estudios funcionales de *splicing* realizados con minigenes híbridos y RT-PCR en linfocitos han coincidido que esta variante induce un empalme aberrante con omisión del exón 23 y el truncamiento prematuro de la proteína (p.Val2985Glyfs*3) (136,137).

No obstante, la variante fue ensayada con otros minigenes que demostraron la alteración del patrón de *splicing* con la existencia de diferentes transcritos. La cuantificación relativa de las isoformas detectadas mediante electroforesis capilar, reveló que el 73% de las isoformas no contiene el exón 23, un 13% no presentaban los exones 23 y 24, un 10% mostraban una delección de los primeros 51 nucleótidos del exón 23 y, por último, el 4% correspondían al transcrito canónico (138).

De acuerdo a los criterios de la ACMG, ha sido clasificada en las bases de datos como patogénica (PP5), al tratarse de una variante ausente en controles en los diferentes estudios poblacionales (PM2) y cuyo efecto deletéreo es apoyado por estudios funcionales *in vitro* (PS3) y por varias líneas de evidencia computacional (PP3).

b) Fenotipo de las familias portadoras

CÁNCER DE MAMA				
Casos (%)	Edad mediana (rango)	CM Bilateral (%)	Subtipo histológico*	Subtipo molecular*
20 (77%)	47 (35-72)	4 (20%)	Ductal invasivo (19/24)	Luminal A (14/24)
				Luminal B (6/24)
				Triple negativo (2/24)
OTROS TIPOS DE CÁNCER				
Tipo de cáncer	Casos (%)	Edad mediana (rango)		
Ovario ^ϕ	5 (19%)	63 (49-76)		
Cérvix ^ϕ	1 (4%)	48		
Endometrio ^ϕ	1 (4%)	71		
Próstata	1 (4%)	46		
Vejiga	1 (4%)	60		
Glioblastoma ^ϕ	1 (4%)	58		
Linfoma	1 (4%)	41		
Portadores afectados: 26 (52%)				
Total de portadores: 50				
Familias portadoras:16				

* Casos de cáncer de mama bilateral contabilizados como eventos independientes

^ϕ Co-afectación de cáncer de mama y otros tumores en portadores

Tabla 28. Fenotipo asociado a las familias portadoras de la variante c.9117G>A

La información fenotípica detallada de los portadores de la variante c.9117G>A se puede consultar en el **Anexo C6**. El perfil fenotípico predominante de las familias portadoras de esta mutación fue carcinoma de mama unilateral de tipo ductal invasivo y subtipo molecular luminal A (caracterizado por la positividad para los receptores hormonales y negatividad para la expresión de HER2). Destaca la presencia de 4 casos de cáncer de mama bilateral y 5 familias portadoras afectadas por tumores de tipo mamario y ginecológico, siendo todos ellos metacrónicos. En su mayoría, la histopatología e inmunohistoquímica de los pacientes afectados de cáncer de mama bilateral han mostrado resultados coincidentes en el tumor contralateral. Esta variante se ha detectado en un varón diagnosticado de cáncer de mama a los 47 años y en portadores afectados de tumores de múltiples orígenes. La edad mediana de aparición de cáncer de mama en portadores es de 47 años, con un rango de edad entre 35 y 72 años mientras que en los casos afectados de cáncer de ovario, la edad mediana de diagnóstico fue de 63 años, con un rango entre los 49 y 76 años (Tabla 28).

c) **Árbol genealógico representativo de las familias portadoras**

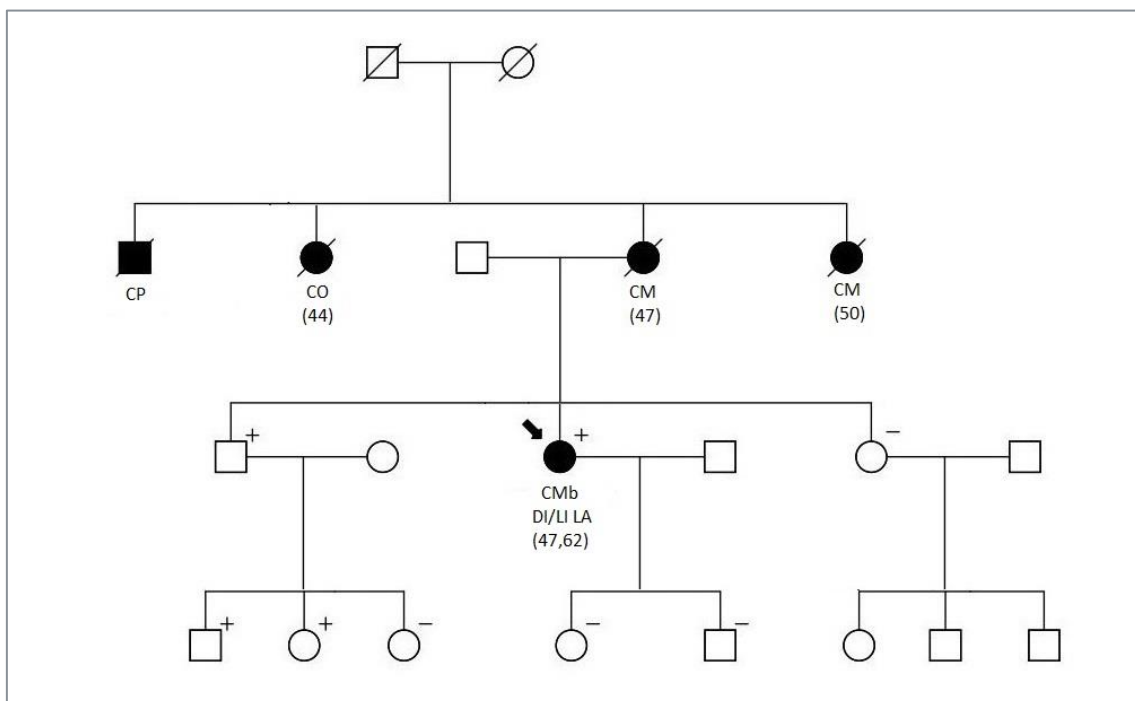


Figura 39. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.9117G>A

CP: cáncer de próstata, CO: cáncer de ovario, CM: cáncer de mama, CMb: CM bilateral,
DI: ductal invasivo, LI: lobulillar invasivo, LA: luminal A

d) Procedencia geográfica de las familias portadoras

Las familias portadoras de la variante c.9117G>A provienen principalmente de los municipios de Cieza y Abarán pertenecientes a la Vega Alta del Segura, localizada en el norte de la Región de Murcia (Figura 40).

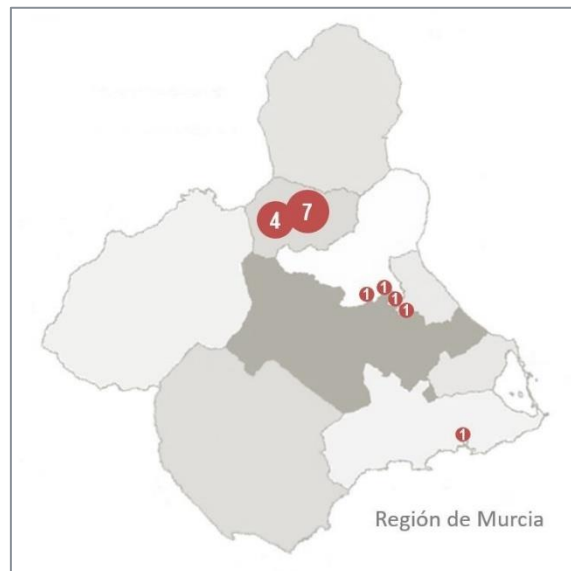


Figura 40. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.9117G>A
(Los círculos rojos engloban el número de familias en cada área geográfica)

1.2. ESTUDIO DE VARIANTES PATOGENICAS DE PROCEDENCIA AFRICANA

Del mismo modo, el estudio de prevalencia del SCMOH realizado en la presente tesis doctoral ha permitido identificar las variantes patogénicas más frecuentes en población del norte de África residente en la Región de Murcia. En la **Tabla 29** se resume la caracterización molecular de dichas variantes, así como el fenotipo asociado en las familias portadoras. Todas ellas han sido descritas como patogénicas, asociadas a una elevada susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama y ovario, según las bases de datos y las referencias bibliográficas disponibles. La prevalencia mutacional asociada a estas variantes representa respectivamente un 4,1% y un 4,2% del total de familias portadoras de variantes genéticas *BRCA1* y *BRCA2* en la Región de Murcia.

GEN	Exón/ Intrón	HGVS (ADNc)	HGVS (proteína)	Tipo de variante	ClinVar	Nº familias	Fenotipo (CI + F)
BRCA1	4	c.181T>G	p.Cys61Gly	<i>missense</i>	VP	4	CM (36) Med TN
							CMb (61,64) DIS/DI TN
							CM (33)
							CO (47)
	10	c.798_799del	p.Ser267LysfsTer19	<i>frameshift</i>	VP	3	CM (31) DI TN + CM (37) TN
							CM (39) DI TN *
BRCA2	10	c.1310_1313del	p.Lys437IlefsTer22	<i>frameshift</i>	VP	4	CM (32) DI TN
							CM (34) DI LA + CM (34)
							CM (41)
							CM (38) DI TN
	14	c.7234_7235insG	p.Thr2412SerfsTer2	<i>frameshift</i>	VP	3	CM (37) DI LA
							CCR (42) + CM (49) DI LA
							CMb (32,49) DI LB

Tabla 29. Caracterización molecular y clínica junto con el fenotipo asociado a las variantes patogénicas detectadas de forma recurrente en familias de procedencia norteafricana. CI: caso índice, F: familiar, VP: variante patogénica, CM: cáncer de mama, CO: cáncer de ovario, CCR: cáncer colorrectal, Med: medular, TN: triple negativo, DIS: ductal *in situ*, DI: ductal invasivo, LA/B: luminal A/B

* Portadora de doble mutación *BRCA1* (c.798_799del) / *BRCA2* (c.8488-1_8489delinsTCCATTACA)

1.2.1. Análisis de *splicing* de la variante c.8488-1_8489delinsTCCATTACA

Consideramos importante destacar el primer caso descrito en la Región de Murcia de una mujer de procedencia norteafricana diagnosticada de cáncer de mama de tipo ductal invasivo y subtipo molecular triple negativo a los 39 años, portadora de una doble mutación en *BRCA1* (c.798_799del) y *BRCA2* (c.8488-1_8489delinsTCCATTACA).

La variante patogénica c.798_799delTT de tipo *frameshift* delecióna dos bases nucleotídicas (TT) en el exón 10 del gen *BRCA1*, lo que produce un desfase en el marco de lectura que genera un codón de parada prematuro y una proteína truncada no funcional (p.Ser267LysfsTer19).

Por otro lado, la variante de nueva descripción c.8488-1_8489delinsTCCATTACA implica la deleción de última base del intrón 19-20 (g) y las dos primeras bases del exón 20 (TG) junto con la inserción de 9 bases nucleotídicas (TCCATTACA). Esta alteración de tipo *indel* afecta a una zona canónica de *splicing* y según las predicciones *in silico*, posiblemente altere el procesamiento del ARN mensajero. Por consiguiente, con el fin de evaluar su efecto en el proceso de *splicing* se realizó un estudio funcional *in vitro* para así, comprobar el impacto biológico de dicha variante a nivel del ARN mensajero.

Para caracterizar el efecto de la variante c.8488-1_8489delinsTCCATTACA a nivel de *splicing*, se realizó una RT-PCR (*primers* ubicados en los exones 19 y 22) a partir de RNA obtenido de sangre periférica de un portador y control sano. Los productos generados se procesaron mediante análisis de fragmentos por electroforesis capilar (**Figura 41A**).

En el caso del electroferograma del portador, a diferencia del correspondiente al control sano donde únicamente se observa el transcrito de referencia (FL) representado por el pico de 368 nucleótidos (nt), se detecta otro producto de intensidad similar $\Delta 20p_3$ (365nt), que por tamaño corresponde a una deleción de 3nt. Con el objetivo de determinar la naturaleza exacta de esta alteración genética, los productos generados en la RT-PCR se analizaron por secuenciación Sanger (**Figura 41B**).

Los resultados obtenidos indican que el alelo portador de la variante genética produce una deleción de 3 nt (gTG) y una inserción de 9 nt (TCCATTACA) que implica la creación de un aceptor críptico (AG) correspondiente a la última base insertada (A) y a la tercera base del exón 20 (**G**), lo que supone la activación de otro punto alternativo de *splicing* con la pérdida neta de 3 nt (TG correspondientes a las dos primeras bases del exón 20 debido a la deleción de la propia variante y **G** correspondiente a la tercera base del exón 20 como consecuencia de la activación de un nuevo sitio de *splicing* alternativo). El triplete de nucleótidos eliminado codifica un aminoácido (triptófano) implicado en la formación del dominio OB2 β 1' de la proteína BRCA2. La plataforma bioinformática *Jpred 4* predice que dicha variante no afecta a la estructura y función de la proteína, puesto que según el análisis *in silico* se conserva la integridad estructural y actividad biológica de dicho dominio (**Figura 41C**).

Por tanto, en base al estudio funcional realizado se demuestra un evento de *splicing* alternativo que mantendría la fase de lectura y, potencialmente podría codificar una proteína funcional.

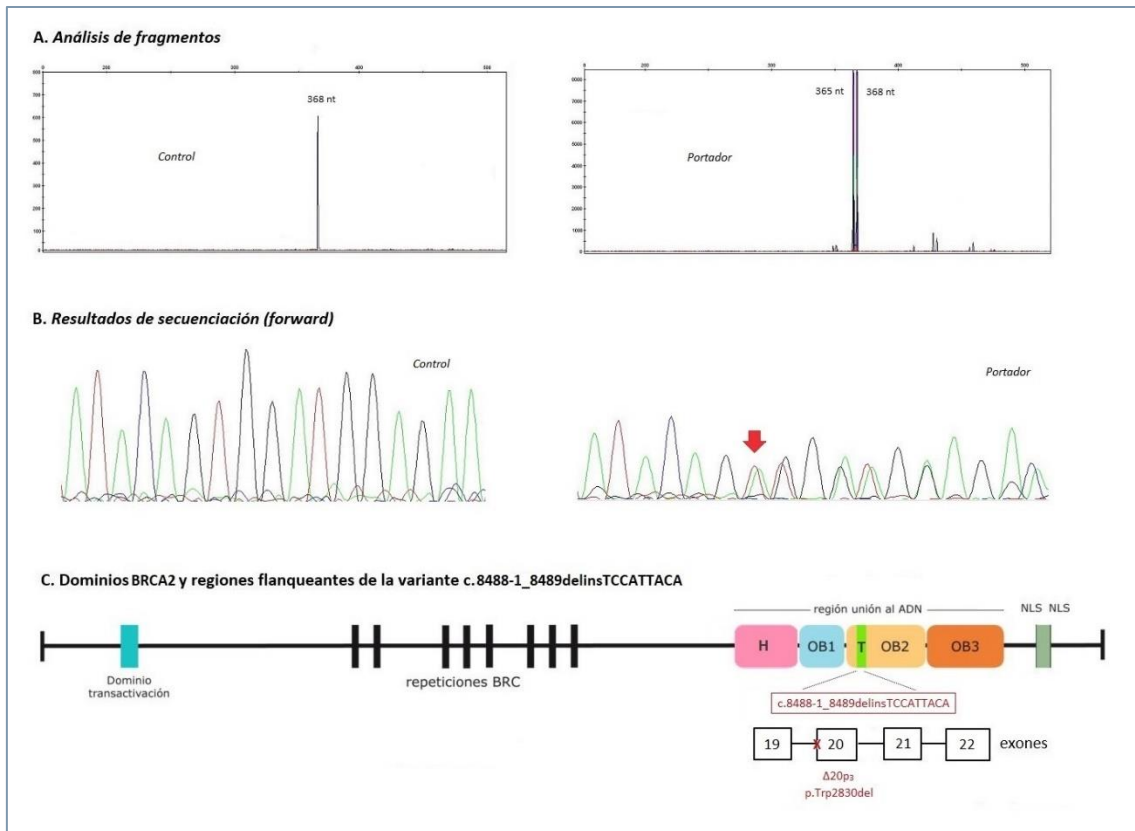


Figura 41. Análisis de *splicing* de la variante c.8488-1_8489delinsTCCATTACA mediante RT-PCR/EC y secuenciación Sanger. En el electroferograma del portador se muestra la contribución relativa del evento $\Delta 20p_3$ a la expresión global detectada con el ensayo RT-PCR E19-E22 mientras que en la secuenciación se puede observar la delección de los 3 nt en el alelo portador de la variante genética

1.3. ESTUDIO DE MUTACIONES FUNDADORAS

Los estudios de haplotipos con análisis de microsatélites han permitido identificar tres variantes genéticas que presentan un efecto fundador en nuestra población de estudio.

Para cada variante genética se realiza una descripción del análisis mutacional, localización geográfica y fenotipo de las familias portadoras, así como una exposición de los resultados obtenidos en el análisis de microsatélites y en la estimación de la antigüedad de cada mutación fundadora.

BRCA1: c.1918C>T

La variante genética c.1918C>T detectada en *BRCA1*, fue descrita por primera vez en 2 familias murcianas por Gabaldó y colaboradores (139). Esta publicación sugiere la presencia de un posible efecto fundador de esta variante en la Región de Murcia. Por esta razón, Gabaldó y colaboradores iniciaron un estudio de haplotipos con marcadores de microsatélites en regiones colindantes a la mutación y al gen *BRCA1* demostrando que compartían un ancestro común y, por lo tanto, fue considerada como una posible mutación fundadora. Posteriormente, esta variante descrita de forma exclusiva en la Región de Murcia, fue detectada en 6 familias por lo que decidimos ampliar el estudio para confirmar el efecto fundador en dicha región y así, completar información sobre el origen y la antigüedad de la variante genética.

a) Caracterización molecular y clínica de la variante

Variante patogénica de tipo *nonsense* que implica la sustitución de un nucleótido (CAA>TAA) en el exón 10 del gen *BRCA1*. Esta alteración genera un codón de parada prematuro en la posición 640 de la proteína BRCA1 (p.Gln640Ter) que se traduce en la síntesis de una proteína truncada con pérdida de dominios funcionales fundamentales (BRCT y *coiled coil*).

De acuerdo a los criterios de la ACMG, ha sido clasificada en las bases de datos como patogénica (PP5), al tratarse de una variante nula en un gen en el cual la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad (PVS1) y ausente en controles en los diferentes estudios poblacionales (PM2).

b) Descripción de las familias portadoras

Actualmente, esta variante patogénica ha sido detectada en 9 familias de nuestra población de estudio (2,7% de las familias *BRCA+* y 5,3% de las familias *BRCA1+*). A continuación, se muestra un árbol genealógico representativo de una familia portadora de dicha variante (Figura 42), incluyéndose los restantes en el Anexo D1.

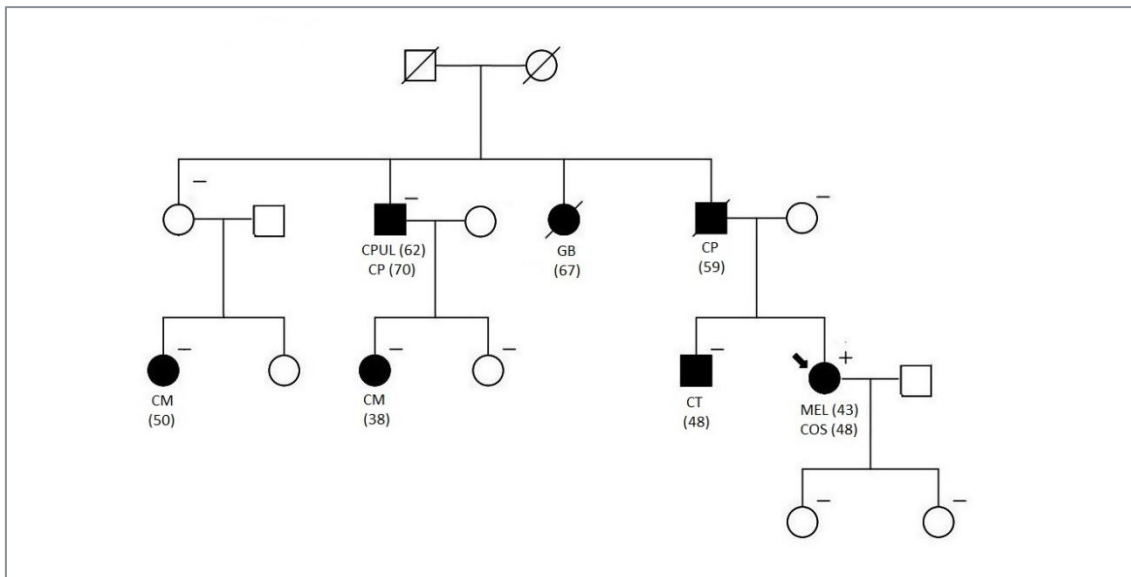


Figura 42. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.1918C>T
 CPUL: cáncer de pulmón, CP: cáncer de próstata, GB: glioblastoma, CM: cáncer de mama,
 CT: cáncer de tiroides, MEL: melanoma, COS: cáncer de ovario seroso

c) Fenotipo de las familias portadoras

CÁNCER DE MAMA				
Casos (%)	Edad mediana (rango)	CM Bilateral (%)	Subtipo histológico*	Subtipo molecular*
10 (67%)	42 (21-64)	2 (20%)	Ductal invasivo (8/12)	Luminal A (1/12)
				Triple negativo (6/12)
OTROS TIPOS DE CÁNCER				
Tipo de cáncer	Casos (%)	Edad mediana (rango)		
Ovario	3 (20%)	48 (47-60)		
Melanoma ϕ	1 (7%)	43		
Piel (basocelular)	1 (7%)	53		
Esófago	1 (7%)	60		
Colon ϕ	1 (7%)	57		
Portadores afectados: 15 (62%)				
Total de portadores: 24				
Familias portadoras: 10				

* Casos de cáncer de mama bilateral contabilizados como eventos independientes

ϕ Co-afectación de cáncer de mama y otros tumores en portadores

Tabla 30. Fenotipo asociado a los portadores de la variante genética c.1918C>T

La información fenotípica detallada de los portadores de la variante c.1918C>T se puede consultar en el **Anexo C7**. El perfil fenotípico predominante de las familias portadoras de esta variante fue el cáncer de mama unilateral de tipo ductal invasivo y subtipo molecular triple negativo, con una edad mediana de diagnóstico de 42 años con un rango de edad entre los 21 y 64 años. En relación a otros tipos de cáncer, se ha observado una discreta asociación de esta variante con el cáncer de ovario de tipo seroso, con una edad mediana de diagnóstico de 48 años con un rango de edad entre los 47 y 60 años. (Tabla 30).

d) Procedencia geográfica de las familias portadoras

La mayoría de las familias portadoras se concentran en dos zonas geográficas de la Región de Murcia representadas en la **Figura 43**: el área metropolitana y la cuenca de Mula.

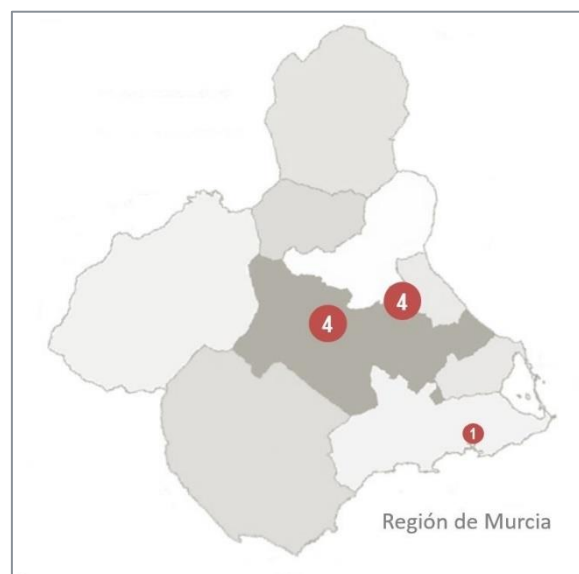


Figura 43. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.1918C>T
(Los círculos rojos indican el número de familias en cada área)

e) Análisis de haplotipos con marcadores microsatélites

Los marcadores seleccionados M1 (D17S855), M2 (17-3858), M3 (D17S1326) y M4 (17-3930) se genotipificaron en los 8 casos índice de las familias portadoras y en 20 controles sanos. La última familia portadora fue posteriormente detectada a la realización del estudio experimental, por lo que no pudo ser incluida en el análisis de

microsatélites. En la **Figura 44** se muestra el análisis de fragmentos de los distintos marcadores en uno de los casos índice. Se pudo comprobar que 8 de los portadores de la variante compartían el mismo haplotipo reflejado en la **Tabla 31** M1(139pb)-M2(122pb)-M3(89pb)-M4(308bp), excepto uno de ellos que presentaba variación en M4 (301pb). Esta diferencia fue comprobada en un familiar portador mostrando el mismo resultado (301pb). Por el contrario, este haplotipo común no se encontró en los controles sanos analizados, lo que indica que cosegrega con la mutación.

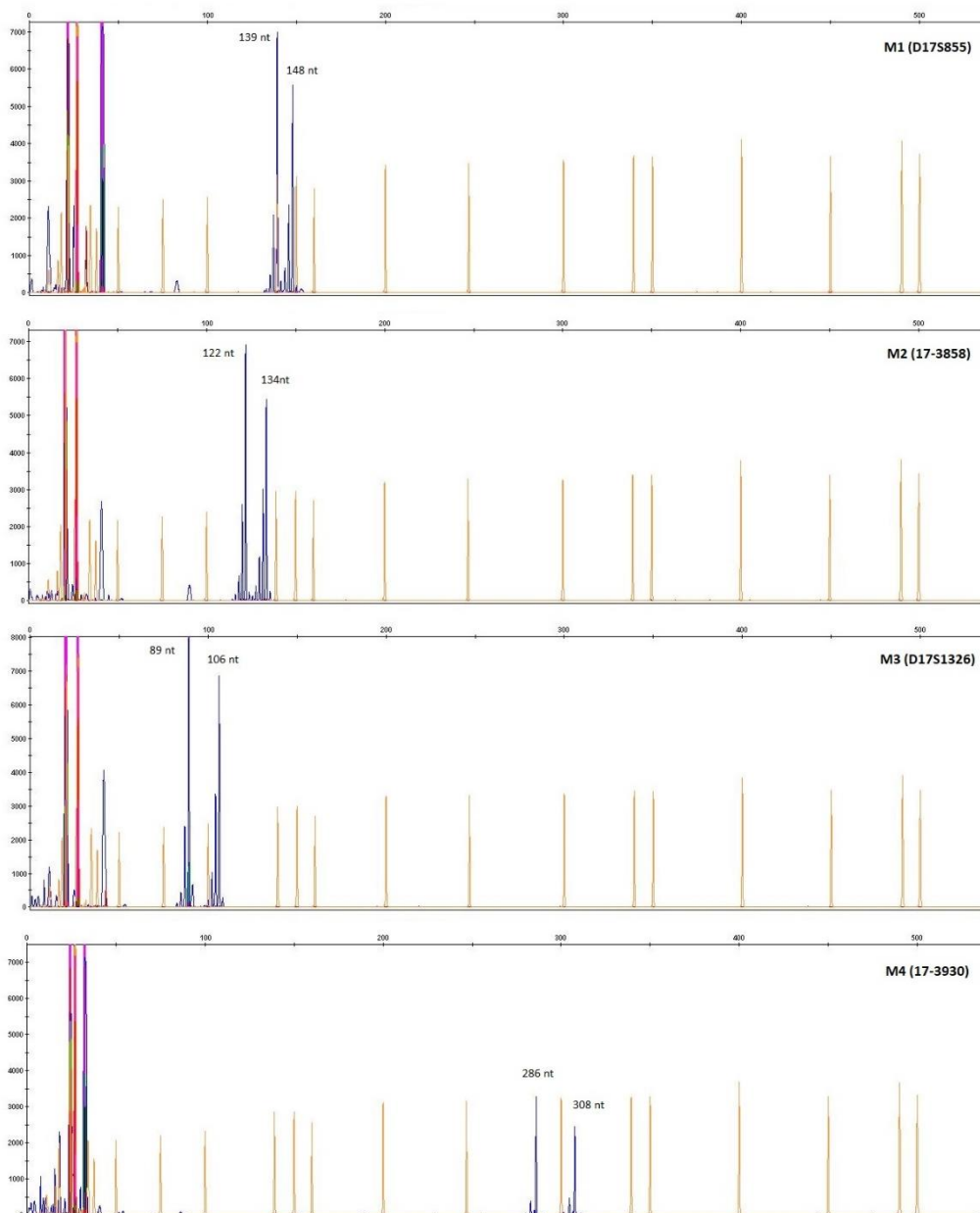


Figura 44. Patrón de picos obtenidos en el análisis de microsatélites de la variante c.1918C>T. Los picos azules se corresponden con los fragmentos amplificados mientras que los picos naranjas pertenecen al estándar de tamaño LIZ-500

	M1 (D17S855)		M2 (17-3858)		M3 (D17S1326)		M4 (17-3930)	
CI 1	139	144	122	126	89	108	308	298
CI 2	139	146	122	126	89	106	308	298
CI 3	139	146	122	114	89	102	308	301
CI 4	139	144	122	128	89	106	308	298
CI 5	139	148	122	134	89	106	308	286
CI 6	139	146	122	128	89	106	301	298
CI 7	139	146	122	118	89	89	308	289
CI 8	139	144	122	120	89	89	308	295

Tabla 31. Haplotipos obtenidos en los portadores de la variante c.1918C>T

(El haplotipo común aparece resaltado en verde) CI: caso índice, M: microsatélite

f) Cálculo de generaciones de la variante

Para el cálculo del número de generaciones que han transcurrido desde el momento en que se originó la variante hasta la actualidad, hemos utilizado los datos referentes al marcador susceptible de recombinación M4 (17-3930). En nuestro caso, el alelo recombinante está presente en 7 de los 8 portadores ($P_d=0,875$) y en 2 de los 48 alelos control ($P_n=0,036$). La fracción θ se determinó a partir de las distancias entre el marcador M4 y el gen *BRCA1*, siendo de $\theta=0,74$ Mb= $0,74$ cM = $7,4 \times 10^{-3}$ M (Figura 45). Por lo tanto $\delta = (0,875 - 0,036) / (1 - 0,036)$; $\delta = 0,869$. Por tanto, se estimó que la mutación tuvo lugar hace aproximadamente 18 generaciones, unos 360 años asumiendo 20 años por cada generación.

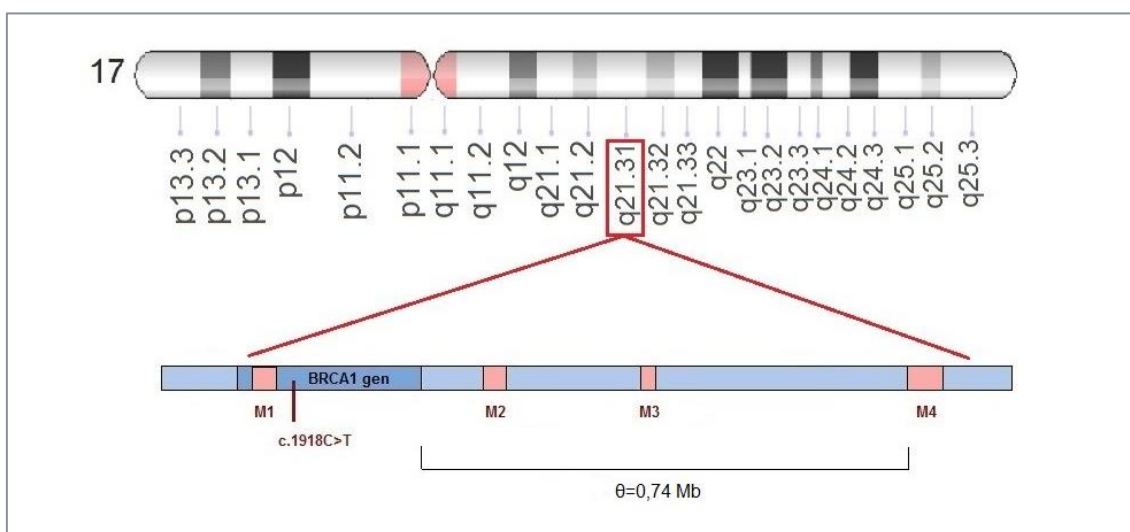


Figura 45. Distancia comprendida entre el marcador recombinante y el gen *BRCA1*

BRCA2: exon2del

La deleción del exón 2 reportada por primera vez en un estudio de grandes reordenamientos en *BRCA2* realizado en familias españolas (140), ha sido descrita en familias españolas de Cataluña (121) y de la Región de Murcia (141). Curiosamente, ambas publicaciones comparten una familia en común. El análisis de haplotipo realizado en familias catalanas respaldaba que se tratase de un gran reordenamiento con efecto fundador en nuestro país. Para constatar esta hipótesis, procedimos a realizar el análisis de haplotipos en las familias portadoras de nuestra población de estudio con los marcadores de microsatélites obtenidos del trabajo publicado por Ruiz de Garibay.

a) Caracterización molecular y clínica de la variante

De acuerdo a los criterios de la ACMG, ha sido clasificada en las bases de datos como patogénica al tratarse de un gran reordenamiento genómico que se corresponde con una deleción genómica de 486 pares de bases seguida de una inserción de un triplete (ATA) en el gen *BRCA2* (Figura 46).

Ruiz de Garibay y colaboradores demostraron mediante un análisis molecular de dicha variante por PCR *long-range*, la deleción heterocigota de ~500 pb en individuos MLPA positivos. El exón 2 incluido en dicha deleción se corresponde con el primer exón codificante y curiosamente, mediante un análisis de ADN complementario confirmaron que el alelo mutado es capaz de expresar una transcripción estable a niveles similares respecto al alelo *wildtype*, lo que parece indicar que el fragmento delecionado no contiene elementos promotores críticos para la expresión de *BRCA2*. Probablemente la traducción de este transcrito sea completamente abolida debido a la falta del codón de inicio situado 39 pb aguas arriba de la región 5'UTR. Sin embargo, según lo descrito no se puede descartar la posibilidad de que se forme otro producto de traducción mediante un codón de inicio alternativo. En este supuesto, el primer codón disponible se sitúa en el exón 4 (codón 124) que supondría la traducción de una proteína *BRCA2* carente de los primeros 123 aminoácidos (p.Met1_Lys123del) (121).

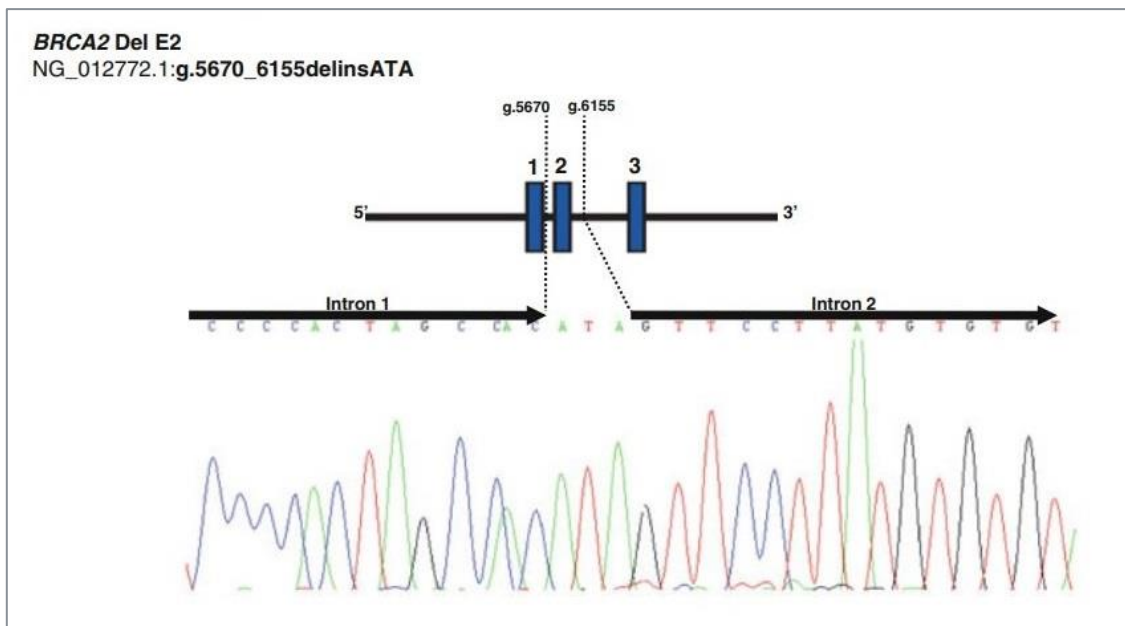


Figura 46. Caracterización molecular de la deleción del exón 2 como reordenamiento genómico (121)

b) Descripción de las familias portadoras

En la actualidad, este reordenamiento génico ha sido detectado en 12 familias de la Región de Murcia (3,6% de las familias *BRCA+* y 7,2% de las familias *BRCA2+*). A continuación, se muestra un árbol genealógico representativo de una familia portadora de dicha variante (Figura 47), incluyéndose los restantes en el Anexo D2.

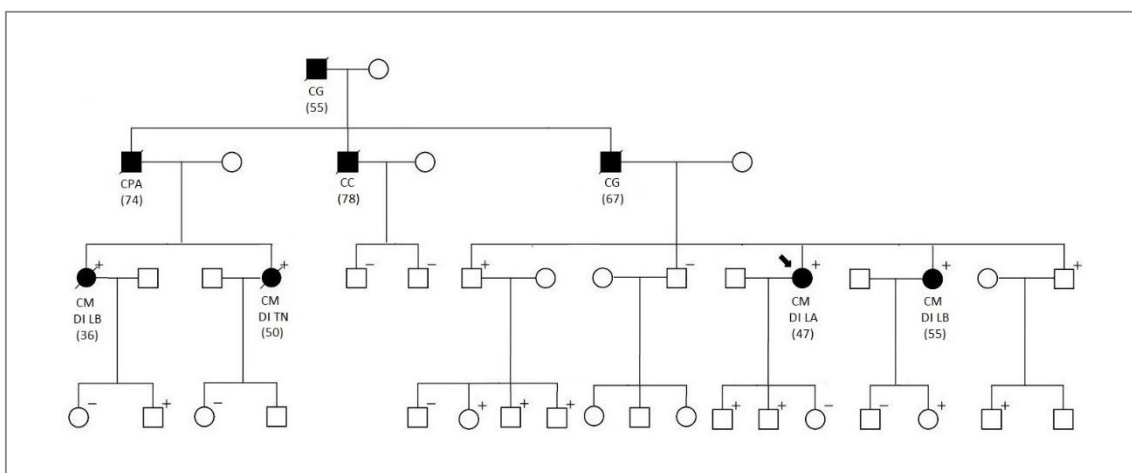


Figura 47. Árbol genealógico de una familia portadora de la deleción del exón 2

CG: cáncer gastrointestinal, CPA: cáncer de páncreas, CC: cáncer cerebral, CCR: cáncer colorrectal,

CM: cáncer de mama, DI: ductal invasivo, LA/LB: luminal A/B, TN: triple negativo

c) Fenotipo de las familias portadoras

La información fenotípica detallada de los portadores de la delección del exón 2 se puede consultar en el **Anexo C8**. El perfil fenotípico predominante de las familias portadoras de este reordenamiento genómico fue carcinoma de mama unilateral de tipo ductal invasivo y subtipo molecular luminal A (caracterizado por la positividad para los receptores hormonales y negatividad para la expresión de HER2). Esta variante se ha detectado en un varón diagnosticado de cáncer de mama a los 60 años y en 3 portadores afectados de cáncer de mama bilateral, siendo uno de ellos de tipo sincrónico. La edad mediana de diagnóstico de cáncer de mama en portadores fue de 43 años, con un rango de edad entre 27 y 81 años mientras que en los casos afectados de cáncer de ovario de tipo seroso, la edad mediana de diagnóstico fue de 71 años, con un rango entre los 67 y 75 años (Tabla 32).

CÁNCER DE MAMA				
Casos (%)	Edad mediana (rango)	CM Bilateral (%)	Subtipo histológico*	Subtipo molecular*
20 (87%)	43 (27-81)	3 (15%)	Ductal invasivo (20/23)	Luminal A (9/23)
				Luminal B (7/23)
				Triple negativo (3/23)
OTROS TIPOS DE CÁNCER				
Tipo de cáncer	Casos (%)	Edad mediana (rango)		
Ovario ^φ	2 (9%)	71 (67-75)		
Próstata	1 (4%)	53		
Vejiga	1 (4%)	69		
Glioblastoma	1 (4%)	80		
Portadores afectados: 23 (43%)				
Total de portadores: 53				
Familias portadoras: 12				

* Casos de cáncer de mama bilateral contabilizados como eventos independientes

^φ Co-afectación de cáncer de mama y ovario en portador

Tabla 32. Fenotipo de los portadores de la delección del exón 2

d) Procedencia geográfica de las familias portadoras

Las familias portadoras de la delección del exón 2 proceden de forma mayoritaria del Valle del Guadalentín, situado al suroeste de la Región de Murcia (Figura 48).

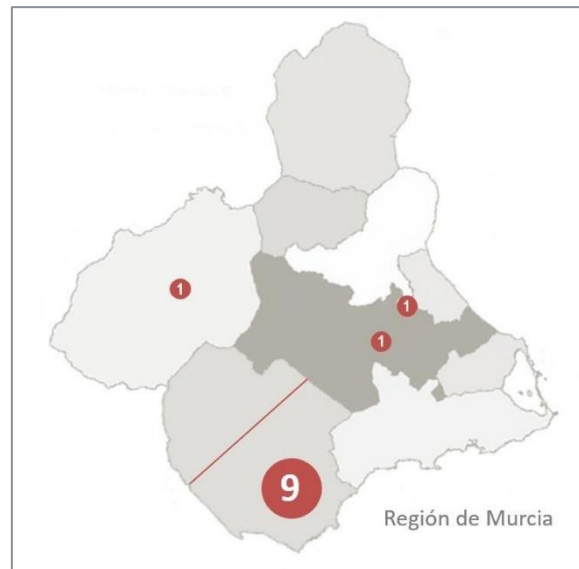


Figura 48. Origen geográfico de las familias portadoras de la delección del exón 2
(Los círculos rojos indican el número de familias en cada área)

e) Análisis de haplotipos con marcadores microsatélites

Los marcadores seleccionados M1 (D13S260), M2 (D13S1493), M3 (D13S153) se genotipificaron en los 12 casos índice de las familias portadoras y en 20 controles sanos. En la Figura 49 se muestra el análisis de fragmentos de los distintos marcadores en uno de los casos índice estudiados. Se pudo comprobar que 12 de los portadores de la variante compartían el mismo haplotipo reflejado en la Tabla 33 M1(161bp)-M2(223 bp), excepto dos de ellos que presentaba variación en M2 (227pb). Esta discrepancia fue comprobada en dos familiares portadores de ambas familias mostrando el mismo resultado (227pb). En M3 se pudo observar un mayor grado de variabilidad. Por el contrario, este haplotipo común no se encontró en los controles sanos analizados, lo que indica que cosegrega con la mutación.

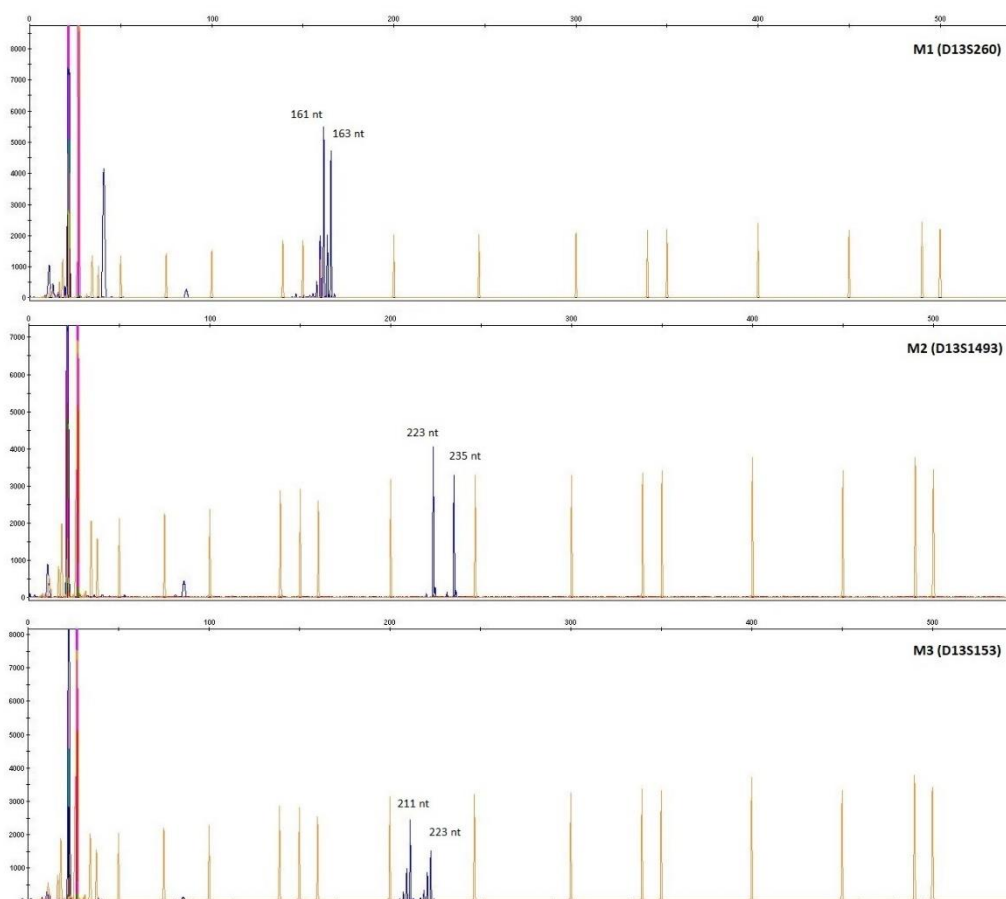


Figura 49. Patrón de picos obtenidos en el análisis de microsatélites de la delección del exón 2. Los picos azules se corresponden con los fragmentos amplificados mientras que los picos naranjas pertenecen al estándar de tamaño LIZ-500.

	M1 (D13S260)		M2 (D13S1493)		M3 (D13S153)	
CI 1	161	167	223	227	223	219
CI 2	161	160	223	235	226	226
CI 3	161	167	227	231	221	228
CI 4	161	161	223	227	223	219
CI 5	161	165	223	223	223	230
CI 6	161	163	223	223	211	219
CI 7	161	163	223	227	211	217
CI 8	161	163	223	227	223	219
CI 9	161	163	223	235	223	211
CI 10	161	157	223	223	211	219
CI 11	161	163	227	227	215	228
CI 12	161	157	223	235	215	219

Tabla 33. Haplotipos obtenidos en los portadores de la delección del exón 2

(El haplotipo común aparece resaltado en verde) CI: caso índice, M: microsatélite

f) Cálculo de generaciones de la variante

Para el cálculo del número de generaciones que han transcurrido desde el momento en que se originó la variante hasta la actualidad, hemos utilizado los datos referentes al marcador susceptible de recombinación M2 (D13S1493). En nuestro caso, el alelo recombinante está presente en 10 de los 12 portadores ($P_d=0,833$) y en 11 de los 52 alelos control ($P_n=0,211$). Por lo tanto $\delta = (0,833-0,211)/(1-0,211)$; $\delta=0,789$. La fracción θ se determinó a partir de las distancias entre el marcador M2 y el gen *BRCA2*, siendo de $\theta=1,03 \text{ Mb} = 1,03 \text{ cM} = 0,01 \text{ M}$ (Figura 50). Por tanto, se estimó que la mutación tuvo lugar hace aproximadamente 22 generaciones, unos 440 años asumiendo 20 años por cada generación.

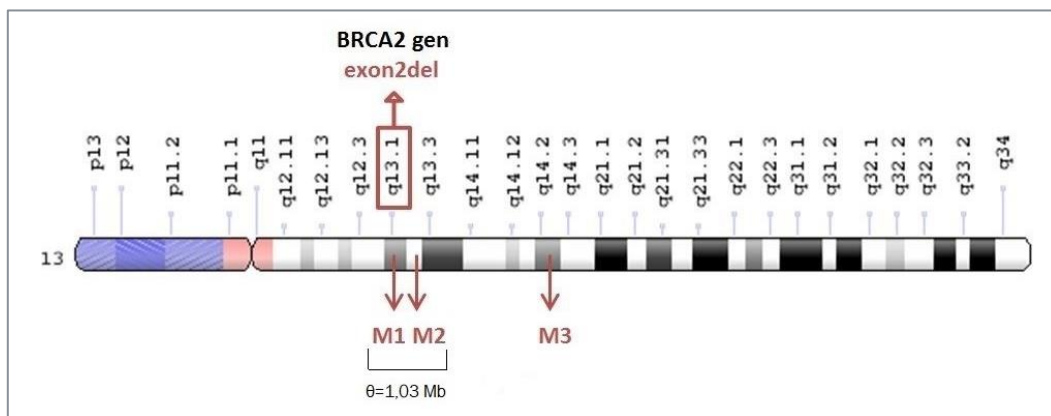


Figura 50. Distancia comprendida entre el marcador recombinante y el gen *BRCA2*

ATM: c.8251_8254del

La variante genética c.8251_8254del detectada en *ATM*, fue descrita previamente en una familia española en el artículo de Tavera-Tapia y colaboradores (142). Inicialmente, fue detectada en 4 familias procedentes de la Región de Murcia. Por este motivo, Castillo-Guardiola y colaboradores iniciaron un estudio de haplotipos con marcadores de microsatélites en regiones colindantes a la mutación y al gen *ATM* demostrando que compartían un ancestro común y, por lo tanto, fue considerada como mutación fundadora en nuestra región (143). Posteriormente, fueron detectadas 2 nuevas familias portadoras de esta variante, por lo que se decidió ampliar el estudio para constatar el efecto fundador en la Región de Murcia y completar información sobre el origen y la antigüedad de la variante genética.

a) Caracterización molecular y clínica de la variante

Variante de tipo *frameshift* que deleciona cuatro bases nucleotídicas (ACTA) en el exón 56 del gen *ATM* lo que produce un desfase en el marco de lectura que genera un codón de parada prematuro y la síntesis de una proteína truncada no funcional (p.Thr2751fs) con pérdida de los dominios funcionales (PI3-PI4 quinasa y FATC) (Figura 51).

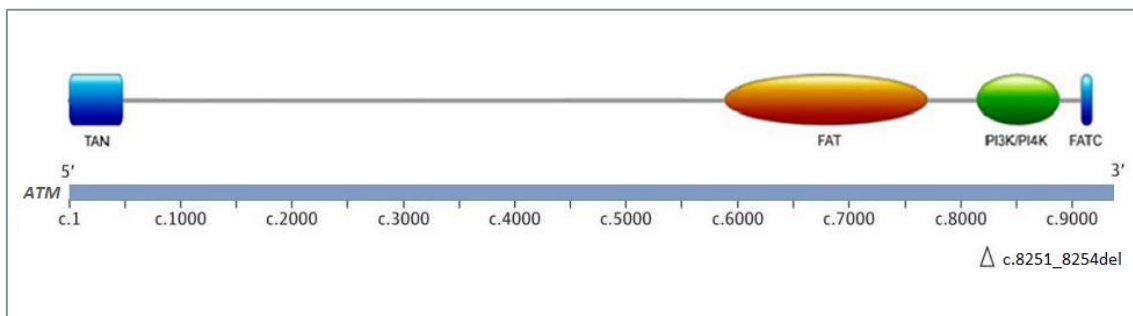


Figura 51. Representación de la variante c.8251_8254del junto a los dominios de la proteína ATM. Figura adaptada de Athanasakis E y col. (144)

De acuerdo a los criterios de la ACMG, ha sido clasificada en las bases de datos como patogénica (PP5) al tratarse de una variante nula en un gen en el cual la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad (PVS1) y ausente en controles en los diferentes estudios poblacionales (PM2).

b) Descripción de las familias portadoras

Actualmente, esta variante genética ha sido detectada en 8 familias de la Región de Murcia (32% de las familias *ATM+*). A continuación, se muestra un árbol genealógico representativo de una familia portadora de dicha variante (**Figura 52**), incluyéndose los restantes en el **Anexo D3**.

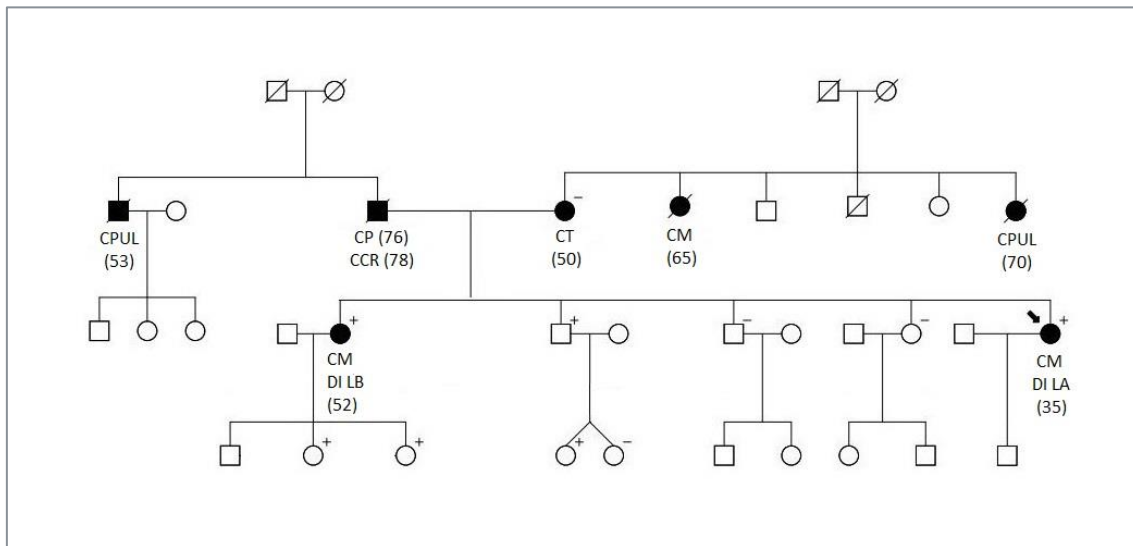


Figura 52. Árbol genealógico de una familia portadora de la variante c.8251_8254del

CPUL: cáncer de pulmón, CP: cáncer de próstata, CCR: cáncer colorrectal, CT: cáncer de tiroides, CM: cáncer de mama, DI: ductal invasivo, LA/LB: Luminal A/B

c) Fenotipo de las familias portadoras

La información fenotípica detallada de los portadores de la variante c.8251_8254del se puede consultar en el **Anexo C9**. El perfil fenotípico predominante asociado a las familias portadoras fue cáncer de mama unilateral de tipo ductal invasivo y subtipo molecular luminal A (caracterizado por la positividad para los receptores hormonales y negatividad para la expresión de HER2). Esta variante se ha observado en portadores afectados de tumores de múltiples orígenes y en dos mujeres diagnosticadas de carcinoma mamario bilateral metacrónico. Los resultados de la histopatología e inmunohistoquímica de los pacientes afectados de cáncer de mama bilateral han mostrado resultados discordantes en el tumor contralateral. La edad mediana de diagnóstico de cáncer de mama en portadores es de 48 años, con un rango de edad entre 33 y 90 años (**Tabla 34**).

CÁNCER DE MAMA				
Casos (%)	Edad mediana (rango)	CM Bilateral (%)	Subtipo histológico*	Subtipo molecular*
12 (80%)	48 (33-90)	2 (17%)	Ductal invasivo (10/14)	Luminal A (9/14) Luminal B (2/14) Triple negativo (1/14)
OTROS TIPOS DE CÁNCER				
Tipo de cáncer	Casos (%)	Edad mediana		
Ovario ^φ	1 (7%)	58		
Cérvix ^φ	1 (7%)	57		
Linfoma	1 (7%)	63		
Melanoma	1 (7%)	68		
Pulmón ^φ	1 (7%)	69		
Vejiga	1 (7%)	71		
Portadores afectados: 15 (56%)				
Total de portadores: 27				
Familias portadoras: 8				

* Casos de cáncer de mama bilateral contabilizados como eventos independientes

^φ Co-afectación de cáncer de mama y otros tumores en portadores

Tabla 34. Fenotipo asociado a los portadores de la variante c.8251_8254del

d) Procedencia geográfica de las familias portadoras

La mayoría de las familias portadoras se concentran en dos zonas geográficas de la Región de Murcia representadas en la **Figura 53**: el área metropolitana y en el municipio de Cartagena.

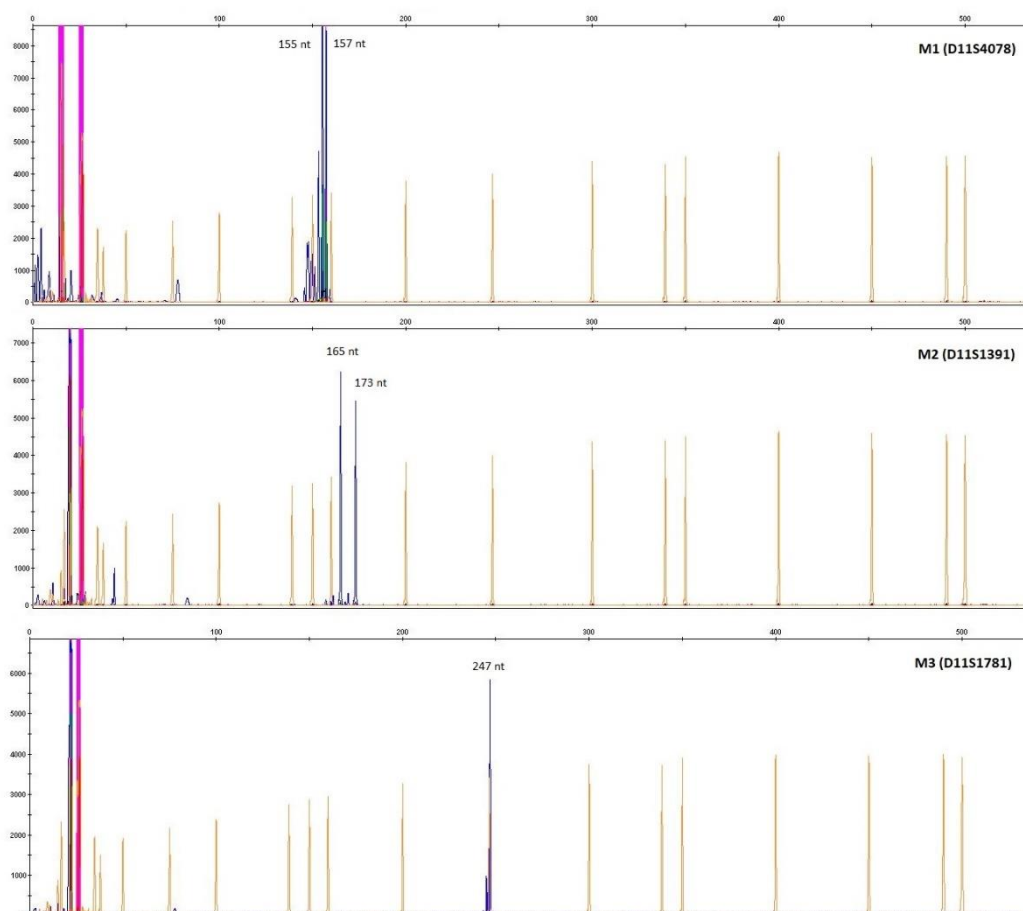


Figura 53. Origen geográfico de las familias portadoras de la variante c.8251_8254del

(Los círculos rojos indican el número de familias en cada área)

e) Análisis de haplotipos con marcadores microsatélites

Los marcadores seleccionados M1 (D11S4078), M2 (D11S1391), M3 (D11S1781), M4 (D11S1390), M5 (D11S4176) y M6 (D11S4197) se genotipificaron en 18 portadores pertenecientes a las 6 familias incluidas en el estudio y en 20 controles sanos. En la **Figura 54** se muestra el análisis de fragmentos de los distintos marcadores en uno de los casos índice estudiados. Se pudo comprobar que un total de 16 portadores pertenecientes a 5 familias compartían un alelo en M1(157pb)-M2(173pb)-M3(247pb)-M4(155pb) mientras que los 2 portadores restantes pertenecientes a la misma familia presentaron una variación en el primer microsatélite M1(155pb)-M2(173pb)-M3(247pb)-M4(155pb). Por el contrario, este haplotipo común no se encontró en los controles sanos analizados, lo que indica que cosegrega con la mutación. En la **Figura 55** se muestran los árboles genealógicos de las familias junto con el análisis de haplotipo. Puesto que las dos últimas familias portadoras fueron posteriormente detectadas a la realización del estudio experimental, no pudieron ser incluidas en el análisis de microsatélites.



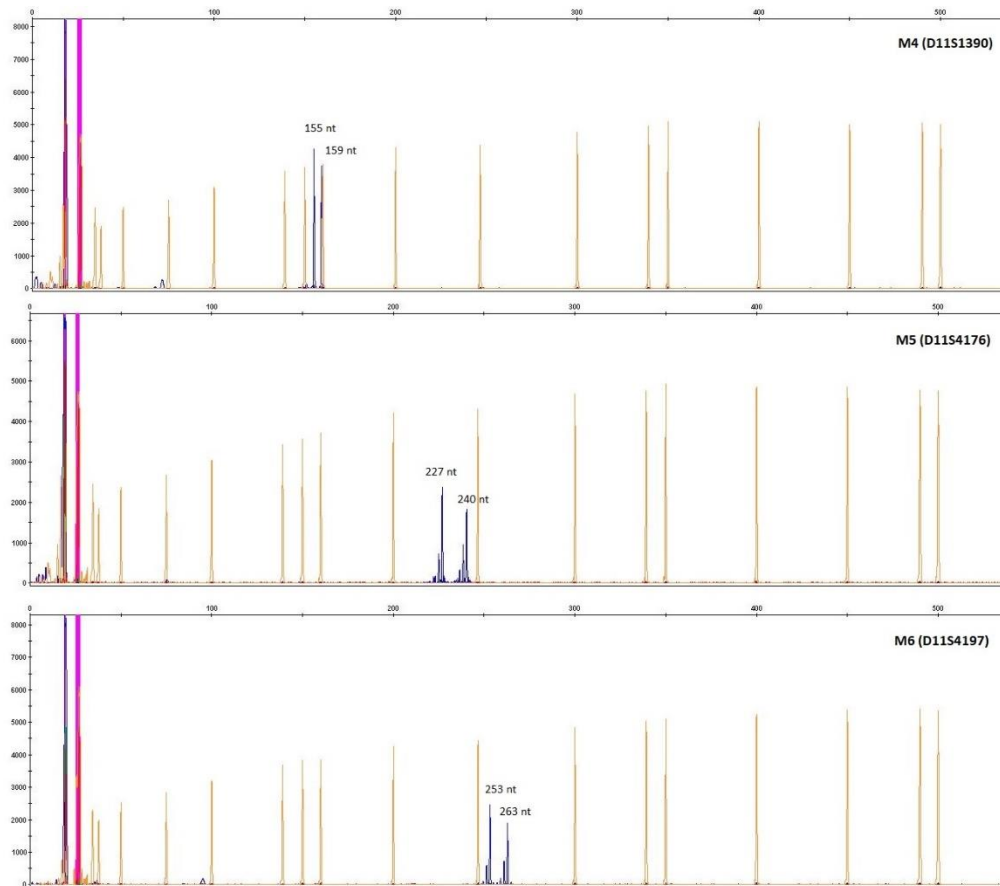


Figura 54. Patrón de picos obtenidos en el análisis de microsatélites de la variante c.8251_8254del. Los picos azules se corresponden con los fragmentos amplificados mientras que los picos naranjas pertenecen al estándar de tamaño LIZ-500

f) Cálculo de generaciones de la variante

Para el cálculo del número de generaciones que han transcurrido desde el momento en que se originó la variante hasta la actualidad, hemos utilizado los datos referentes a los marcadores susceptibles de recombinación M1 (D11S4078) y M5 (D11S4176). El alelo 157pb de M1 se encontró en 16 de los 18 portadores ($Pd=16/18=0,889$) y en 5 de los 58 alelos control ($Pn=0,086$). Por otro lado, el alelo 238pb en M5 se encontró en 4 de los 18 afectados ($Pd=0,222$) y en 4 de los 58 alelos control ($Pn=0,069$). A partir de estos datos, se realizó el cálculo del desequilibrio de ligamiento (δ) para los marcadores M1 y M5, siendo 0,878 y 0,165 respectivamente. La fracción θ se determinó a partir de las distancias entre los marcadores y el gen *ATM*, siendo de $\theta=4 \text{ Mb} =4 \text{ cM}=0,04 \text{ M}$ para M1 y de $\theta=14 \text{ Mb} =14 \text{ cM}=0,14 \text{ M}$ para M5 (Figura 56). Según estos datos, se estimó que la mutación tuvo lugar hace aproximadamente 7 generaciones, unos 140 años asumiendo 20 años por cada generación.

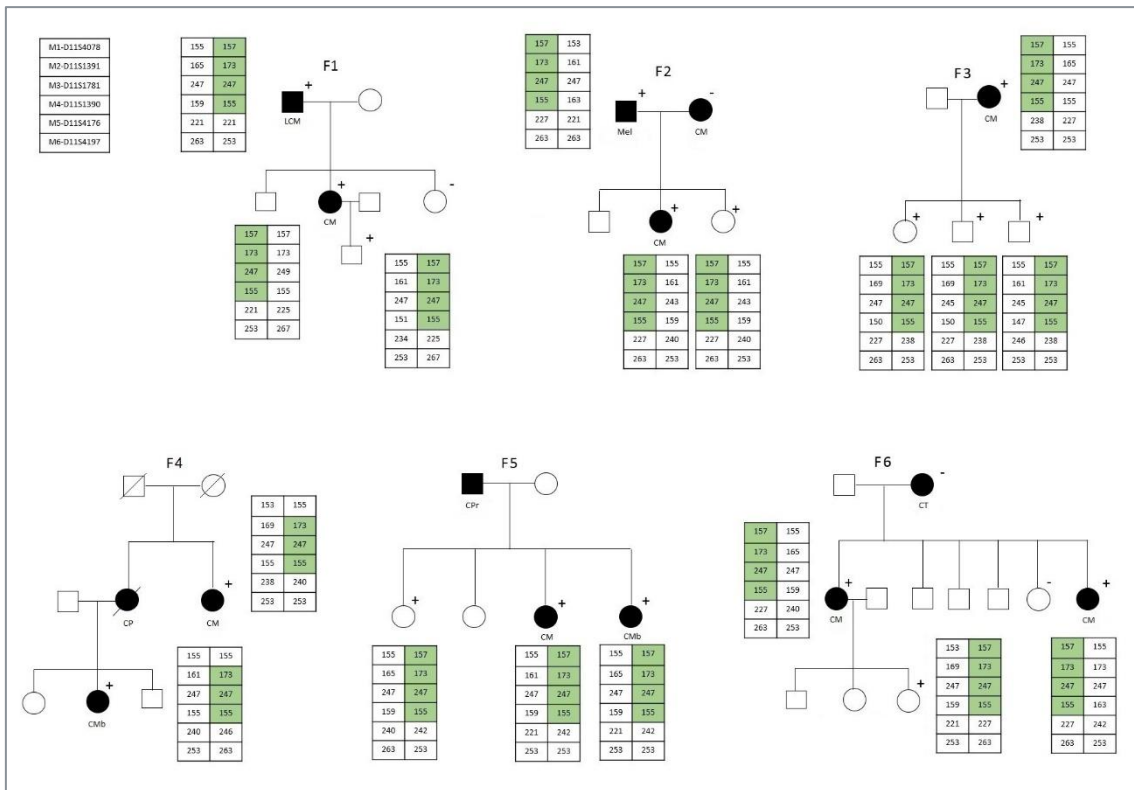


Figura 55. Haplotipo de los portadores de la variante c.8251_8254del (El haplotipo común aparece resaltado en verde) CM: cáncer de mama, CMB: cáncer de mama bilateral, CP: cáncer de páncreas, CPR: cáncer de próstata, CT: cáncer de tiroides, LCM: linfoma células del manto, Mel: melanoma

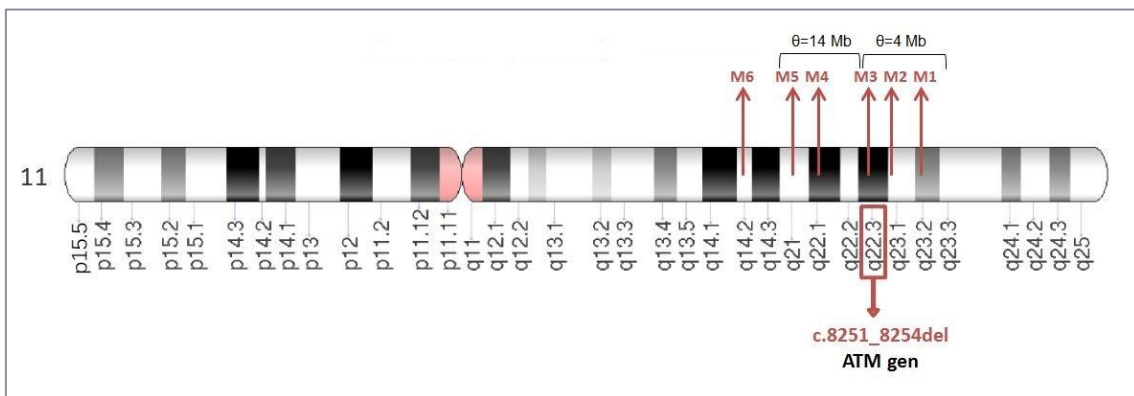


Figura 56. Distancia comprendida entre los marcadores recombinantes y el gen ATM

2. ESTUDIO DE VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO

En la presente tesis doctoral se registraron las VUS detectadas en el análisis de los genes *BRCA1/2* y aquellas obtenidas del estudio genético mediante panel de genes a los pacientes con resultado no informativo seleccionados de acuerdo a los criterios del Comité de Asesoramiento Genético. Se registraron un total de 141 familias portadoras de 115 VUS detectadas en genes clínicamente accionables, siendo la mayoría de tipo *missense*. La distribución por genes se muestra en la **Figura 57**. Al igual, que en el caso de las variantes patogénicas, los principales genes en los que se hallaron VUS fueron *BRCA1/2*, seguido de los genes de moderada penetrancia *ATM* y *CHEK2*.

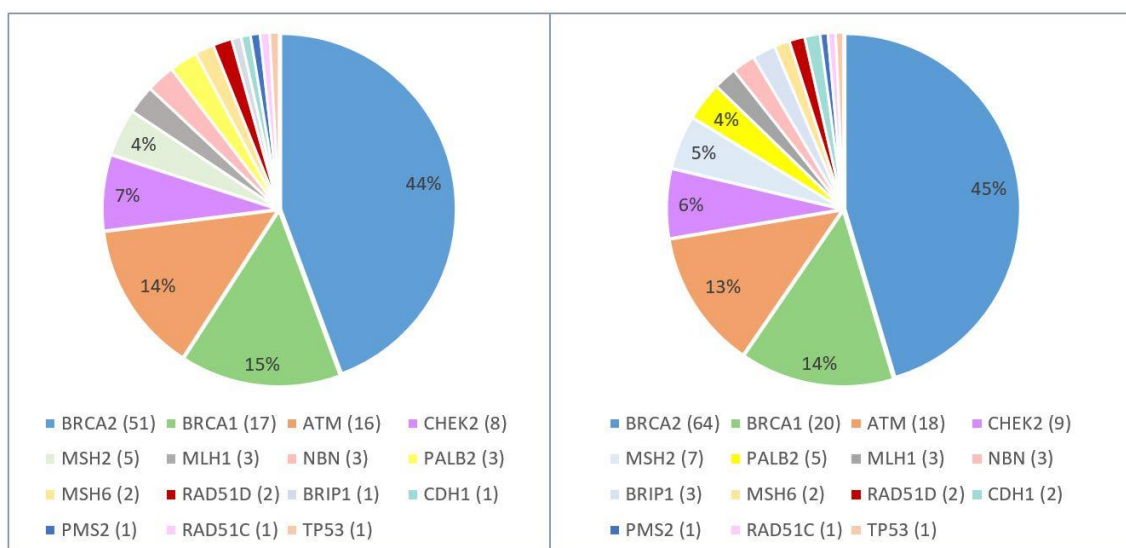


Figura 57. Distribución por genes de las variantes de significado clínico incierto (VUS). La imagen de la izquierda representa las VUS detectadas en cada gen mientras que la imagen de la derecha muestra las familias portadoras de VUS por gen, indicando respectivamente entre paréntesis el número total de VUS y de familias portadoras de VUS correspondientes a cada uno de los genes

2.1. RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO

Posteriormente, se realizó una reevaluación de las 115 VUS registradas consultando diversas bases de datos y herramientas bioinformáticas *in silico*, además de investigar si existían nuevas evidencias científicas en la bibliografía disponible que permitiesen reclasificar dichas variantes (**Tablas 35 y 36**). Un total de 7 variantes fueron reclasificadas como benignas o probablemente benignas y 1 variante como probablemente patogénica, mientras que el 93% del total de variantes se mantuvieron como VUS a pesar de los esfuerzos empleados en el proceso de reclasificación.

2.2. PRIORIZACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO

Del total de VUS reclasificadas como tal, se realizó una priorización de aquellas con mayor riesgo de resultar patogénicas y, por tanto, en las que sería recomendable realizar estudios complementarios para determinar su efecto clínico. En total se priorizaron 16 del total de VUS (15%), de las cuales aparecen señaladas en negrita aquellas priorizadas para su posterior estudio de *splicing* (Tabla 37). La distribución por genes de VUS priorizadas se muestra en la Figura 58.

Del mismo modo, consideramos adecuado realizar un seguimiento de los portadores de las VUS priorizadas registrando el fenotipo asociado y la historia oncológica familiar.

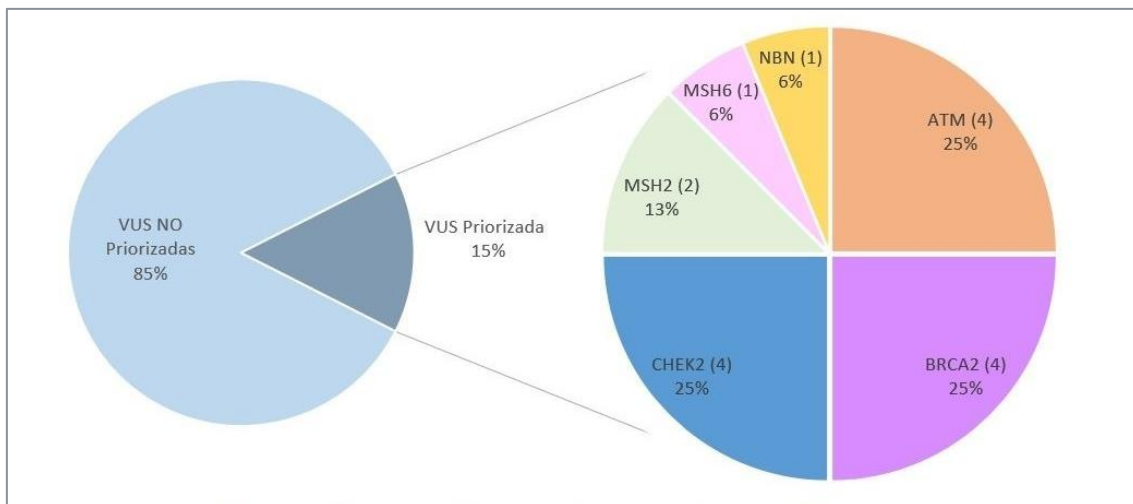


Figura 58. Distribución por genes de las variantes de significado clínico desconocido priorizadas

Resulta interesante destacar las evidencias científicas que apoyan la posible patogénicidad de las variantes priorizadas de acuerdo a la bibliografía disponible:

- * La variante c.967A>G produce un cambio de isoleucina por valina en el residuo 323 de la proteína ATM. Aunque las herramientas bioinformáticas utilizadas proporcionan predicciones discordantes, se debería considerar su posible patogénicidad ya que en la bibliografía consultada se ha descrito en pacientes con ataxia telangiectasia y se ha clasificado como deletérea al afectar a la funcionalidad de la proteína (145–148).
- * La variante c.6067G>A produce un cambio de glicina por arginina en el residuo 2023 de la proteína ATM. La mayoría de las herramientas bioinformáticas utilizadas

apoyan su patogenicidad. Esta variante fue descrita en pacientes con cáncer de mama en estudios previos prediciéndose como potencialmente patogénica pero no se ha confirmado con estudios funcionales o de casos-controles (149–151). Por lo tanto, se requieren estudios complementarios que aporten conclusiones sobre su efecto deletéreo y su posible asociación con un mayor riesgo de cáncer.

- * La variante c.4594G>T reemplaza la valina con fenilalanina en el codón 1532 de la proteína BRCA2. La mayoría de las herramientas bioinformáticas apoyan la patogenicidad de esta variante descrita en pacientes con cáncer de mama. Los estudios experimentales han demostrado que la valina 1532 juega un papel importante en la interacción entre BRCA2 y RAD51 y, por lo tanto, la variante V1532F debilita la interacción de BRCA2 con RAD51 afectando a la funcionalidad de la proteína BRCA2 (152). Por tanto, se debería considerar su posible patogenicidad de acuerdo a los estudios funcionales descritos en la bibliografía.
- * La variante c.442A>G produce un cambio de arginina por glicina en el residuo 148 de la proteína CHEK2. Las herramientas *in silico* no predicen un impacto significativo en el *splicing*, a pesar de producirse el cambio a tres nucleótidos del final del segundo exón codificante. Sin embargo, la predicción computacional y un estudio funcional *in vivo* realizado en levaduras por Delimitsou A. y colaboradores sugieren que esta variante puede tener un impacto nocivo en la función de la proteína (153). Además, debería considerarse su posible patogenicidad ya que en la bibliografía consultada se ha descrito en pacientes con antecedentes personales y/o familiares de cáncer de mama y de ovario hereditario (108).
- * La variante c.1427C>T produce un cambio de treonina por metionina en el residuo 476 de la proteína CHEK2 y ha sido descrita en pacientes con cáncer de mama pero también en cáncer colorrectal (154,155). La mayoría de las herramientas bioinformáticas y un estudio funcional *in vivo* realizado en levaduras por Roeb W. y colaboradores la predicen deletérea (156,157). Además, el fenotipo alarmante del caso índice perteneciente a nuestro estudio (cáncer de mama a los 21 años), justifica la necesidad confirmar su patogenicidad mediante un estudio de cosegregación de la variante.

GEN	Exón/ Intrón	HGVS (ADNC)	HGVS (proteína)	refSNP	Tipo de variante	ClinVar	HGMD	Varsome	Criterios ACMG	Reclasificación
BRCA1	10	c.1571C>T	p.Ala524Val	rs80357333	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP3	VUS
		c.1631A>C	p.Gln544Pro	rs397508892	<i>missense</i>	VUS	VPP	VUS	PM2	VUS
		c.2018_2023del	p.Glu673_Pro674del	rs879254165	<i>In-frame deletion</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , PM4	VUS
		c.2397T>A	p.Asn799Lys	rs80357203	<i>missense</i>	VUS	ND	VPB	PM2 , BP3 + BP4	VUS
		c.2534T>C	p.Ile845Thr	rs397508976	<i>missense</i>	VUS	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.2634A>G	p.Ala878=	rs730881451	<i>synonymous</i>	VPB	ND	VB	BP4 + BP6 + BP7	VPB
		c.2770A>G	p.Asn924Asp	rs760877199	<i>missense</i>	VPB	ND	VPB	PM2 , BP3 + BP4	VPB
		c.3433G>T	p.Val1145Phe	rs431825396	<i>missense</i>	VUS	VUS	VUS	PM2 , PP3	VUS
		c.3605A>G	p.Tyr1202Cys	ND	<i>missense</i>	ND	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.3759T>A	p.Ser1253=	ND	<i>synonymous</i>	VPB	ND	VPB	BP4 + BP6 + BP7	VPB
	c.3889T>A	p.Ser1297Thr	rs1450793674	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 + PM5 , PP3	VUS	
	c.3928A>G	p.Thr1310Ala	rs2053499046	<i>missense</i>	VUS	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS	
	12	c.4251G>T	p.Val1417=	ND	<i>synonymous</i>	ND	ND	VPB	BP4 + BP7	VUS
	14	c.4582C>G	p.Leu1528Val	rs2052603566	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
	15	c.4882A>G	p.Met1628Val	rs80357465	<i>missense</i>	VUS(2); VB(2); VPB(7)	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
18	c.5174A>G	p.Glu1725Gly	rs2051862353	<i>missense</i>	-	ND	VUS	PM2	VUS	
23	c.5507_5508del	p.Glu1836ValfsTer43	ND	<i>frameshift</i>	ND	DM	VPP	PVS1 , PM2	VPP	

GEN	Exón/ Intrón	HGVS (ADNc)	HGVS (proteína)	refSNP	Tipo de variante	ClinVar	HGMD	Varsome	Criterios ACMG	Reclasificación
BRCA2	3	c.179A>G	p.Asn60Ser	rs80358463	missense	VUS(4); VB(2); VPB(4)	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.280C>T	p.Pro94Ser	rs80358531	missense	VUS(6); VPB(5)	VUS	VUS	PM2	VUS
	IN 5	c.475+14C>T	-	rs55698822	intrónica	VPB	ND	VPB	BP4 + BP6	VPB
	9	c.754G>A	p.Asp252Asn	rs549269828	missense	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
	10	c.811G>A	p.Gly271Arg	rs786204274	missense	VUS(7); VPB(2)	ND	VUS	PM2	VUS
		c.1564G>C	p.Gly522Arg	rs80358442	missense	VUS(4); VPB(5)	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.1598C>T	p.Thr533Ile	rs781763239	missense	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.1717G>A	p.Ala573Thr	rs761411987	missense	ND	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.1763A>G	p.Asn588Ser	rs373400041	missense	VP(1); VUS(7); VPB(1)	VPP	VUS	PM2	VUS
		c.1803A>G	p.Lys601=	ND	synonymous	ND	VUS	VPB	BP4 + BP7	VUS
	11	c.2119G>A	p.Asp707Asn	rs80358487	missense	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.2176G>A	p.Val726Ile	No descrita	missense	ND	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.2464T>C	p.Cys822Arg	rs80358512	missense	VUS	VUS	VPB	PM2 , BP3 + BP4	VUS
		c.2944A>C	p.Ile982Leu	rs28897717	missense	VUS(3); VB(2); VPB(3)	VUS	VPB	PM2 , BP6 + BP4	VUS
		c.3032C>G	p.Thr1011Arg	rs80358548	missense	VP(1); VUS(7); VPB(3)	VUS	VUS	PM2 , PP3	VUS
		c.3088T>G	p.Phe1030Val	rs80358554	missense	VUS(6); VPB(1)	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.3299A>T	p.Asn1100Ile	rs80358575	missense	VUS(8); VPB(1)	VUS	VUS	PM2	VUS
		c.3302A>G	p.His1101Arg	rs398122761	missense	VUS(5); VPB(2)	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS

GEN	Exón/ Intrón	HGVS (ADNc)	HGVS (proteína)	refSNP	Tipo de variante	ClinVar	HGMD	Varsome	Criterios ACMG	Reclasificación
BRCA2	11	c.3461C>T	p.Thr1154Ile	rs786202212	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.3482A>G	p.Asp1161Gly	rs1060502458	<i>missense</i>	VPB	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.3767A>C	p.His1256Pro	rs80358618	<i>missense</i>	VUS(4); VPB(1)	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.4132A>G	p.Thr1378Ala	rs1204269313	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.4256A>C	p.Lys1419Thr	ND	<i>missense</i>	ND	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.4315G>A	p.Ala1439Thr	rs80358666	<i>missense</i>	VUS(6); VPB(1)	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.4316C>A	p.Ala1439Asp	rs80358667	<i>missense</i>	VUS(7); VPB(1)	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.4396T>A	p.Leu1466Ile	rs1555283763	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.4594G>T	p.Val1532Phe	rs80358693	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , PP3	VUS
		c.5027G>A	p.Ser1676Asn	rs876660686	<i>missense</i>	VUS	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.5328G>A	p.Leu1776=	ND	<i>synonymous</i>	ND	ND	VPB	BP4 + BP7	VUS
		c.5353A>G	p.Thr1785Ala	rs786202394	<i>missense</i>	VUS	ND	VPB	PM2 , BP3 + BP4	VUS
		c.5870T>C	p.Ile1957Thr	rs587782320	<i>missense</i>	VUS(4); VPB(1)	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.5894T>G	p.Leu1965Arg	ND	<i>missense</i>	ND	ND	VPB	PM2 , BP3 + BP4	VUS
		c.6125A>G	p.Gln2042Arg	rs80358852	<i>missense</i>	VUS(4); VPB(3)	ND	VPB	PM2 , BP3 + BP4	VUS
		c.6293C>T	p.Ser2098Phe	rs80358867	<i>missense</i>	VUS(6); VPB(1)	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.6443C>A	p.Ser2148Tyr	rs80358880	<i>missense</i>	VUS(3); VPB(5)	VUS	VPB	PM2 , BP3 + BP4	VUS
c.6550C>G	p.Gln2184Glu	rs80358887	<i>missense</i>	VUS(4); VPB(2)	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS		

GEN	Exón/ Intrón	HGVS (ADNc)	HGVS (proteína)	refSNP	Tipo de variante	ClinVar	HGMD	Varsome	Criterios ACMG	Reclasificación
BRCA2	11	c.6665A>G	p.Tyr2222Cys	rs397507875	<i>missense</i>	VUS(9); VPB(1)	VPP	VUS	PM2 , BP4 , PP5	VUS
	IN 13	c.7008-14del	-	rs1064794191	intrónica	VPB	ND	VPB	BP6	VPB
	14	c.7271G>C	p.Arg2424Thr	rs756057155	<i>missense</i>	VUS	ND	VPB	PM2 , BP3 + BP4	VUS
		c.7394C>T	p.Ala2465Val	rs80358960	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
	15	c.7559G>T	p.Arg2520Leu	rs80358982	<i>missense</i>	VUS(2); VPB(1)	VUS	VUS	PM2 , PP3	VUS
	18	c.8077A>G	p.Ile2693Val	rs1060502493	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.8098A>G	p.Ile2700Val	rs80359053	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
	21	c.8723T>G	p.Val2908Gly	rs28897753	<i>missense</i>	VPB	VUS	VUS	PM2 , PP3 , BP6	VUS
	22	c.8854A>G	p.Met2952Val	rs397508016	<i>missense</i>	VUS(3); VB(1); VPB(1)	VPP	VUS	PM2 , BP4	VUS
	23	c.9006A>T	p.Glu3002Asp	rs80359153	<i>missense</i>	VUS(3); VPB(3)	ND	VUS	PM2 + PM5 , PP3	VUS
	25	c.9275A>G	p.Tyr3092Cys	rs80359195	<i>missense</i>	VUS(2); VB(1); VPB(9)	VPP	VUS	PM2 , PP3	VUS
	26	c.9514C>T	p.Leu3172Phe	ND	<i>missense</i>	ND	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
	26	c.9573G>C	p.Trp3191Cys	rs398122617	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
	27	c.10151G>A	p.Arg3384Gln	rs80358397	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
		c.10043insA	p.Asn3348fsTer20	ND	<i>frameshift</i>	ND	ND	VPP	PVS1 , PM2	VUS

Tabla 35. Reclasificación de las variantes de significado clínico desconocido obtenidas del estudio genético mediante el análisis de los genes *BRCA1/2*. Las variantes que aparecen en negrita son aquellas que han sido reclasificadas. ND: no descrita, VUS: variante de significado clínico desconocido, VPB: variante probablemente benigna, VB: variante benigna, VPP: variante probablemente patológica, VP: variante patológica

GEN	Exón/ Intrón	HGVS (ADNc)	HGVS (proteína)	refSNP	Tipo de variante	ClinVar	HGMD	Varsome	Criterios ACMG	Reclasificación
ATM	6	c.610G>A	p.Gly204Arg	rs147915571	missense	VUS(9); VPB(2)	VUS	VUS	PM2	VUS
	8	c.967A>G	p.Ile323Val	rs587781511	missense	VP/VPP	VPP	VUS	PM2 , PP5	VUS
	IN 8	c.1066-6T>G	-	rs201686625	intrónica	VB	VUS	VPB	BS1 + BS2 , BP6 , PP5	VB
	9	c.1229T>C	p.Val410Ala	rs56128736	missense	VUS(3); VB(6); VPB(11)	VUS	VUS	PM2 , BP6	VUS
	15	c.2289T>A	p.Phe763Leu	rs34231402	missense	VUS(3); VB(5); VPB(6)	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
	20	c.2944C>T	p.Arg982Cys	rs587779830	missense	VUS	VUS	VUS	PM2 , PP3	VUS
	22	c.3277A>G	p.Ile1093Val	rs876659667	missense	VUS	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
	IN 23	c.3402+3A>C	-	rs786203688	intrónica	ND	ND	VUS	PM2 + PM4 , PP3	VUS
	29	c.4388T>G	p.Phe1463Cys	rs138327406	missense	VUS(3); VB(6); VPB(6)	VUS	VB	BS1 + BS2 , PP3	VUS
	40	c.5975A>C	p.Lys1992Thr	rs150757822	missense	VUS(7); VB(2); VPB(6)	VUS	VUS	PM2	VUS
	41	c.6067G>A	p.Gly2023Arg	rs11212587	missense	VUS(7); VB(3); VPB(10)	VUS	VP	PS1 , PM2 , PP3 + PP5	VUS
	IN 45	c.6572+11C>T	-	rs368049107	intrónica	VPB	ND	VPB	BP4 + BP6	VPB
	49	c.7187C>G	p.Thr2396Ser	rs370559102	missense	VUS(8); VB(2); VPB(3)	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
	51	c.7618G>A	p.Val2540Ile	rs35203200	missense	VUS(11); VPB(1)	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
	56	c.8207A>G	p.Asn2736Ser	rs1190456608	missense	VUS	VUS	VUS	PM2 , PP3	VUS
58	c.8495G>A	p.Arg2832His	rs529296539	missense	VUS	VUS	VP	PM2 + PM5	VUS	
BRIP1	15	c.2220G>T	p.Gln740His	rs45589637	missense	VUS(16); VPB(6)	VUS	VUS	PM2 , BS3	VUS
CDH1	7	c.854C>T	p.Thr285Ile	rs587781634	missense	VUS	ND	VUS	BS1	VUS

GEN	Exón/ Intrón	HGVS (ADNc)	HGVS (proteína)	refSNP	Tipo de variante	ClinVar	HGMD	Varsome	Criterios ACMG	Reclasificación
CHEK2	2	c.134C>T	p.Thr45Met	rs558321010	missense	VUS	ND	VUS	PM2	VUS
	IN 3	c.320-5T>A	-	rs121908700	intrónica	VUS(7); VB(2); VPB(6)	VUS	VUS	PM2 + PM4, PP3	VUS
	4	c.442A>G	p.Arg148Gly	rs876660482	missense	VUS	VUS	VUS	PM2, PP3	VUS
	10	c.1008G>A	p.Gln336Gln	rs201544715	synonymous	VUS(6); VPB(1)	ND	VUS	PM2, PP3	VUS
	12	c.1216C>T	p.Arg406Cys	rs587782527	missense	VUS(8); VPB(1)	VUS	VUS	PM2	VUS
	14	c.1427C>T	p.Thr476Met	rs142763740	missense	VUS(12); VPP(15)	VPP	VP	PS3, PP3 + PP5, PM2 + PM5	VUS
	15	c.1489G>A	p.Asp497Asn	rs143965148	missense	VUS(3); VPB(5)	VUS	VPB	BS3, BP4, PM2	VUS
16	c.1562G>A	p.Arg521Gln	rs373959274	missense	VUS	VUS	VUS	PM2	VUS	
MLH1	2	c.157G>A	p.Glu53Lys	rs63751199	missense	VUS	ND	VUS	PM2, PP3	VUS
	5	c.386G>A	p.Ser129Asn	rs755678310	missense	VUS	ND	VUS	PM2, BP4	VUS
	11	c.976G>T	p.Val326Leu	ND	missense	VUS	ND	VUS	PM2 + PM5, PP3	VUS
MSH2	3	c.470G>C	p.Gly157Ala	rs765489269	missense	VUS	ND	VUS	PM2, PP3	VUS
	6	c.1045C>G	p.Pro349Ala	rs267607939	missense	VP(1); VUS(6); VPB(4)	VPP	VPP	PM2 + PM5, PP3	VUS
	7	c.1130A>G	p.Gln377Arg	rs776174711	missense	VUS	ND	VUS	PM2, PP3	VUS
	9	c.1405C>G	p.Leu469Val	rs780702096	missense	VUS	VUS	VUS	PM2	VUS
	12	c.1787A>G	p.Asn596Ser	rs41295288	missense	VUS(6); VB(3); VPB(5)	VUS	VUS	PM2, BP6	VUS
MSH6	4	c.2281A>G	p.Arg761Gly	rs199876321	missense	VUS	ND	VUS	PM2, PP3	VUS
	9	c.3883C>T	p.Pro1295Ser	ND	missense	VUS	ND	VUS	PM2, PP3	VUS

GEN	Exón/ Intrón	HGVS (ADNc)	HGVS (proteína)	refSNP	Tipo de variante	ClinVar	HGMD	Varsome	Criterios ACMG	Reclasificación
NBN	3	c.283G>A	p.Asp95Ans	rs61753720	<i>missense</i>	VUS(3); VB(6); VPB(7)	VUS	VUS	PM2 , PP3	VUS
	13	c.1999T>C	p.Ser667Pro	rs587780091	<i>missense</i>	VUS(9); VPB(2)	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
	IN 13	c.2071-4A>G	-	rs746994234	intrónica	VUS(6); VPB(1)	VUS	VPP	PM2 , PP3	VUS
PALB2	4	c.742G>C*	p.Val248Leu	rs572102702	<i>missense</i>	VUS	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
	4	c.814G>A	p.Glu272Lys	rs515726127	<i>missense</i>	VUS	VUS	VUS	PM2 , BP4	VUS
	8	c.2816T>G	p.Leu939Trp	rs45478192	<i>missense</i>	VUS(3); VB(5); VPB(13)	VUS	VUS	PM2 , BP6	VUS
PMS2	12	c.2012C>T	p.Thr671Met	rs587780046	<i>missense</i>	VUS(12); VPB(1)	VUS	VUS	PM2 , PP3	VUS
RAD51C	1	c.134A>G	p.Glu45Gly	rs587781383	<i>missense</i>	VUS(8); VPB(1)	ND	VUS	PM2 , BP4	VUS
RAD51D	1	c.26G>C	p.Cys9Ser	rs140825795	<i>missense</i>	VUS(11); VPB(3)	VUS	VPB	BS1 , BP6 , PP3	VUS
	5	c.412A>G	p.Asn138Asp	rs141690729	<i>missense</i>	VUS	VUS	VUS	BP4	VUS
TP53	6	c.665C>A	p.Pro222Gln	ND	<i>missense</i>	VUS	ND	VPP	PM2 + PM5 , PP3	VUS

Tabla 36. Reclasificación de las variantes de significado clínico desconocido obtenidas del estudio genético con panel de genes a los pacientes con resultado no informativo.

Las variantes que aparecen en negrita son aquellas que han sido posteriormente reclasificadas. ND: no descrita, VUS: variante de significado clínico desconocido, VPB: variante probablemente benigna, VB: variante benigna, VPP: variante probablemente patogénica, VP: variante patogénica

GEN	HGVS (ADNc)	HGVS (proteína)	refSNP	Nº casos	Caso índice	Familiares	Criterio de priorización	
ATM	c.967A>G	p.Ile323Val	rs587781511	1	CM (47)	Hermana CM (49), padre CP, tía pat. CM (45), tío pat. CMv (66), tío pat. CPR 75, primo mat. LEU	Bibliografía	Li A y col. (145) George Priya Doss C y col. (146) Carranza y col. (147) Fiévet A y col. (148)
	c.3402+3A>C	-	rs786203688	1	CM (34)	Madre CCR (68), abuela mat. CM (>50), tía mat. CM (70), tía pat. CM (30), tía pat. CM (79)	Splicing	Varsome (0,9998)
	c.4388T>G	p.Phe1463Cys	rs138327406	2	CO (34)	Hermana CM (44), padre CPR (67), tía pat. CM (65), tía mat. CM (29), tío pat. CPR (65), abuela mat. CO (84), abuela pat. CEND (63)	REVEL	Patogénica (0.758)
					CM (49)	Madre CE (76), tía pat. CM (60), tía pat. CM (62), tía pat. CM, tía mat. CCR (49)		
c.6067G>A	p.Gly2023Arg	rs11212587	1	CMb (39)	Hermana CM (43), tía mat. CM (60), abuela mat. CG	Bibliografía	Mangone FR y col. (149) Podralska M y col. (150) Thorstenson YR y col. (151)	
BRCA2	c.3032C>G	p.Thr1011Arg	rs80358548	1	CMb (45,47)	Abuela CM	REVEL	Patogénica (0.72)
	c.4594G>T	p.Val1532Phe	rs80358693	1	CM (31)	Hermana CM (42), tío pat. CPR (80)	Bibliografía	Ochiai K y col (152)
	c.7559G>T	p.Arg2520Leu	rs80358982	1	CO (25)	CM (61)	REVEL	Patogénica (0.7419)
	c.9275A>G	p.Tyr3092Cys	rs80359195	3	CM (61)	Hermana CM (50), hermano CDESC, sobrina CG	REVEL	Patogénica (0.808)
CM (36)					Abuelo pat. CPC, tío pat. CU, prima pat. CM			
CM (49)					Hermana CM (48), hermana CM (55), hermana CM (55),			
CHEK2	c.320-5T>A	-	rs121908700	2	CM (27)	Madre CO (56), abuela mat. CM (38), abuelo mat. CD, tía mat. CV, tío mat. CC (40), tío pat. LINF (30) CP (40)	Splicing	Varsome (0,8037)
					CM (37)	Abuela mat. CM (45), tía mat. CM (33)	Bibliografía	Kraus C y col. (158) Vargas-Parra y col (159)

GEN	HGVS (ADNc)	HGVS (proteína)	refSNP	Nº casos	Caso índice	Familiares	Criterio de priorización	
CHEK2	c.442A>G	p.Arg148Gly	rs876660482	1	CM (47)	Madre CM, tía mat. CM, prima mat. CM	Bibliografía	Delimitou A y col. (153) Apostolou y col. (108)
	c.1008G>A	p.Gln336Gln	rs201544715	1	CM (38)	Madre CM (60), tía mat. CM (59)	REVEL	Patogénica (0.85)
	c.1427C>T	p.Thr476Met	rs142763740	1	CM (21)	Abuelo mat. CH (82)	Splicing	Varsome (0,9999)
MSH2	c.470G>C	p.Gly157Ala	rs765489269	1	CM (39)	Madre CM (49), abuela mat. LEU (76), tío pat. CCR (70), tío pat. CCR 53	Bibliografía	Yurgelun MB y col. (154) Eliade M y col. (155) Desrichard y col (156) Roeb W y col. (157)
	c.1045C>G	p.Pro349Ala	rs267607939	1	CM (42)	Abuela pat. CM (90), tía pat. CM (42), tía pat. CM, prima pat. CM (50),	REVEL	Patogénica (0.9929)
MSH6	c.3883C>T	p.Pro1295Ser	ND	1	CO (39) CM (60)	Madre CM (80), hermana LINF (50), hermana LINF (61), abuela mat. CM (70), tía abuela mat. CPC, tía mat. CM (40)	REVEL	Patogénica (0.7059)
NBN	c.2071-4A>G	-	rs746994234	1	CM (47)	Abuela mat. CM (54), abuelo mat. CH (88), tía mat. CM (66), sobrina CC (18), prima mat. CM (51), primo mat. CCR (56)	Splicing	Varsome (0,9987)

Tabla 37. Variantes de significado clínico desconocido priorizadas en genes clínicamente accionables junto a la información fenotípica de portadores y familiares. Las variantes priorizadas que aparecen en negrita han sido seleccionadas para caracterizar su posible efecto deletéreo a nivel de *splicing*. ND: no descrita, CC: cáncer de cerebro, CCR: cáncer colorrectal, CD: cáncer desconocido, CEND: cáncer endocrino, CE: cáncer endometrio, CM: cáncer de mama, CMv: cáncer de mama en varón, CG: cáncer ginecológico, CH: cáncer hepático, CO: cáncer de ovario, CPC: cáncer de páncreas, CPR: cáncer de próstata, CP: cáncer de pulmón, CV: cáncer de vejiga, CU: cáncer urotelial, LEU: leucemia, LINF: linfoma, ND: no descrita

2.3. VARIANTES PRIORIZADAS SUSCEPTIBLES DE *SPLICING* ABERRANTE

A continuación, se muestran los resultados de los estudios *in vitro* realizados en portadores de las variantes priorizadas susceptibles de *splicing* aberrante en genes clínicamente accionables según las predicciones bioinformáticas *in silico*.

2.3.1. Análisis de *splicing* de la variante c.3402+3A>C en *ATM*

Esta alteración genética no ha sido descrita en bases de datos de referencia ni en la bibliografía disponible. Al tratarse de una variante intrónica asociada a un riesgo elevado de afectar al *splicing* según los análisis *in silico*, se realizó una RT-PCR a partir de RNA obtenido de sangre periférica de un portador y un control sano para caracterizar el efecto de esta variante a nivel de *splicing*. Los fragmentos obtenidos de RT-PCR (*primers* ubicados en el exón 21 y 24) se analizaron por electroforesis capilar, observándose diferencias cualitativas y cuantitativas significativas en ambas muestras (Figura 59A).

En el electroferograma del portador de la variante, además del transcrito de referencia (FL) representado por el pico de 401nt, se detecta otro producto de intensidad similar (283nt), que por tamaño corresponde a $\Delta 23$ (delección completa del exón 23 compuesto por 118nt). También se observa un fragmento de pequeña intensidad (191nt) que corresponde por tamaño a $\Delta 23+\Delta 24p_{92}$ (omisión completa del exón 23 y pérdida parcial del exón 24 equivalente a un total de 210nt). La secuenciación de los productos de la RT-PCR confirmó la presencia de los tres transcritos: FL, $\Delta 23$ y $\Delta 23+\Delta 24p_{92}$ (Figura 59B).

Se predice que la isoforma mayoritaria ($\Delta 23$) genera un codón de parada prematuro y la formación de una proteína truncada (p.Arg1095SerfsTer22) sin actividad catalítica como consecuencia de la pérdida de los dominios FAT, PI3K/PI4K y FATC. De lo contrario, la isoforma minoritaria ($\Delta 23+\Delta 24p_{92}$) induce la síntesis de una proteína acortada p.(Arg1095_Ser1165del) que conserva todos los dominios esenciales para su actividad. No obstante, la isoforma $\Delta 23+\Delta 24p_{92}$ se expresa en una proporción desestimable considerándose que no debe aportar una actividad biológica relevante (Figura 59C).

Por tanto dada la proporción de ambos transcritos generados, consideramos probado que el alelo portador de la variante no expresa exón 23 (o expresa una proporción insignificante), por lo que consideramos razonable clasificar la variante como probablemente patogénica.

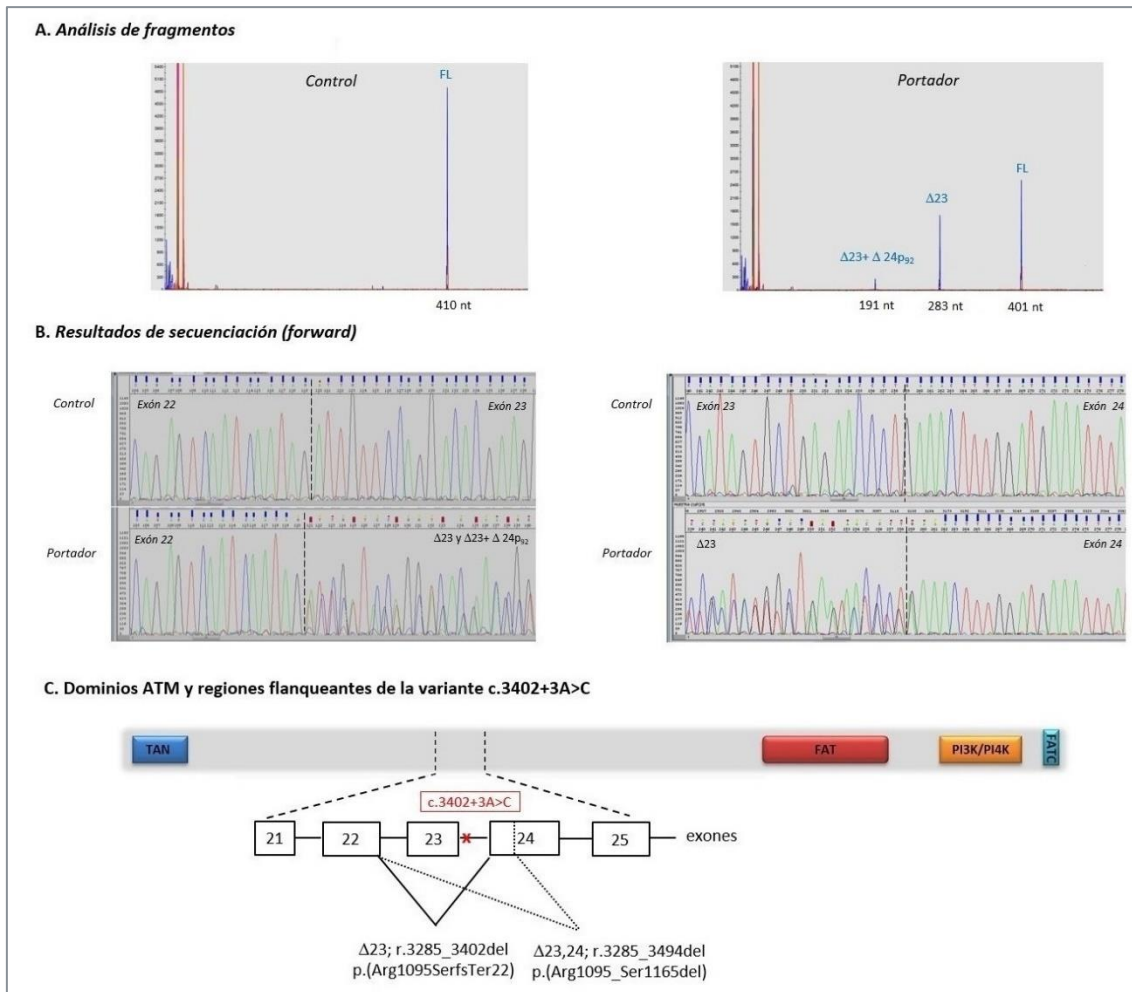


Figura 59. Análisis de *splicing* de la variante c.3402+3A>C mediante RT-PCR/EC y secuenciación Sanger

Esta variante genética fue detectada en una mujer diagnosticada de cáncer de mama a los 34 años con antecedentes oncológicos familiares en rama materna y paterna. Debido a la probada patogenicidad de la variante, se consideró oportuno realizar un estudio de cosegregación resultando positivo en la madre del probando, diagnosticada de cáncer de colon a los 68 años. No se pudo extender el estudio a otros familiares debido a la inexistencia de afectados vivos en la rama familiar estudiada (**Figura 60**).

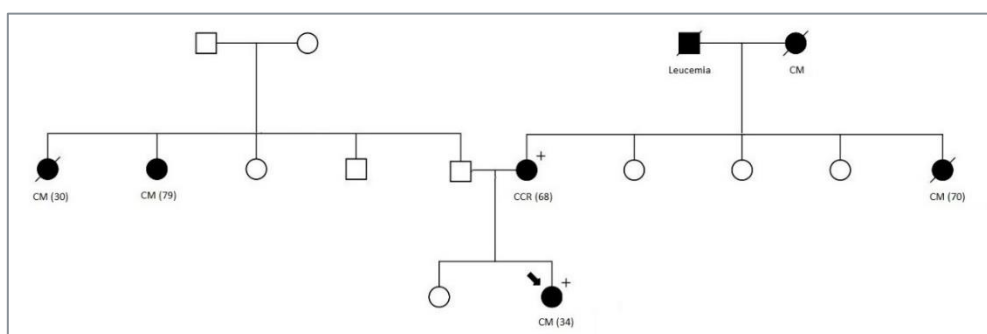


Figura 60. Árbol genealógico de la familia portadora de la variante c.3402+3A>C

2.3.2. Análisis de *splicing* de la variante c.320-5T>A en *CHEK2*

Esta variante intrónica asociada según las predicciones *in silico* a una pérdida parcial de reconocimiento del sitio aceptor de *splicing* constitutivo, ha sido descrita en la literatura científica donde se reportan diversos estudios funcionales destinados a caracterizar el posible efecto de dicha variante a nivel de *splicing* (Figura 61). Kraus y colaboradores realizaron un análisis de la variante genética mediante RT-PCR en el que identificaron un transcrito carente de los exones 3 y 4 que no generaba un codón de parada prematuro (p.Glu107_Val197del). No obstante, comprobaron que la expresión de dicho transcrito aberrante en comparación con el alelo salvaje fue inferior al 20% y, por lo tanto, puede ser considerado como un alelo hipomorfo (158). Posteriormente, Vargas-Parra y colaboradores confirmaron los resultados del estudio previo realizado y realizaron un estudio de frecuencia mutacional de casos y controles que no mostró diferencias significativas, lo que impide considerar el alelo de la variante de alto riesgo (159). Ambas publicaciones ofrecen resultados concordantes por lo que no consideramos conveniente realizar un nuevo análisis del efecto de esta variante a nivel de *splicing*.

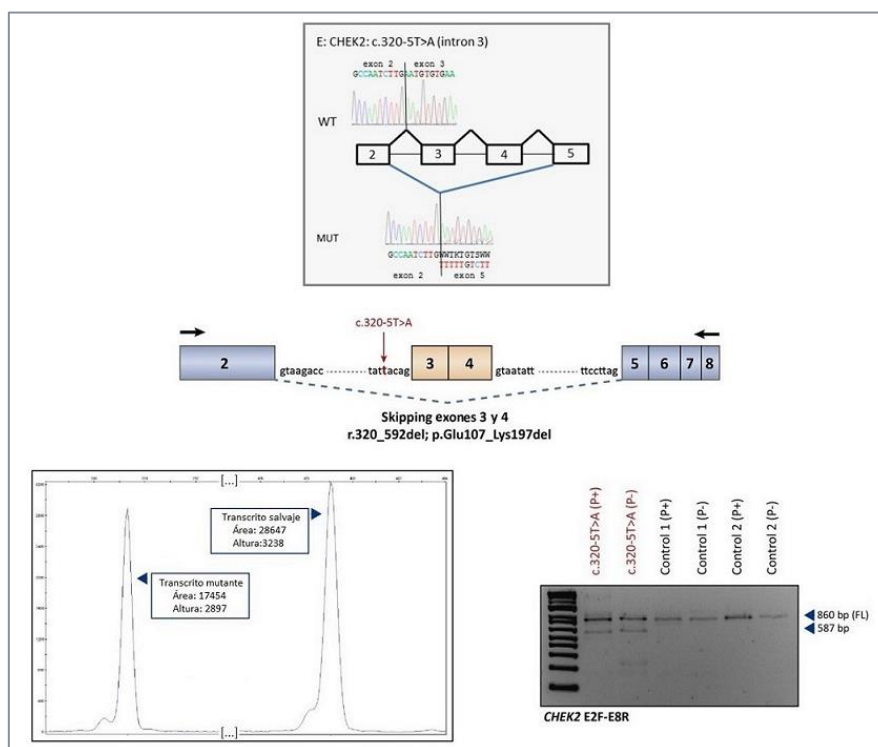


Figura 61. Análisis de *splicing* de la variante c.320-5T>A. La imagen superior muestra la secuenciación Sanger obtenida de Kraus y col. (158). La imagen inferior adaptada de Vargas-Parra y col. representa los dominios *CHEK2* y las regiones flanqueantes de la variante junto con la amplificación de los productos obtenidos por RT-PCR en electroforesis capilar y en gel de agarosa (con y sin puromicina) (159)

2.3.3. Análisis de *splicing* de la variante c.1008G>A en CHEK2

Variante genética de tipo *synonymous* que afecta a un nucleótido conservado próximo a la zona canónica de *splicing*. Las herramientas *in silico* predicen que esta alteración puede debilitar el sitio donante de *splicing* constitutivo y alterar el procesamiento del ARN mensajero. Sin embargo, no se ha identificado en la literatura científica descripción de ningún estudio previo de *splicing* que confirme estas predicciones, por lo que sería interesante profundizar en el posible efecto de esta variante nivel del ARN mensajero.

Para la caracterización de la variante c.1008G>A se ha realizado una RT-PCR (*primers* localizados en los exones 6 y 11) a partir de RNA de sangre periférica obtenido de un portador y un control sano. Los productos obtenidos de la RT-PCR fueron analizados por electroforesis capilar (Figura 62). El análisis de fragmentos no mostraba diferencias cualitativas ni cuantitativas significativas. En ambos electroferogramas se detectó un producto principal que corresponde al transcrito de referencia (399nt), y dos productos adicionales de baja intensidad (314nt, 339nt) que se corresponden con eventos de *splicing* alternativo expresados de forma natural. La secuenciación de la variante a partir de los productos de la RT-PCR demostró expresión bialélica balanceada en el portador. Esto resulta esencial para confirmar que la electroforesis capilar está capturando la expresión procedente del alelo mutado, demostrando así que dicha variante no afecta al patrón de *splicing* constitutivo.

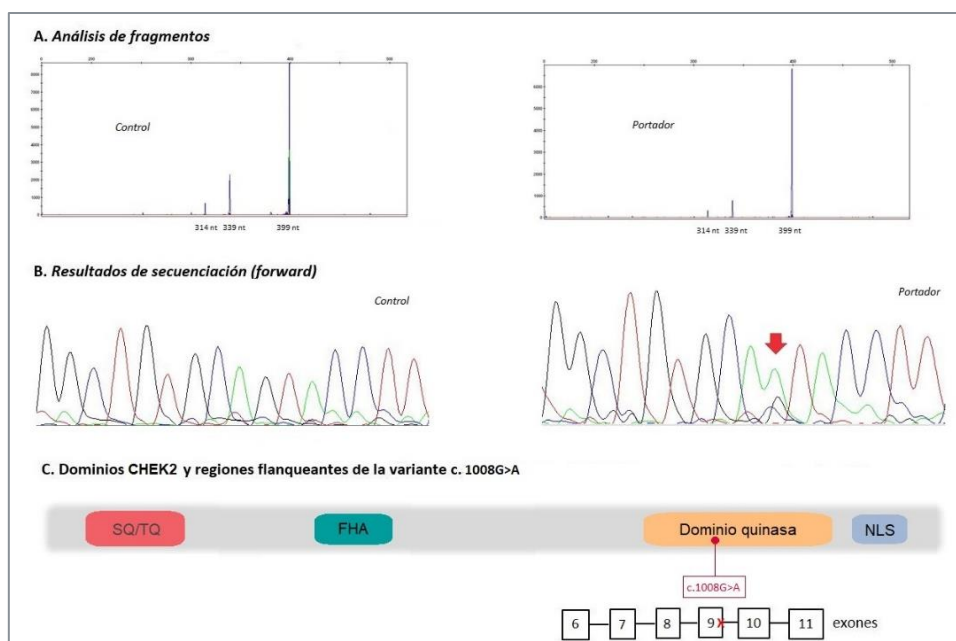


Figura 62. Análisis de *splicing* de la variante c.1008G>A mediante RT-PCR/EC y secuenciación Sanger

Por último, una limitación destacable en el estudio de priorización fue que la variante priorizada c.2071-4A>G (*NBN*) no pudo ser analizada debido a la imposibilidad de obtener una muestra biológica de sangre periférica necesaria para realizar la extracción de ARN y posterior estudio de RT-PCR. En consecuencia, no fue posible realizar el análisis *in vitro* de *splicing* y, por lo tanto, no se pudo comprobar si dicha variante afecta al patrón de *splicing*, tal y como se predice en los programas computacionales.

V. Discusión

1. ESPECTRO MUTACIONAL DEL SCSMOH EN LA REGIÓN DE MURCIA

En la presente tesis doctoral, el conocimiento del espectro mutacional de predisposición hereditaria al cáncer de mama y ovario ha evidenciado la variabilidad genética existente en la Región de Murcia, lo que justifica el empleo de un panel genético que permita el análisis de los genes clínicamente accionables relacionados con este síndrome hereditario. Los resultados de nuestro estudio revelan que, la tasa mutacional más significativa de variantes clínicamente relevantes, se corresponde con los principales genes de susceptibilidad genética *BRCA1/2*, seguida de un porcentaje relevante en genes de alta y moderada penetrancia (*ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1* y *TP53*). Del mismo modo, los principales genes en los que se hallaron VUS fueron *BRCA1/2*, seguido de los genes de moderada penetrancia *ATM* y *CHEK2*. No obstante, la interpretación de los resultados obtenidos en el presente estudio debe considerarse sesgada debido a la evolución cronológica del diagnóstico molecular de este síndrome hereditario basada en el análisis de los genes *BRCA1* y *BRCA2* hasta que posteriormente, se incorporaron a la rutina diagnóstica los paneles genéticos mediante NGS.

Cabe destacar que, los datos de nuestro estudio han resultado concordantes con lo reportado en la bibliografía. La evidencia científica destaca una mayor prevalencia de variantes patogénicas asociadas a *BRCA1* y *BRCA2* al ser considerados los principales genes responsables de la predisposición hereditaria asociada a este tipo de tumores, seguida de un porcentaje considerable en genes de moderada penetrancia que presentan una evidente contribución a la heredabilidad del cáncer de mama y ovario (*ATM*, *CHEK2*, *PALB2*) (Figura 63).

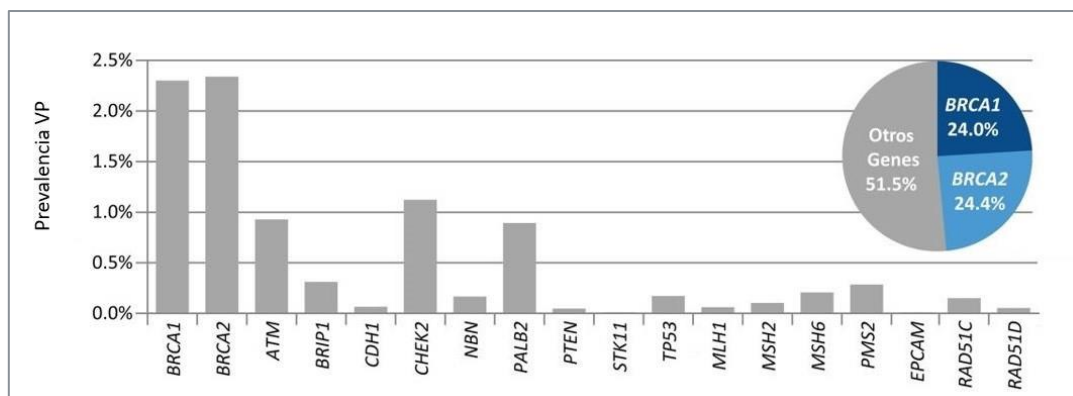


Figura 63. Prevalencia de variantes patogénicas asociada a los principales genes clínicamente accionables relacionados con cáncer de mama y ovario hereditario. Figura adaptada de Buys SS y col. (160)

VARIANTES RECURRENTES

El análisis de prevalencia desarrollado en la presente tesis doctoral ofrece una visión actualizada de aquellas variantes genéticas recurrentes en la Región de Murcia, principalmente asociadas a los genes *BRCA1* y *BRCA2*, responsables de una proporción significativa de casos de cáncer de mama y ovario hereditario. Los resultados obtenidos indican que los cambios c.68_69del, c.212+1G>A y c.5123C>A se han detectado en un 30% de la población portadora de variantes en *BRCA1*, mientras que la delección del exón 2 junto con los cambios c.3264dup, c.3455T>G y c.9117G>A se han encontrado en el 30% de la población portadora de variantes en *BRCA2* (161).

BRCA1: c.68_69del

El estudio de prevalencia realizado en la Región de Murcia ha revelado que c.68_69del representa la variante patogénica más recurrente en nuestra población de estudio.

Esta variante genética identificada por primera vez en familias canadienses (162), ha sido considerada una mutación fundadora de origen judío ashkenazi. Sin embargo, la evidencia de un ancestro común en portadores judíos de diferentes orígenes étnicos (non-ashkenazi) indica que puede tratarse de una antigua mutación judía anterior a la Diáspora que comparten prácticamente todos los judíos (163). Debido a los flujos migratorios motivados por los acontecimientos históricos, se encuentra ampliamente distribuida en todas las poblaciones, siendo la variante genética más frecuente a nivel mundial según la base de datos internacional *Breast Cancer Information Core* (BIC) [acceso en julio 2022, <https://www.research.nhgri.nih.gov/bic/>].

En población española ha sido observada con una prevalencia variable en diferentes regiones de España, siendo especialmente recurrente en el área mediterránea (164). Su elevada frecuencia en nuestro país se encuentra relacionada con la presencia histórica de judíos (sefardíes) en la Península Ibérica (165).

Un análisis de haplotipo realizado en población ashkenazi estima que fue originada hace aproximadamente 1200 años y a través de portadores judíos fue introducida en población hispana hace unos 650 años, por lo que se trata de un probable marcador de ascendencia judía entre los españoles que indica el origen común de la mutación en

población española (judíos sefardíes) y judía ashkenazi. Por otra parte, resulta conveniente destacar que esta mutación ha sido reportada esporádicamente en distintas poblaciones, surgiendo de forma independiente al presentar un haplotipo diferente al encontrado en población judía ashkenazi, por lo que resulta lógico pensar que se pueda tratar de una mutación *hot spot* (166).

BRCA1: c.212+1G>A

La variante genética c.212+1G>A identificada por primera vez en un estudio californiano (167) ha sido reportada de forma esporádica en población hispana y caucásica (74). No obstante, en un estudio publicado recientemente se ha destacado su elevada prevalencia en población guatemalteca, en el cual sugieren que se trate de una posible mutación fundadora en este país. (168)

En España, esta variante también presenta una prevalencia significativa en la región mediterránea. Sin embargo, no existe constancia que se haya descrito en otros estudios españoles con tanta frecuencia como la encontrada en la Región de Murcia (164).

BRCA1: c.5123C>A

La variante genética c.5123C>A ha sido considerada como mutación fundadora de origen judío sefardí según los estudios de haplotipo realizados por Sagi y colaboradores (124). Se trata de una variante ampliamente distribuida en población hispana y caucásica (74), descrita de forma recurrente en diversas áreas geográficas de nuestro país (164). Su elevada frecuencia en población española parece estar relacionada con la presencia histórica de judíos (sefardíes) en la península Ibérica.

BRCA2: c.3264dup

La variante genética c.3264dup identificada por primera vez en población española (169) ha sido reportada en población hispana y caucásica (74), destacando de forma recurrente en España (115,164,170–173) con una prevalencia significativa en la Comunidad Valenciana (174) y en la Región de Murcia (141).

BRCA2: c.3455T>G

La variante genética c.3455T>G registrada por primera vez en población asiática (175) ha sido reportada de forma esporádica en población caucásica de origen español (176) y francés (177). Sin embargo, no existe constancia que se haya descrito en otros estudios españoles con tanta frecuencia como la encontrada en la Región de Murcia.

BRCA2: c.9117G>A

La variante genética c.9117G>A reportada por primera vez en una familia holandesa (178), se encuentra ampliamente descrita a nivel mundial por lo que resulta lógico pensar que se pueda tratar de una mutación *hot spot*. En estudios de prevalencia realizados en población española, no existen evidencias de una frecuencia tan alta en otras áreas geográficas de nuestro país como la encontrada en la Región de Murcia.

a) Caracterización de las variantes recurrentes en la Región de Murcia

Las variantes genéticas (anteriormente mencionadas) distinguidas por su elevada prevalencia en la Región de Murcia han sido descritas como patogénicas, asociadas a una elevada susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama y ovario, según las bases de datos y las referencias bibliográficas disponibles.

La caracterización molecular de c.68_69del, c.212+1G>A, c.5123C>A en *BRCA1* y c.3264dup, c.3455T>G, c.9117G>A en *BRCA2* coincide con los tipos de variantes genéticas más frecuentes en ambos genes de acuerdo a la base de datos BIC: *frameshift*, *single nucleotide variant (SNV)* o *intervening sequence (IVS)*.

Respecto a los grandes reordenamientos, los estudios realizados a nivel mundial reportaron una mayor frecuencia en *BRCA1* respecto a *BRCA2*, coincidiendo con lo descrito en población española. Los reordenamientos genómicos en *BRCA1* representan el 2,1% de las familias españolas con cáncer de mama y ovario hereditario, mientras que en *BRCA2* explican el 1,5% (140,179). Curiosamente, los resultados de nuestro estudio contrastan con lo descrito en la bibliografía, encontrando una mayor prevalencia de familias portadoras de reordenamientos genómicos en *BRCA2* (4,1% *BRCA1* vs 7,8% *BRCA2*), destacando la deleción del exón 2 como el reordenamiento genómico más recurrente en nuestra población de estudio.

Por último, se han descrito correlaciones genotipo-fenotipo en función de la localización de las variantes genéticas que sugieren que alteraciones genéticas ubicadas en la parte central de *BRCA1* y *BRCA2* se asocian con un mayor riesgo de cáncer de ovario mientras que la predisposición al cáncer de mama resulta superior en los extremos de ambos genes. No obstante, los estudios descritos en la bibliografía revelan una correlación más clara asociada a las variantes genéticas pertenecientes a *BRCA2* (180).

En nuestro caso, los resultados no fueron concluyentes puesto que el número de variantes recurrentes obtenidas en ambos genes mediante el análisis de prevalencia resulta limitado para establecer una correlación de este tipo y además, la mayoría de estas variantes genéticas no se ubican en dichas regiones específicas asociadas a una mayor predisposición al desarrollo de cáncer de mama y ovario.

b) Fenotipo de las familias portadoras

El tamaño muestral obtenido en el presente trabajo ha permitido realizar una correlación genotipo-fenotipo representativa de nuestra población de estudio, observando diferencias estadísticamente significativas entre las variantes patogénicas *BRCA1* y *BRCA2* detectadas de forma recurrente en familias portadoras de la Región de Murcia (Tabla 38).

	Triple negativo	Luminal A	Luminal B	χ^2 de Pearson
<i>BRCA1</i>	53 (63%)	15 (18%)	3 (3%)	p<0.001
<i>BRCA2</i>	10 (14%)	39 (55%)	15 (21%)	

Tabla 38. Correlación genotipo-fenotipo (subtipo molecular asociado a cáncer de mama) de las variantes patogénicas recurrentes *BRCA1* y *BRCA2* detectadas en portadores de la Región de Murcia

De esta manera, los portadores afectados de cáncer de mama asociado a variantes patogénicas en *BRCA1* han presentado un perfil histológico dominante de tipo ductal invasivo y subtipo molecular triple negativo. En cambio, el fenotipo asociado a los portadores de variantes patogénicas *BRCA2* diagnosticados de cáncer de mama, ha resultado más heterogéneo. Al igual que la mayoría de los tumores *BRCA1* han sido de

tipo ductal infiltrante sin embargo, predomina el fenotipo luminal A con positividad de receptores hormonales y negatividad para HER2. En relación a la edad de diagnóstico del tumor, se ha observado que la mediana en portadores BRCA1/BRCA2 afectados de cáncer de mama fue superior a los 40 años.

Asimismo, destaca un número superior de casos de cáncer de mama bilateral asociado a las variantes c.68_69del y c.5123C>A en *BRCA1* mientras que las variantes *BRCA2* presentan una mayor prevalencia de cáncer de mama en el varón. La concordancia observada en el perfil histopatológico e inmunohistoquímico de los carcinomas mamarios bilaterales de tipo sincrónico y metacrónico fue del 65%, inferior a lo descrito en estudios previos (181). Este dato evidencia que la expresión fenotípica del primer tumor fue relativamente predictiva del estatus de expresión del segundo tumor. Sin embargo, no siempre resulta así, lo que refuerza la necesidad de determinar el perfil histopatológico e inmunohistoquímico de cada tumor para establecer de forma adecuada el pronóstico y la decisión terapéutica.

Previsiblemente, los carcinomas mamarios han presentado diferencias más significativas en sus características fenotípicas respecto al cáncer de ovario, mostrando éste un perfil fenotípico predominante. Prácticamente la totalidad de los casos de carcinoma ovárico observados en portadoras *BRCA* han resultado de tipo seroso de alto grado, coincidiendo con lo descrito en la bibliografía. Asimismo, la edad mediana de diagnóstico del cáncer de ovario fue superior a los 50 años. Resulta interesante destacar la fuerte asociación fenotípica de la variante c.212+1G>A en *BRCA1* con el cáncer de ovario contabilizando un total de 12 portadores afectados.

Con respecto a otros tipos de cáncer, se ha observado una mayor asociación de las variantes patogénicas descritas como recurrentes en la Región de Murcia con otros tumores de tipo ginecológico, carcinoma colorrectal y cáncer de próstata.

Por tanto, la correlación genotipo-fenotipo de las variantes patogénicas *BRCA1/2* consideradas en nuestro estudio, no ha mostrado diferencias significativas con la descripción fenotípica reportada anteriormente en la literatura científica (24).

c) Procedencia geográfica de las familias portadoras

En el estudio realizado sobre el origen geográfico de las familias estudiadas se ha observado como aquellas portadoras de las variantes c.68_69del, c.5123C>A y c.3264dup presentan una procedencia heterogénea, encontrándose ampliamente distribuidas por la Región de Murcia. Sin embargo, las familias portadoras del resto de variantes patogénicas recurrentes, limitan su procedencia a áreas geográficas concretas. De este modo, la delección del exón 2 se delimita al Valle del Guadalentín, c.212+1G>A a la Comarca del Noroeste, c.9117G>A a la Vega Alta del Segura y c.3455T>G a la zona sureste de la Región de Murcia.

Resulta interesante destacar que las variantes genéticas caracterizadas por una distribución heterogénea en la Región de Murcia coinciden con aquellas ampliamente descritas en el territorio nacional mientras que la delección del exón 2 y los cambios c.212+1G>A, c.3455T>G y c.9117G>A son variantes distinguidas de forma predominante en la citada región.

d) Comparativa de prevalencia mutacional

Los resultados obtenidos con este trabajo nos han permitido realizar una comparativa de prevalencia mutacional de los genes *BRCA*, principalmente enfocada a población europea y española. De esta forma, observamos que las variantes patogénicas *BRCA1* más recurrentes descritas en población europea c.5266dup, c.68_69del, c.3331_3334del, c.5123C>A y c.181T>G presentan una prevalencia relevante en la Región de Murcia, a excepción de la mutación fundadora en judíos ashkenazi c.5266dup, que únicamente ha sido reportada en una familia de nuestra población de estudio. Sin embargo, las variantes patogénicas *BRCA2* más recurrentes en población europea c.3264dup, c.5946del c.2808_2811del y c.6275_6276del presentan una prevalencia insignificante en la Región de Murcia, excepto c.3264dup siendo considerada una de las mutaciones *BRCA2* más frecuentes en población murciana.

Por otro lado, las variantes patogénicas *BRCA1* destacadas por su elevada frecuencia en población española c.211A>G, c.68_69del, c.5123C>A, c.3770_3771del y c.3331_3334del han sido detectadas de forma significativa en la Región de Murcia. No

obstante, de las variantes patogénicas *BRCA2* con una prevalencia considerable en población española c.3264dup, c.2808_2811del, c.9026_9030del, c.6275_6276del y c.9018C>A, únicamente c.3264dup y c.9026_9030del presentan tasas mutacionales relevantes con un total de 10 y 8 familias portadoras, respectivamente. Resulta interesante destacar cierta afinidad genética observada especialmente con las poblaciones de la región mediterránea debido a la proximidad geográfica existente con nuestra población de estudio (Figura 64).

En consecuencia, el análisis comparativo realizado permite afirmar que los resultados obtenidos de prevalencia mutacional asociada a *BRCA1* respecto a población europea y española, resultan más concordantes que los referentes a *BRCA2*.



Figura 64. Mapa representativo de las variantes patogénicas recurrentes y fundadoras *BRCA1/BRCA2* relacionadas con el cáncer de mama y ovario hereditario en portadores españoles y de procedencia norteafricana residentes en la Región de Murcia. Las variantes genéticas aparecen ordenadas por orden de prevalencia y aquellas destacadas en negrita se corresponden con las variantes comunes más recurrentes en portadores de España y de la Región de Murcia

VARIANTES RECURRENTE DE PROCEDENCIA AFRICANA

BRCA1: c.181T>G

Esta variante genética considerada mutación fundadora de Europa Central, se encuentra ampliamente distribuida en países europeos y en poblaciones procedentes del norte de África como consecuencia de los movimientos coloniales y migratorios acontecidos a lo largo de la historia (79). Sin embargo, no existe constancia de su existencia en población española. En nuestra población de estudio ha sido descrita en 4 familias procedentes del norte de África (1,2% de los portadores *BRCA+* y 2,3% de los portadores *BRCA1+*).

BRCA1: c.798_799del

Esta variante genética reconocida como mutación fundadora del norte de África, ha sido detectada en España, Francia y el sur de Italia, observándose una evidente propagación a los países del mediterráneo debido a su proximidad geográfica (182). En nuestra población de estudio ha sido descrita en 3 familias procedentes del norte de África (0,9% de los portadores *BRCA+* y 1,8% de los portadores *BRCA1+*).

BRCA2: c. 1310_1313del

Esta variante genética presenta una alta frecuencia en la región noreste de Marruecos, lo que sugiere un potencial efecto fundador en esta área geográfica restringida del país que posiblemente, se haya extendido a países colindantes y europeos debido a la proximidad geográfica y a la coexistencia histórica de estas poblaciones (183). En nuestra población de estudio ha sido descrita en 4 familias procedentes del norte de África (1,2% de los portadores *BRCA+* y 2,4% de los portadores *BRCA2+*).

BRCA2: c. 7234_7235insG

Esta variante genética reportada en población marroquí (184), ha sido registrada en 3 familias de nuestra población de estudio con origen norteafricano (0,9% de los portadores *BRCA+* y 1,8% de los portadores *BRCA2+*).

MUTACIONES FUNDADORAS

Los estudios de haplotipo realizados han permitido demostrar la existencia de tres mutaciones fundadoras que aparecen de forma recurrente en familias de la Región de Murcia. Dicho efecto fundador justificaría una fracción sustancial de los casos de cáncer de mama y ovario hereditario detectados en nuestra población de estudio, lo que explicaría la alta prevalencia de estas variantes genéticas en la Región de Murcia.

a) Efecto fundador de la variante c.1918C>T

La variante genética c.1918C>T (*BRCA1*) descrita por primera vez en dos familias murcianas por Gabaldó y colaboradores, ha sido reportada de forma exclusiva en la Región de Murcia. El estudio de haplotipos realizado en las 8 familias portadoras de la variante patogénica c.1918C>T ha permitido confirmar el supuesto publicado en el artículo de Gabaldó y colaboradores acerca del posible carácter fundacional de dicha variante en nuestra población de estudio (139). El presente estudio ha evidenciado la presencia de un haplotipo común en las familias portadoras, demostrando la existencia de un ancestro común. La estimación de la antigüedad de dicha variante fue de 18 generaciones, lo que supone que sea una mutación fundadora de reciente aparición.

En base a nuestro conocimiento, esta mutación únicamente se ha descrito en familias de la Región de Murcia, pertenecientes principalmente a dos zonas geográficas concretas (área metropolitana y la cuenca de Mula). Este hecho revela una penetrancia significativa de la variante en nuestra población de estudio y confirma la hipótesis de considerarse una mutación fundadora en la Región de Murcia (185).

Por otra parte, el fenotipo relacionado con esta variante genética resulta compatible con lo reportado en la literatura científica sobre tumores mamarios asociados a *BRCA1*, correspondiéndose con un perfil histológico de tipo ductal invasivo y subtipo molecular triple negativo asociado a una edad mediana de diagnóstico de 42 años (24).

b) Efecto fundador de la delección del exón 2

La delección del exón 2 fue descrita por primera vez en un estudio de grandes reordenamientos en *BRCA2* realizado en familias españolas (140). Posteriormente, fue reportada por Ruiz de Garibay y colaboradores en familias catalanas (121) y por Gabaldó y colaboradores en familias murcianas (141). En la actualidad, ha sido detectada en 12 familias procedentes de la Región de Murcia, considerándose el reordenamiento genómico más recurrente en nuestra población de estudio.

El estudio de haplotipos diseñado por Ruiz de Garibay y colaboradores en familias catalanas evidenciaba que se tratase de un reordenamiento genómico con efecto fundador en nuestro país. Tras ampliar el análisis de haplotipos en las 12 familias murcianas que portaban dicha delección, se pudo observar que los portadores compartían el mismo haplotipo. La discrepancia observada en los resultados obtenidos del último microsatélite se debe a la amplia distancia existente entre el gen y el microsatélite, la cual justifica un mayor número de eventos de recombinación. La estimación de la antigüedad de dicha variante fue de 22 generaciones, lo que supone que sea una mutación fundadora de reciente aparición.

Por tanto, se concluye que la delección del exón 2 es una mutación fundadora en España al demostrar la presencia de un ancestro común con las familias estudiadas en la publicación de Ruiz de Garibay. Este efecto fundador acentuado en población murciana explicaría una fracción significativa de los reordenamientos genómicos detectados en *BRCA2*, justificando así su alta prevalencia respecto a los descritos en *BRCA1* (186).

El perfil fenotípico asociado a este reordenamiento genómico no muestra diferencias significativas con lo descrito respecto a los carcinomas mamarios asociados a variantes genéticas en *BRCA2* (24). Destaca un perfil histológico de tipo ductal invasivo con un subtipo molecular heterogéneo en el que prevalece el fenotipo luminal. La edad mediana de diagnóstico se estima en 43 años con un rango muy amplio de valores entre los 27 y los 81 años. Asimismo, resulta interesante destacar que la mayoría de las familias portadoras procedían de un área geográfica específica de la Región de Murcia, la comarca del Valle Guadalentín.

c) Efecto fundador de la variante c.8251_8254del

La variante genética c.8251_8254del (*ATM*) descrita previamente en una familia española por Tavera-Tapia y colaboradores (142), ha sido detectada en 8 familias de la Región de Murcia. La presente tesis doctoral ha permitido completar el estudio de haplotipos iniciado por Castillo-Guardiola y colaboradores (143), constatando de forma fehaciente el efecto fundador de esta variante genética en la Región de Murcia. Este hecho podría explicar la mayor tasa de detección de variantes genéticas en *ATM* en nuestra población de estudio respecto a lo descrito previamente en la bibliografía.

Además, la continuación de dicho estudio ha permitido consolidar datos referentes al origen y a la antigüedad de esta mutación fundadora. El análisis de microsatélites ha demostrado que las familias portadoras de la variante genética compartían un haplotipo común, exceptuando que los portadores de una de ellas presentaban variación en el primer microsatélite. Este hallazgo podría indicar que esta última familia guardase un menor grado de parentesco respecto a las demás familias. El análisis realizado sobre la procedencia geográfica de las familias ha revelado que las aquellas que compartían el primer haplotipo provenían del área metropolitana de Murcia, mientras que la última familia procedía de la comarca del Altiplano, de forma que la diferencia evidenciada en el haplotipo puede asociarse con una mayor lejanía geográfica (Figura 65).

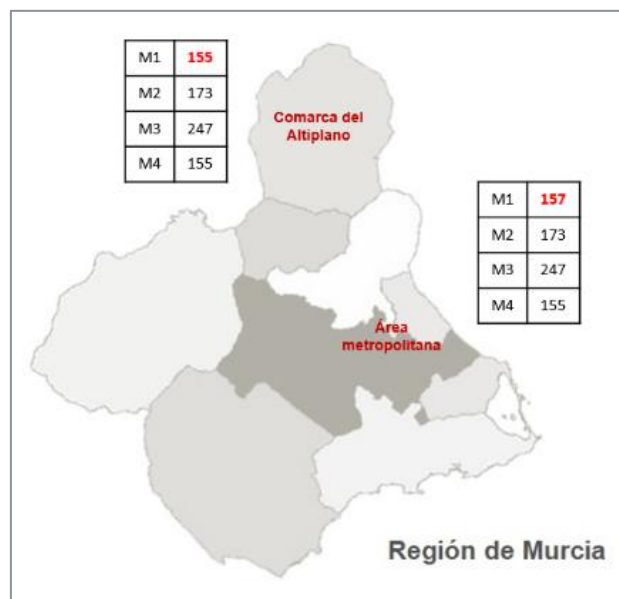


Figura 65. Representación geográfica de los haplotipos de las familias portadoras de c.8251_8254del

La estimación de la antigüedad de dicha variante ha sido actualizada a 7 generaciones, lo que supone que sea una mutación fundadora de reciente aparición y que el número de familias afectadas sea considerable en una población reducida como la Región de Murcia.

Una limitación destacable fue la imposibilidad de obtener información sobre el origen de la familia donde fue descrita por primera vez la mutación en el artículo español de Tavera-Tapia y colaboradores ni poder realizar el estudio de haplotipos en esta familia.

En relación a la expresión fenotípica de la variante c.8251_8254del se ha observado que el cáncer de mama se corresponde con el fenotipo más diagnosticado, estando presente en todas las familias portadoras de dicha variante genética. Esto resulta compatible con lo descrito en la bibliografía disponible sobre el fenotipo asociado a variantes genéticas en *ATM* (142,187,188).

En los estudios realizados en portadores de variantes patogénicas en *ATM*, no se han demostrado características histopatológicas distintivas del cáncer de mama (189). Por el contrario, se ha reportado una evidente asociación del subtipo molecular de cáncer de mama caracterizado por la positividad para los receptores hormonales (estrógenos y progesterona), mientras que existe una mayor heterogeneidad en la expresión del receptor HER2 (160). En consonancia, el perfil fenotípico predominante del cáncer de mama en las familias de nuestra población de estudio fue de tipo ductal invasivo y subtipo molecular luminal A. La edad mediana de diagnóstico de cáncer de mama en portadores es de 48 años, similar a lo reportado por Tavera-Tapia y colaboradores (142).

Además del cáncer de mama, en las familias portadoras de esta variante genética se diagnosticaron otros tipos de cáncer en hombres: linfoma de las células del manto (63 años), melanoma con metástasis pulmonares (68 y 69 años, respectivamente) y cáncer de vejiga (71 años). Estudios previos sostenían la idea de que alteraciones genéticas en *ATM* principalmente estaban vinculadas a un riesgo incrementado de cáncer de mama (142,160,187,188,190), pero la mayoría apoyaban relación con otros tipos de carcinomas y neoplasias hematológicas (151,191–194).

2. PRIORIZACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO

En los genes de predisposición al cáncer hereditario, la interpretación clínica de variantes genéticas resulta esencial en el proceso de asesoramiento genético de las familias portadoras. La incorporación de los paneles de genes a la rutina diagnóstica ha supuesto un aumento exponencial del número de VUS detectadas, lo que supone un importante problema asociado al diagnóstico molecular del cáncer hereditario. Estas variantes presentan evidencia científica insuficiente para respaldar su benignidad o patogenicidad y, por lo tanto, la comprensión de su implicación clínica plantea serias dificultades a clínicos y pacientes. Asimismo, la incertidumbre asociada a estas variantes sin clasificar puede suponer un importante dilema en el manejo clínico y asesoramiento del paciente y de los familiares (129). Según las recomendaciones de expertos y la declaración Europea de consenso publicadas recientemente, es recomendable informar las VUS halladas en *BRCA1/2* y en otros genes, principalmente en aquellos con riesgo relativo alto. Sin embargo, esta información no debe considerarse para la toma de decisiones clínicas ni para estudios predictivos en familiares (72). Hasta la fecha, el Comité de Asesoramiento Genético de la Región de Murcia ha decidido de forma consensuada informar únicamente las VUS priorizadas. No obstante, se ha considerado conveniente mantener en continua reevaluación todas las VUS detectadas y realizar un seguimiento de los portadores de variantes priorizadas a la espera de nuevos hallazgos que aporten evidencia científica para su futura clasificación clínica.

Cabe destacar que la revisión periódica y estudio pormenorizado de estas variantes sin clasificar implica una inversión importante de recursos por parte del laboratorio clínico y de las consultas de asesoramiento genético. Con el objetivo de facilitar este proceso, destaca la importancia de implementar un sistema de revisión eficiente que incluya estrategias de priorización para identificar objetivamente aquellas variantes en las que resulta recomendable realizar estudios adicionales para así poder determinar su efecto clínico y posible implicación en el SCMOH de forma prioritaria con respecto al resto de las VUS (131). Por ello, durante estos últimos años nuestro grupo de trabajo ha focalizado sus esfuerzos en el diseño de algoritmos destinados a la clasificación de variantes genéticas y priorización de VUS. La **Figura 66** muestra la evolución de los diferentes algoritmos empleados en el Laboratorio de Genómica.

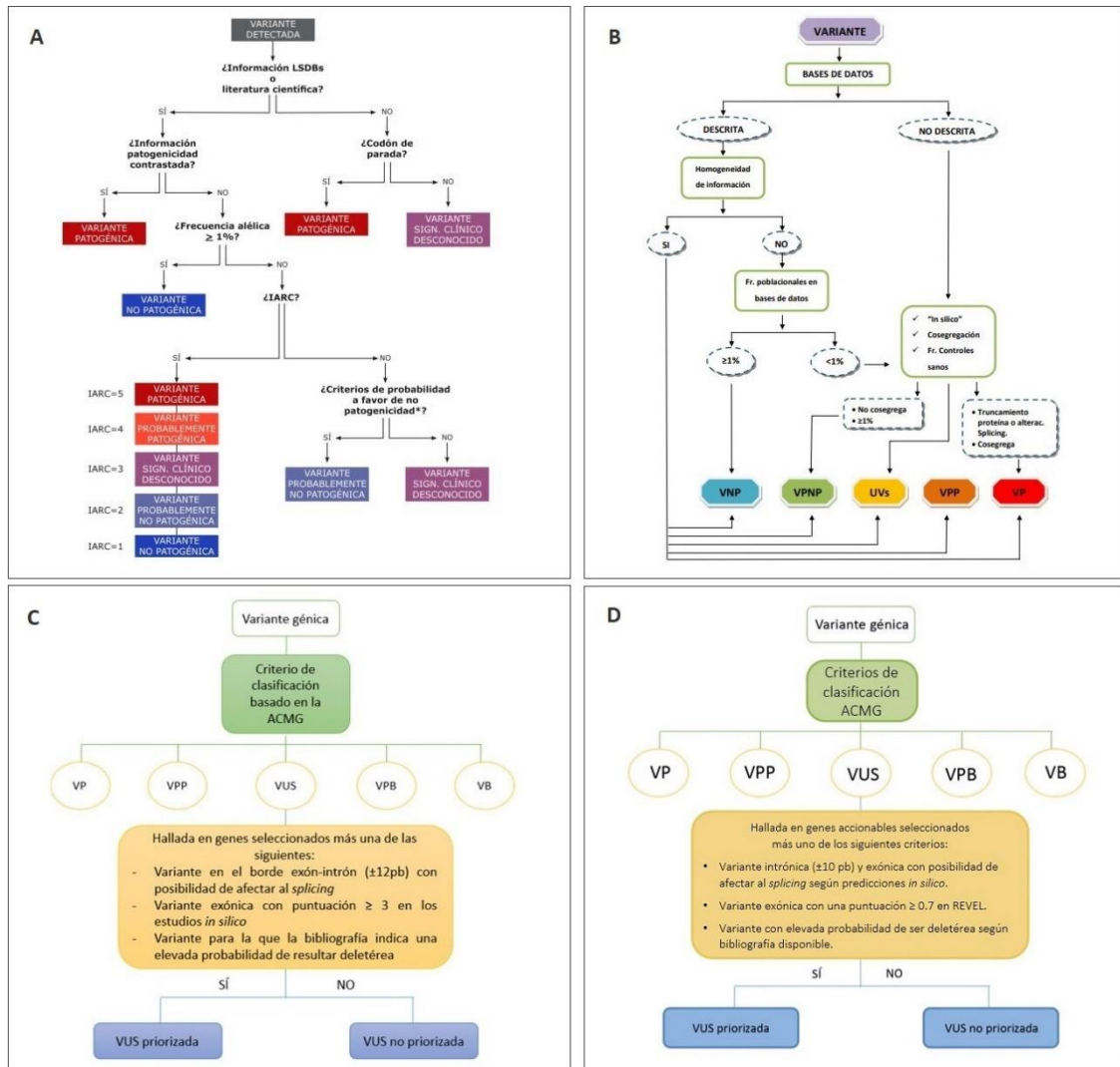


Figura 66. Evolución del algoritmo de clasificación de variantes genéticas obtenidas en los estudios de secuenciación masiva en el Laboratorio de Genómica. A. Clasificación según Gabaldó-Barrios X (195), B. Clasificación según Sánchez-Bermúdez AI (196), C. Clasificación según Castillo-Guardiola V (143). D. Clasificación según algoritmo actual. LSDBs: *Locus Specific Databases*, IARC: *International Agency for Research on Cancer*, ACMG: *American College of Medical Genetics and Genomics*, REVEL: *Rare Exome Variant Ensemble Learner*, Fr: frecuencia, VNP: variante no patogénica, VPP: variante probablemente patogénica, UVs (VUS): variante de significado clínico desconocido, VPB: variante probablemente benigna, VP: variante patogénica, VB: variante benigna

Los modelos propuestos por Gabaldó-Barrios (2014) y por Sánchez-Bermúdez (2016) se centran en la clasificación de variantes genéticas según la IARC, utilizando información contrastada obtenida de bases de datos específicas y evidencia científica basada en frecuencia alélica, análisis de cosegregación, estudios *in silico* o funcionales. El modelo propuesto posteriormente por Castillo-Guardiola (2019) y el diseñado en el presente

estudio, incluyen un algoritmo de priorización de VUS a la clasificación de variantes genéticas según la ACMG. Ambos modelos han tomado como referencia un algoritmo previamente desarrollado por Bonache y colaboradores (71) y un conjunto de criterios adoptados de un compendio de publicaciones actualizadas sobre predicción de patogenicidad de variantes genéticas (126–131). Los criterios de priorización de variantes implementados en el algoritmo actual, basados en la accionabilidad clínica de los genes y en las predicciones estimadas por las herramientas computacionales permiten seleccionar aquellas variantes susceptibles de patogenicidad, acuñadas con el término de VUS priorizadas (197). De esta forma, se priorizaron variantes intrónicas (± 10 pb) y exónicas con posibilidad de afectar al *splicing* según predicciones *in silico* y aquellas variantes exónicas con una puntuación ≥ 0.7 en REVEL, además de variantes genéticas con elevada probabilidad de ser deletérea según bibliografía disponible.

Si realizamos una comparativa de los resultados obtenidos en estudios previos como los publicados por Bonache y colaboradores (35 variantes priorizadas de un total de 383 VUS), y Castillo-Guardiola (23 variantes priorizadas de un total de 79 VUS) existen diferencias significativas en el número de variantes priorizadas obtenidas por Castillo-Guardiola respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo (16 variantes priorizadas de un total de 115 VUS) (71,143). Esto se puede explicar por limitar el número de genes estudiados a aquellos clínicamente accionables y utilizar REVEL como soporte bioinformático para evaluar el potencial efecto clínico de las variantes *missense*, lo que reduce considerablemente el número de variantes priorizadas.

El *score* de 0.7 empleado como umbral para discriminar entre benignidad y patogenicidad, se asocia con una sensibilidad de 0.5786 y una especificidad de 0.9556. Cabe destacar que, inicialmente fue empleado un *score* de 0.58 relacionado con una sensibilidad de 0,6883 y una especificidad de 0.9209 (198). Esta modificación se traduce en una reducción del número de variantes priorizadas sujetas a estudios adicionales, lo que permite optimizar los recursos disponibles en el laboratorio clínico para realizar estudios complementarios (análisis de cosegregación, estudios de casos-controles y ensayos funcionales) únicamente en aquellas variantes susceptibles de patogenicidad que puedan conferir un mayor riesgo de cáncer de mama y ovario hereditario.

En la presente tesis doctoral, un total de 115 VUS fueron detectadas en los genes clínicamente accionables estudiados. Al igual que sucede con las variantes patogénicas, los principales genes en los que se hallaron VUS fueron *BRCA1/2*, seguido de los genes de moderada penetrancia *ATM* y *CHEK2* (Figura 67). Esto podría explicarse porque existe evidencia científica de una mayor prevalencia de variantes descritas en estos genes respecto a otros genes de alta y moderada penetrancia (160).

Del total de VUS, 7 fueron reclasificadas como benignas o probablemente benignas y 1 como probablemente patogénica. Estos resultados coinciden con lo reportado en otros estudios de reclasificación de variantes, destacando un número superior de variantes reclasificadas como benignas (130). Tras realizar una profunda revisión bibliográfica y aplicar el algoritmo de priorización diseñado en el presente trabajo, un total de 16 VUS fueron priorizadas, lo que supuso un 15% del total de VUS detectadas.

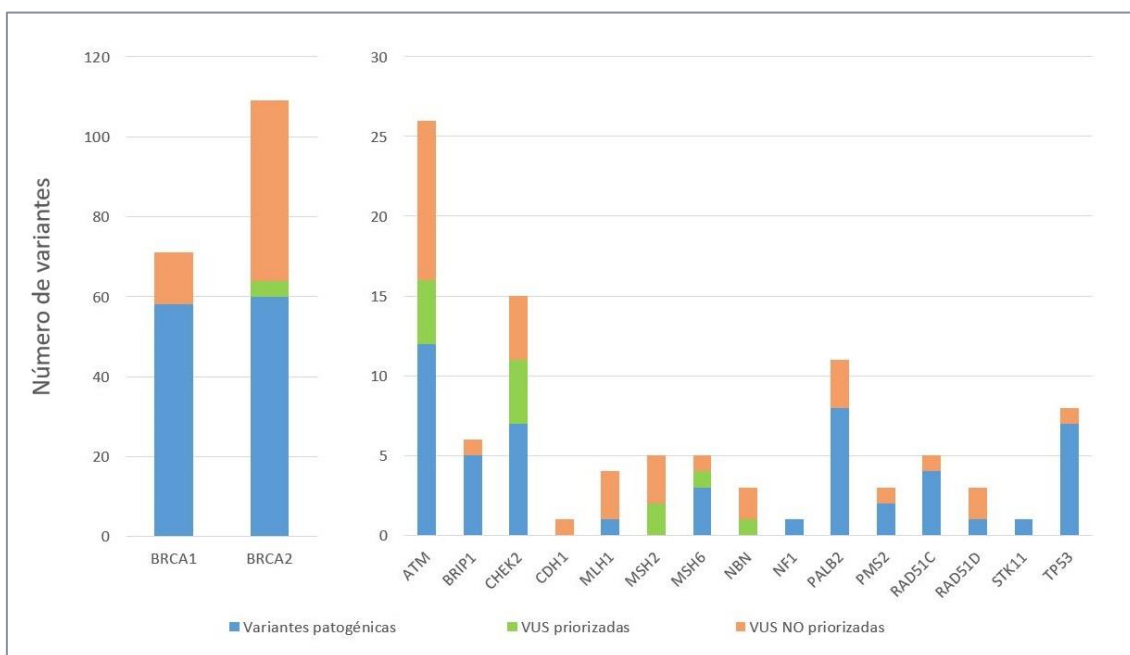


Figura 67. Resumen de las variantes patogénicas, VUS priorizadas y VUS no priorizadas detectadas en genes clínicamente accionables

Dada la implicación clínica de la interpretación y la clasificación de variantes genéticas, la implementación del algoritmo de priorización de variantes desarrollado por nuestro grupo de investigación ha supuesto un avance de gran utilidad en la práctica clínica. Los resultados sugieren que es una estrategia eficaz para optimizar la realización de estudios complementarios en aquellas variantes priorizadas, lo que supone una mejora

del rendimiento del laboratorio clínico y de las consultas de asesoramiento genético. Asimismo, se han notificado 20 familias portadoras de VUS priorizadas (15%), lo que permitirá realizar un seguimiento periódico de estos pacientes, quedando a la espera de evidencia científica que posibilite la futura clasificación de estas variantes y por ende, un correcto asesoramiento genético. No obstante, consideramos necesario continuar aplicando dicho algoritmo para obtener un mayor número de resultados y conclusiones que nos permitan mejorar el proceso de priorización y reclasificación de VUS.

Otro aspecto importante a considerar es la necesidad de estandarizar la interpretación y clasificación de variantes genéticas. Los criterios ACMG-AMP establecidos por Richards y colaboradores (67) fueron refinados por Nykamp y colaboradores (199). Sin embargo, su implementación en la práctica clínica resulta compleja ya que introdujo múltiples mejoras detalladas en los criterios previamente establecidos. Tavgigian y colaboradores propusieron un marco de aproximación bayesiana integrando los criterios ACMG-AMP en una base matemática que permite simplificar mediante un sistema de puntos el proceso de clasificación de variantes genéticas (200,201). Posteriormente, se fundaron dos iniciativas *Clinical Genome Resource (ClinGen)* y *ClinVar* impulsadas por *National Institutes of Health (NIH)* para consolidar la estandarización e interpretación de las variantes genéticas. *ClinGen* es un recurso dedicado a evaluar la accionabilidad clínica de los genes y evidencia clínica de variantes genéticas por consensos de expertos, además de desarrollar e implementar sistemas para estandarizar la interpretación y clasificación de variantes genéticas. Del mismo modo, permite la difusión de conocimientos y recursos para uso clínico y de investigación a la comunidad científica destinados a mejorar el manejo clínico y asesoramiento genético de los pacientes (202). Posiblemente, la aplicación de esta agrupación de estrategias destinadas a la estandarización de la clasificación de variantes genéticas junto con la inclusión de la frecuencia de alelos menores (MAF) podrían ser útiles en la optimización del algoritmo desarrollado en el presente estudio.

VUS priorizadas susceptibles de *splicing* alternativo o aberrante

Del mismo modo, consideramos que la caracterización de los eventos de *splicing* es una herramienta de gran utilidad en la clasificación de variantes genéticas. Por este motivo,

con el fin de interpretar aquellas variantes priorizadas localizadas en sitios canónicos de *splicing*, en la presente tesis doctoral se realizaron estudios funcionales de RT-PCR y posterior análisis de fragmentos por electroforesis capilar o secuenciación Sanger confirmando los siguientes resultados:

- ✓ Presencia de 1 evento de *splicing* aberrante, permitiendo así clasificar la variante c.3402+3A>C en *ATM* como probablemente patogénica.
- ✓ La variante c.1008G>A en *CHEK2* no altera el patrón de *splicing* constitutivo, lo que reduce significativamente la probabilidad de que dicha variante sea patogénica por lo que en ausencia de datos complementarios, consideramos adecuado tipificar esta variante como VUS no priorizada.
- ✓ Presencia de un evento de *splicing* alternativo en el análisis *in vitro* de la variante c.8488-1_8489delinsTCCATTACA en *BRCA2* que mantendría la fase de lectura y, potencialmente podría codificar una proteína funcional, por lo que dicha variante debe clasificarse como VUS. No obstante, consideramos conveniente incluirla como VUS priorizada con la finalidad de poder realizar estudios de cosegregación que permitan en un futuro clasificar dicha variante de forma definitiva. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible extender el estudio genético a familiares.

Asimismo, asumiendo las conclusiones aportadas en los estudios funcionales previos en los que se ha probado la presencia de un evento de *splicing* alternativo en el análisis *in vitro* de la variante c.320-5T>A en *CHEK2* (158,159), se reduce significativamente la probabilidad de que dicha variante sea patogénica, y en ausencia de datos complementarios que ayuden a la clasificación definitiva de la misma, consideramos adecuado tipificar esta variante como VUS no priorizada.

Una limitación importante en el estudio de priorización de variantes fue la imposibilidad de poder realizar el estudio *in vitro* de la variante priorizada c.2071-4A>G en *NBN* susceptible de alterar el patrón de *splicing*, tal y como se predice en los programas computacionales.

Desde el punto de vista de la traslación a la clínica, destacamos la importancia de compartir estos nuevos hallazgos con la comunidad científica para así, facilitar la interpretación y reclasificación de variantes genéticas.

3. PERSPECTIVAS FUTURAS EN EL ESTUDIO GENÉTICO DEL SCMOH

Los avances científicos y tecnológicos relacionados con el estudio genético del cáncer de mama y ovario hereditario han supuesto una revolución de gran utilidad clínica en la práctica clínica. No obstante, la interpretación de los resultados obtenidos del análisis genético mediante panel de genes continúa siendo un importante desafío para los genetistas debido al incremento significativo de nuevos genes analizados y del número de VUS detectadas de forma frecuente mediante este tipo de estudios genéticos. Por ello, resulta necesario limitar la inclusión de genes a aquellos con accionabilidad clínica demostrada y establecer unos criterios de priorización de VUS que nos permitan optimizar la realización de estudios complementarios en aquellas variantes con mayor potencial deletéreo con el fin de dilucidar su efecto clínico y posible implicación en el SCMOH de forma prioritaria con respecto al resto de las VUS.

Por otro lado, los criterios de selección de pacientes candidatos a la realización de estudios genéticos se han ido moderando con el paso del tiempo, lo que supone un incremento cada vez mayor del número de individuos estudiados. Además, las pruebas oncogenéticas se han convertido en una poderosa herramienta predictiva terapéutica que han aumentado la demanda de estudios genéticos solicitados. Por todo ello, resulta conveniente destacar la importancia de consensuar estrategias consistentes destinadas al asesoramiento genético de las familias portadoras.

Por último, una proporción significativa de la predisposición hereditaria a estos tumores se explica a partir de un modelo de susceptibilidad poligénica combinado con factores no genéticos que permite estimar el riesgo individual de desarrollar cáncer. Por ello, la aplicación en la práctica clínica de modelos optimizados de predicción y estratificación de riesgo que permitan predecir la susceptibilidad hereditaria al cáncer, puede ser muy útil en un contexto de cribado poblacional para detectar aquellas pacientes de alto riesgo candidatas a pruebas genéticas.

En definitiva, la medicina de precisión ha supuesto una nueva perspectiva en el estudio genético de este síndrome hereditario y en el abordaje terapéutico del cáncer, cuya finalidad se basa en el beneficio de los avances científicos y tecnológicos para mejorar las opciones de diagnóstico precoz y tratamiento personalizado del cáncer.

VI. Conclusiones

Conclusión 1

Este trabajo demuestra la existencia de una importante representación de variantes patogénicas recurrentes asociadas a los genes *BRCA1* y *BRCA2* en la población de estudio. De hecho, los cambios c.68_69del, c.212+1G>A y c.5123C>A han correspondido al 30% de la población portadora de variantes en *BRCA1*, mientras que la delección del exón 2 junto con los cambios c.3264dup, c.3455T>G, c.9117G>A se han encontrado en el 30% de la población portadora de variantes en *BRCA2*. Paralelamente, se han detectado las variantes c.181T<G y c.798_799del en *BRCA1*, y c.1310_1313del y c.7234_7235insG en *BRCA2*, descritas previamente en población de origen norteafricano, por lo que se pone de manifiesto la importante representación de estas familias en la Región de Murcia.

Conclusión 2

En comparación con población europea y española, los resultados obtenidos de prevalencia mutacional asociada a *BRCA1* en la Región de Murcia, resultan más concordantes que los referentes a *BRCA2*. En los estudios de correlación genotipo-fenotipo en los portadores de variantes patogénicas recurrentes destaca el cáncer de mama unilateral como fenotipo más frecuente. Las características histopatológicas e inmunofenotípicas asociadas a tumores mamarios en *BRCA1/2* resultan compatibles con lo reportado previamente en la bibliografía.

Conclusión 3

Con respecto a estudios previos, se ha confirmado la presencia de un ancestro común de dos mutaciones fundadoras en la Región de Murcia: la variante c.1918C>T (*BRCA1*) detectada de forma exclusiva en nuestra población de estudio y la delección c.8251_8254del (*ATM*). Del mismo modo, la delección del exón 2 (*BRCA2*) se ha constatado como mutación fundadora en población española. Además, se ha demostrado que dichas variantes genéticas son de reciente aparición.

Conclusión 4

El notable incremento de variantes de significado clínico desconocido alerta sobre la necesidad de establecer criterios de priorización de VUS para seleccionar aquellas variantes en las que sería recomendable realizar estudios complementarios para determinar su efecto clínico y posible implicación en el SCMOH de forma prioritaria con respecto al resto de las VUS. En este sentido, la aplicación de un algoritmo de priorización se convierte en una herramienta útil y necesaria en la práctica asistencial.

Conclusión 5

El análisis *in vitro* de *splicing* permite reducir de forma significativa la incertidumbre asociada a las VUS priorizadas susceptibles de modificar el procesamiento del ARN mensajero. Los resultados de los estudios funcionales realizados en la presente tesis doctoral nos permiten concluir que:

- ✓ La variante c.3402+3A>C en *ATM* debe ser reclasificada por *splicing* aberrante como probablemente patogénica.
- ✓ Las variantes c.320-5T>A en *CHEK2* y c.8488-1_8489delinsTCCATTACA en *BRCA2* inducen un evento de *splicing* alternativo que mantendría la fase de lectura y, potencialmente podrían codificar una proteína funcional, por lo que en ausencia de datos complementarios, deberán considerarse como VUS.
- ✓ La variante c.1008G>A en *CHEK2* no altera el patrón de *splicing* constitutivo, por lo que en ausencia de datos complementarios, deberá considerarse como VUS.

VII. Anexos

Anexo A. Conformidad del proyecto de investigación por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca



Se he recibido en la Secretaría del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, la solicitud de evaluación del siguiente Proyecto de Investigación:

Título: Estudio de variantes genéticas recurrentes y priorización de variantes de significado clínico desconocido asociadas al síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH) en familias de la región de Murcia

Investigadora Principal: **M^a Desamparados Sarabia Meseguer**

El estudio será evaluado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos de este Hospital en su próxima reunión

Murcia, 7 de mayo de 2021

GARCIA GOMEZ
ROSARIO -
07566554Z

Firmado digitalmente
por GARCIA GOMEZ
ROSARIO - 07566554Z
Fecha: 2021.05.07
09:56:55 +02'00'

Fdo. Rosario García Gómez
Secretaría Técnica CEIm

Anexo B. Consentimiento informado para realización de pruebas genéticas con fines asistenciales y de investigación traslacional relacionados con el cáncer hereditario

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS GENÉTICAS EN CÁNCER HEREDITARIO.

UNIDAD DE ASESORAMIENTO GENÉTICO EN CÁNCER HEREDITARIO.
SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA.

Introducción

Este formulario describe los beneficios, riesgos y limitaciones de las pruebas genéticas de susceptibilidad heredada al cáncer. Ésta es una prueba voluntaria y usted debe obtener asesoramiento genético antes de firmar este formulario.

¿Para qué se hace?

Esta prueba analiza un gen o genes específicos para detectar cambios genéticos denominados mutaciones. El gen o los genes analizados se asocian a un síndrome específico de cáncer hereditario. Esta prueba ayudará a determinar si una persona tiene un riesgo significativamente mayor de desarrollar ciertos tumores debidos a una mutación (o mutaciones) del gen de predisposición al cáncer. Las pruebas genéticas permiten calcular el riesgo de cáncer hereditario de manera más precisa que el que se logra considerando sólo los antecedentes personales y familiares de la persona.

¿Qué le vamos a hacer?

Para este estudio se le extraerá sangre para llenar un tubo de ensayo que se analizará en un laboratorio de este centro. En algunas ocasiones es posible que sea necesario que esta muestra sea enviada a otro laboratorio de referencia para completar el estudio.

¿Qué beneficios se esperan obtener de este procedimiento?

Los resultados de esta prueba podrían ayudarle a usted y a su médico a tomar decisiones informadas sobre su atención médica, tales como pruebas de detección precoz, cirugías para reducir el riesgo y estrategias de tratamiento con fármacos con finalidad preventiva.

La identificación de una mutación (o mutaciones) en un gen en una familia permite que otros familiares consanguíneos determinen si comparten o no el mismo riesgo de cáncer hereditario. Si obtiene un resultado positivo, se le proporcionará la información de cómo se hereda este tumor y de la probabilidad de que sus hijos y parientes consanguíneos puedan haber heredado la misma mutación (o mutaciones) en el gen o genes analizados.

Si obtiene un resultado negativo para una mutación que se sabe que existe en su familia, no puede transmitir esta mutación a sus hijos y por lo general, se considera que usted tiene el mismo riesgo de cáncer que la población general.

¿Qué riesgos tiene?

Las pruebas genéticas por lo general requieren que el ADN se extraiga de una muestra de sangre. Los efectos secundarios de una extracción de sangre son poco comunes pero podrían incluir: mareos, desmayos, dolor, hemorragia, formación de hematomas, y en raras ocasiones, infección. Los resultados de esta prueba serán comunicados exclusivamente a usted y serán custodiados por el Hospital.

¿Qué genes se estudian?

En la mayoría de los casos, el estudio se limita inicialmente al análisis de un grupo o **panel de genes** relacionados con la enfermedad o el trastorno genético mediante metodología de secuenciación masiva.

En el caso de que en el estudio genético se detecte una variante patogénica o probablemente patogénica (ambas relacionadas con una mayor predisposición a padecer la enfermedad), este resultado se comprobará nuevamente mediante el método de confirmación de Sanger, utilizando la misma muestra de sangre periférica obtenida previamente. Así mismo, los hallazgos de grandes reordenamientos génicos también serán comprobados mediante la metodología disponible en el laboratorio.

En cualquier caso, y a pesar de la exhaustividad de estos estudios, **es posible que no se logre encontrar la causa** de la enfermedad o del trastorno genético, ya que la sensibilidad de estas pruebas no es del 100%.

¿Qué limitaciones tiene esta técnica?

Los estudios de secuenciación masiva generan una gran cantidad de datos y es preciso distinguir los que puedan ser relevantes de los que puedan no serlo. Existen además ciertas limitaciones técnicas que conviene conocer para interpretar los resultados con precisión:

- Existen ciertas regiones en los genes que pueden resultar difíciles de analizar. Si esto sucediera en el análisis, se indicaría en el informe.
- Si el estudio se limita al análisis de un grupo o panel de genes, únicamente se podrán detectar mutaciones en estos genes. Por tanto, mutaciones de interés en otros genes no incluidos en el panel no van a ser detectadas. El informe incluirá la lista exacta de genes analizados, así como el diseño de panel específico empleado para el estudio.

¿Cuáles son los posibles resultados de un estudio de secuenciación masiva?

Nos podemos encontrar ante cuatro situaciones posibles:

- 1) *Que se detecte una o más alteraciones considerada/s como causante/s de la enfermedad o del trastorno genético* que indicó el estudio, lo que confirmaría o aclararía el diagnóstico. En esta situación, se comentará con el paciente el alcance y las implicaciones del resultado.
- 2) *Que se detecte una o más alteraciones de significado incierto*. En este caso puede ser necesario solicitar exploraciones complementarias o estudiar a otros miembros de la familia con el fin de intentar confirmar si los hallazgos se relacionan o no con la enfermedad o el trastorno genético que motivó el estudio.
- 3) *Que no se detecten alteraciones* que puedan explicar la enfermedad o el trastorno genético.
- 4) *Que, en el caso de que se analicen todos los genes (secuenciación del exoma), se detecten hallazgos incidentales o fortuitos*. Estos se definen como alteraciones detectadas de forma casual, no relacionadas con la enfermedad o el trastorno genético que indicó el estudio, pero que pueden tener implicaciones relevantes para la salud del paciente y/o de sus familiares.

¿Qué hallazgos se informan al paciente y cuáles no?

Se informan:

- Hallazgos causantes o relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que indicó el estudio.

- **Si el paciente o el tutor legal lo solicita y lo autoriza**, hallazgos incidentales o fortuitos no relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que indicó el estudio pero que pudieran tener consecuencias importantes para la salud del paciente o de sus familiares.

No se informan:

- Hallazgos de significado incierto sin relación causal aparente con el motivo del estudio.

El conocimiento sobre la función de los genes y su papel en determinadas enfermedades y trastornos genéticos avanza de forma rápida y progresiva. Una alteración genética identificada y considerada de significado incierto en la actualidad, deberá ser revisada más adelante. Por ello, en estos casos, se recomienda que, pasado un tiempo (uno o dos años), se acuda de nuevo a consulta para revisar la situación y comprobar si se dispone de nueva información que pudiera modificar la interpretación inicial del hallazgo.

¿Qué alternativas hay?

La no realización de este procedimiento supone tener que basarnos en los antecedentes personales o familiares para intentar hacer una aproximación al riesgo personal de padecer un cáncer aparentemente hereditario. Estas aproximaciones son menos precisas que las basadas en estudios genéticos y dificultan la toma de decisiones posterior para el seguimiento u otras medidas preventivas.

¿NOS AUTORIZA?

Por este documento solicitamos de forma general la autorización para realizar el procedimiento y/o prueba mencionados, y para usar imágenes e información de la Historia Clínica con fines docentes o científicos, ya que está siendo atendido en un Hospital Universitario. El anonimato será respetado.

Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y será tratada en conformidad con la **Ley Orgánica de Protección de Datos Personales 3/2018** y los derechos que conlleva de acceso, cancelación, rectificación y oposición.

En caso de obtener su autorización, los resultados de los estudios genéticos serán conservados y custodiados en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y podrán ser compartidos, de forma anónima sin identificadores personales, con otros grupos de investigación con el fin de aumentar el conocimiento sobre las enfermedades genéticas.

DECLARACIONES Y FIRMAS

Declaro mi conformidad con los puntos siguientes:

Con respecto al alcance de la prueba y a la información de los hallazgos:

Deseo que el ADN extraído de mí / la persona bajo mi tutela legal sea analizado mediante técnicas de biología molecular para valorar susceptibilidad heredada al cáncer.

Entiendo que es posible encontrar hallazgos de significado incierto y que existe además la posibilidad de encontrar hallazgos incidentales no relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que ha indicado el estudio.

Deseo / No deseo ser informado de los hallazgos incidentales que se puedan detectar y que pudieran tener consecuencias importantes para mi salud o la de mis familiares.

Con relación a la posible utilización de la muestra de ADN

Deseo / No deseo que la muestra de ADN se destruya una vez realizado el estudio.

Autorizo / No autorizo a que la muestra de ADN conservada en el HUVA pueda ser compartida de forma anónima con otros grupos que investiguen sobre la misma enfermedad o trastorno genético

Entiendo que el conocimiento médico avanza con el paso del tiempo y que sería conveniente acudir de nuevo a consulta más adelante para revisar la situación y comprobar si se dispone de nueva información que pudiera modificar la interpretación inicial de los resultados.

1. Firma del/la paciente:

D./D.^a con D.N.I.

He sido informado/a suficientemente de la intervención que se me va a realizar, y me han explicado los riesgos, complicaciones y alternativas posibles; lo he comprendido y he tenido el tiempo suficiente para valorar mi decisión. Por tanto, estoy satisfecho/a con la información recibida. Por ello, doy mi consentimiento para que se realice dicha prueba por el médico responsable y a ser informado/a de los resultados según lo arriba dispuesto. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno, solicitándolo por escrito, sin que esta decisión repercuta en mis cuidados posteriores.

Firma del paciente

Fecha:/...../.....

2. Firma de familiar o tutores

El paciente D./Dña. no tiene capacidad para decidir en este momento.

D. /D^a. con D.N.I. y en calidad de he sido informado/a suficientemente de la intervención que se le va a realizar. Por ello, doy expresamente mi consentimiento. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno.

Firma del tutor o familiar

Fecha: / /

3. Relativo al médico que solicita:

Dr./Dra. he informado al paciente y/o al tutor o familiar del objeto y naturaleza del procedimiento que se le va a realizar explicándole los riesgos, complicaciones y alternativas posibles.

Firma del médico

Fecha:/...../.....

4. Relativo a la no aceptación (REVOCACIÓN) del Consentimiento Informado:

D./Dña.....con D.N.I.....

He sido informado de que puedo revocar este documento previamente a la realización de la intervención, por lo que manifiesto que **NO** doy mi Consentimiento para someterme a la realización de la misma, dejando sin efecto mi Consentimiento anterior.

Firma del paciente

Fecha:/...../.....

Anexo C1. Fenotipo de las familias portadoras de la variante c.68_69del. RH: receptores hormonales, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, CDIS: carcinoma ductal in situ, ND: no disponible

Familia	Paciente	Sexo	Edad	Cáncer	Histopatología	Inmunohistoquímica
1	Caso índice	♀	39,51	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH- HER2-
2	Caso índice	♀	35,36	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH- HER2-
3	Caso índice	♀	40	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
4	Caso índice	♀	42	Mama	ND	ND
	Familiar	♀	56	Mama	Ductal invasivo	RH- HER2-
5	Caso índice	♀	23	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
	Familiar	♀	44	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
6	Caso índice	♀	55	Ovario	Seroso	-
	Familiares	♀	61	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
		♀	51	Ovario	Seroso	-
7	Caso índice	♀	63	Mama	ND	ND
	Familiar	♀	41	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
8	Caso índice	♀	55	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
9	Caso índice	♀	47	Mama	ND	ND
	Familiares	♀	70	Ovario	Seroso	-
		♀	39,52	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH+
10	Caso índice	♀	47	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
	Familiares	♀	61	Melanoma	-	-
		♀	56	Cérvix	-	-
11	Caso índice	♀	49	Ovario	Seroso	-
12	Caso índice	♀	44,52	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH- HER2-
			52	Endometrio	-	-
13	Caso índice	♀	32,36	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH- HER2-
14	Caso índice	♀	43	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
15	Caso índice	♀	36	Mama	Medular	RH+ HER2-
	Familiar	♀	14	Ovario	Mucinoso	-
16	Caso índice	♀	35	Mama	Medular	RH- HER2-
17	Caso índice	♀	45	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
18	Caso índice	♀	39,52	Mama bilateral	Medular + CDIS	RH- HER2-
			55		Ductal Invasivo	RH+ HER2-
19	Caso índice	♀	75	Ovario	Seroso	-
20	Caso índice	♀	61	Ovario	Seroso	-
21	Caso índice	♀	42	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
22	Caso índice	♀	49	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
23	Caso índice	♀	59	Ovario	Seroso	-

Anexo C2. Fenotipo de las familias portadoras de la variante c.212+1G>A. RH: receptores hormonales, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, ND: no disponible

Familia	Paciente	Sexo	Edad	Cáncer	Histopatología	Inmunohistoquímica
1	Caso índice	♀	61	Mama	ND	ND
			62	Ovario	ND	-
	Familiar	♀	41	Mama	Ductal invasivo	RH- HER2-
2	Caso índice	♀	35	Mama	Medular	RH+
			33	Mama	ND	ND
	Familiar	♀	60	Ovario	ND	-
3	Caso índice	♀	50	Ovario	Seroso	-
			64	Mama	Ductal invasivo	RH- HER2-
	Familiar	♀	37	Ovario	Seroso	-
4	Caso índice	♀	33	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH- HER2-
			45			RH+ HER2+
	Familiares	♀	31	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
		♀	66	Ovario	Seroso	-
	♂	54	Vejiga	-	-	
5	Caso índice	♀	35	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
			36	Ovario	Seroso	-
6	Caso índice	♀	62	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
			70			RH- HER2-
	Familiares	♀	64	Colon	-	-
		♂	57	Próstata	-	-
		♀	53	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
	♀	43	Ovario	Seroso	-	
7	Caso índice	♀	28	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
8	Caso índice	♀	50	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
9	Caso índice	♀	45	Ovario	Seroso	-
			71	Ovario	Seroso	-
	Familiares	♀	51	Ovario	Seroso	-
10	Caso índice	♀	28	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
11	Caso índice	♀	37,46	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
			Familiar	♀	57	Mama
12	Caso índice	♀	33	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
13	Caso índice	♀	34	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
14	Caso índice	♀	56	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
15	Caso índice	♀	62	Ovario	Seroso	-
16	Caso índice	♀	42	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
			45	Ovario	Seroso	-

Anexo C3. Fenotipo de las familias portadoras de la variante c.5123C>A. RH: receptores hormonales, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, CDIS: carcinoma ductal in situ, ND: no disponible

Familia	Paciente	Sexo	Edad	Cáncer	Histopatología	Inmunohistoquímica
1	Caso índice	♀	36,46	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH- HER2-
	Familiar	♀	34	Mama	Ductal invasivo	RH- HER2-
2	Caso índice	♀	58	Ovario	Seroso	-
73	Caso índice	♀	48	Mama	Medular	RH+ HER2-
	Familiares	♀	42,55	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH- HER2-
		♀	44	Mama bilateral	Medular	RH- HER2-
		♀	47		Metaplásico	
4	Caso índice	♀	34	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
	Familiares	♀	64	Gástrico	-	-
		♀	36	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
		♀	39	Mama	Ductal invasivo	RH- HER2-
5	Caso índice	♀	37	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
		♀	47	Ovario	Transicional	-
6	Caso índice	♀	40	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH- HER2-
		♀	41		CDIS	
7	Caso índice	♀	50,53	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH- HER2-
	Familiares	♀	60	Ovario	Seroso	-
7	Familiares	♀	55	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
8	Caso índice	♀	32	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
9	Caso índice	♀	34	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
10	Caso índice	♀	33	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
11	Caso índice	♀	38	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
	Familiar	♀	58	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
12	Caso índice	♀	54	Ovario	Seroso	-

Anexo C4. Fenotipo de las familias portadoras de la variante c.3264dup. RH: receptores hormonales, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, ND: no disponible

Familia	Paciente	Sexo	Edad	Cáncer	Histopatología	Inmunohistoquímica
1	Caso índice	♀	53,65	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH+ HER2-
	Familiar	♀	36	Mama	Lobulillar invasivo	RH+ HER2+
2	Caso índice	♀	38	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
	Familiar	♀	51	Mama	Lobulillar invasivo	RH+ HER2-
3	Caso índice	♀	58	Ovario	Seroso	-
			65	Leucemia	-	-
4	Caso índice	♀	70	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
5	Caso índice	♂	65	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
6	Caso índice	♀	56	Ovario	Seroso	-
7	Caso índice	♀	45	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
8	Caso índice	♀	49	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
	Familiar	♀	49	Mama	ND	ND
9	Caso índice	♀	54	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
10	Caso índice	♀	59	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-

Anexo C5. Fenotipo de las familias portadoras de la variante c.3455T>G. RH: receptores hormonales, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, ND: no disponible

Familia	Paciente	Sexo	Edad	Cáncer	Histopatología	Inmunohistoquímica
1	Caso índice	♀	50	Mama	Ductal invasivo	RH- HER2-
2	Caso índice	♀	38	Mama bilateral	Ductal invasivo Lobulillar invasivo	RH+ HER2-
3	Caso índice	♂	72	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
4	Caso índice	♀	48	Mama	Mucinoso	RH+ HER2-
	Familiar	♂	78	Colon	-	-
5	Caso índice	♀	48	Ovario	Seroso	-
	Familiar	♀	54	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
		♀	41	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
6	Caso índice	♀	31	Mama	Ductal invasivo	RH- HER2-
	Familiares	♀	49	Mama	Ductal invasivo	RH- HER2-
		♀	56	Ovario	ND	-
7	Caso índice	♀	44	Ovario	Seroso	-
	Familiar	♀	53	Ovario	Seroso	-
8	Caso índice	♀	52	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
	Familiares	♀	57	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
		♀	48	Mama	Lobulillar invasivo	RH+ HER2-
		♂	73	Colon	-	-
		♀	81	Endocrino	-	-
9	Caso índice	♀	50	Ovario	Seroso	-
10	Caso índice	♂	50	Próstata	-	-
11	Caso índice	♀	73	Endometrio	Seroso	-

Anexo C6. Fenotipo de las familias portadoras de la variante c.9117G>A. RH: receptores hormonales, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, CDIS: carcinoma ductal in situ, ND: no disponible

Familia	Paciente	Sexo	Edad	Cáncer	Histopatología	Inmunohistoquímica
1	Caso índice	♀	48	Cérvix	-	-
		♀	52,57	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
2	Caso índice	♀	47	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
		♀	62		Lobulillar Invasivo	
3	Caso índice	♀	46	Mama	ND	ND
			60	Ovario	ND	-
	Familiar	♀	49	Ovario	Seroso	-
			59	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
4	Caso índice	♀	42	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
5	Caso índice	♀	35	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
	Familiar	♂	46	Próstata	-	-
6	Caso índice	♀	43,53	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
			71	Endometrio	-	-
7	Caso índice	♀	38	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
	Familiares	♀	46	Mama	CDIS	RH+ HER2-
		♂	47	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
8	Caso índice	♀	36	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
9	Caso índice	♀	54,72	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
10	Caso índice	♀	44	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
11	Caso índice	♀	38	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
	Familiares	♀	47	Mama	CDIS	RH+
		♂	41	Linfoma	-	-
12	Caso índice	♀	76	Ovario	Seroso	-
13	Caso índice	♀	58	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
			58	Glioblastoma	-	-
	Familiares	♀	63	Ovario	Seroso	-
		♀	62	Mama	Lobulillar Invasivo	RH+ HER2-
14	Caso índice	♀	40	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
	Familiar	♂	60	Vejiga	-	-
15	Caso índice	♀	43	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
16	Caso índice	♀	71	Ovario	Seroso	-
	Familiar	♀	41	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-

Anexo C7. Fenotipo de las familias portadoras de la variante c.1918C>T. RH: receptores hormonales, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, ND: no disponible

Familia	Paciente	Sexo	Edad	Cáncer	Histopatología	Inmunohistoquímica
1	Caso índice	♀	27	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
	Familiares	♀	33	Mama	Ductal invasivo	RH- HER2-
		♀	ND	Mama bilateral	ND	ND
2	Caso índice	♀	48,63	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH- HER2-
	Familiar	♀	55	Mama	ND	ND
3	Caso índice	♀	43	Melanoma	-	-
			48	Ovario	Seroso	-
4	Caso índice	♀	36	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
	Familiar	♀	47	Ovario	Seroso	-
5	Caso índice	♀	37	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2+
6	Caso índice	♀	57	Colon	-	-
			63	Mama	Ductal invasivo	RH- HER2-
	Familiar	♂	60	Esófago	-	-
7	Caso índice	♀	60	Ovario	ND	ND
8	Caso índice	♀	21	Mama	ND	ND
	Familiar	♂	53	Piel (basocelular)	-	-
9	Caso índice	♀	64	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-

Anexo C8. Fenotipo de las familias portadoras de la delección del exón 2. RH: receptores hormonales, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, ND: no disponible

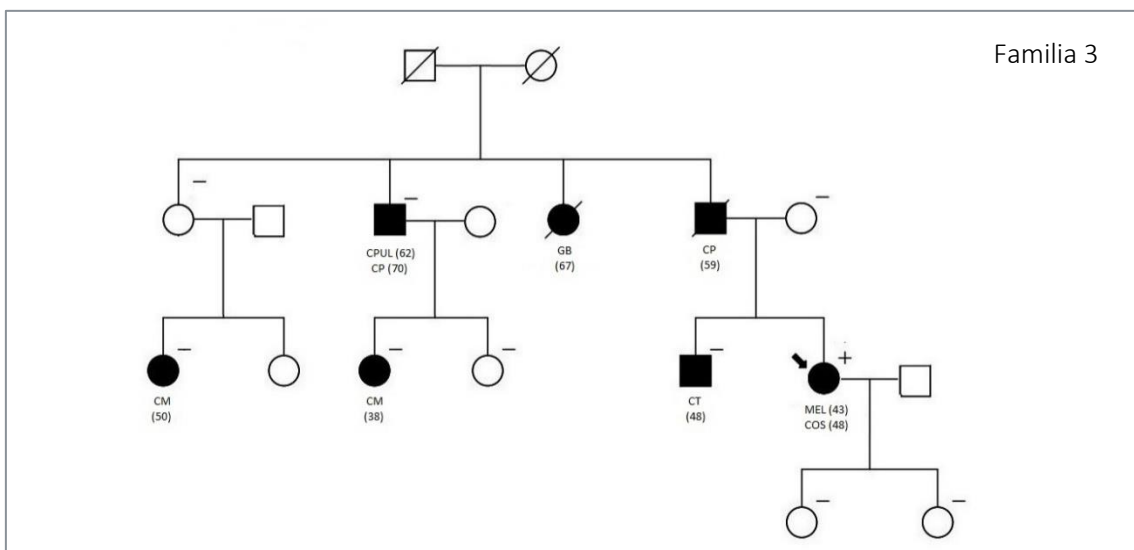
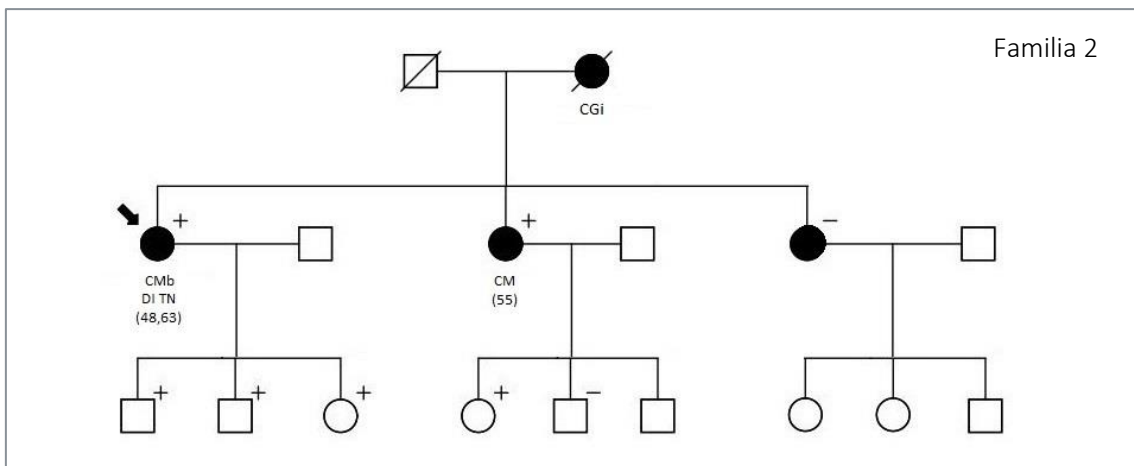
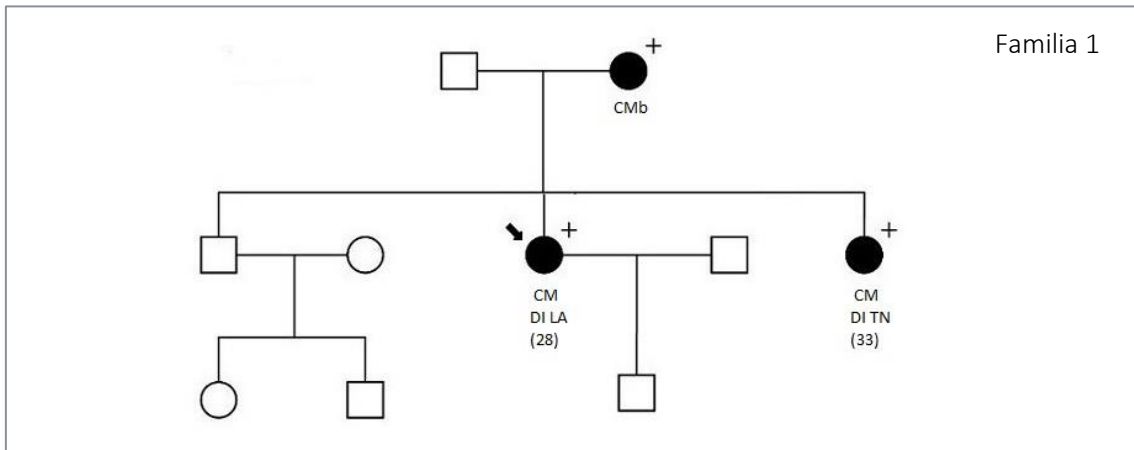
Familia	Paciente	Sexo	Edad	Cáncer	Histopatología	Inmunohistoquímica
1	Caso índice	♀	67	Ovario	ND	ND
			71,81	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH+ HER2+
	Familiares	♀	35,48	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH+ HER2-
		♀	30	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2+
2	Caso índice	♂	60	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
3	Caso índice	♀	27	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
			53	Colon	-	-
	Familiares	♂	69	Gástrico	-	-
		♀	38	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
4	Caso índice	♀	43	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
5	Caso índice	♀	46	Mama	Lobulillar Invasivo	RH+ HER2-
	Familiar	♂	80	Glioblastoma	-	-
6	Caso índice	♀	45	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
	Familiar	♀	47	Mama	Ductal Invasivo	RH+
7	Caso índice	♀	47	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
			50	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
	Familiares	♀	36	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
			55	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
8	Familiares	♀	40	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
9	Caso índice	♀	75	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
			75	Ovario	Seroso	-
10	Caso índice	♀	39	Mama	Metaplásico	RH- HER2-
	Familiar	♀	41	Mama bilateral	Ductal, Lobulillar	RH+ HER2-
11	Caso índice	♀	41	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-
12	Caso índice	♀	40	Mama	Ductal Invasivo	RH- HER2-

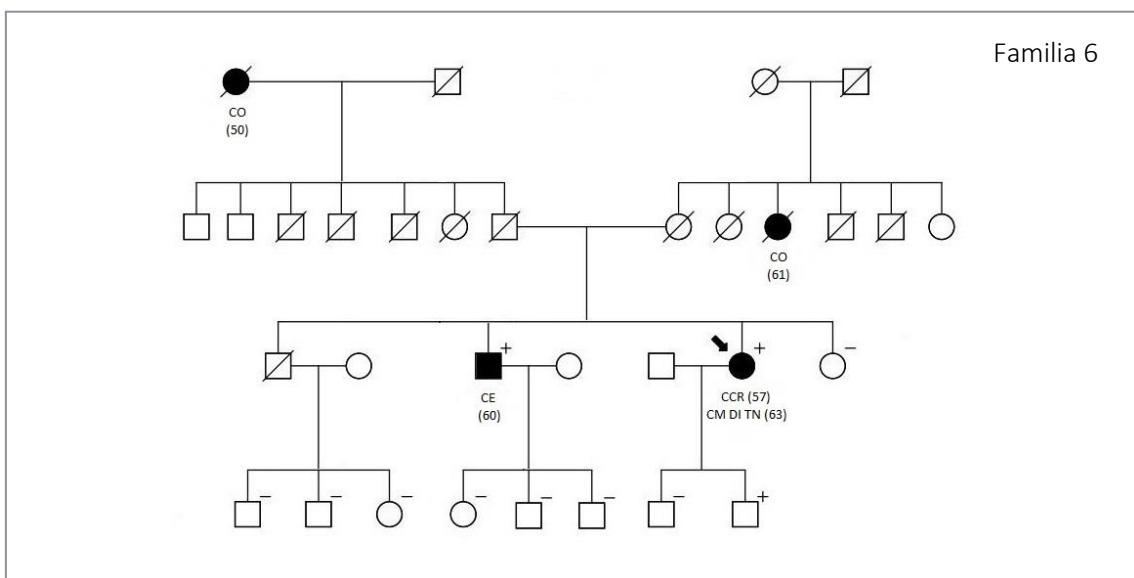
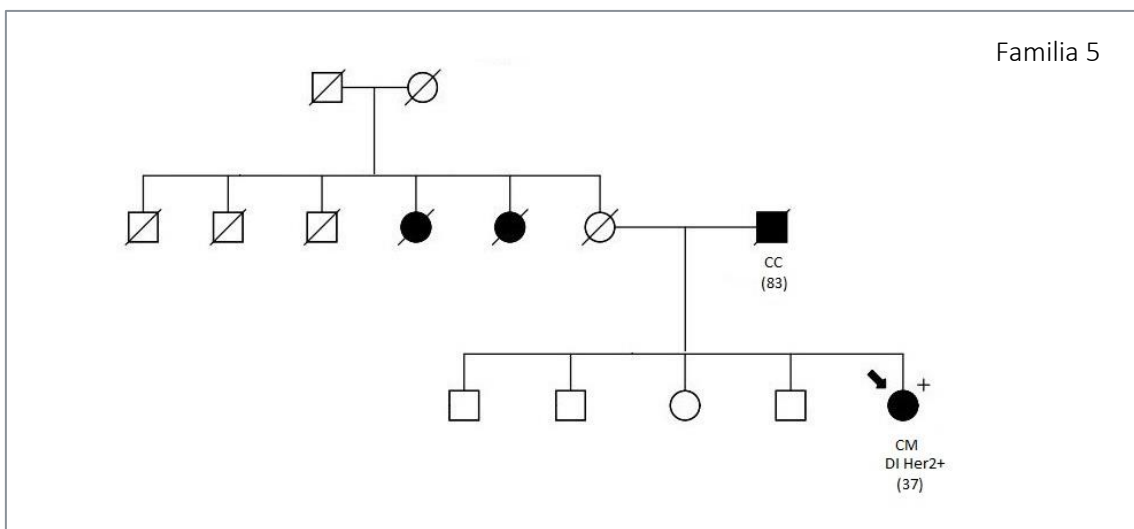
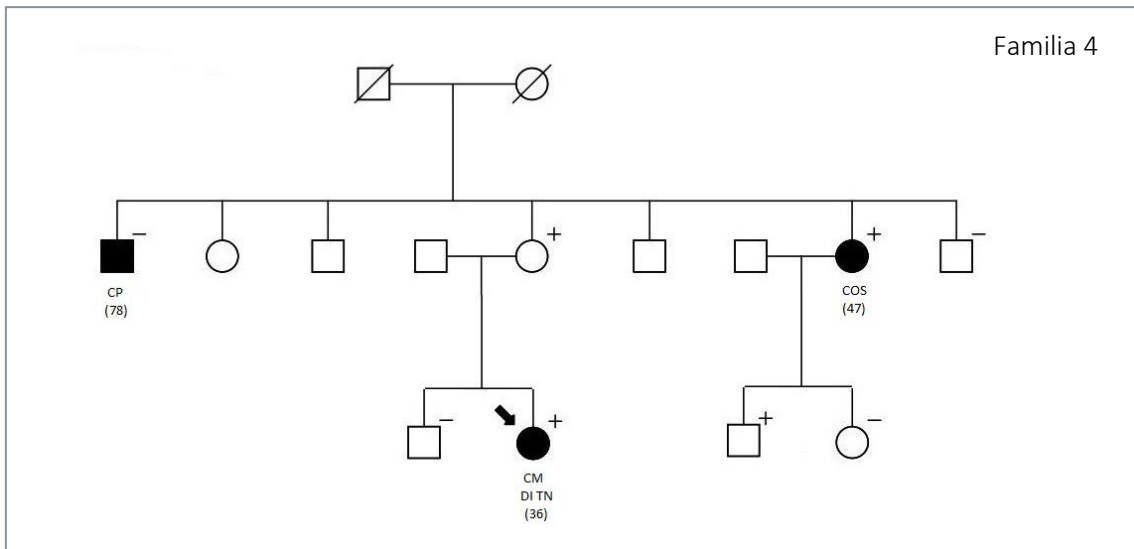
Anexo C9. Fenotipo de las familias portadoras de la variante c.8251_8254del. RH: receptores hormonales, HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, ND: no disponible

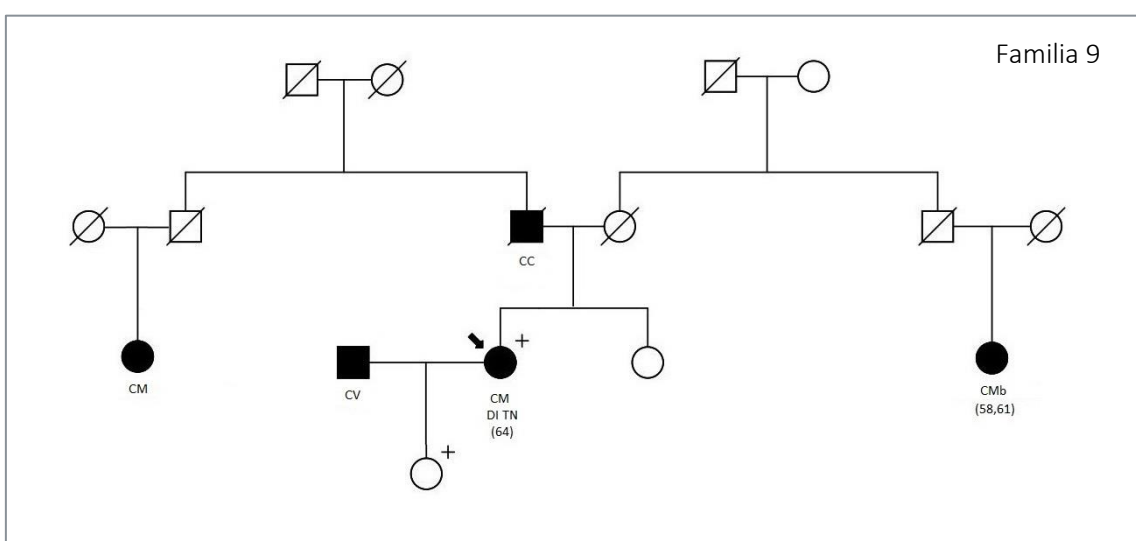
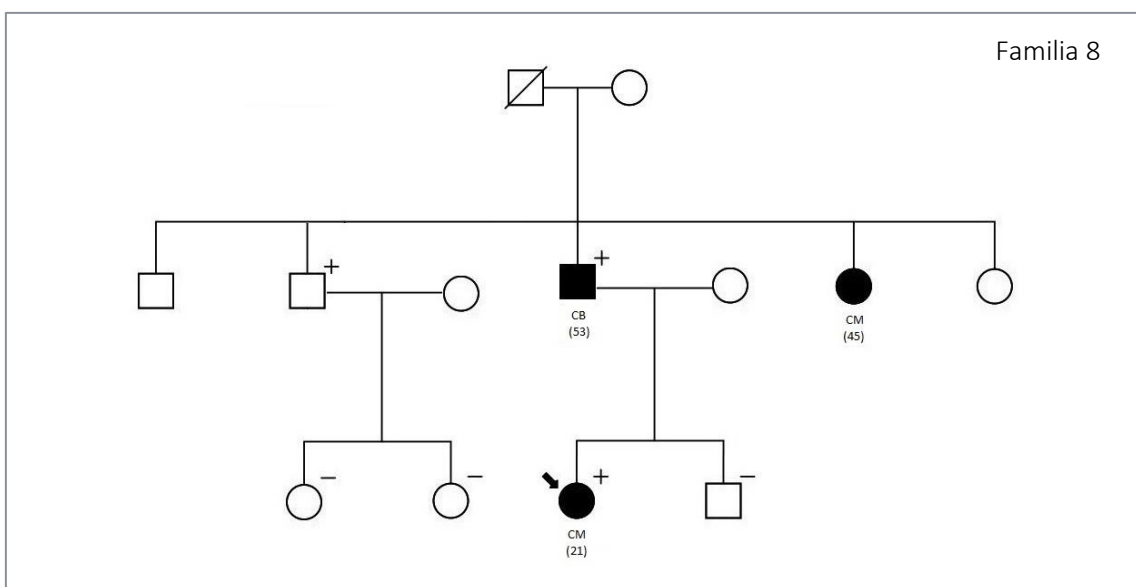
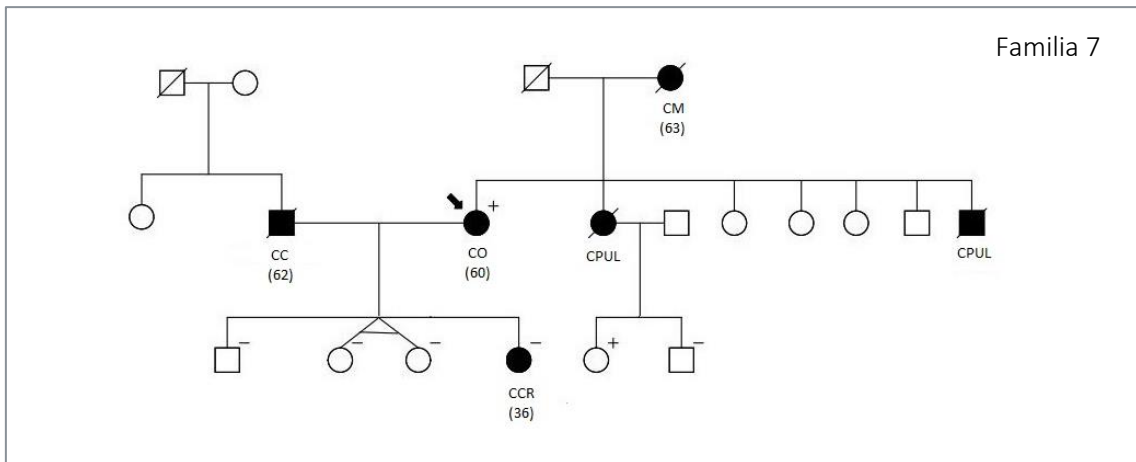
Familia	Paciente	Sexo	Edad	Cáncer	Histopatología	Inmunohistoquímica
1	Caso índice	♀	33	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
	Familiar	♂	63	Linfoma de células del manto	-	-
2	Caso índice	♀	34	Mama	Ductal Invasivo	RH+ HER2+
	Familiar	♂	68	Melanoma	-	-
			69	Pulmón	-	-
3	Caso índice	♀	53	Mama	Lobulillar invasivo	RH+ HER2-
4	Caso índice	♀	47	Mama bilateral	Ductal Invasivo	RH+ HER2-
			58		Medular	RH- HER2-
	Familiar	♀	90	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
			♂	71	Vejiga	-
5	Caso índice	♀	33	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH+ HER2-
			46		Lobulillar invasivo	RH+ HER2-
	Familiar	♀	33	Mama	ND	ND
6	Caso índice	♀	35	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
	Familiar	♀	52	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2+
7	Caso índice	♀	49	Mama	Ductal invasivo	ND
	Familiar	♀	55	Mama	Ductal invasivo	RH+ HER2-
8	Caso índice	♀	54	Mama bilateral	Ductal invasivo	RH+ HER2-
			57	Cérvix	-	-
			58	Ovario	Mucinoso	-

Anexo D1. Árboles genealógicos de las familias portadoras de la variante genética c.1918C>T en *BRCA1*.

CM: cáncer de mama, CM: CM bilateral, DI: ductal invasivo, LA: luminal A, TN: triple negativo, CGi: cáncer ginecológico, CPUL: cáncer de pulmón, CP: cáncer de próstata, GB: glioblastoma, MEL: melanoma, CO: cáncer de ovario, COS: cáncer de ovario seroso, CT: cáncer de tiroides, CC: cáncer de cabeza y cuello, CE: cáncer de esófago, CCR: cáncer colorrectal, CB: carcinoma basocelular, CV: carcinoma de cavum.

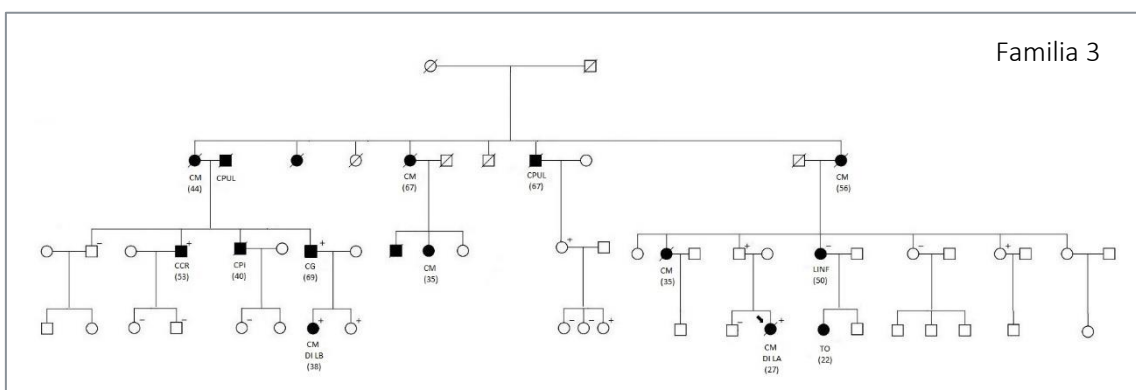
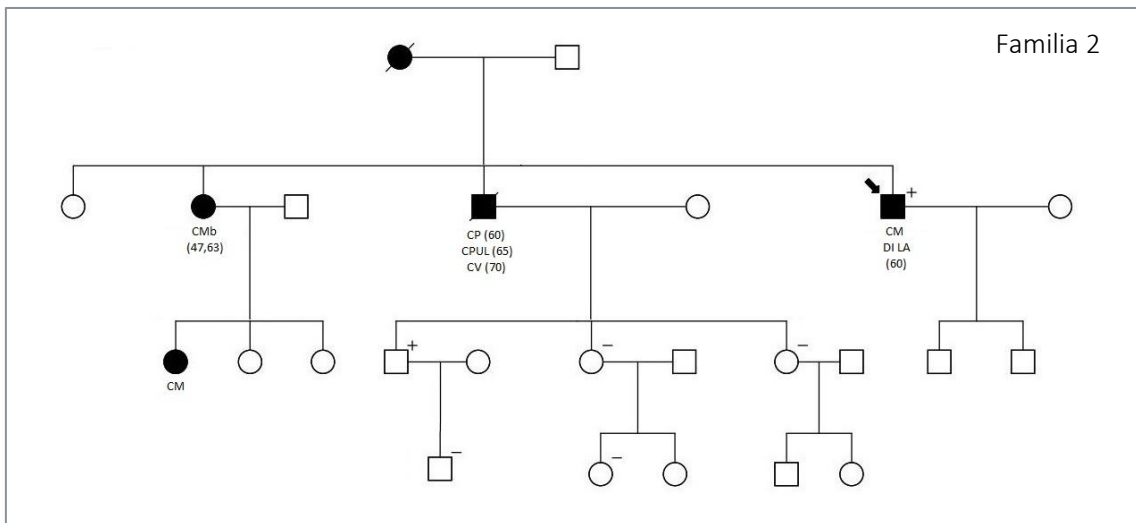
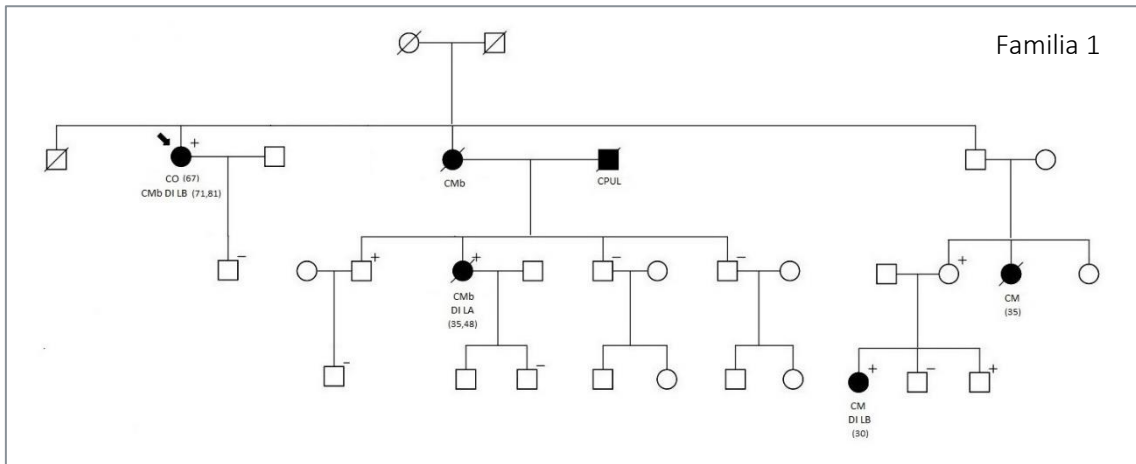


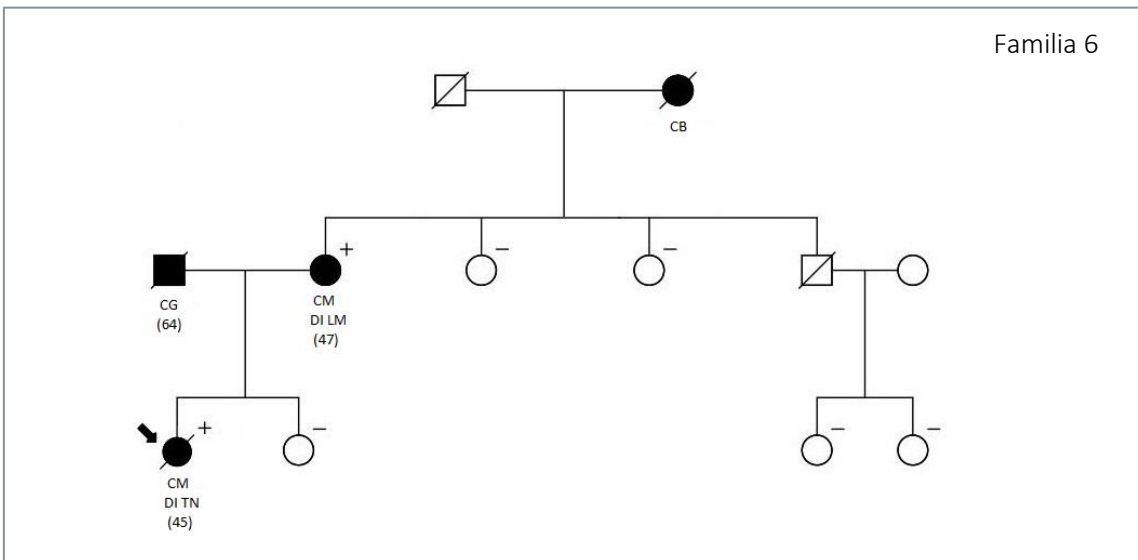
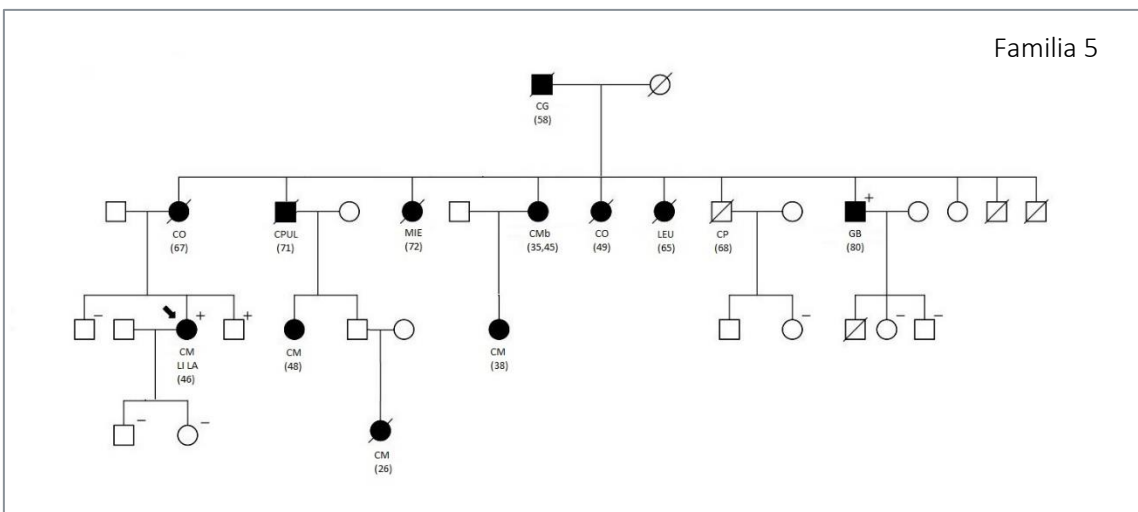
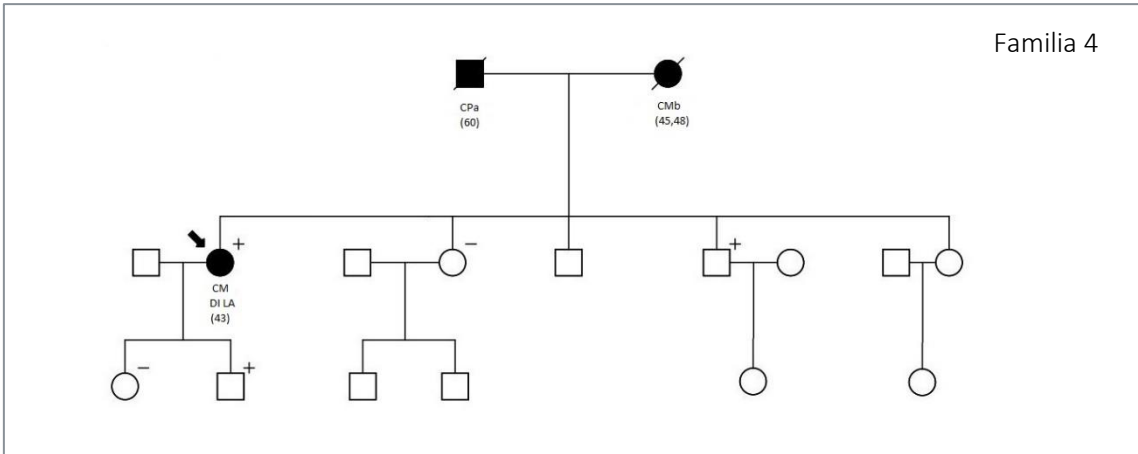


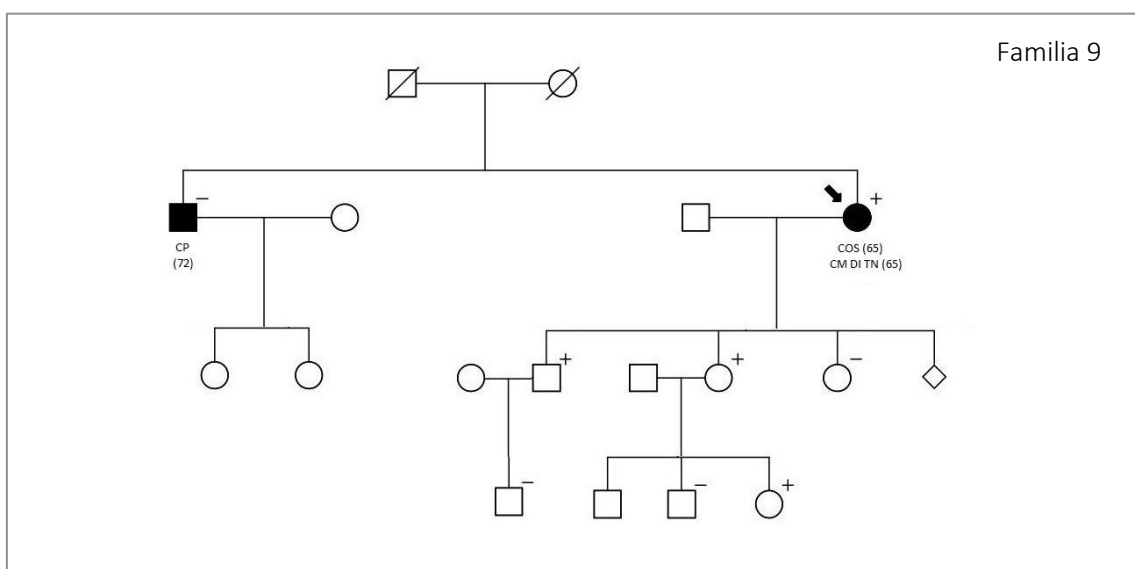
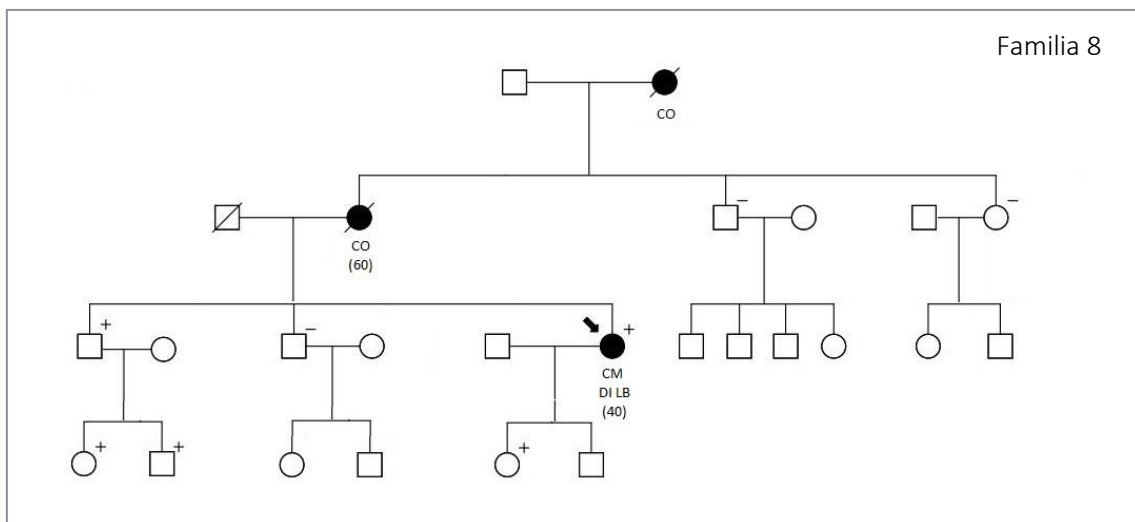
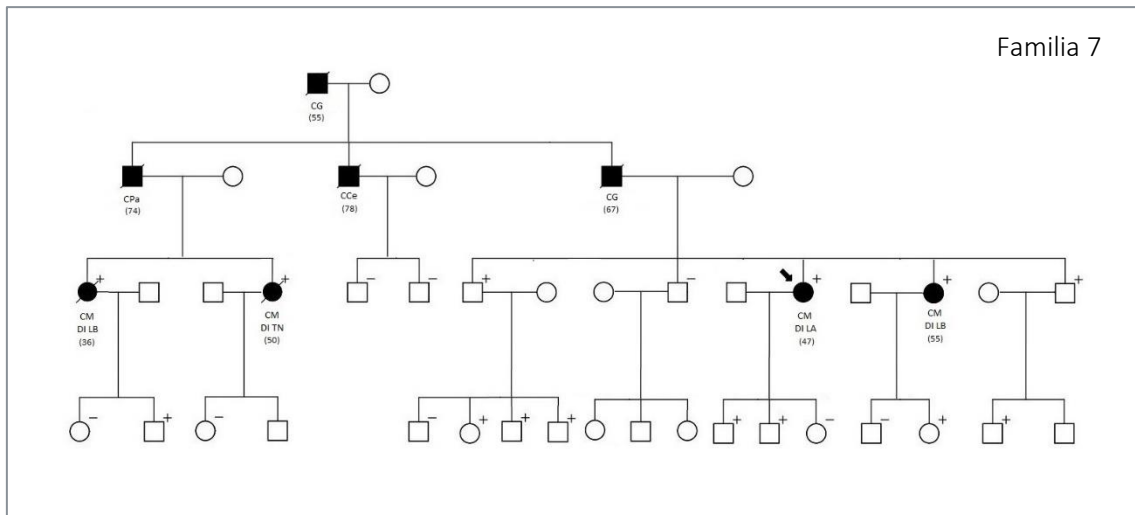


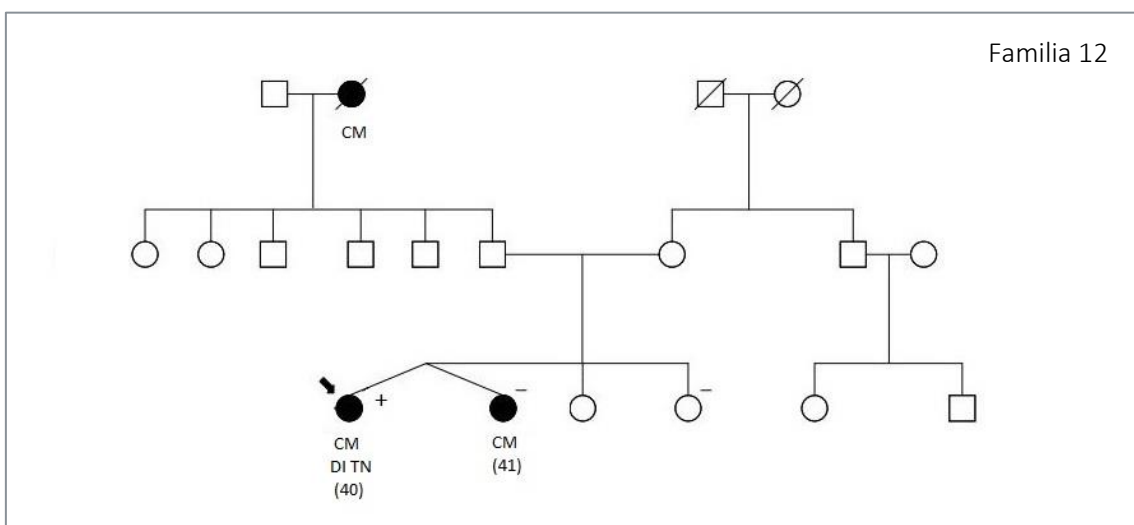
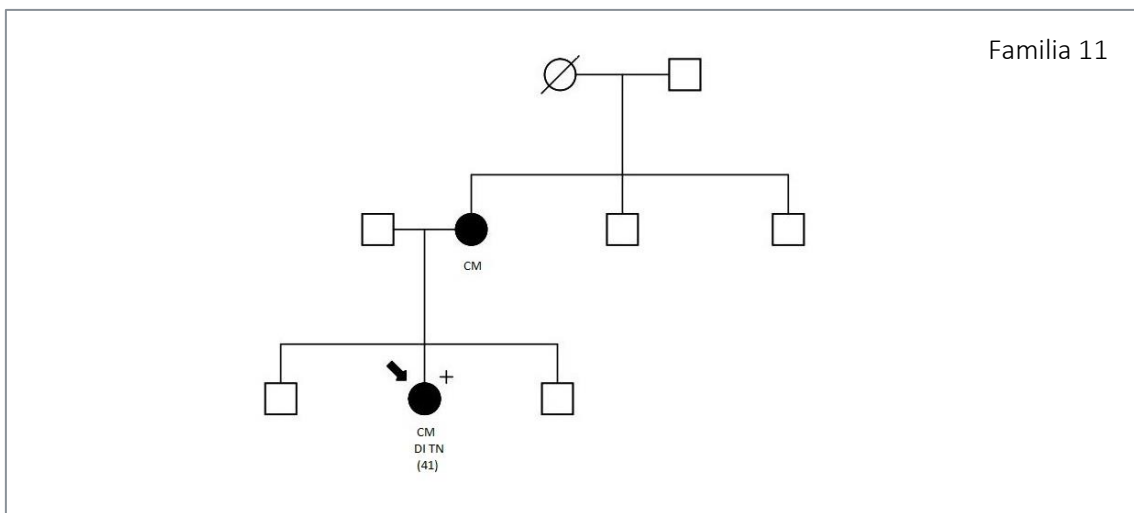
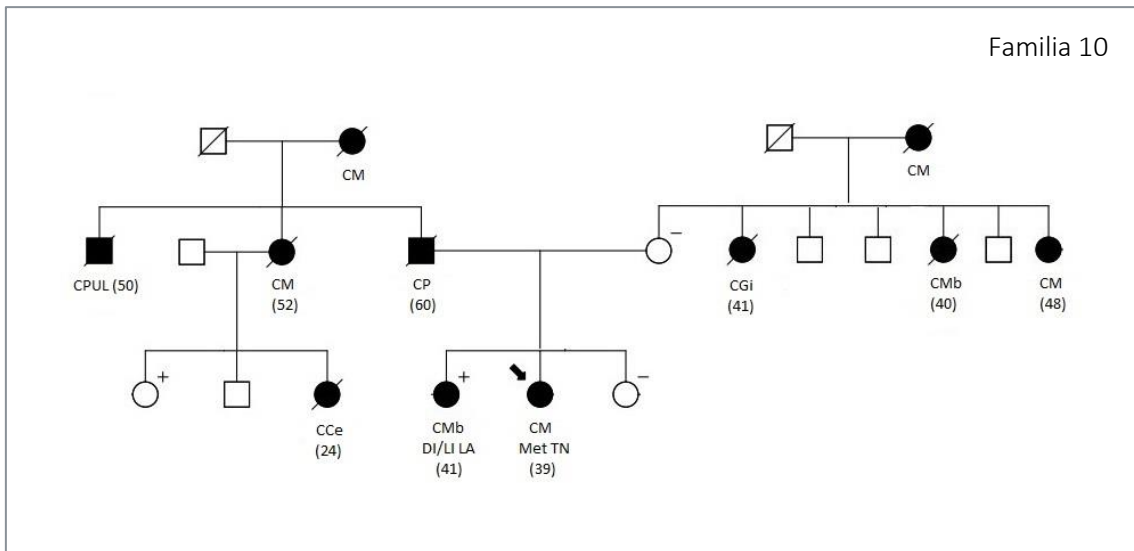
Anexo D2. Árboles genealógicos de las familias portadoras de la delección del exón 2 en *BRCA2*.

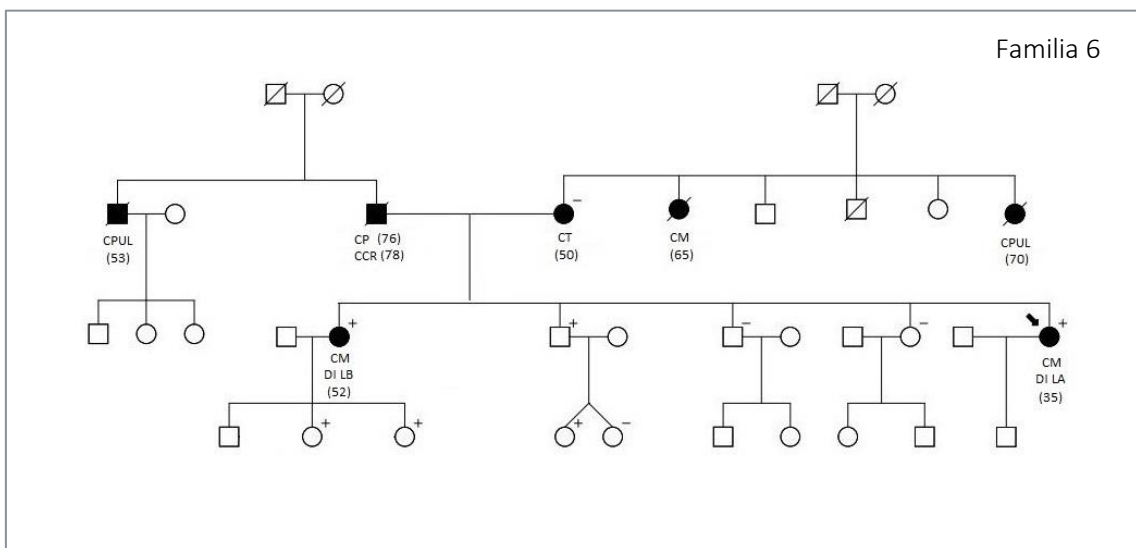
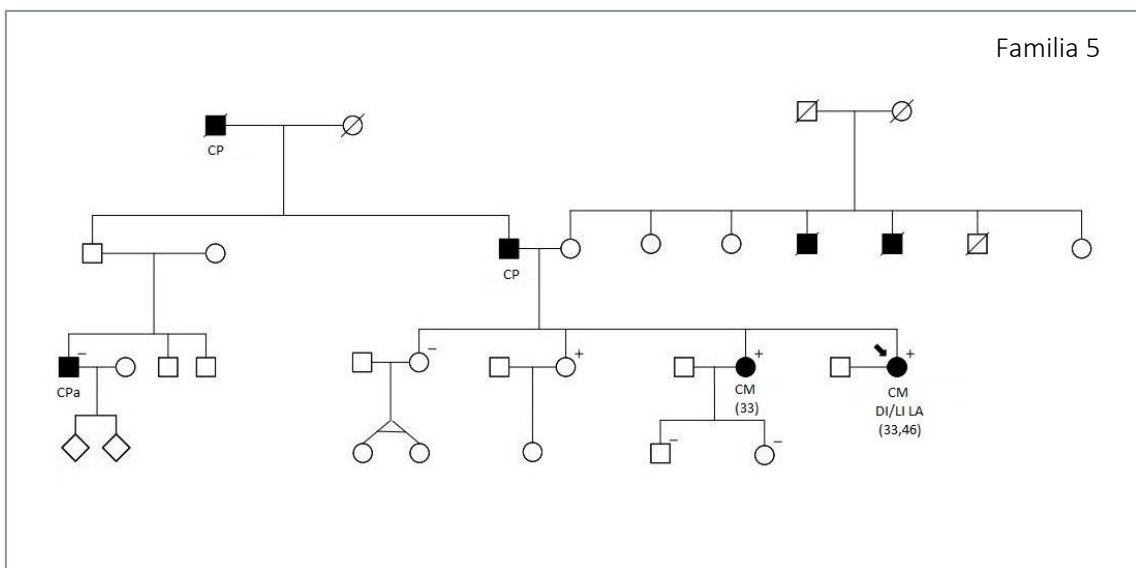
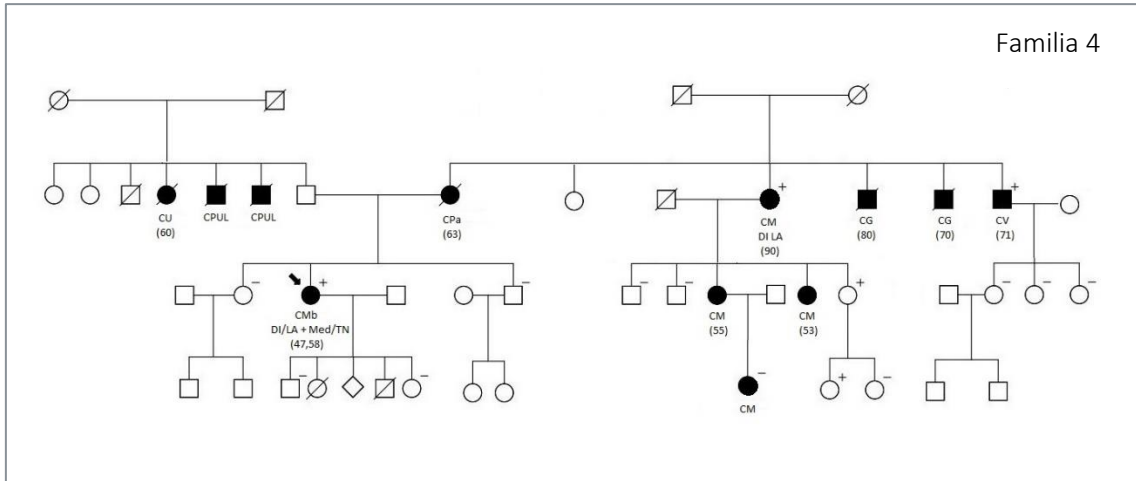
CM: cáncer de mama, CM: CM bilateral, DI: ductal invasivo, LI: lobulillar invasivo, Met: metaplásico, TN: triple negativo, LA/B: luminal A/B, CGi: cáncer ginecológico, CO: cáncer de ovario, COS: cáncer de ovario seroso, TO: teratoma ovárico, CPUL: cáncer de pulmón, CP: cáncer de próstata, CPa: cáncer de páncreas, CPi: cáncer de piel, CB: carcinoma basocelular, CC: carcinoma cerebral, CG: cáncer gástrico, CCR: cáncer colorrectal, GB: glioblastoma, LEU: leucemia, LINF: linfoma, MIE: mieloma, CV: cáncer de vejiga.

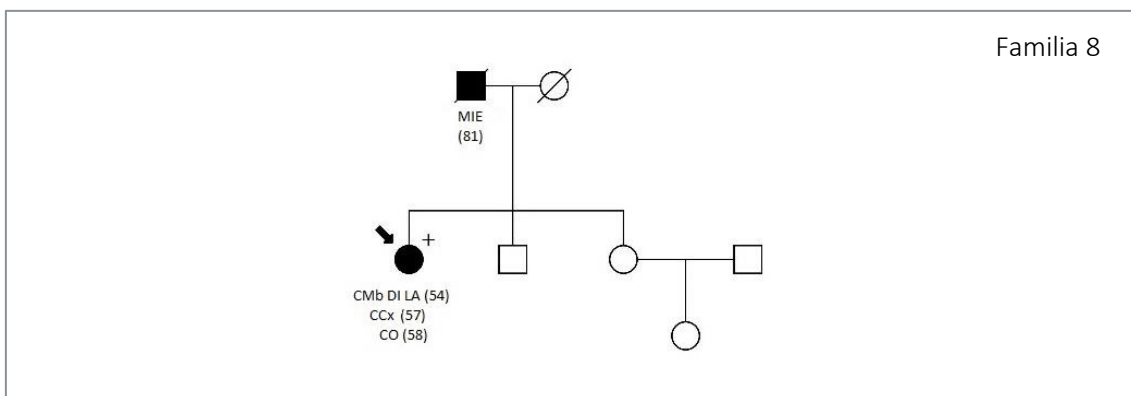
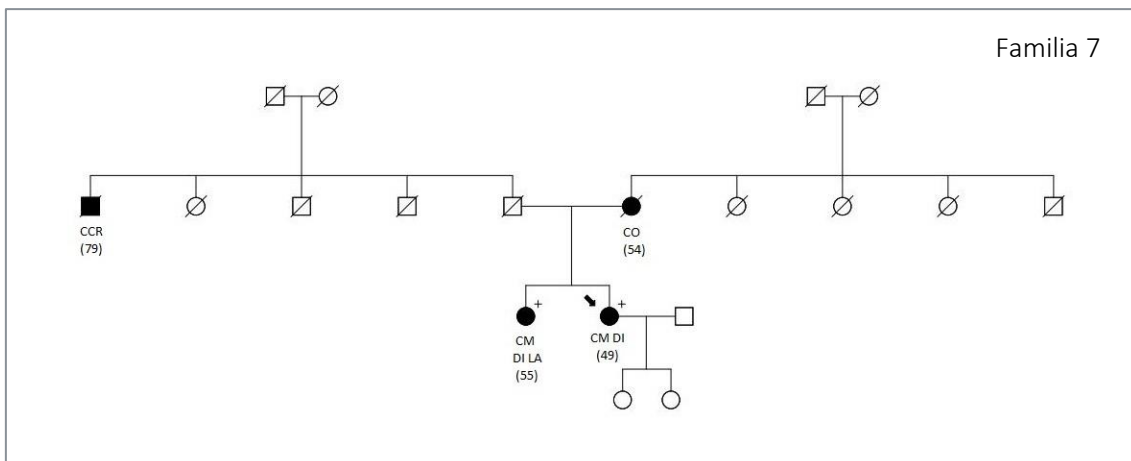












VIII. Bibliografía

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Red Española de Registros de Cáncer. Disponible en: <http://redecancer.org>.
3. Redondo A, Guerra E, Manso L, Martín-Lorente C, Martínez-García J, Pérez-Fidalgo JA, et al. SEOM clinical guideline in ovarian cancer (2020). *Clin Transl Oncol.* 2021;23(5):961-8.
4. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2021. Disponible en: https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_Espana_2021.pdf.
5. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer; 2020. Disponible en <https://gco.iarc.fr/>.
6. Fox EJ, Salk JJ, Loeb LA. Exploring the implications of distinct mutational signatures and mutation rates in aging and cancer. *Genome Med.* 2016;8(1):30.
7. Hong WK, Bast RC, Hait WN et al., Genetic Predisposition to Cancer. *Holland-Frei Cancer Medicine*, 8th ed., 2010.
8. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer Targets Ther.* 2019;11:151-64.
9. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health.* 2019;11:287-99.
10. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000;343(2):78-85.
11. Rebbeck TR, Mitra N, Wan F, Sinilnikova OM, Healey S, McGuffog L, et al. Association of Type and Location of BRCA1 and BRCA2 Mutations With Risk of Breast and Ovarian Cancer. *JAMA.* 2015;313(13):1347-61.
12. Spurdle AB, Whaley PJ, Thompson B, Feng B, Healey S, Brown MA, et al. BRCA1 R1699Q variant displaying ambiguous functional abrogation confers intermediate breast and ovarian cancer risk. *J Med Genet.* 2012;49(8):525-32.
13. Meeks HD, Song H, Michailidou K, Bolla MK, Dennis J, Wang Q, et al. BRCA2 Polymorphic Stop Codon K3326X and the Risk of Breast, Prostate, and Ovarian Cancers. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2015;108(2):djv315.
14. Vande Perre P, Imbert-Bouteille M, Pujol P. Oncogenética: cánceres de mama hereditarios. *EMC - Ginecol-Obstet.* 2019;55(3):1-14.

15. Llorc G, Chirivella I, Morales R, Serrano R, Sanchez AB, Teulé A, et al. SEOM clinical guidelines in Hereditary Breast and ovarian cancer. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. 2015;17(12):956-61.
16. Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GDV, Boehning D. Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J*. 2012;1:e201204005.
17. Wang B. BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail. *Cell Biosci*. 2012;2(1):6.
18. Jensen RB, Carreira A, Kowalczykowski SC. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature*. 2010;467(7316):678-83.
19. Holloman WK. Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(7):748-54.
20. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(1):68-78.
21. Stoppa-Lyonnet D. The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: where do we go from here? *Eur J Hum Genet*. 2016;24(S1):S3-9.
22. Buisson R, Masson JY. PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(20):10312-23.
23. Díez O. Aspectos moleculares de predisposición hereditaria al cáncer de mama y al cáncer de ovario. Sociedad Española de Oncología Médica. Cáncer Hereditario. 3ª ed. España: GoNext Producciones S.L. 2019; p. 141.
24. Hoang LN, Gilks BC. Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome: Moving Beyond BRCA1 and BRCA2. *Adv Anat Pathol*. 2018;25(2):85-95.
25. Ewald IP, Ribeiro PLI, Palmero EI, Cossio SL, Giugliani R, Ashton-Prolla P. Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review. *Genet Mol Biol*. 2009;32(3):437-46.
26. Hollis RL, Churchman M, Gourley C. Distinct implications of different BRCA mutations: efficacy of cytotoxic chemotherapy, PARP inhibition and clinical outcome in ovarian cancer. *OncoTargets Ther*. 2017;10:2539-51.
27. Toss A, Tomasello C, Razzaboni E, Contu G, Grandi G, Cagnacci A, et al. Hereditary Ovarian Cancer: Not Only BRCA 1 and 2 Genes. *BioMed Res Int*. 2015;2015:341723.
28. Economopoulou P, Dimitriadis G, Psyrris A. Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(1):1-8.
29. Daly MB, Pal T, Buys SS, Dickson P, Domchek SM, Elkhany A et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic. *J Natl Compr Canc Netw*. Version 2.2022.
30. Correa H. Li-Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet*. 2016;5(2):84-8.

31. Kechagioglou P, Papi RM, Provatopoulou X, Kalogera E, Papadimitriou E, Grigoropoulos P, et al. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Res.* 2014;34(3):1387-400.
32. van der Post RS, Vogelaar IP, Carneiro F, Guilford P, Huntsman D, Hoogerbrugge N, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. *J Med Genet.* 2015;52(6):361-74.
33. Schrader KA, Masciari S, Boyd N, Salamanca C, Senz J, Saunders DN, et al. Germline mutations in CDH1 are infrequent in women with early-onset or familial lobular breast cancers. *J Med Genet.* 2011;48(1):64-8.
34. Tomlinson IP, Houlston RS. Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet.* 1997;34(12):1007-11.
35. Chen J, Lindblom A. Germline mutation screening of the STK11/LKB1 gene in familial breast cancer with LOH on 19p. *Clin Genet.* 2000;57(5):394-7.
36. McKinnon PJ. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep.* 2004;5(8):772-6.
37. Boder E, Sedgwick RP. Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics.* 1958;21(4):526-54.
38. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet.* 2006;38(8):873-5.
39. González-Santiago S, Ramón y Cajal T, Aguirre E, Alés-Martínez JE, Andrés R, Balmaña J, et al. SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer (2019). *Clin Transl Oncol.* 2020;22(2):193-200.
40. Mavaddat N, Michailidou K, Dennis J, Lush M, Fachal L, Lee A, et al. Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes. *Am J Hum Genet.* 2019;104(1):21-34.
41. Dareng EO, Tyrer JP, Barnes DR, Jones MR, Yang X, Aben KKH, et al. Polygenic risk modeling for prediction of epithelial ovarian cancer risk. *Eur J Hum Genet.* 2022;1-14.
42. Archer S, Babb de Villiers C, Scheibl F, Carver T, Hartley S, Lee A, et al. Evaluating clinician acceptability of the prototype CanRisk tool for predicting risk of breast and ovarian cancer: A multi-methods study. *PLoS ONE.* 2020;15(3):e0229999.
43. Carver T, Hartley S, Lee A, Cunningham AP, Archer S, de Villiers CB, et al. CanRisk Tool – A web interface for the prediction of breast and ovarian cancer risk and the likelihood of carrying genetic pathogenic variants. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2021;30(3):469-73.
44. Lee A, Mavaddat N, Wilcox AN, Cunningham AP, Carver T, Hartley S, et al. BOADICEA: a comprehensive breast cancer risk prediction model incorporating genetic and nongenetic risk factors. *Genet Med.* 2019;21(8):1708-18.

45. Lee A, Yang X, Tyrer J, Gentry-Maharaj A, Ryan A, Mavaddat N, et al. Comprehensive epithelial tubo-ovarian cancer risk prediction model incorporating genetic and epidemiological risk factors. *J Med Genet.* 2021;jmedgenet-2021-107904.
46. Bahcall O. Common variation and heritability estimates for breast, ovarian and prostate cancers. *Nat Genet.* 2013;1-1.
47. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994;266(5182):66-71.
48. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 1995;378(6559):789-92.
49. Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian SV, Nathanson KL, et al. Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *N Engl J Med.* 2015;372(23):2243-57.
50. Lastra-Aras E, Robles-Díaz L, Guillén-Ponce C, Alba E, Cruz JJ. SEOM recommendations on the structure and operation of hereditary cancer genetic counseling units (HCGCUs). *Clin Transl Oncol Print.* 2013;20-5.
51. Berliner JL, Cummings SA, Boldt Burnett B, Ricker CN. Risk assessment and genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer syndromes—Practice resource of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2021;30(2):342-60.
52. Smith SD, Kawash JK, Grigoriev A. Lightning-fast genome variant detection with GROM. *GigaScience.* 2017;6(10):1-7.
53. Kottemann MC, Smogorzewska A. Fanconi anemia and the repair of Watson and Crick crosslinks. *Nature.* 2013;493(7432):356-63.
54. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature.* 1970; 227(5258):561-3.
55. Riley M, Pardee AB, Jacob F, Monod J. Expression of a structural gene. *Journal of Molecular Biology* 1960; 2:261–225.
56. Gilbert W. Why genes in pieces. *Nature.* 1978; 271:501–501.
57. Brett D, Kemmner W, Koch G, Roefzaad C, Gross S, Schlag PM. A rapid bioinformatic method identifies novel genes with direct clinical relevance to colon cancer. *Oncogene* 2001; 20:4581–4585.
58. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012;489(7414):101-8.
59. Mudge JM, Frankish A, Harrow J. Functional transcriptomics in the post-ENCODE era. *Genome Res.* 2013;23(12):1961-73.

60. BCSteve, CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons.
61. Montes FM, Vázquez JP, Rosas HR. Bioquímica de Laguna y Piña. 8th ed. *Manual Moderno*, 2018.
62. Wang Z, Burge CB. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA N Y N*. 2008;14(5):802-13.
63. Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(3):153-65.
64. Padgett RA. New connections between splicing and human disease. *Trends Genet*. 2012;28(4):147-54.
65. Spurdle AB, Couch FJ, Hogervorst FBL, Radice P, Sinilnikova OM, Group for the IUGVW. Prediction and assessment of splicing alterations: implications for clinical testing. *Hum Mutat*. 2008;29(11):1304-13.
66. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat*. 2008;29(11):1282-91.
67. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2015;17(5):405-24.
68. Lindor NM, Goldgar DE, Tavtigian SV, Plon SE, Couch FJ. BRCA1/2 Sequence Variants of Uncertain Significance: A Primer for Providers to Assist in Discussions and in Medical Management. *The Oncologist*. 2013;18(5):518-24.
69. Eccles DM, Mitchell G, Monteiro ANA, Schmutzler R, Couch FJ, Spurdle AB, et al. BRCA1 and BRCA2 genetic testing-pitfalls and recommendations for managing variants of uncertain clinical significance. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2015;26(10):2057-65.
70. Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. Two Decades After BRCA: Setting Paradigms in Personalized Cancer Care and Prevention. *Science*. 2014;343(6178):1466-70.
71. Bonache S, Esteban I, Moles-Fernández A, Tenés A, Duran-Lozano L, Montalban G, et al. Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018;144(12):2495-513.
72. Singer CF, Balmaña J, Bürki N, Delalogue S, Filieri ME, Gerdes AM, et al. Genetic counselling and testing of susceptibility genes for therapeutic decision-making in breast cancer-an European consensus statement and expert recommendations. *Eur J Cancer*. 2019;106:54-60.

73. Mayr E. Systematics and the origin of species from the point of view of a zoologist. USA: Harvard University Press, 1942.
74. Rebbeck TR, Friebel TM, Friedman E, Hamann U, Huo D, Kwong A, et al. Mutational Spectrum in a Worldwide Study of 29,700 Families with BRCA1 or BRCA2 Mutations. *Hum Mutat.* 2018;39(5):593-620.
75. Cox DM, Nelson KL, Clytone M, Collins DL. Hereditary cancer screening: Case reports and review of literature on ten Ashkenazi Jewish founder mutations. *Mol Genet Genomic Med.* 2018;6(6):1236-42.
76. Claes K, Machackova E, De Vos M, Poppe B, De Paepe A, Messiaen L. Mutation Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in the Belgian Patient Population and Identification of a Belgian Founder Mutation BRCA1 IVS5+3A>G. *Dis Markers.* 1999;15(1-3):69-73.
77. Liede A, Cohen B, Black DM, Davidson RH, Renwick A, Hoodfar E, et al. Evidence of a founder BRCA1 mutation in Scotland. *Br J Cancer.* 2000;82(3):705-11.
78. McDevitt TM. Spectrum and incidence of BRCA1 and BRCA2 mutations in the Republic of Ireland—An Audit (abstract). *Eur J Hum Genet.* 2009;17:195.
79. Janavičius R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J.* 2010;1(3):397-412.
80. Ozolina S, Sinicka O, Jankevics E, Inashkina I, Lubinski J, Gorski B, et al. The 4154delA mutation carriers in the BRCA1 gene share a common ancestry. *Fam Cancer.* 2009;8(1):1-4.
81. Sarantaus L, Huusko P, Eerola H, Launonen V, Vehmanen P, Rapakko K, et al. Multiple founder effects and geographical clustering of BRCA1 and BRCA2 families in Finland. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2000;8(10):757-63.
82. Muller D, Bonaiti-Pellié C, Abecassis J, Stoppa-Lyonnet D, Fricker JP. BRCA1 testing in breast and/or ovarian cancer families from northeastern France identifies two common mutations with a founder effect. *Fam Cancer.* 2004;3(1):15-20.
83. Anagnostopoulos T, Pertesi M, Konstantopoulou I, Armaou S, Kamakari S, Nasioulas G, et al. G1738R is a BRCA1 founder mutation in Greek breast/ovarian cancer patients: evaluation of its pathogenicity and inferences on its genealogical history. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;110(2):377-85.
84. Peelen T, van Vliet M, Petrij-Bosch A, Mieremet R, Szabo C, van den Ouweland AMW, et al. A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet.* 1997;60(5):1041-9.
85. Hansen T v. O, Ejlersen B, Albrechtsen A, Bergsten E, Bjerregaard P, Hansen T, et al. A common Greenlandic Inuit BRCA1 RING domain founder mutation. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115(1):69-76.

86. Marroni F, Cipollini G, Peissel B, D'Andrea E, Pensabene M, Radice P, et al. Reconstructing the Genealogy of a BRCA1 Founder Mutation by Phylogenetic Analysis. *Ann Hum Genet.* 2008;72(3):310-8.
87. Papi L, Putignano AL, Congregati C, Zanna I, Sera F, Morrone D, et al. Founder mutations account for the majority of BRCA1-attributable hereditary breast/ovarian cancer cases in a population from Tuscany, Central Italy. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;117(3):497-504.
88. Malacrida S, Agata S, Callegaro M, Casella C, Barana D, Scaini MC, et al. BRCA1 p.Val1688del Is a Deleterious Mutation That Recurs in Breast and Ovarian Cancer Families From Northeast Italy. *J Clin Oncol.* 2008;26(1):26-31.
89. Baudi F, Quaresima B, Grandinetti C, Cuda G, Faniello C, Tassone P, et al. Evidence of a founder mutation of BRCA1 in a highly homogeneous population from southern Italy with breast/ovarian cancer. *Hum Mutat.* 2001;18(2):163-4.
90. Russo A, Calò V, Bruno L, Schirò V, Agnese V, Cascio S, et al. Is BRCA1-5083del19, identified in breast cancer patients of Sicilian origin, a Calabrian founder mutation? *Breast Cancer Res Treat.* 2009;113(1):67-70.
91. Möller P, Heimdal K, Apold J, Fredriksen Å, Borg Å, Hovig E, et al. Genetic epidemiology of BRCA1 mutations in Norway. *Eur J Cancer.* 2001;37(18):2428-34.
92. Einbeigi Z, Bergman A, Kindblom LG, Martinsson T, Meis-Kindblom JM, Nordling M, et al. A founder mutation of the BRCA1 gene in Western Sweden associated with a high incidence of breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2001;37(15):1904-9.
93. Loizidou M, Marcou Y, Anastasiadou V, Newbold R, Hadjisavvas A, Kyriacou K. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germline mutations to the incidence of early-onset breast cancer in Cyprus. *Clin Genet.* 2007;71(2):165-70.
94. Hadjisavvas A, Charalambous E, Adamou A, Neuhausen SL, Christodoulou CG, Kyriacou K. Hereditary breast and ovarian cancer in Cyprus: identification of a founder BRCA2 mutation. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;151(2):152-6.
95. Krajc M, De Grève J, Goelen G, Teugels E. BRCA2 founder mutation in Slovenian breast cancer families. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(12):879-82.
96. Neuhausen SL, Godwin AK, Gershoni-Baruch R, Schubert E, Garber J, Stoppa-Lyonnet D, et al. Haplotype and Phenotype Analysis of Nine Recurrent BRCA2 Mutations in 111 Families: Results of an International Study. *Am J Hum Genet.* 1998;62(6):1381-8.
97. Zeegers MP, van Poppel F, Vlietinck R, Spruijt L, Ostrer H. Founder mutations among the Dutch. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(7):591-600.
98. Pisano M, Cossu A, Persico I, Palmieri G, Angius A, Casu G, et al. Identification of a founder BRCA2 mutation in Sardinia. *Br J Cancer.* 2000;82(3):553-9.

99. Palomba G, Cossu A, Friedman E, Budroni M, Farris A, Contu A, et al. Origin and distribution of the BRCA2-8765delAG mutation in breast cancer. *BMC Cancer*. 2007;7:132.
100. Monne M, Piras G, Fancello P, Santona MC, Uras A, Landriscina G, et al. Identification of a founder BRCA2 mutation in Sardinian breast cancer families. *Fam Cancer*. 2007;6(1):73-9.
101. Palomba G, Loi A, Uras A, Fancello P, Piras G, Gabbas A, et al. A role of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in breast cancer susceptibility within Sardinian population. *BMC Cancer*. 2009;9:245.
102. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavgigian SV, et al. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet*. 1996;13(1):117-9.
103. Korenberg JR, Rykowski MC. Human genome organization: Alu, LINES, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. *Cell*. 1988;53(3):391-400.
104. Mazoyer S. The Exon 13 Duplication in the BRCA1 Gene Is a Founder Mutation Present in Geographically Diverse Populations. *Am J Hum Genet*. 2000;67(1):207-12.
105. Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, Eijk R van, Olmer R, Drüsedau M, et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet*. 1997;17(3):341-5.
106. Hansen T v O, Jønson L, Albrechtsen A, Andersen MK, Ejlersen B, Nielsen FC. Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115(2):315-23.
107. Pertesi M, Konstantopoulou I, Yannoukakos D. Haplotype analysis of two recurrent genomic rearrangements in the BRCA1 gene suggests they are founder mutations for the Greek population. *Clin Genet*. 2011;80(4):375-82.
108. Apostolou P, Pertesi M, Aleporou-Marinou V, Dimitrakakis C, Papadimitriou C, Razis E, et al. Haplotype analysis reveals that the recurrent BRCA1 deletion of exons 23 and 24 is a Greek founder mutation. *Clin Genet*. 2017;91(3):482-7.
109. Engert S, Wappenschmidt B, Betz B, Kast K, Kutsche M, Hellebrand H, et al. MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. *Hum Mutat*. 2008;29(7):948-58.
110. Ticha I, Kleibl Z, Stribrna J, Kotlas J, Zimovjanova M, Mateju M, et al. Screening for genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 genes in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients: high proportion of population specific alterations in BRCA1 gene. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124(2):337-47.

111. Weitzel JN, Lagos VI, Herzog JS, Judkins T, Hendrickson B, Ho JS, et al. Evidence for Common Ancestral Origin of a Recurring BRCA1 Genomic Rearrangement Identified in High-Risk Hispanic Families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(8):1615-20.
112. Weitzel JN, Clague J, Martir-Negron A, Ogaz R, Herzog J, Ricker C, et al. Prevalence and Type of BRCA Mutations in Hispanics Undergoing Genetic Cancer Risk Assessment in the Southwestern United States: A Report From the Clinical Cancer Genetics Community Research Network. *J Clin Oncol.* 2013;31(2):210-6.
113. Peixoto A, Santos C, Rocha P, Pinheiro M, Príncipe S, Pereira D, et al. The c.156_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;114(1):31-8.
114. Vega A, Campos B, Bressac-de-Paillerets B, Bond PM, Janin N, Douglas FS, et al. The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum Mutat.* 2001;17(6):520-1.
115. Díez O, Osorio A, Durán M, Martínez-Ferrandis JI, Hoya M de la, Salazar R, et al. 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.* 2003;22(4):301-12.
116. Campos B, Díez O, Odefrey F, Domènech M, Moncoutier V, Martínez-Ferrandis JI, et al. Haplotype analysis of the BRCA2 9254delATCAT recurrent mutation in breast/ovarian cancer families from Spain. *Hum Mutat.* 2003;21(4):452-452.
117. Infante M, Durán M, Acedo A, Pérez-Cabornero L, Sanz D, García-González M, et al. BRCA1 5272-1G>A and BRCA2 5374delTATG are founder mutations of high relevance for genetic counselling in breast/ovarian cancer families of Spanish origin. *Clin Genet.* 2010;77(1):60-9.
118. Infante M, Durán M, Lasa A, Acedo A, de la Hoya M, Esteban-Cardena E, et al. Two founder BRCA2 mutations predispose to breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(2):567-71.
119. Pajares B, Porta J, Porta JM, Sousa CF de, Moreno I, Porta D, et al. Hereditary breast and ovarian cancer in Andalusian families: a genetic population study. *BMC Cancer.* 2018;18(1):647.
120. Palanca S, de Juan I, Perez-Simó G, Barragán E, Chirivella I, Martínez E, et al. The deletion of exons 3–5 of BRCA1 is the first founder rearrangement identified in breast and/or ovarian cancer Spanish families. *Fam Cancer.* 2013;12(1):119-23.
121. Ruiz de Garibay G, Gutiérrez-Enríquez S, Garre P, Bonache S, Romero A, Palomo L, et al. Characterization of four novel BRCA2 large genomic rearrangements in Spanish breast/ovarian cancer families: review of the literature, and reevaluation of the genetic mechanisms involved in their origin. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133(1):273-83.

122. Blay P, Santamaría I, Pitiot AS, Luque M, Alvarado MG, Lastra A, et al. Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer families from Asturias (Northern Spain). *BMC Cancer*. 2013;13:243.
123. Ruiz de Sabando A, Urrutia Lafuente E, García-Amigot F, Alonso Sánchez A, Morales Garofalo L, Moreno S, et al. Genetic and clinical characterization of BRCA-associated hereditary breast and ovarian cancer in Navarra (Spain). *BMC Cancer*. 2019;19:1145.
124. Sagi M, Eilat A, Ben Avi L, Goldberg Y, Bercovich D, Hamburger T, et al. Two BRCA1/2 founder mutations in Jews of Sephardic origin. *Fam Cancer*. 2011;10(1):59-63.
125. Machado PM, Brandão RD, Cavaco BM, Eugénio J, Bento S, Nave M, et al. Screening for a BRCA2 Rearrangement in High-Risk Breast/Ovarian Cancer Families: Evidence for a Founder Effect and Analysis of the Associated Phenotypes. *J Clin Oncol*. 2007;25(15):2027-34.
126. Mucaki EJ, Caminsky NG, Perri AM, Lu R, Laederach A, Halvorsen M, et al. A unified analytic framework for prioritization of non-coding variants of uncertain significance in heritable breast and ovarian cancer. *BMC Med Genomics*. 2016;9:19.
127. Caminsky NG, Mucaki EJ, Perri AM, Lu R, Knoll JHM, Rogan PK. Prioritizing Variants in Complete Hereditary Breast and Ovarian Cancer Genes in Patients Lacking Known BRCA Mutations. *Hum Mutat*. 2016;37(7):640-52.
128. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet*. 2016;99(4):877-85.
129. Morales A, Hershberger RE. Variants of Uncertain Significance: Should We Revisit How They Are Evaluated and Disclosed? *Circ Genomic Precis Med*. 2018;11(6):e002169.
130. Mersch J, Brown N, Pirzadeh-Miller S, Mundt E, Cox HC, Brown K, et al. Prevalence of Variant Reclassification Following Hereditary Cancer Genetic Testing. *JAMA*. 2018;320(12):1266-74.
131. Mahecha D, Nuñez H, Lattig MC, Duitama J. Machine learning models for accurate prioritization of variants of uncertain significance. *Hum Mutat*. 2022;43(4):449-60.
132. Vreeswijk MPG, Kraan JN, van der Klift HM, Vink GR, Cornelisse CJ, Wijnen JT, et al. Intronic variants in BRCA1 and BRCA2 that affect RNA splicing can be reliably selected by splice-site prediction programs. *Hum Mutat*. 2009;30(1):107-14.
133. PreAnalytiX. PAXgene® Blood RNA Kit, manual del uso. 2019.
134. Sanz DJ, Acedo A, Infante M, Durán M, Pérez-Cabornero L, Esteban-Cardenosa E, et al. A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010;16(6):1957-67.

135. Millevoi S, Bernat S, Telly D, Fouque F, Gladieff L, Favre G, et al. The c.5242C>A BRCA1 missense variant induces exon skipping by increasing splicing repressors binding. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120(2):391-9.
136. Bonatti F, Pepe C, Tancredi M, Lombardi G, Aretini P, Sensi E, et al. RNA-based analysis of BRCA1 and BRCA2 gene alterations. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;170(2):93-101.
137. Acedo A, Hernández-Moro C, Curiel-García Á, Díez-Gómez B, Velasco EA. Functional Classification of BRCA2 DNA Variants by Splicing Assays in a Large Minigene with 9 Exons. *Hum Mutat.* 2015;36(2):210-21.
138. Acedo A, Sanz DJ, Durán M, Infante M, Pérez-Cabornero L, Miner C, et al. Comprehensive splicing functional analysis of DNA variants of the BRCA2 gene by hybrid minigenes. *Breast Cancer Res BCR.* 2012;14(3):R87.
139. Gabaldó-Barrios X, Sarabia-Meseguer MD, Alonso-Romero JL, Marín-Vera M, Marín-Zafra G, Sánchez-Henarejos P, et al. Novel BRCA1 deleterious mutation (c.1918C>T) in familial breast and ovarian cancer syndrome who share a common ancestry. *Fam Cancer.* 2014;13(3):431-5.
140. Gutiérrez-Enríquez S, de La Hoya M, Martínez-Bouzas C, de Abajo AS, Cajal TR y., Lloret G, et al. Screening for large rearrangements of the BRCA2 gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;103(1):103-7.
141. Gabaldó-Barrios X, Sarabia-Meseguer MD, Marín-Vera M, Sánchez-Bermúdez AI, Macías-Cerrolaza JA, Sánchez-Henarejos P, et al. Molecular characterization and clinical interpretation of BRCA1/BRCA2 variants in families from Murcia (south-eastern Spain) with hereditary breast and ovarian cancer: clinical–pathological features in BRCA carriers and non-carriers. *Fam Cancer.* 2017;16(4):477-89.
142. Tavera-Tapia A, Pérez-Cabornero L, Macías JA, Ceballos MI, Roncador G, de la Hoya M, et al. Almost 2% of Spanish breast cancer families are associated to germline pathogenic mutations in the ATM gene. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;161(3):597-604.
143. Castillo-Guardiola V. Aportación de la secuenciación masiva de nueva generación en el diagnóstico del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario mediante el uso de un panel de genes. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, 2019.
144. Athanasakis E, Melloni E, Rigolin GM, Agnoletto C, Voltan R, Vozzi D, et al. The p53 transcriptional pathway is preserved in ATMmutated and NOTCH1mutated chronic lymphocytic leukemias. *Oncotarget.* 2014;5(24):12635-45.
145. Li A, Swift M. Mutations at the ataxia-telangiectasia locus and clinical phenotypes of A-T patients. *Am J Med Genet.* 2000;92(3):170-7.
146. George Priya Doss C, Rajith B. Computational refinement of functional single nucleotide polymorphisms associated with ATM gene. *PLoS One.* 2012;7(4):e34573.

147. Carranza D, Vega AK, Torres-Rusillo S, Montero E, Martinez LJ, Santamaría M, et al. Molecular and Functional Characterization of a Cohort of Spanish Patients with Ataxia-Telangiectasia. *Neuromolecular Med.* 2017;19(1):161-74.
148. Fiévet A, Bellanger D, Rieunier G, Dubois d'Enghien C, Sophie J, Calvas P, et al. Functional classification of ATM variants in ataxia-telangiectasia patients. *Hum Mutat.* 2019;40(10):1713-30.
149. Mangone FR, Miracca EC, Feilotter HE, Mulligan LM, Nagai MA. ATM gene mutations in sporadic breast cancer patients from Brazil. *SpringerPlus.* 2015;4:23.
150. Podralska M, Ziólkowska-Suchanek I, Żurawek M, Dzikiewicz-Krawczyk A, Słomski R, Nowak J, et al. Genetic variants in ATM, H2AFX and MRE11 genes and susceptibility to breast cancer in the polish population. *BMC Cancer.* 2018;18(1):452.
151. Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, Jenkins MA, Yu KM, Bachrich T, et al. Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res.* 2003;63(12):3325-33.
152. Ochiai K, Yoshikawa Y, Yoshimatsu K, Oonuma T, Tomioka Y, Takeda E, et al. Valine 1532 of human BRC repeat 4 plays an important role in the interaction between BRCA2 and RAD51. *FEBS Lett.* 2011;585(12):1771-7.
153. Delimitsou A, Fostira F, Kalfakakou D, Apostolou P, Konstantopoulou I, Kroupis C, et al. Functional characterization of CHEK2 variants in a *Saccharomyces cerevisiae* system. *Hum Mutat.* 2019;40(5):631-48.
154. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2017;35(10):1086-95.
155. Eliade M, Skrzypski J, Baurand A, Jacquot C, Bertolone G, Loustalot C, et al. The transfer of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer to healthcare: What are the implications for the management of patients and families? *Oncotarget.* 2016;8(2):1957-71.
156. Desrichard A, Bidet Y, Uhrhammer N, Bignon YJ. CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families. *Breast Cancer Res BCR.* 2011;13(6):R119.
157. Roeb W, Higgins J, King MC. Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer. *Hum Mol Genet.* 2012;21(12):2738-44.
158. Kraus C, Hoyer J, Vasileiou G, Wunderle M, Lux MP, Fasching PA, et al. Gene panel sequencing in familial breast/ovarian cancer patients identifies multiple novel mutations also in genes others than BRCA1/2. *Int J Cancer.* 2017;140(1):95-102.
159. Vargas-Parra G, del Valle J, Rofes P, Gausachs M, Stradella A, Moreno-Cabrera JM, et al. Comprehensive analysis and ACMG-based classification of CHEK2 variants in hereditary cancer patients. *Hum Mutat.* 2020;41(12):2128-42.

160. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, Brown KL, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer*. 2017;123(10):1721-30.
161. Rosado-Jiménez L, Mestre-Terkemani Y, Garcia-Hernández R, Zafra-Poves M, García-Aliaga A, Expósito-García M, et al. Prevalence and phenotype, of the most frequent BRCA1/BRCA2 mutations, related to the hereditary breast and ovarian cancer syndrome, in families from Murcia (south-east of Spain). *Clin Chem Lab Med* 2021; 59: 462-s484.
162. Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S, et al. Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet*. 1994;8(4):392-8.
163. Bruchim Bar-Sade R, Kruglikova A, Modan B, Gak E, Hirsh-Yechezkel G, Theodor L, et al. The 185delAG BRCA1 Mutation Originated before the Dispersion of Jews in the Diaspora and Is Not Limited to Ashkenazim. *Hum Mol Genet*. 1998;7(5):801-5.
164. Díez O, Gutiérrez-Enríquez S, Balmaña J. Heterogeneous prevalence of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain according to the geographical area: implications for genetic testing. *Fam Cancer*. 2010;9(2):187-91.
165. Díez O, Osorio A, Robledo M, Barroso A, Domènech M, Cortés J, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Jewish mutations in Spanish breast cancer patients. *Br J Cancer*. 1999;79(7):1302-3.
166. Laitman Y, Feng BJ, Zamir IM, Weitzel JN, Duncan P, Port D, et al. Haplotype analysis of the 185delAG BRCA1 mutation in ethnically diverse populations. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(2):212-6.
167. Friedman LS, Szabo CI, Ostermeyer EA, Dowd P, Butler L, Park T, et al. Novel inherited mutations and variable expressivity of BRCA1 alleles, including the founder mutation 185delAG in Ashkenazi Jewish families. *Am J Hum Genet*. 1995;57(6):1284-97.
168. Ren M, Orozco A, Shao K, Albanez A, Ortiz J, Cao B, et al. Germline variants in hereditary breast cancer genes are associated with early age at diagnosis and family history in Guatemalan breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2021;189(2):533-9.
169. Campos B, Díez O, Domènech M, Baena M, Pericay C, Balmaña J, et al. BRCA2 mutation analysis of 87 Spanish breast/ovarian cancer families. *Ann Oncol*. 2001;12(12):1699-703.
170. Llorca G, Muñoz CY, Tuser MP, Guillermo IB, Lluch JRG, Bale AE, et al. Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain. *Hum Mutat*. 2002;19(3):307-307.
171. Duran M, Esteban-Cardenosa E, Velasco E, Infante M, Miner C. Mutational analysis of BRCA2 in Spanish breast cancer patients from Castilla-Leon: Identification of four novel truncating mutations. *Hum Mutat*. 2003;21(4):448-448.

172. de Sanjosé S, Leóné M, Bérez V, Izquierdo A, Font R, Brunet JM, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in young breast cancer patients: A population-based study. *Int J Cancer*. 2003;106(4):588-93.
173. Esteban Cardeñosa E, Bolufer Gilabert P, de Juan Jimenez I, Palanca Suela S, Barragán González E, Chirivella González I, et al. Broad BRCA1 and BRCA2 mutational spectrum and high incidence of recurrent and novel mutations in the eastern Spain population. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;121(1):257-60.
174. de Juan Jiménez I, García Casado Z, Palanca Suela S, Esteban Cardeñosa E, López Guerrero JA, Segura Huerta Á, et al. Novel and recurrent BRCA1/BRCA2 mutations in early onset and familial breast and ovarian cancer detected in the Program of Genetic Counseling in Cancer of Valencian Community (eastern Spain). Relationship of family phenotypes with mutation prevalence. *Fam Cancer*. 2013;12(4):767-77.
175. Singh J, Thota N, Singh S, Padhi S, Mohan P, Deshwal S, et al. Screening of over 1000 Indian patients with breast and/or ovarian cancer with a multi-gene panel: prevalence of BRCA1/2 and non-BRCA mutations. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;170(1):189-96.
176. Gutiérrez-Enríquez S, Ramón Y Cajal T, Alonso C, Corral A, Carrasco P, Cornet M, et al. Ionizing radiation or mitomycin-induced micronuclei in lymphocytes of BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(3):611-22.
177. Caux-Moncoutier V, Pagès-Berhouet S, Michaux D, Asselain B, Castéra L, De Pauw A, et al. Impact of BRCA1 and BRCA2 variants on splicing: clues from an allelic imbalance study. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(11):1471-80.
178. Peelen T, Vliet M van, Bosch A, Bignell G, Vasen HFA, Klijn JGM, et al. Screening for BRCA2 mutations in 81 Dutch breast-ovarian cancer families. *Br J Cancer*. 2000;82(1):151-6.
179. de la Hoya M, Gutiérrez-Enríquez S, Velasco E, Osorio A, de Abajo AS, Vega A, et al. Genomic Rearrangements at the BRCA1 Locus in Spanish Families with Breast/Ovarian Cancer. *Clin Chem*. 2006;52(8):1480-5.
180. Lubinski J, Phelan CM, Ghadirian P, Lynch HT, Garber J, Weber B, et al. Cancer variation associated with the position of the mutation in the BRCA2 gene. *Fam Cancer*. 2004;3(1):1-10.
181. Swain SM, Wilson JW, Mamounas EP, Bryant J, Wickerham DL, Fisher B, et al. Estrogen Receptor Status of Primary Breast Cancer Is Predictive of Estrogen Receptor Status of Contralateral Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2004;96(7):516-23.
182. Laraqui A, Uhrhammer N, EL Rhaffouli H, Sekhsokh Y, Lahlou-Amine I, Bajjou T, et al. *BRCA* Genetic Screening in Middle Eastern and North African: Mutational Spectrum and Founder *BRCA1* Mutation (c.798_799delTT) in North African. *Dis Markers*. 2015;2015:1-8.

183. Laarabi FZ, Ratbi I, Elalaoui SC, Mezzouar L, Doubaj Y, Bouguenouch L, et al. High frequency of the recurrent c.1310_1313delAAGA BRCA2 mutation in the North-East of Morocco and implication for hereditary breast–ovarian cancer prevention and control. *BMC Res Notes*. 2017;10:188.
184. Tazzite A, Juhadi H, Nadifi S, Aretini P, Falaschi E, Collavoli A, et al. BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Moroccan breast/ovarian cancer families: Novel mutations and unclassified variants. *Gynecol Oncol*. 2012;125(3):687-92.
185. Rosado-Jiménez L, Mestre-Terkemani Y, García-Aliaga A, Garcia-Hernández R, Zafra-Poves M, Expósito-García M, et al. Prevalence and founder effect of the BRCA1 c.1918C>T variant in hereditary breast and ovarian cancer families from Murcia (southeastern Spain). *Clin Chem Lab Med* 2021; 59: 462-s484.
186. Rosado-Jiménez L, Mestre-Terkemani Y, García-Aliaga A, Sánchez-Henarejos P, Macías-Cerrolaza JA, Moya-Martínez P, et al. Evidence for a founder effect of BRCA2 rearrangement in Spanish hereditary breast/ovarian cancer families. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59: 462-s484.
187. Brunet J, Gutiérrez-Enríquez S, Torres A, Bérez V, Sanjosé S, Galceran J, et al. ATM germline mutations in Spanish early-onset breast cancer patients negative for BRCA1/BRCA2 mutations. *Clin Genet*. 2008;73(5):465-73.
188. Graña B, Fachal L, Darder E, Balmaña J, Ramón y Cajal T, Blanco I, et al. Germline ATM mutational analysis in BRCA1/BRCA2 negative hereditary breast cancer families by MALDI-TOF mass spectrometry. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;128(2):573-9.
189. Balleine RL, Murali R, Bilous AM, Farshid G, Waring P, Provan P, et al. Histopathological features of breast cancer in carriers of ATM gene variants. *Histopathology*. 2006;49(5):523-32.
190. Goldgar DE, Healey S, Dowty JG, Da Silva L, Chen X, Spurdle AB, et al. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2011;13(4):R73.
191. Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(11):813-22.
192. Dombernowsky SL, Weischer M, Allin KH, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Risk of cancer by ATM missense mutations in the general population. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(18):3057-62.
193. Minion LE, Dolinsky JS, Chase DM, Dunlop CL, Chao EC, Monk BJ. Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2. *Gynecol Oncol*. 2015;137(1):86-92.
194. LaDuca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS, Keiles S, Tandy S, Pesaran T, et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. *Genet Med*. 2014;16(11):830-7.

195. Gabaldó-Barrios X. Caracterización molecular y prevalencia de las variantes genéticas en BRCA1/2 en el Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario en la Región de Murcia. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, 2014.
196. Sánchez-Bermúdez AI. Prevalencia y Análisis Mutacional de los Genes RAD51C y RAD51D en Familias con Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario No Asociado a BRCA1 y/o BRCA2 de la Región de Murcia. Tesis doctoral. Universidad de Murcia, 2016.
197. Castillo-Guardiola V, Sarabia-Meseguer MD, Rosado-Jiménez L, Marín-Vera M, Macías-Cerrolaza JA, Cuevas-Tortosa E, et al. Utilidad de los algoritmos de priorización de variantes con significado clínico desconocido en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. *Rev Med Lab.* 2021;2(1):21-9.
198. Castillo-Guardiola V, Rosado-Jiménez L, Sarabia-Meseguer MD, Marín-Vera M, Macías-Cerrolaza JA, García-Hernández R, et al. Next step in molecular genetics of hereditary breast/ovarian cancer: Multigene panel testing in clinical actionably genes and prioritization algorithms in the study of variants of uncertain significance. *Eur J Med Genet.* 2022;65(4):104468.
199. Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho YY, et al. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2017;19(10):1105-17.
200. Tavigian SV, Greenblatt MS, Harrison SM, Nussbaum RL, Prabhu SA, Boucher KM, et al. Modeling the ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* 2018;20(9):1054-60.
201. Tavigian SV, Harrison SM, Boucher KM, Biesecker LG. Fitting a naturally scaled point system to the ACMG/AMP variant classification guidelines. *Hum Mutat.* 2020;41(10):1734-7.
202. Milko LV, Funke BH, Hershberger RE, Azzariti DR, Lee K, Riggs ER, et al. Development of Clinical Domain Working Groups for the Clinical Genome Resource (ClinGen): lessons learned and plans for the future. *Genet Med.* 2019;21(4):987-93.