



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
TESIS DOCTORAL

Utilidad del estudio genético, mediante un amplio panel de genes clínicamente accionables, en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.

**D. Younes Mestre Terkemani**

2023





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Utilidad del estudio genético, mediante un amplio panel de genes clínicamente accionables, en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.

Autor: Younes Mestre Terkemani

Director/es: D.<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Desamparados Sarabia Meseguer

D. Francisco Ruiz Espejo

D. José Luis Alonso Romero





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. Younes Mestre Terkemani

doctorando del Programa de Doctorado en

Ciencias de la salud

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Utilidad del estudio genético, mediante un amplio panel de genes clínicamente accionables, en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.

y dirigida por,

D./Dña. M<sup>a</sup> Desamparados Sarabia Meseguer

D./Dña. Francisco Ruiz Espejo

D./Dña. José Luis Alonso Romero

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 06 de septiembre de 2023

Fdo.: Younes Mestre Terkemani

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia



*Si se siembra la semilla con fe y se cuida con perseverancia,  
solo será cuestión de tiempo recoger sus frutos.*

Thomas Carlyle

*A mis padres*

*A mis hermanas*

*A Safae*

*A Syla*



## *Agradecimientos*

*Fue un camino muy largo, que sin vosotros hubiera sido imposible, por lo cual dedicaré estas líneas a todos los que habéis aportado un granito de arena para llevar a cabo este proyecto.*

*A mis directores*

*Amparo Sarabia, Paco Ruiz y José Luis Alonso, por haberme dado esta oportunidad, por la confianza depositada en mí, por la sabiduría que me habéis transmitido, por vuestra dedicación, vuestro apoyo constante y sobre todo por vuestro cariño.*

*Siempre os seré agradecido desde el fondo del corazón.*

*A todos mis compañeros del Laboratorio de Genómica,*

*por haberme brindado la oportunidad de formar parte de esta familia tan hermosa “la familia LDG”, por haber compartido conmigo tanto los buenos como los malos momentos a lo largo de este camino, por todo lo que he aprendido de vosotros.*

*A las Unidades de Asesoramiento genético del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y del Hospital General Universitario Morales Meseguer,*

*por su labor y contribución en este proyecto.*

*A todo el personal del servicio de Análisis clínicos,*

*por haber contribuido en mi formación como analista y permitido crecer personal y profesionalmente durante estos 4 años de residencia. En especial Paco Avilés por haber sido mi tutor de residencia, haberme guiado y haber estado presente siempre que te he necesitado. A Pepe por haber sido un jefe de servicio con una gran dedicación y siempre a la escucha de mis necesidades durante la residencia.*

*A mis compañeros durante la residencia,*

*Por los momentos compartidos, en especial a mis compañeras de promoción María Arnaldos y Marta Expósito, por los viajes que hemos hecho durante la residencia y los buenos momentos compartidos.*

*Laura, Ángeles y Raúl,*

*Gracias por la ayuda prestada para completar la tesis.*

*A los “supernenés”,*

*Por ser unas personas especiales, por vuestro cariño, por los buenos momentos compartidos, por ser estupendos compañeros de trabajo, pero sobre todo por vuestra sincera amistad. Jesús, gracias por ser y estar, has sido la persona sobre la cual siempre he podido contar durante mi aventura en las tierras murcianas, gracias de corazón.*

*A mis amigos de infancia,*

*Por haber siempre estado a mi lado, a pesar de la distancia que nos separa.*

*A mi familia,*

*A mi madre por ser la luz que ilumina mi camino, por tu amor incondicional, a mi padre por haber me enseñado la escuela de la vida, por haber luchado siempre por mi bienestar y por tu amor infinito, a mis dos hermanas por vuestro apoyo, cariño y por vuestra confianza y ánimos.*

*A mi mujer,*

*Por ser mi mejor compañera de vida, gracias por animarme cuando más lo he necesitado, gracias por tu apoyo y amor que han sido mi fuente de motivación a lo largo de esta tesis, gracias por ser esta persona tan especial que ha hecho que este largo camino sea más ameno.*

*A mi Sylia,*

*Llegaste a mitad de esta aventura, pero tu llegada cambió mi vida. Tu presencia, tu sonrisa han sido fuente de inspiración y motivación, eres mi mayor tesoro y la persona que me permite cada día sacar la mejor versión de mí.*

*En definitiva, gracias a todos los que habéis participado a lograr este proyecto.*



# Índice



Abreviaturas .....	21
Lista de figuras.....	23
Lista de tablas .....	28
<b><i>I. Introducción.....</i></b>	<b>31</b>
1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA Y OVARIO .....	33
2. CARCINOGENÉESIS Y FACTORES DE RIESGO .....	34
3. HEREDABILIDAD Y ARQUITECTURA GENÉTICA SUBYACENTE .....	35
4. CLASIFICACIÓN DE CÁNCER DE MAMA .....	36
5. CLASIFICACIÓN DE CÁNCER DE OVARIO .....	39
6. SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO .....	41
6.1. Evolución del estudio genético en el SCMOH .....	42
6.2. Daños producidos en el ADN y mecanismos de reparación .....	42
6.3. Genes implicados en el SCMOH y otros síndromes .....	44
6.3.1. SCMOH asociado a BRCA1/2 .....	44
6.3.2. ATM y Ataxia-telangiectasia .....	47
6.3.3. TP53 y síndrome de Li- Fraumeni.....	48
6.3.4. CHEK2 .....	49
6.3.5. PALB2.....	50
6.3.6. PTEN y síndrome de Cowden .....	51
6.3.7. STK11 y Síndrome de Peutz-Jeghers .....	51
6.3.8. NF1 y Neurofibromatosis tipo 1 .....	52
6.3.9. CDH1 .....	53
6.4. Otros genes relacionados con el SCMOH .....	55
6.4.1. RAD51C (RAD51 paralog C) y RAD51D (RAD51 paralog D) .....	55
6.4.2. PMS2.....	56
7. CÁNCER DE MAMA EN EL VARÓN .....	56
8. SUSCEPTIBILIDAD POLIGÉNICA EN CÁNCER DE MAMA Y OVARIO .....	57
9. CLASIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES.....	58
9.1. La clasificación molecular .....	58
9.1.1. Variantes en región exónica .....	58
9.1.2. Variantes espliceogénicas o intrónicas .....	59
9.2. Clasificación clínica .....	61
9.2.1. Variante de significado clínico desconocido o incierto.....	65
9.2.2. Variantes con efecto fundador .....	66
10. RECURSOS DISPONIBLES PARA CLASIFICAR LAS VARIANTES .....	66
10.1. Bases de datos clínicas y moleculares .....	67

10.2.	Programas predictivos o predictores <i>in silico</i> .....	70
10.3.	Frecuencia alélica de la población control .....	71
10.4.	Estudios funcionales .....	72
10.5.	Co-ocurrencia en <i>cis/trans</i> .....	72
10.6.	Estudio de co-segregación .....	73
11.	ELABORACIÓN DEL INFORME GENÉTICO .....	73
<b>II.</b>	<b><i>Hipótesis y objetivo</i></b> .....	<b>75</b>
1.	IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	77
2.	OBJETIVOS .....	78
<b>III.</b>	<b><i>Metodología</i></b> .....	<b>79</b>
1.	PACIENTES Y ESTUDIO.....	81
1.1.	Selección de pacientes .....	81
1.2.	Características clínicas e inmunohistoquímicas de los pacientes .....	82
2.	ANÁLISIS GENÉTICO.....	82
2.1.	Secuenciación masiva .....	82
2.2.	Secuenciación de Sanger .....	84
2.2.1	Selección de la región a amplificar.....	84
2.2.2	Diseño de los primers .....	84
2.2.3	Amplificación de la secuencia diana .....	84
2.2.4	Comprobación de la correcta amplificación.....	85
2.2.5	Purificación de la PCR de amplificación .....	86
2.2.6	Reacción de secuenciación.....	87
2.2.7	Purificación de la reacción de secuenciación .....	88
2.2.8	Electroforesis capilar .....	89
2.3.	Amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación (MLPA) .....	89
2.4.	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) .	91
2.4.1	Extracción y purificación del ARN .....	92
2.4.2	Obtención de ADNc: RT-PCR .....	92
2.4.3	Amplificación del ADNc y comprobación en gel de agarosa .....	92
2.4.4	Análisis de fragmentos .....	93
3.	ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GÉNICAS .....	94
3.1.	Análisis molecular .....	94
3.2.	Análisis clínico .....	95
3.3.	Priorización de las VUS detectadas en el estudio .....	95
4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	96
<b>IV.</b>	<b><i>Resultados</i></b> .....	<b>98</b>

1.	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA .....	100
2.	RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL PANEL DE 20 GENES INDICADOS EN LA NCCN .....	103
3.	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LOS CRITERIOS DE LA SEOM 2019 .....	103
4.	CONTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS VP/VPP DETECTADAS EN LOS GENES CLÍNICAMENTE ACCIONABLES EN PACIENTES CON SCMOH.....	107
4.1.	Contribución de las VP/VPP identificadas en los genes clínicamente en pacientes con SCMOH.....	107
4.2.	Caracterización de las VP/VPP detectadas en los genes clínicamente accionables en pacientes con SCMOH .....	108
4.3.	Estudio de correlación genotipo-fenotipo de las VP/VPP detectadas en genes clínicamente accionable en pacientes con SCMOH .....	113
4.3.1	Variantes patogénicas detectadas en BRCA1 .....	120
4.3.2	Variantes patogénicas detectadas en el gen BRCA2 .....	131
4.3.3	Variantes patogénicas detectadas en el gen ATM .....	141
4.3.4	Variantes patogénicas detectadas en el gen CHEK2 .....	148
4.3.5	Variantes patogénicas detectadas en el gen PMS2 .....	153
4.3.6	Variantes patogénicas detectadas en RAD51C .....	155
4.3.7	Variantes patogénicas detectadas en RAD51D .....	157
4.3.8	Variantes patogénicas detectadas en el gen TP53.....	159
4.3.9	Variantes patogénicas detectadas en el gen PALB2 .....	162
4.3.10	Variantes patogénicas detectadas en el gen BRIP1 .....	164
4.3.11	Variantes patogénicas detectada en el gen NF1 .....	166
4.4.	Características clínicas de cáncer de mama en casos índices portadores de VP/VPP en BRCA1/2, ATM y CHEK2.....	168
4.5.	Características clínicas de cáncer de ovario en casos índices portadores de VP/VPP en BRCA1/2 y ATM.....	169
5.	VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO INCIERTO DETECTADAS EN GENES CLÍNICAMENTE ACCIONABLES .....	170
5.1.	Reclasificación de las VUS detectadas .....	170
5.2.	Categorización molecular de las VUS reclasificadas .....	170
5.3.	Priorización de las VUS .....	171
6.	ESTUDIO DE SPLICING DE LA VARIANTE c.375+2T>C EN EL GEN TP53 .....	183
7.	CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES DETECTADAS EN GENES SUSCEPTIBLES DE SCMOH ...	185
7.1.	Variantes patogénicas detectadas en genes susceptibles de SCMOH.....	185
7.2.	VUS detectadas con el panel de 30 genes.....	188
<b>V.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>191</b>
1.	RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL PANEL DE LOS 20 GENES DE ACCIONABILIDAD CLÍNICA ....	193
2.	EVALUACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS DE LOS CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	197

3.	CONTRIBUCIÓN Y CATEGORIZACIÓN MOLECULAR DE LAS VP7VPP DETECTADAS EN LOS GENES CLÍNICAMENTE ACCIONABLES EN PACIENTES CON SCMOH.....	199
3.1.	Contribución de cada uno de los 20 genes de la NCCN en el SCMOH.....	199
3.1.1.	Genes BRCA.....	206
3.1.2.	Genes no BRCA.....	207
3.2.	Caracterización molecular de las VP/VPP detectadas .....	208
4.	ESTUDIO GENOTIPO-FENOTIPO EN LAS VP/VPP DETECTADAS EN LOS 20 GENES DE LA NCCN	209
4.1.	Estudio genotipo-fenotipo en las VP/VPP detectadas en los genes BRCA1/2	209
4.2.	Estudio genotipo-fenotipo en las VP/VPP detectadas en los genes no BRCA	210
4.2.1.	ATM .....	210
4.2.2.	CHEK2 .....	212
4.2.3.	Rad51D/C .....	212
4.2.4.	PMS2.....	213
4.2.5.	PALB2.....	213
4.2.6.	TP53 .....	213
4.2.7.	BRIP1.....	214
4.2.8.	NF1.....	215
4.3.	Estudio genotipo-fenotipo en pacientes portadores de 2VP/VPP .....	215
4.3.1.	Pacientes portadores de doble VP/VPP en los genes BRCA1 y BRCA2 .....	215
4.3.2.	Pacientes portadores de doble VP/VPP en los genes ATM y CHEK2.....	216
5.	VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO.....	216
5.1.	Reclasificación de las VUS.....	216
5.2.	Distribución y categorización molecular de las VUS detectadas en los 20 genes de la NCCN .....	217
5.3.	Priorización de las VUS .....	218
6.	APLICACIÓN DE LA TÉCNICA MOLECULAR RT-PCR EN EL ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS VARIANTES SUSCEPTIBLES DE MADURACIÓN ALTERNATIVA DEL ARN MENSAJERO.....	220
7.	RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO, CLASIFICACIÓN MOLECULAR Y CLÍNICA DE GENES SUSCEPTIBLES DE SCMOH .....	222
7.1.	MRE11 .....	223
7.2.	XRCC2 .....	223
7.3.	RAD50.....	224
<b>VI.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>225</b>
<b>VII.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>229</b>

VIII. Bibliografia.....	242
-------------------------	-----

## Abreviaturas

<b>Aa:</b>	Amino Ácido
<b>ACMG:</b>	Colegio Americano de genética Médica y Genómica ( <i>American College of Medical genetics and Genomics</i> )
<b>ADN:</b>	Ácido DesoxirriboNucleico
<b>AJCC:</b>	Comité Conjunto Estadounidense del Cáncer ( <i>American Joint Committe on Cáncer</i> )
<b>BER:</b>	Reparación por Escisión de Base nitrogenada ( <i>Base Excision Repair</i> )
<b>BIC:</b>	Núcleo de Información sobre el cáncer de Mama ( <i>Breast cáncer Information Core</i> )
<b>CAT:</b>	Catálogo
<b>CDI:</b>	Cáncer de mama Ductal Invasivo
<b>dbSNP:</b>	Base de datos de Polimorfismo de un Solo nucleótido ( <i>data base of Single Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>DSB:</b>	Rotura de Dos Hebras de ADN ( <i>Double Strand Break</i> )
<b>FS:</b>	Cambio de marco de lectura ( <i>Frameshift</i> )
<b>HER2:</b>	Receptor tipo 2 del factor de crecimiento Epidérmico Humano ( <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i> )
<b>HGMD:</b>	Base de Datos de Mutaciones Genéticas Humanas ( <i>Human Gen Mutation Database</i> )
<b>HGVS:</b>	Sociedad de Variación del Genoma Humano ( <i>Human Genome Variation Society</i> )
<b>IARC:</b>	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer ( <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
<b>IF:</b>	Sin cambio de marco de lectura ( <i>Inframe</i> )
<b>LA:</b>	Luminal A
<b>LB:</b>	Luminal B
<b>MMR:</b>	Mecanismos de reparación del desajuste ( <i>MisMatchRepair</i> )
<b>MS:</b>	Cambio de sentido ( <i>Missense</i> )
<b>mTOR:</b>	Diana de la Rapamicina en los Mamíferos ( <i>Mamalian Targuet of Rapamycin</i> )
<b>NCCN:</b>	Red Nacional de Centros Oncológicos Integrales ( <i>National Comprehensive Cancer Network</i> )

NER:	Reparación por Escisión de Nucleótido ( <i>Nucleotide Excision Repair</i> )
NGS:	Secuenciación Nueva Generación ( <i>Next Generation Sequencing</i> )
NS:	Sin sentido ( <i>Nonsense</i> )
NST:	Tipo No Especifico ( <i>No Specific Type</i> )
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PARP:	Poli-ADP Ribosa Polimerasa ( <i>Poly-ADP Ribose Polymerase</i> )
Pb:	Pares de Bases
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RE:	Receptor de Estrógenos
REF:	Referencia
RG:	Reordenamiento Génico
REVEL:	<i>Rare Exome Variant Ensemble Learner</i>
RP:	Receptor de Progesterona
RT-PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa ( <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
SCMOH:	Síndrome del Cáncer de Mama y Ovario Hereditario
SEOM:	Sociedad Española de Oncología Médica
SNV:	Variante de un Solo Nucleótido ( <i>Single Nucleotide Variant</i> )
SSB:	Rotura de Una Hebra de ADN ( <i>Single Strand Break</i> )
SSBR:	Reparación de Rotura de una Hebra de ADN ( <i>Single Strand Break Repair</i> )
TN:	Triple Negative
TNM:	Tamaño, Nódulo, Metástasis
UV:	Luz Ultra Violeta
VB:	Variante(s) Benigna(s)
VP:	Variante(s) Patogénica(s)
VPB:	Variante(s) Probablemente Benigna(s)
VPP:	Variante(s) Probablemente Patogénica(s)
VUS:	Variante de Significado clínico Incierto ( <i>Variante of Uncertain Significance</i> )

Lista de figuras

**Figura 1:** Incidencia de casos de cáncer en mujeres y hombres durante el año 2020

**Figura 2:** Clasificación del cáncer de mama según la última edición de libro de la OMS 2019.

**Figura 3:** Clasificación histológica del cáncer de ovario según la SEOM

**Figura 4:** Dominios funcionales de *BRCA1/2*

**Figura 5:** Resumen de los mecanismos de reparación de ADN a través de *ATM*

**Figura 6:** Mecanismos de reparación de ADN de *CHEK2*

**Figura 7:** Inhibición de la vía mTOR mediada por LKB1

**Figura 8:** Papel de la *E-CADHERIN* en la adhesión celular

**Figura 9:** Papel de E-CADHERINA en regulación de señalización Wnt/beta-catenina

**Figura 10:** Estimación de la heredabilidad del cáncer de mama y ovario

**Figura 11:** Tipos de mutaciones exónicas más frecuentes que puede sufrir el ADN

**Figura 12:** Proceso de *splicing*

**Figura 13:** Distintas situaciones de alteración de *Splicing*.

**Figura 14:** Ejemplo de algoritmo de clasificación de VUS

**Figura 15:** Fase de activación de la Taq polimerasa

**Figura 16:** Ejemplo de revelado de gel de agarosa

**Figura 17:** Purificación enzimática de la PCR de amplificación con ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent ®.

**Figura 18:** Programa empleado en la reacción de secuenciación

**Figura 19:** Condiciones de reacción de amplificación MLPA

**Figura 20:** Proceso resumido de RT-PCR para el estudio de variantes de *splicing* alternativo

**Figura 21:** Electroferograma de análisis de fragmentos

**Figura 22:** Algoritmo utilizado para priorizar las VUS en las variantes que se encuentran en genes cuya accionabilidad clínica ha sido demostrada

**Figura 23:** Distribución (%) de los distintos tipos de cánceres en los 63 casos en donde se ha identificado una alteración genética (VP/VPP) en la cohorte seleccionada

**Figura 24:** Distribución histológica de los 57 cánceres de mama\* en la muestra de estudio con diagnóstico molecular (VP/VPP)

**Figura 25:** Distribución (%) de la clasificación molecular de los 57 cánceres de mama en la muestra de estudio con diagnóstico molecular (VP/VPP)

**Figura 26:** Distribución histológicas de los 27 cánceres de ovario\* en la muestra de estudio con diagnóstico molecular (VP/VPP)

**Figura 27:** Flujo de trabajo y rendimiento de los grupos de los criterios de selección de la SEOM 2019

**Figura 28:** Tasa de detección (%) de cada uno de los criterios que forman los 3 grupos de criterios de selección de la SEOM 2019

**Figura 29:** Rendimiento diagnóstico (%) de cada uno de los 20 genes de la NCCN versión 3.2019 estudiados en la muestra

**Figura 30:** Distribución (%) de los diferentes tipos de VP/VPP detectadas en el estudio

**Figura 31:** Fenotipo de los casos índices portadores de VP/VPP en los distintos genes de accionabilidad clínica detectados en la cohorte del estudio

**Figura 32:** Distribución de las VP/VPP sobre el gen *BRCA1* y sus principales dominios

**Figura 33:** Distribución (%) de la clasificación histológica del cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en *BRCA1*

**Figura 34:** Distribución (%) de la clasificación molecular del cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en *BRCA1*

**Figura 35:** Distribución de las VP sobre el gen *BRCA2* y sus principales dominios

**Figura 36:** Distribución (%) de los tipos moleculares de cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en el gen *BRCA2*

**Figura 37:** Distribución de las VP/VPP sobre el gen *ATM* y sus principales dominios

**Figura 38:** Distribución (%) de los diferentes tipos histológicos de cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en el gen *ATM*

**Figura 39:** Distribución (%) de los diferentes tipos moleculares de cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en *ATM*

**Figura 40:** Distribución de las VP/VPP sobre el gen *CHEK2* y sus principales dominios

**Figura 41:** Localización de la VP sobre el gen *PMS2* y sus principales dominios

**Figura 42:** Localización de la VP/VPP sobre el gen *RAD51C* y sus principales dominios

**Figura 43:** Localización de la VP sobre el gen *RAD51D* y sus principales dominios

**Figura 44:** Localización de las dos VP/VPP sobre el gen *TP53* y sus principales dominios

**Figura 45:** Localización de la VPP sobre el gen *PALB2* y sus principales dominios

**Figura 46:** Localización de la VP/VPP sobre el gen *BRIP1* y sus principales dominios

**Figura 47:** Localización de la VPP sobre el gen *NF1* y sus principales dominios

**Figura 48:** Distribución (%) de las VUS halladas en los 20 genes de la NCCN versión 3.2019 (n=96) en la muestra de estudio

**Figura 49:** Distintas variantes únicas detectadas después de la reclasificación y priorización de las VUS detectadas al inicio del estudio

**Figura 50:** VUS reclasificadas como VB/VPB

**Figura 51:** Estado mutacional de la totalidad de la cohorte (n=414) tras la reclasificación y priorización de las 129 VUS iniciales

**Figura 52:** Análisis por RT-PCR/EC y RT-PCR/Sanger de la VP c.375+2T>C

**Figura 53:** Árbol familiar del caso índice portadora de la VPP c.375+2C>T en el gen *TP53*

**Figura 54:** Distintas variantes VUS y VP/VPP detectadas en los 30 genes susceptibles estudiados

**Figura 55:** Algoritmos de priorización de las VUS



## Lista de tablas

**Tabla 1:** Clasificación TNM según el libro de la OMS de 2019

**Tabla 2:** Subtipos de cáncer de mama y tratamiento

**Tabla 3:** Estadio de cáncer de ovario según la clasificación TNM

**Tabla 4:** Principales síndromes hereditario asociados a cáncer de mama

**Tabla 5:** Resumen de las características de los portadores de VP/VPP en los genes *BRCA1/2*.

**Tabla 6:** Clasificación clínicas de las variantes genéticas

**Tabla 7:** Criterios de grados de patogenicidad para clasificar las variantes genéticas

**Tabla 8:** Criterios de benignidad para clasificar las variantes genéticas

**Tabla 9:** Reglas de combinación de criterios para clasificar las variantes genéticas obtenidas

**Tabla 10:** Criterios establecidos por la SEOM (2019) para el diagnóstico genético de SCMOH

**Tabla 11:** Reactivos y condiciones de PCR de amplificación

**Tabla 12:** Condiciones y reactivos de reacción de secuenciación

**Tabla 13:** Mezcla de la reacción RT-PCR con un volumen final de 20µl

**Tabla 14:** Secuencias de *primers* y transcrito empleado para la amplificación de la secuencia diana

**Tabla 15:** Caracterización de las VP/VPP obtenidas en los genes clínicamente accionable en el estudio

**Tabla 16:** Estudio genotipo-fenotipo de las VP/VPP detectadas en el panel de 20 genes

**Tabla 17:** Características clínicas de cáncer de mama en portadores de VP/VPP y no portadores de VP/VPP

**Tabla 18:** Edad media de casos índices con cáncer de ovario portadores de VP/VPP y no portadores de VP/VPP

**Tabla 19:** VUS priorizadas en función del algoritmo de priorización

**Tabla 20:** VUS no priorizadas detectadas en el estudio

**Tabla 21:** Caracterización de las VP/VPP detectadas en los genes susceptibles de SCMOH en el estudio

**Tabla 22:** Comparativa de resultados de rendimiento global (%) por caso índice con otros estudios nacionales

**Tabla 23:** Comparativa de resultados de rendimiento global por caso índice con otros estudios europeos

**Tabla 24:** Comparativa de resultados de rendimiento global por caso índice con otros estudios no europeos o mundiales

**Tabla 25:** Comparativa de rendimientos diagnósticos de estudios nacionales

**Tabla 26:** Comparativa de distribución de las VP/VPP por genes en los estudios nacionales

**Tabla 27:** Comparativa de rendimientos diagnósticos de estudios europeos

**Tabla 28:** Comparativa de distribución de las VP/VPP por genes en los estudios europeos

**Tabla 29:** Comparativa de rendimientos diagnósticos de estudios mundiales

**Tabla 30:** Comparativa de distribución de las VP/VPP por genes en los estudios mundiales

**Tabla 31:** Variantes susceptibles de *splicing* aberrante comprobadas por RT-PCR



# I. Introducción



## 1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA Y OVARIO

El cáncer sigue siendo una de las causas principales de morbi-mortalidad a nivel mundial. En el año 2020 se diagnosticaron casi 19.3 millones nuevos casos y se prevé, que en el año 2040, el número de nuevos casos alcanzará una cifra de 28.9 millones (1).

Durante el año 2020 el cáncer de mama fue el cáncer más diagnosticado, afectando a un total de 2.257.256 casos, o sea, un 11,7 % tomando en cuenta ambos géneros (1). Este porcentaje alcanza un 24,5% si se toma en cuenta solo el género femenino logrando una cifra de 2.254.000 mujeres diagnosticadas (1).

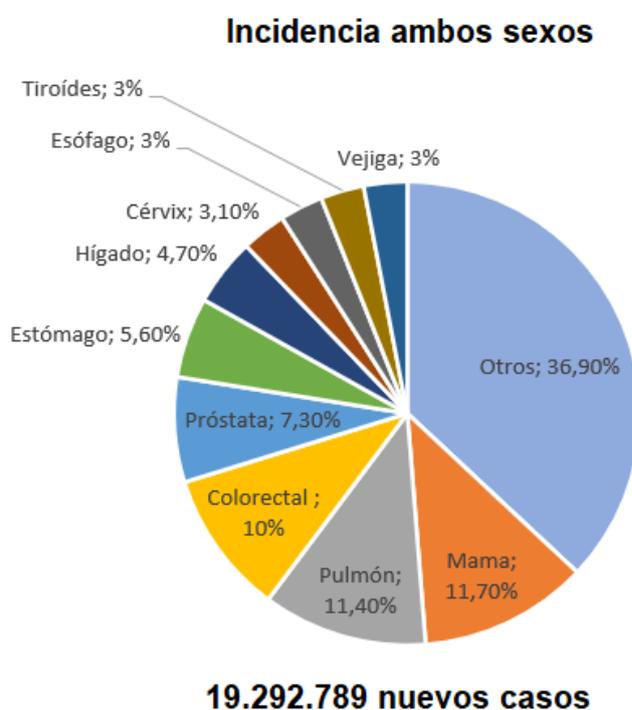


Figura 1: Incidencia de casos de cáncer en mujeres y hombres durante el año 2020 (1).

A nivel europeo, durante el mismo año 2020, el cáncer más diagnosticado en las mujeres fue el de mama, con un total de 355.021 casos, lo que equivale a un 28,7% de la totalidad de los cánceres diagnosticados en las mujeres europeas (2). A nivel nacional, la tendencia fue la misma, 34.060 mujeres fueron diagnosticadas, casi un tercio de la totalidad de los cánceres diagnosticados en las mujeres de nuestro país (2), además, se prevé que esta tendencia se mantendrá durante el año 2023 con un total de 35.001 mujeres diagnosticadas (3). En cuanto a la mortalidad en España, en 2020, aproximadamente 6500 mujeres fallecieron por cáncer de mama (4). Así pues, la comunidad de Madrid fue la que más número de defunciones registró con 812 muertes, seguida de Barcelona con 785 defunciones y Valencia en el tercer puesto con un

total de 386 víctimas. Melilla fue la comunidad menos afectada con 10 muertes. Murcia se colocó en el noveno puesto con 178 defunciones (4).

El cáncer de ovario afecta a menos mujeres ya que fue el séptimo cáncer más diagnosticado a nivel mundial durante el año 2020, con un total de 312.800 mujeres diagnosticadas, lo cual equivalente a un 3,4% (1).

A nivel europeo, durante el mismo año, el cáncer de ovario fue el octavo cáncer más diagnosticado, con un total de 39.414 pacientes afectadas, equivalente a un 3,2 % de la totalidad de los cánceres diagnosticados en Europa (2).

De los 27 países de la unión europea nuestro país ocupa el quinto último puesto, con un total de 3.513 casos diagnosticados durante el año 2020 equivalente a un 8,9% de los cánceres diagnosticados (2). En cuanto a la mortalidad se registró un total aproximado de 2200 defunciones, de las cuales 284 provienen de la comunidad de Madrid convirtiéndose en la comunidad con más mortalidad por este cáncer, seguida de la comunidad de Barcelona con 267 pacientes muertes y Valencia en el tercer puesto con 124 mujeres fallecidas; Melilla y Ceuta fueron las comunidades menos afectadas con 3 muertes. Murcia se colocó en el puesto número 11, con 58 pacientes fallecidas (4).

## **2. CARCINOGENESIS Y FACTORES DE RIESGO**

La base de la formación del cáncer es principalmente genética, de tal forma que dicho proceso se puede desencadenar por cambios estructurales en la secuencia del ADN (mutaciones en genes claves, pérdidas o ganancias de cromosomas enteros) o por cambios epigenéticos que causan el silenciamiento de genes claves, gracias a la hipermetilación de zonas promotoras.

En general, se ha visto que una célula debe de acumular en torno a 10 mutaciones para convertirse en tumoral (5); el conjunto de estas mutaciones lograrían la inestabilidad genética (pérdida del control sobre el ciclo celular, inhibición de mecanismos reparación de ADN, suprimir mecanismos de senescencia celular, activar mecanismos preservadores de la longitud telomérica, entre otros) involucrada en el desarrollo del cáncer.

Dicho lo anterior, parece evidente que el factor genético es primordial en el desarrollo del cáncer, de ahí la predisposición a desarrollar cáncer en aquellos individuos portadores de una variante genética patogénica en un gen asociado al desarrollo tumoral (6). Sin embargo, se ha visto que el desarrollo del cáncer es un proceso multifactorial en el cual influyen también factores externos capaces de modificar de forma individual la predisposición que tiene cada persona en desarrollar

el cáncer. Se conocen como factores de riesgo, aquellos componentes que amplifican el riesgo de sufrir un cáncer, varios estudios se llevaron a cabo para determinar aquellos factores de riesgo para el cáncer de mama y ovario y se resumen en lo siguiente (7) (8):

- Factores biológicos: El sexo y la edad son dos factores de riesgo claves, ya que las mujeres tienen un entorno hormonal (estrógenos y progesterona) que favorece el desarrollo de cáncer de mama y ovario. Por otra parte, se ha visto una asociación positiva entre la endometriosis y el desarrollo de cáncer de ovario (9).
- Estilo de vida: la hormonoterapia, la obesidad y el sedentarismo son factores de riesgo importantes para el desarrollo de cáncer de mama u ovario. El alcohol y el tabaco son factores de riesgo para el cáncer de mama mientras que existe controversia en su implicación en el desarrollo de cáncer de ovario (8) (10).
- Factores relacionados con la propia mama: una elevada densidad mamaria puede incrementar hasta 5 veces el riesgo de sufrir cáncer de mama (11); por otra parte, se considera como factor de riesgo cualquier antecedente de lesión mamaria que sea benigna o maligna.
- Factores medio ambientales: en general cualquier agente carcinógeno sea físico o químico o exposición a radiaciones.
- Otros factores que sin lugar a duda constituyen un riesgo para el desarrollo de cáncer de mama y ovario son por una parte los antecedentes familiares (a mayor número de familiares de primer grado y cuanto menor edad de diagnóstico, más riesgo de sufrir cáncer) y por otra, la presencia de alguna mutación germinal en algún gen de riesgo; en este caso, el riesgo dependerá de la heredabilidad y la arquitectura genética del gen en cuestión, al cual sumaremos los factores de riesgo citados anteriormente.

### **3. HEREDABILIDAD Y ARQUITECTURA GENÉTICA SUBYACENTE**

De forma estricta se define la heredabilidad como la proporción (expresada en tanto por uno) de la variabilidad fenotípica observada en la población. Dicho de otra forma, la heredabilidad consiste en la contribución de la genética en la aparición de un fenotipo (en este caso el cáncer), por lo cual una heredabilidad de 1, significa que la aparición del cáncer depende solamente del componente genético, mientras que una heredabilidad de 0 implica la ausencia del componente genético en la aparición del cáncer. Gracias al estudio de *Lichtenstein et al* se pudo determinar la

heredabilidad de varios cánceres comunes de los cuales, el de mama la heredabilidad se sitúa en un 0.27 y el de ovario en un 0.22 (12).

Sin embargo en la práctica clínica este concepto no es del todo correcto, ya que la heredabilidad tiene en cuenta solo componente genético y considera la presencia de solo un locus responsable del cáncer, no toma en cuenta la frecuencia poblacional de los alelos de riesgo, la magnitud de asociación de riesgo de locus con el cáncer (penetrancia) y tampoco las posibles interacciones que pueden existir entre varios loci para el desarrollo del cáncer; de ahí, el concepto de la arquitectura genética subyacente a la heredabilidad, que toma en cuenta la frecuencia alélica y riesgo atribuido a cada locus en el desarrollo del cáncer e incluso, en el caso de que existiera, las posibles interacciones entre varios loci.

Teniendo en cuenta este concepto, la arquitectura genética subyacente a la heredabilidad del cáncer de mama y ovario se dividiría en 3 modelos:

- Loci donde se localizan variantes de poca frecuencia, pero elevada penetrancia (ya bien definidos).
- Loci donde se localizan variantes muy frecuentes en la población, pero con riesgo muy bajo. Fueron determinados mediante GWAS (el Estudio de Asociación del Genoma Completo o *Genome Wide Association Studies*) del cual se sacó la teoría de susceptibilidad poligénica en el cáncer de mama y ovario.
- Loci donde se localizan variantes raras y de penetrancia moderada.

Destacar que el riesgo es conferido a variantes genéticas concretas, de tal forma que diferentes variantes génicas de un mismo gen pueden tener riesgos muy distintos. A modo de ejemplo, la variante BRCA1:p.Arg1669Gln es una variante de riesgo intermedio aunque el gen es considerado de alto riesgo.

#### 4. CLASIFICACIÓN DE CÁNCER DE MAMA

La última edición del libro de la OMS (Organización Mundial de la Salud) del año 2019, clasifica el cáncer de mama según la clasificación TNM (Tamaño, Nódulo, Metástasis), a través de la cual obtenemos el estadio del cáncer (**Tabla 1**), grado histológico de Nottingham (cuando son tumores invasivos) (13), clasificación histológica (**Figura 2**), y la clasificación molecular que se basa en la expresión de receptores hormonales, que son: RE (Receptor de Estrógenos), RP (Receptor de Progesterona), además de la expresión del HER2 (Receptor tipo 2 del factor de crecimiento Epidérmico Humano o *Human Epidermal growth factor Receptor 2*) y el Ki67 (índice de

proliferación celular). A través de estos biomarcadores se obtienen 4 subtipos de clasificación de cáncer de mama: LA (Luminal A), LB (Luminal B), HER2 y *Basal-like* o TN (Triple Negativo), esta última clasificación ha permitido orientar de forma más eficaz los tratamientos, además de obtener pronósticos más precisos (Tabla 2).

Estadio clínico	Clasificación TNM
Estadio 0	Tis; N0; M0
Estadio IA	T1 <sup>b</sup> ; N0; M0
Estadio IB	T (0;1); N1mi; M0
Estadio IIA	T (0;1); N1; M0 / T2; N0; M0
Estadio IIB	T2; N0; M0 / T3; N0; M0
Estadio IIIA	T (0;1;2); N2; M0 / T3; N (1;2); M0
Estadio IIIB	T4; N (0;1;2); M0
Estadio IIIC	Cualquier T; N3; M0
Estadio IV	Cualquier T; Cualquier N; M1

Tabla 1: Clasificación TNM según el libro de la OMS de 2019. Tis: tumor in situ; T1<sup>b</sup>: tumor de más de 0.1cm y menos de 0.5cm; T0: no hay evidencia de tumor primario; T1: tumor de menos de 2cm; T2: tumor de más de 2cm y menos de 5cm; T3: tumor de más de 5cm; T4: tumor de cualquier tamaño con extensión directa en pared torácica y/o piel; N0: no se evidencia metástasis en los nódulos regionales; N1: micrometástasis o afectación de 1 hasta 3 nódulos axilares, N2: metástasis de 4 hasta 9 nódulos axilares; N3: metástasis de 10 nódulos axilares; M0: ninguna metástasis distante; M1: metástasis distante (13).



Figura 2: Clasificación del cáncer de mama según la última edición de libro de la OMS 2019. Los tumores epiteliales invasivos de tipo Ductal o lobulillar (marcados en rojo) son los más comunes y suman entre los dos el 95% de los tipos histológicos de cáncer de mama (14). \* Existe un subtipo de CDI que es el NST (de Tipo No Especifico o *No Specific Type*). Los NST son diagnosticados por exclusión cuando no predomina ningún patrón histológico específico y suman el 70% de los CDI (14).

SUBTIPO	DEFINICIÓN	TRATAMIENTO
• Luminal A	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luminal A</li> <li>• RE y/o RP positivos</li> <li>• HER2 negativo</li> <li>• Ki 67 &lt; 14%</li> </ul>	Hormonoterapia
• Luminal B	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luminal B (Her2 negativo)</li> <li>• RE y/o RP positivos</li> <li>• HER2 negativo</li> <li>• Ki 67 &gt; 14%</li> <li>• Luminal B (Her2 positivo)</li> <li>• RE y/o RP positivos</li> <li>• HER2 positivo</li> <li>• Cualquier Ki67</li> </ul>	Hormonoterapia ± citotóxicos  Citotóxicos + Anti HER2 + Hormonoterapia
• HER2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HER2 positivo no lum.</li> <li>• HER2 positivo</li> <li>• RE y RP negativos</li> </ul>	Citotóxicos + Anti HER2
• Basal-Like	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Triple negativo</li> <li>• RE y RP negativos</li> <li>• HER2 negativo</li> </ul>	Citotóxicos

Tabla 2: Subtipos de cáncer de mama y tratamiento adecuados (14).

## 5. CLASIFICACIÓN DE CÁNCER DE OVARIO

La clasificación del cáncer de ovario se basa en el estadiaje, grado histológico y clasificación histológica. El conjunto de estas clasificaciones nos permite orientar el tratamiento más adecuado y establecer pronósticos precisos.

El estadiaje se obtenía mediante la clasificación de FIGO hasta el año 2018 que se empezó a emplear la clasificación TNM de la AJCC (Comité Conjunto Estadounidense del Cáncer o *American Joint Committee on Cancer*) (15) (Tabla 3).

En cuanto a la clasificación histológica, el 90% de los cánceres de ovarios son epiteliales, de los cuales el 70% son serosos de alto grado o conocidos también como cáncer de ovario de tipo 1 y el 20% restante son los de tipo 2 e incluyen los serosos de bajo grado, endometroide, de células claras y el mucinoso (Figura 3). Los de tipo 1 y de tipo 2 son muy diferentes desde el punto de vista clínico y molecular, de tal forma que los de tipo 1 están generalmente vinculados a variantes patogénicas (VP) o variantes probablemente patogénicas (VPP) germinales en *BRCA1*, *BRCA2* (*Breast Cancer Susceptibility Genes*) y *TP53* (*Tumoral Protein 53*), tienen peor supervivencia a los 5 años y responden bien a Taxol, derivados de platino e inhibidores de la *PARP* (Poli-ADP Ribosa Polimerasa o *Poly-ADP Ribose Polymerase*). Mientras que los de tipo 2 suelen asociarse a VP/VPP germinales en los genes *PTEN* (*Phosphatase and TENSin homolog*), *PIK3CA* (*Phosphatidyl-Inositol-*

4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic subunit Alpha), KRAS (Kirsten RAT Sarcoma viral oncogene homolog), BRAF (B-RAF proto oncogene), MAP2K (Mitogen-activated protein kinase kinase) y ERBB2 (ERYthroBlastic oncogene B), tiene mejor supervivencia a los 5 años y presentan mala respuesta frente a Taxol y derivados de platino (16).

Etapa AJCC	TNM	Etapa FIGO	Descripción de la etapa*
I	T1N0M0	I	El cáncer está solamente en el ovario (u ovarios) o la(s) trompa(s) de Falopio (T1). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IA	T1aN0M0	IA	El cáncer está en un ovario, y el tumor está restringido al interior del ovario; o el cáncer está en una trompa de Falopio, y solo se encuentran dentro de la trompa de Falopio. No hay cáncer en las superficies externas del ovario o de la trompa de Falopio. No hay células cancerosas en el líquido (ascitis) o en los lavados del abdomen y la pelvis (T1a). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IB	T1bN0M0	IB	El cáncer está en ambos ovarios o en las trompas de Falopio, pero no en sus superficies externas. No hay células cancerosas en el líquido (ascitis) o en los lavados del abdomen y la pelvis (T1b). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IC	T1cN0M0	IC	El cáncer está en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio, y tiene cualquiera de las siguientes características: <ul style="list-style-type: none"> <li>• El tejido (cápsula) que rodea el tumor se reventó durante la cirugía, lo que podría permitir que las células cancerosas se derramen hacia el abdomen y la pelvis (llamado derrame quirúrgico). Esta etapa se identifica como IC1.</li> <li>• El cáncer se encuentra en la superficie exterior de al menos uno de los ovarios o trompas de Falopio, o la cápsula (tejido que rodea el tumor) se reventó antes de la cirugía (lo que podría permitir que las células cancerosas se derramen hacia el abdomen y la pelvis). Esta etapa se identifica como IC2.</li> <li>• Hay células cancerosas en el líquido (ascitis) o en los lavados del abdomen y la pelvis. Esta etapa se identifica como IC3.</li> </ul> No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
II	T2 N0 M0	II	El cáncer se encuentra en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio y se ha propagado a otros órganos (como el útero, la vejiga, el colon sigmoide, o el recto) de la pelvis o hay cáncer peritoneal primario (T2). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIA	T2a N0 M0	IIA	El cáncer se ha propagado o ha invadido (ha crecido en) el útero, o las trompas de Falopio, o los ovarios. (T2a) No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIB	T2b N0 M0	IIB	El cáncer está en la superficie externa o ha crecido hacia otros órganos cercanos en la pelvis, como la vejiga, el colon sigmoide o el recto (T2b). No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
IIIA1	T1 o T2 ON1M0	IIIA1	El cáncer se encuentra en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio, o hay cáncer peritoneal primario (T1) y pudo haberse propagado o crecido hacia órganos cercanos en la pelvis (T2). Se ha extendido a los ganglios linfáticos retroperitoneales (pélvicos y/o paraaórticos) solamente. No se ha propagado a sitios distantes (M0).
IIIA2	T3a N0 o N1 M0	IIIA2	El cáncer está en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio, o hay cáncer peritoneal primario y se ha propagado o ha crecido hacia órganos fuera de la pelvis. Durante la cirugía, el cáncer no se puede observar a simple vista en el abdomen (fuera de la pelvis), pero se detectan depósitos diminutos de cáncer en el revestimiento del abdomen cuando se examinó en el laboratorio (T3a). El cáncer pudo o no haberse propagado a los ganglios linfáticos retroperitoneales (N0 o N1), pero no se ha propagado a partes distantes (M0).
IIIB	T3b N0 o N1 M0	IIIB	Hay cáncer en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio, o hay cáncer peritoneal primario y se ha propagado o ha crecido hacia órganos fuera de la

			pelvis. Los depósitos de cáncer son lo suficientemente grandes como para que el cirujano pueda verlos, pero no miden más de 2 cm (aproximadamente 3/4 de pulgada) de ancho. (T3b) Puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos retroperitoneales (NO o N1), pero no se ha extendido al interior del hígado o al bazo ni a sitios distantes (M0)	
IIIC	T3c NO o N1 M0	IIIC	El cáncer está en uno o ambos ovarios o en las trompas de Falopio, o hay cáncer peritoneal primario y se ha propagado o ha crecido hacia órganos fuera de la pelvis. Los depósitos de cáncer miden más de 2 cm (aproximadamente 3/4 de pulgada) de ancho, y estos pueden estar por fuera (la cápsula) del hígado o el bazo (T3c). Puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos retroperitoneales (NO o N1), pero no se ha extendido al interior del hígado o al bazo ni a sitios distantes (M0).	
IVA	Cualquier Cualquier M1a	T N	IVA	Hay células cancerosas en el líquido que rodea a los pulmones (a esto se le llama un derrame pleural maligno) sin ninguna otra área de propagación del cáncer, como al hígado, el bazo, el intestino, o los ganglios linfáticos fuera del abdomen (M1a).
IVB	Cualquier Cualquier M1b	T N	IVB	El cáncer se propagó al interior del bazo o el hígado, a los ganglios linfáticos aparte de los ganglios linfáticos retroperitoneales, y/o a otros órganos o tejidos fuera de la cavidad peritoneal, tal como los pulmones y los huesos (M1b).

Tabla 3: Estadio de cáncer de ovario según la clasificación TNM (15).

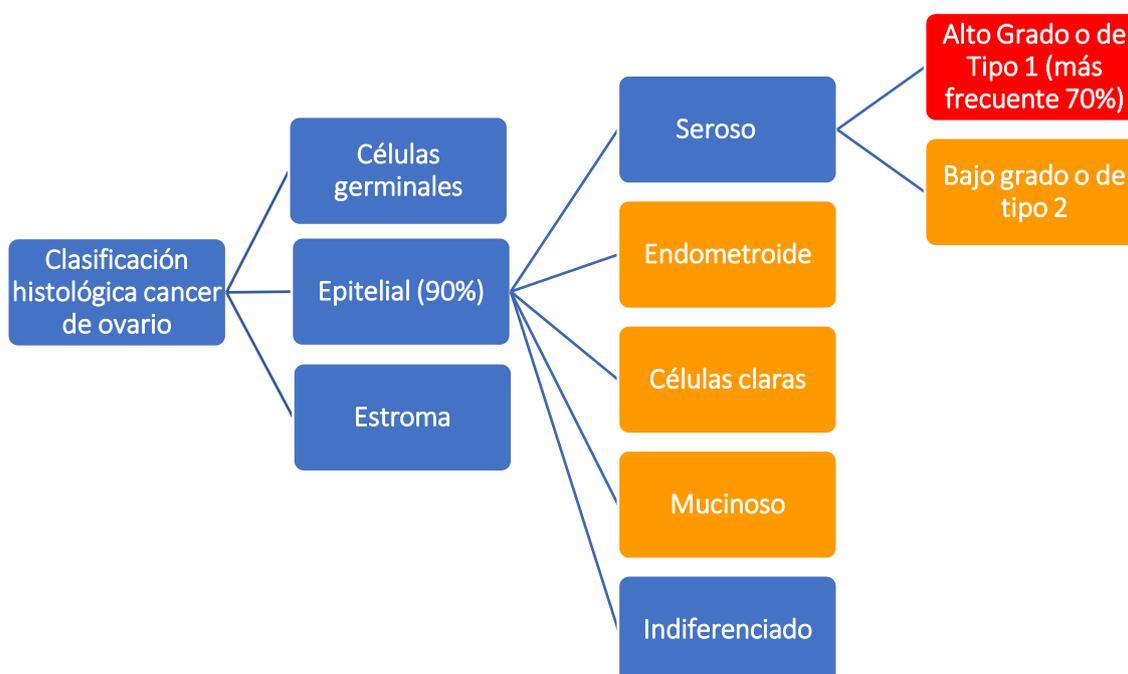


Figura 3: Clasificación histológica del cáncer de ovario según la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) (17). En rojo cáncer de ovario de tipo 1 y en naranja cáncer de ovario de tipo 2.

## 6. SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO

Aunque la mayoría de los cánceres de mama son esporádicos, se estima que 15% de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama tienen una historia familiar con antecedentes de cáncer de mama u ovario, y hasta el 10% de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama tienen susceptibilidad genética (18), formando parte del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH). Inicialmente, este síndrome se vinculó a la presencia de VP/VPP en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (*breast-cancer-susceptibility genes*), pero hoy en día se sabe que hay

muchos más genes involucrados en este síndrome, con penetrancia variable. De hecho, un estudio reciente ha demostrado que tras la recogida de los datos de 29700 familias (provenientes de los 6 continentes) portadoras de VP/VPP en *BRCA1* o *BRCA2*, la tasa de incidencia de cáncer de mama y ovario juntos, era de 5% para *BRCA1* y de 2% para *BRCA2* (13). Por otra parte, el cáncer de mama en algunos casos, es solo un componente de otros síndromes de cáncer hereditario; dicho de otra forma, en muchos casos, pacientes diagnosticados de cáncer de mama al ser portadores de VP/VPP germinales en genes concretos tienen susceptibilidad de desarrollar cáncer de mama además de otros tipos de cánceres. En este caso, el más frecuente es el SCMOH asociado a *BRCA1/2*, sin embargo existen más síndromes no menos importantes (**Tabla 4**) (13).

Síndrome	Gen involucrado
Ataxia-telangiectasia	<i>ATM</i>
Síndrome de Li-Fraumeni	<i>TP53</i>
Síndrome de Cowden	<i>PTEN</i>
Síndrome de Peutz-Jeghers	<i>STK11</i>
Neurofibromatosis tipo 1	<i>NF1</i>

Tabla 4: Principales síndromes hereditarios asociados al cáncer de mama (13).

### 6.1. Evolución del estudio genético en el SCMOH

En los años 90 se identificaron los dos primeros genes relacionados con la predisposición al cáncer de mama: *BRCA1/2* (19) (20), caracterizado por tener una herencia autosómica dominante y ser genes de elevada penetrancia, pero no completa. Este paso fue crucial, impulsó la investigación científica sobre este campo de tal forma que a lo largo de los años se descubrieron más genes involucrados en este síndrome.

En 2005, la llegada de la NGS (Secuenciación de Nueva Generación o *Next Generation Sequencing*), conocida también como secuenciación masiva, revolucionó el diagnóstico genético, ya que a diferencia de la secuenciación de Sanger permitió la secuenciación de varios genes (panel de genes) en un tiempo mucho más corto y un coste por base mucho más barato (21) (22). Sin embargo, aunque hayan transcurrido años desde entonces, la aplicación de paneles de genes en el SCMOH sigue suponiendo un reto para los profesionales de laboratorio y los clínicos, ya que se siguen encontrando variantes de diferentes genes de las que se desconoce su implicación clínica.

### 6.2. Daños producidos en el ADN y mecanismos de reparación

El ADN está constantemente expuesto a daños y procesos que lo alteran. Ese daño se puede producir por:

- SSB (Rotura de Una Hebra de ADN o *Single Strand Break*) y/o por la modificación de bases nitrogenadas debido a su oxidación, generación de sitios apurínicos o apirimidínicos, formación de un aducto de ADN causado por agentes mutagénicos, por la luz Ultra Violeta (UV). Para ello existen los 2 principales mecanismos de reparación (23):
  - o Los mecanismos por escisión: por una parte, está la BER (Reparación por Escisión de Base nitrogenada o *Base Excision Repair*), el cual actúa cuando solo la base nitrogenada está alterada. En general produce una rotura en la hebra de ADN donde actúa, por eso suele ser un paso previo a la SSBR (Reparación de Rotura de una Hebra de ADN o *Single Strand Break Repair*). En este proceso el papel de la *PARP* es fundamental ya que favorece el reclutamiento de las proteínas necesarias para la síntesis de la hebra de ADN rota. Por otra parte, está la NER (Reparación por Escisión de Nucleótidos o *Nucleotide Excision Repair*) que actúa cuando es todo el nucleótido el que ha sufrido daño.
  - o Los MMR (mecanismos de reparación del desajuste o *MisMatchRepair*): es un mecanismo gracias al cual se detectan inserciones, deleciones e incorporación erróneas de bases. Los genes involucrados en este proceso son los genes pertenecientes a la familia *Mut*, *MLH1* (*MutLHomolog1*), *MSH2* (*MutSHomolog2*), *MSH6* (*MutSHomolog6*), *MLH3* (*MutLHomolog6*) y *PMS2* (*PMS1 homolog2*). Las mutaciones de los genes responsables del MMR producen una alteración de la longitud de secuencias repetidas del ADN (conocidas como microsatélites). Este fenómeno se denomina inestabilidad de microsatélites y es el desencadenante del síndrome de Lynch, que es un síndrome de cáncer hereditario que aumenta el riesgo de sufrir cáncer colorrectal y endometrio (24). La inestabilidad de microsatélites no solo está relacionada con el síndrome de Lynch, sino también con otros tumores como pueden ser cáncer gástrico, leucemia y linfomas (25).
- DSB (Rotura de Dos Hebras de ADN o *Double Strand Break*) tras someter el ADN a agentes que los dañan como pueden ser las radiaciones ionizantes o UV (23). Para ellos existen dos mecanismos de reparación (26):
  - o La recombinación homóloga: la recombinación homóloga es un proceso más preciso y libre de errores ya que la recombinación se hace con la cromátida hermana, pero se da solo en la fase S y G2 del ciclo celular. En este proceso intervienen muchas proteínas de las cuales muchas de ellas están involucradas

en el SCMOH, destacando *ATM* (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*), *CHEK2* (*Checkpoint Kinase 2*), *TP53*, *PALB2* (*Partner and Localizer of BRCA2*), *BARD1* (*BRCA1 Associated Ring Domain 1*), *BRIP1* (*BRCA1 Interacting Protein 1*), *RAD51* (*RAD51 Recombinase*) y *BRCA1/2* entre otras.

- NHEJ (Unión de los Extremos No Homólogos o *NonHomologous End Joining*): es un método menos preciso en el cual tras una DSB, a través de varias proteínas, une los extremos de las DSB. Muy útil en el caso de que no sea posible la recombinación homóloga.

### 6.3. Genes implicados en el SCMOH y otros síndromes

#### 6.3.1. SCMOH asociado a *BRCA1/2*

El gen *BRCA1* (OMIM: 113705) se sitúa en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21.31), formado por 24 exones de los cuales dos son no codificantes, da lugar a una proteína de 1863 aa (amino ácidos), mientras que el gen *BRCA2* (OMIM: 600185) se encuentra en el brazo largo del cromosoma 13 (13q13.1). Este gen presenta más longitud en pares de bases que *BRCA1*, está formado por 27 exones (de los cuales el primero es no codificante) y da lugar a una proteína de 3418 aa.

Ambas proteínas tienen dominios a través de los cuales interaccionan con otras proteínas (**Figura 4**) con el objetivo principal de reparar el ADN como se ve en la (**Figura 5**).

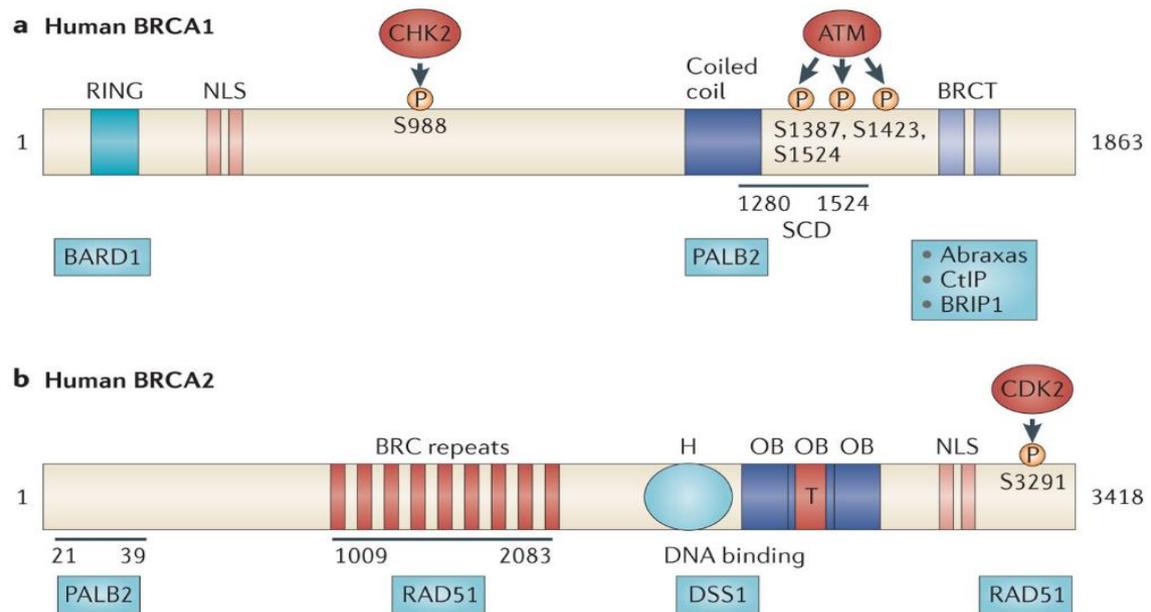


Figura 4: Dominios funcionales de *BRCA1/2*. **a)** En el extremo N-terminal se encuentra el dominio *RING*, a través del cual se une *BRCA1* a *BARD1* formando un heterodímero que adquiere propiedades de E3 ubiquitina ligasa que favorece la reparación del ADN a través de varias vías como por ejemplo la activación de la recombinación homóloga a través de la Claspina. El exón 11 contiene dos señales de localización celular (NLS) que se fosforilan por *ATM* tras exposición a radiación ionizante, activando así *BRCA1*. La región central contiene un sitio de fosforilación de *CHEK2*. La región *Coiled coil* en la cual se une *PALB2* activa la recombinación homóloga para la reparación del ADN. La región BRCT en el extremo C-terminal, se une a la proteína *Abraxas*, la proteína *CtIP*, y la proteína helicasa *BRIP1*, de tal forma que el complejo BRCT-*Abraxas* participa en el reclutamiento de *BRCA1* en el sitio de rotura de ADN, el complejo BRCT-*CtIP* promueve la activación de la recombinación homóloga y el complejo BRCT-*BRIP1* está asociado a la reparación del ADN regulando el punto G2/M del ciclo celular. **b)** *BRCA2* se une tanto en la región N-terminal con *PALB2* y C-terminal con *RAD51* ambos importantes para la reparación del ADN, la unión C-terminal orienta *BRCA2* en los sitios dañados del ADN y la unión N-terminal favorece la recombinación homóloga y reparación de ADN. Las copias repetidas de BRC situadas en el exón 11 sirven de unión con la proteína *RAD51* para reparar el ADN. Los 3 dominios OB sirven de unión al DNA, de tal forma que el segundo dominio OB en forma de torre (T) tiene la capacidad de unirse a las doble hebras de ADN para su reparación (27) (28) (29).

Pacientes portadores de VP/VPP germinales en *BRCA1/2*, además de aumentar el riesgo a lo largo de la vida de sufrir cáncer de mama y ovario, según la NCCN (Red Nacional de Centros Oncológicos Integrales o *National Comprehensive Cancer Network*) en su última versión (v2.2023), estos pacientes tienen mayor riesgo de sufrir cáncer de próstata, páncreas y melanoma, pero este último, solo en pacientes portadores de VP/VPP germinales en *BRCA2* (30).

En cuanto a cáncer de mama y ovario, los pacientes portadores de VP/VPP germinales en *BRCA1*, tienen un riesgo acumulado de sufrir cáncer de mama y ovario a los 80 años, de 67% y 45%, respectivamente (31). Si nos fijamos en las características histológicas y moleculares de ambos tumores, los cánceres de mama asociados a VP/VPP germinales en *BRCA1* se caracterizan por

grados histológicos más altos, con infiltraciones linfoides y clasificación molecular predominante tipo TN, histológicamente son en la mayoría de los casos tumores tipo carcinoma invasivo NST, carcinoma invasivo metaplásico y carcinoma invasivo medular. En resumen, son más agresivos que los de *BRCA2* (32) (33) (34). Los cánceres de ovario causados por *BRCA1* suelen ser de tipo 1, o sea, serosos de alto grado (35). En cuanto a las mutaciones que sufre el gen *BRCA1*, se ha visto por una parte, que las que se manifiestan en la región C-terminal son propensas a desarrollar cáncer de mama (36) y por otra parte, que generalmente son mutaciones puntuales, aunque se ha visto que en España hasta el 8,2% pueden ser grandes RG (Reordenamientos Génicos) (37).

Los pacientes portadores de VP/VPP germinales en *BRCA2*, el riesgo acumulado a los 80 años para padecer de cáncer de mama y ovario es de 66% y 12%, respectivamente (31). En cuanto a las características histológicas y moleculares para cada tumor, los cánceres de mama en estos pacientes son menos agresivos, e histológicamente es frecuente encontrarse con carcinoma ductal *in situ*, o carcinoma lobulillar *in situ* (38). En cuanto a la clasificación molecular, suelen ser LA o LB con frecuencia bastante más importante que los *BRCA1*, 35% frente a 9% para LA y 40% frente a 21% para LB (39). Los cánceres de ovario causados por *BRCA2*, suelen ser también de tipo 1, o sea, serosos de alto grado al igual que *BRCA1* (35). En cuanto a las VP/VPP que sufre el gen *BRCA2*, se ha visto que estas VP/VPP en la región central del gen están relacionadas con el desarrollo cánceres de ovario (13).

Sin embargo, no ocurre lo mismo en los hombres, se ha constatado que los cánceres de mama en aquellos portadores de VP/VPP germinales en *BRCA2* son más agresivos que los que afectan a las mujeres (40), y que el 76% de cánceres de mama en los hombres son *BRCA2*, y solo el 16% *BRCA1* (41).

En los pacientes portadores de VP/VPP germinales en *BRCA1/2* hay estudios que han demostrado que el estilo de vida, factores genéticos y la paridad tiene un potente impacto en la penetrancia y el riesgo de sufrir cáncer (42) (43). De hecho, a mayor número de embarazos a término, menor riesgo cáncer de mama tanto en portadores de VP/VPP germinales en *BRCA1/2* pero, no ocurre lo mismo con la lactancia, ya que se ha visto que solo protege a las mujeres portadoras de VP/VPP germinales en *BRCA1* y no a las portadoras de *BRCA2* (44). La menarquia precoz se ha asociado a un aumento de riesgo de cáncer de mama en las portadoras de VP/VPP germinales en *BRCA2* pero no en *BRCA1* (45). Por otra parte, no se ha encontrado una asociación entre el uso de anticonceptivos orales y el riesgo de sufrir cáncer de mama tanto en las portadoras de VP/VPP germinales en *BRCA1/2* (45) (46), pero sí se ha visto que la menopausia a una edad avanzada protege frente al cáncer de mama independientemente de la VP/VPP *BRCA* que tenga la mujer

(46). En la **Tabla 5** se resumen todas las características relacionadas con los portadores de VP/VPP de los genes *BRCA1/2*.

Características	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
Riesgo acumulado a los 80 años de cáncer de mama	67%	66%
Riesgo acumulado a los 80 años de cáncer de ovario	45%	12%
Características predominantes del cáncer de mama	Son más agresivos, grados histológicos altos, tumores invasivos tipo (NST, metaplásicos o medulares). Predomina el TN	Grados histológicos más bajos, menos agresivos, predomina tumores <i>in situ</i> tipo ductal o lobulillar. Predomina los LA o LB. En hombres más agresivos y mayoritarios.
Características predominantes del cáncer de ovario	Seroso de alto grado tipo1	Seroso de alto grado tipo1
Embarazo a termino	Factor protector	Factor protector
Lactancia	Factor protector	No influye
Menarquía precoz	No influye	Factor protector
Menopausia tardía	Factor protector	Factor protector
Anticonceptivos orales	No influye	No influye

Tabla 5: Resumen de las características de los portadores de VP/VPP en los genes *BRCA1/2*. NST: Tipo No Especifico (*No Specific Type*); LA: Luminal A; LB: Luminal B.

### 6.3.2. *ATM* y *Ataxia-telangiectasia*

El gen *ATM* (OMIM: 607585), se encuentra en el brazo largo del cromosoma 11 (11q22.3), contiene 63 exones, pero solo 62 codificantes que dan lugar a una proteína de 3056 aa.

*ATM* actúa en dos situaciones, la primera frente a radiaciones ionizantes y la segunda cuando hay una rotura de las dos hebras de ADN, haciendo de puente entre complejo MRN (*MRE11/RAD50/NBN* o *NBS1*); al detectar el daño en el ADN, fosforila la *ATM* quinasa, que a su vez fosforila, por una parte *CHEK2* y *TP53*, y por otra parte, a *BRCA1* (**Figura 5**) para lograr:

- 1- Detención del ciclo celular controlando la fase S y G2-M, activando *CHEK2* y la fase G2 activando *TP53*, con la finalidad de ralentizar el ciclo celular y dar el tiempo suficiente a los mecanismos de reparación del ADN para actuar.

- 2- Reclutando proteínas necesarias para la recombinación homóloga y la consiguiente reparación del ADN a través de la activación de *BRCA1/2*.

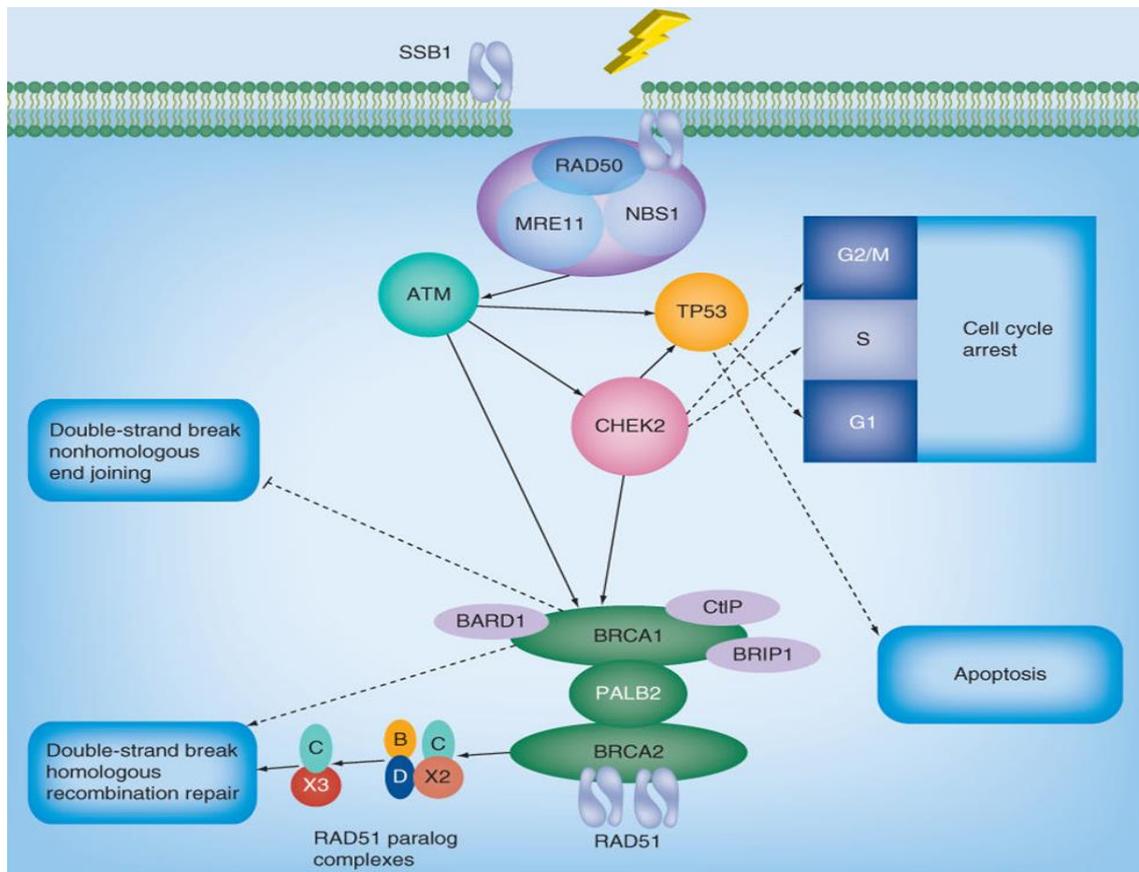


Figura 5: Resumen de los mecanismos de reparación de ADN a través de ATM (47).

Los pacientes portadores de VP/VPP en homocigosis en *ATM* desarrollan la enfermedad de Ataxia-telangiectasia, que es una enfermedad autosómica recesiva en la cual se manifiesta ataxia cerebelosa, esterilidad, inmunodeficiencias, y elevada predisposición a desarrollar tumores, además a una elevada sensibilidad a radiaciones ionizantes (13). Mientras que los pacientes con VP/VPP en un único alelo, tienen un riesgo absoluto de sufrir cáncer de mama hasta un 40%, un riesgo absoluto de sufrir cáncer de ovario de un 3%, riesgo absoluto de sufrir cáncer de páncreas de hasta un 10% y también un incremento de riesgo en los varones de sufrir cáncer de próstata (30).

### 6.3.3. *TP53* y síndrome de Li- Fraumeni

El gen *TP53* (OMIM: 191170), localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1), está formado por 11 exones y codifica una proteína de 393 aa.

*TP53* es considerado como un potente agente antitumoral, ya que actúa sobre el ciclo celular, y lo ralentiza para favorecer la reparación del ADN (Figura 5). Además, se ha visto que está

implicado en la senescencia celular y favorece la apoptosis de las células dañadas. Últimamente se ha visto que también juega un papel en la regulación de la inmunidad en microambientes tumorales, de tal forma que mejora la inmunidad antitumoral y favorece la transactivación de muchos genes inmunosupresores como por ejemplo PDL1 (48) (49). *TP53* tiene un papel importante en la recombinación homóloga que consiste en controlar y asegurarse del buen funcionamiento de la recombinación homóloga, ya que se encarga de revisar el heterodúplex formado después de intercambio de hebras mediado por RAD51. Por otra parte, puede inhibir la recombinación homóloga en el caso de secuencias de ADN mal emparejadas (50).

Los pacientes con el síndrome de Li-Fraumeni asociado a una VP/VPP germinal en *TP53*, desarrollan varios tipos de tumores, de tal forma que tumores de corteza suprarrenal, tumores cerebrales (carcinoma de los plexos coroides), leucemias, sarcomas, tumores de tejidos blandos y cáncer de mama suman el 70% de todos los tumores que pueden desarrollar estos pacientes (51). Se sabe también que las VP/VPP en el gen *TP53* pueden causar cáncer de ovario de tipo 1, de hecho, según la última estadística de la IARC (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer o *International Agency for Research on Cancer*) el cáncer de mama y de los genitales femeninos suman el 20% de los cánceres generados por VP/VPP germinales causada por *TP53* además, la mayoría de estas VP/VPP suelen ser variantes de tipo MS (cambio de sentido o *Missense*).

Se ha visto en un estudio de la IARC del 2018 publicado en el libro de OMS 2019, que de 522 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama y portadoras de VP/VPP germinales en *TP53*, 491 mujeres padecían de un carcinoma invasivo *NST*, y que este tumor se manifestaba sobre todo en mujeres entre 26-30 años (13).

#### 6.3.4. *CHEK2*

El gen *CHEK2* (OMIM: 604373), ubicado en el brazo largo del cromosoma 22 (22q12.1), está formado por 15 exones, de los cuales 14 son codificantes que traducen una proteína de 543 aa.

*CHEK2* es un potente agente antitumoral que actúa a dos niveles; el primero bloquea el ciclo celular de las células dañadas a través de la fosforilación de *P53* y *CDC25A/C* (dos proteínas cruciales para la regulación del ciclo celular ya que una vez fosforiladas, interaccionan con otras proteínas para bloquear el ciclo celular) (52) (53). El segundo favorece la reparación del ADN activando a *BRCA1* (para la recombinación homóloga), *TP53* y *KAP1* (una proteína que favorece la relajación de la cromatina y reclutamiento de proteínas reparadoras de ADN) (54) (**Figura 6**).

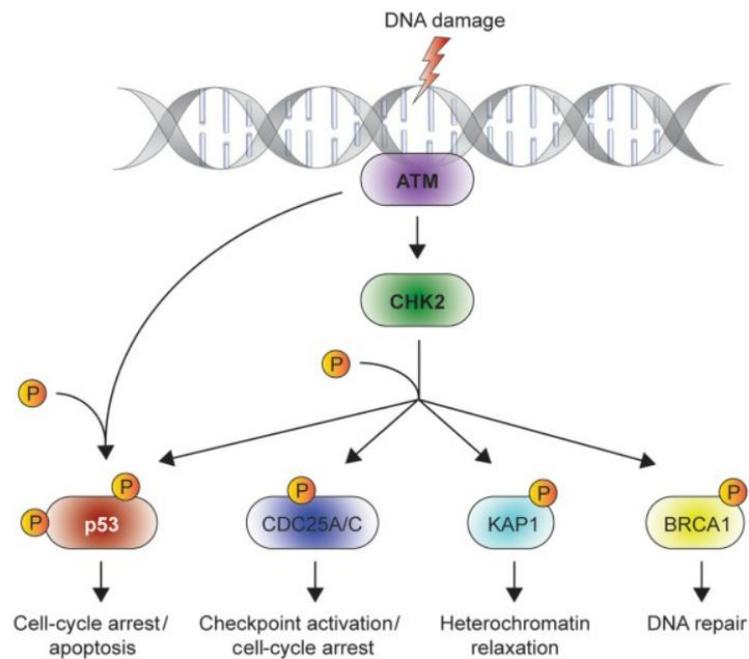


Figura 6: Mecanismos de reparación de ADN de *CHEK2* (52).

Pacientes portadores de alguna VP/VPP de tipo FS (cambio de marco de lectura o *Frameshift*) en *CHEK2* tienen un riesgo absoluto de sufrir cáncer de mama de hasta un 40%; por otra parte, las VP/VPP germinales en *CHEK2* son responsables del 2,5% de todos los casos de cánceres de mama en mujeres (55), y 4,1% de todos los cánceres de mama en hombres (56). Además del cáncer de mama, estos pacientes tienen un riesgo absoluto de hasta un 10% de sufrir cáncer de colorrectal (30).

A nivel más específico, las pacientes portadoras de la VP germinal *CHEK2* c.1100delC en heterocigosis poseen un riesgo acumulativo para desarrollar cáncer de mama RE positivo y RE negativo hasta los 80 años de 20% y 3%, respectivamente (57). Además, esta VP se ha asociado a una elevada tasa de cáncer de mama bilateral (58).

#### 6.3.5. *PALB2*

El gen *PALB2* (OMIM: 610355), localizado en el brazo pequeño del cromosoma 16 (16p12.2), compuesto por 13 exones, codifica una proteína de 1186 aa.

*PALB2* se une a *BRCA2* promoviendo su localización en estructuras nucleares claves y habilitando su función de reparación de ADN por recombinación, de ahí su nombre (*Partner and Localizer of BRCA2*). Además de reclutar *BRCA2*, también recluta *RAD51* llevándolo a sitios de ADN rotos para su consiguiente reparación (Figura 5). *PALB2*, no se une únicamente a *BRCA2* sino que se puede

unir también a *BRCA1*, y de la misma forma que *BRCA2*, recluta *RAD51* y activa los mecanismos de reparación de ADN por recombinación homóloga.

Los pacientes portadores de VP/VPP germinales en heterocigosis en *PALB2* tienen un aumento de riesgo de sufrir cáncer de mama de ovario y de páncreas, de tal forma que el riesgo absoluto es de un 60%, 5% y 10%, respectivamente (30). En España se estima que las VP/VPP germinales en *PALB2* son responsables del 1% de cáncer de mama y 4% de cáncer de páncreas (59).

#### 6.3.6. *PTEN* y síndrome de Cowden

El gen *PTEN* (OMIM: 601728), se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10 (10q23.31), codificando una proteína de 403 aa a partir de 9 exones codificantes.

El gen *PTEN* es considerado como un supresor tumoral, de tal forma que activa una fosforilasa que bloquea la vía de señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT/mTOR (Diana de la Rapamicina en los Mamíferos o *Mamalian Target of Rapamycin*) (60). Esta vía de señalización induce la proliferación celular no controlada, resistencia a la apoptosis celular, además de favorecer la angiogénesis y metástasis (61).

El síndrome de *Cowden* consiste en un grupo heterogéneo de trastornos autosómicos dominantes que afecta a paciente portadores de VP/VPP germinales en el gen *PTEN*. Es característico encontrar en este tipo de pacientes lesiones mucocutáneas de tipo fibromas orales y queratosis acras. Estos pacientes tienen elevada susceptibilidad de sufrir cáncer de mama, de colon, renal, tiroideo, endometrial y melanoma (13) (30). En estos pacientes el riesgo acumulado de tener un cáncer de mama hasta los 70 años es del orden del 81% (62). Por otra parte, el 34% de ellos desarrollarían un cáncer de mama multifocal y bilateral (62). En cuanto al resto de cánceres, el riesgo a lo largo de la vida de padecer cáncer es de hasta un 20% para cáncer de colon, un 34% para cáncer renal, un 35% para cáncer de tiroides, 28% para cáncer endometrial, y un 6% para melanoma (30).

#### 6.3.7. *STK11* y Síndrome de Peutz-Jeghers

El gen *STK11* (*Serine/Threonine Kinase 11*) conocido también como *LKB1* (*Liver Kinase B1*), (OMIM: 602216), es un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13.3), compuesto por 9 exones que codifican una proteína de 433 aa.

*STK11* codifica la proteína quinasa hepática B1, una serina/treonina quinasa que participa en varios procesos fisiológicos, incluida la regulación del metabolismo celular, la polaridad celular y la respuesta al daño del ADN. Actúa como agente antitumoral a través de múltiples mecanismos,

el más clásico, la inhibición de la vía de señalización mTOR mediada AMPK (Proteína Quinasa Activada por AMP o *AMP-Activated Protein Kinase*) (Figura 7).

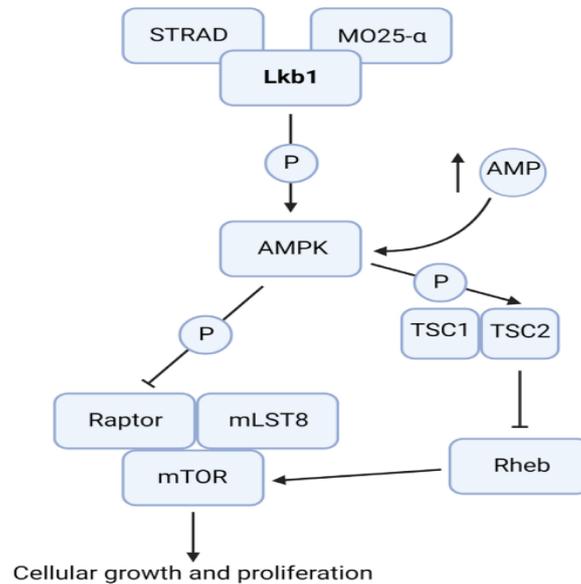


Figura 7: Inhibición de la vía mTOR mediada por LKB1 (63). LKB1 ensambla un heterotrímero con STRAD y MO25- $\alpha$ , lo que permite fosforilar AMPK, la fosforilación de AMPK inhibe la vía de mTOR a través de dos mecanismos: el directo fosforilando Raptor que a su vez inhibirá mTOR, el indirecto a través de la fosforilación de TSC2 que inhibirá Rheb un mediador que induce a la activación de mTOR (63). AMPK: Proteína Quinasa Activada por AMP o *AMP-Activated Protein Kinase*; P: fosforilación; Rheb: homólogo de Ras enriquecido en cerebro; TSC: complejo de esclerosis tuberosa.

El 90% de los pacientes con VP/VPP germinales en *STK11* padecen el síndrome de Peutz-Jeghers, que es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por pigmentación mucocutánea, pólipos en el tracto gastrointestinal, y desarrollo de varios tipos de cánceres, destacando cáncer del intestino delgado, colorrectal, gástrico, pancreático, cáncer de mama, testicular, y de los genitales femeninos (ovario no epitelial). Se ha estimado que el riesgo absoluto para sufrir un cáncer de mama siendo portador de una VP/VPP germinal en *STK11* varía entre 32%-54%, para el cáncer de páncreas >15%, para el cáncer colorrectal 39% y para cáncer de ovario no epitelial >10% (64) (30).

### 6.3.8. *NF1* y Neurofibromatosis tipo 1

El gen *NF1* (*NeuroFibromin 1*), (OMIM: 613113) localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q11.2), con sus 58 exones codifica una proteína de 2839 aa.

*NF1* es un agente antitumoral que codifica la proteína neurofibromina cuyo papel es inhibir la vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK, transformando el RAS-GTP (forma activa) a RAS GDP (forma

inactiva) (65); esa vía controla múltiples funciones celulares importantes tal como la proliferación, crecimiento y senescencia celular (66).

Pacientes con VP/VPP germinales en *NF1* desarrollan tumores en el sistema nervioso central y periférico, cerebro y en la mama. El riesgo acumulativo de sufrir cáncer de mama en mujeres portadoras de una VP/VPP germinal en *NF1* hasta los 50 años es de un 40%, no existiendo datos sugestivos de incremento de riesgo de sufrir cáncer de mama en mujeres de más de 50 años (30). En los hombres portadores de una VP/VPP germinal en *NF1* es extremadamente raro que desarrollen cáncer de mama, aunque últimamente se publicó un caso (65).

#### 6.3.9. *CDH1*

*CDH1* (OMIM: 192090), es un gen situado en el brazo largo del cromosoma 16 (16q22.1), compuesto por 16 exones que codifican una proteína de 882 aa.

La proteína *CDH1* o E-CADHERIN es una proteína compleja que tiene dos funciones:

- 1- Mantener la adhesión celular y mantener la morfología de las células epiteliales durante la embriogénesis y a lo largo de la vida. Lo hace a través de 2 dominios, el extracelular que es calcio dependiente que va a permitir la unión entre células en el espacio extracelular, y el dominio intracelular, que interacciona por un lado con la proteína p120-catenina y por otro lado con la beta-catenina actuando de puente para la unión con la actina, con la finalidad de mantener la integridad de la estructura de las células epiteliales (**Figura 8**).

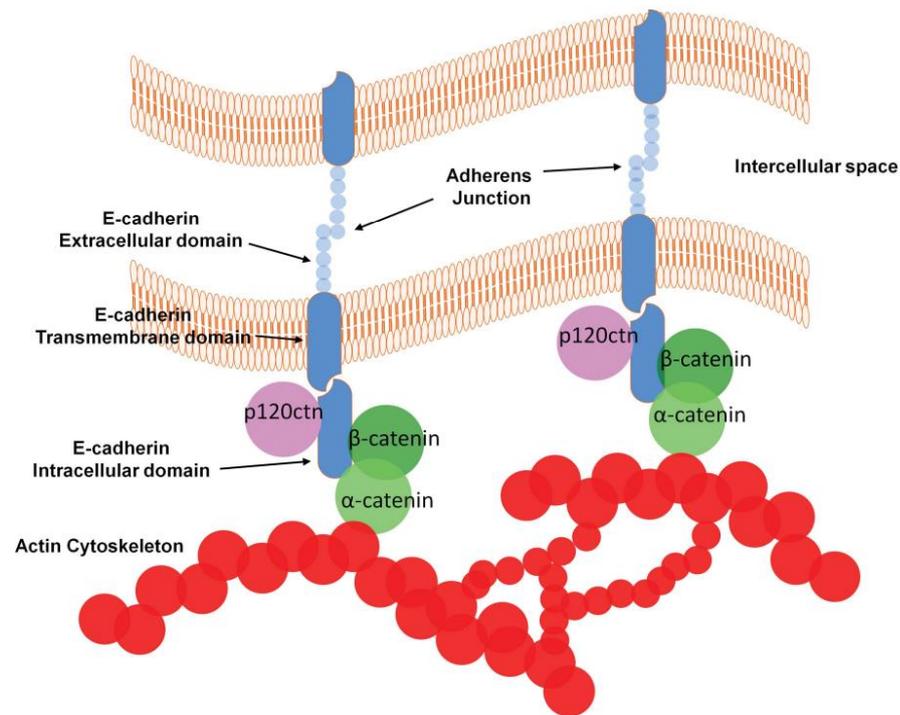


Figura 8: Papel de la E-cadherina en la adhesión celular (67). El dominio extracelular que favorece la unión entre distintas células epiteliales, y el dominio intracelular que a través de su unión con p120-catenina, beta-catenina y alfa catenina se unirá a la actina citoesquelética para mantener con fuerza la integridad de la estructura de las células epiteliales.

- 2- Regular la vía de señalización Wnt/beta-catenina de tal forma que *CDH1* es un potente inhibidor de esta vía cuyo resultado final es la activación de oncogén c-Myc que induce una proliferación celular descontrolada, crecimiento celular acelerado y activación de lo que se llama la transición epitelio-mesénquima, proceso en el cual las células epiteliales pierden su integridad y capacidad de adhesión y ganan capacidad migratoria de esa forma promueve la metástasis celular (Figura 9).

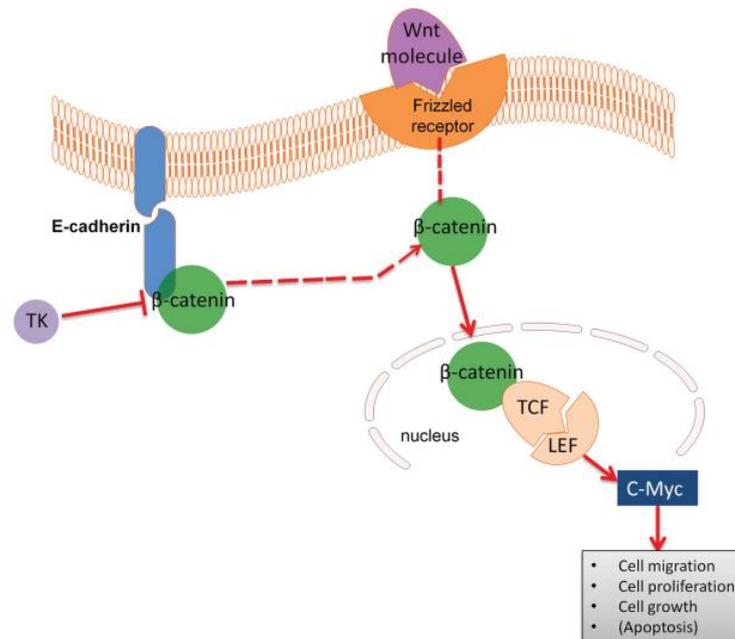


Figura 9: Papel de E-cadherina en regulación de señalización Wnt/beta-catenina (67). La TK (Tirosina quinasa) al fosforilar el complejo E-cadherina/beta-catenina se produce la liberación de la beta-catenina en el citoplasma para contrarrestar el efecto de la vía Wnt/beta-catenina que implica la entrada de la beta-catenina en el núcleo de la célula que activará el TCF (*T-Cell Factor*) que activará a su vez el LEF (*Lymphoid Enhancer Factor*) e inducirá la expresión del protooncogén C-Myc.

Pacientes portadores de VP/VPP germinales en *CDH1* desarrollan cáncer de mama invasivo lobulillar en más de 90% de los casos (67), y cáncer gástrico difuso hereditario. El riesgo acumulativo a lo largo de la vida para desarrollar carcinoma lobulillar invasivo en mujeres portadoras de VP/VPP germinal en *CDH1* es de 39% (68). Por otra parte, 50% de pacientes con cáncer gástrico difuso hereditario son portadores de una VP/VPP germinal en *CDH1*, el riesgo acumulativo a los 80 años de sufrir cáncer gástrico difuso hereditario es de 67% en varones y 83% en mujeres (69), además estos pacientes tienen menor tasa de supervivencia y mayores tasa de metástasis (67).

#### 6.4. Otros genes relacionados con el SCMOH

##### 6.4.1. *RAD51C* (*RAD51 paralog C*) y *RAD51D* (*RAD51 paralog D*)

El gen *RAD51C* (OMIM: 602774) localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q22), está formado por 9 exones que codifican una proteína de 376 aa. El gen *RAD51D*, localizado también en el cromosoma 17 pero en un loci distinto (17q12), está compuesto por 10 exones que codifican una proteína de 328 aa.

*RAD51C* y *RAD51D* participan en el mecanismo de reparación de DSB por recombinación homóloga, ya que al ser reclutados por *BRCA1/2*, *PALB2* y *BARD1*, favorecen el desplazamiento de la proteína *RPA* (*Replication Protein A*) para formar un filamento de nucleoproteína *RAD51* que invade la monohebra de ADN formando una horquilla de replicación.

Pacientes con VP/VPP germinales en los genes *RAD51C* y *RAD51D* tienen un aumento de riesgo de sufrir cáncer de mama y ovario. El riesgo absoluto para ambos genes es similar, siendo un 40% como máximo para el cáncer de mama y alrededor de un 15% para el cáncer de ovario (30).

#### 6.4.2. *PMS2*

El gen *PMS2* (OMIM: 600259), se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 (7p22.1), codifica una proteína de 862 aa a partir de sus 15 exones.

El gen *PMS2* es un gen que participa en el mecanismo de reparación del desajuste. Forma el heterodímero MutL-alfa al unirse a *MLH1*. Este heterodímero tiene actividad endonucleolítica para quitar el ADN mal apareado una vez detectado (70).

Las VP/VPP germinales en el gen *PMS2* no solo se han asociado al síndrome de Lynch, sino también al SCMOH, ya que se ha visto que el hallazgo de VP/VPP en este gen se ha asociado con un aumento de riesgo de sufrir cáncer de mama con un riesgo acumulado a los 70 años de 8,6% (71).

## 7. CÁNCER DE MAMA EN EL VARÓN

El cáncer de mama en los hombres es muy infrecuente, contabilizando <1% de los cánceres que afectan a los hombres (13). Se sabe que los genes *BRCA1/2* son los más prevalentes en el cáncer de mama en los hombres con historias familiares de SCMOH, ya que el 76% se deben a VP/VPP germinales en *BRCA2*, y el 16% en *BRCA1* (41). El gen *CHEK2* es el causante de 4,1% de los cánceres de mama en hombres. Otros genes podrían estar involucrados, pero hasta el día de hoy, existe poca evidencia debido a los pocos casos de cáncer de mama en varones. Estos genes son: *PALB2*, *ATM*, *RAD51C*, *RAD51D*, *TP53*, *CDH1* y *PTEN* (72).

Por otro lado, se ha visto que en los pacientes portadores de VP/VPP germinales en *BRCA1/2* el riesgo acumulado de sufrir cáncer de mama a lo largo de la vida es de 1-2% y 5-10%, respectivamente (13). La mayoría de los casos de cánceres de mama invasivos suelen ser NST, y el 90% de los casos son RE+ y RP+ mientras con los TN y HER2+ son raros (13).

Se ha visto también que los cánceres de mama *BRCA2* en hombres son más agresivos en línea general que los *BRCA1*, a diferencia de las mujeres, en donde los tumores *BRCA1* suelen ser más agresivos.

## 8. SUSCEPTIBILIDAD POLIGÉNICA EN CÁNCER DE MAMA Y OVARIO

No todos los cánceres de mama y ovario hereditarios se justifican por VP/VPP germinales en los genes de alta o moderada penetrancia, si no que una parte importante de la predisposición hereditaria de estos cánceres, se debe a lo que se conoce como el modelo de susceptibilidad poligénica al cáncer de mama y ovario. Consiste en la suma de riesgos relativos de varias variantes de muy bajo riesgo, pero con alta frecuencia en la población, de tal forma que la suma de estas variantes puede desencadenar un proceso tumoral. El modelo GWAS permitió identificar estas variantes que suelen ser de tipo SNV (Variante de un Solo Nucleótido o *Single Nucleotide Variant*). El riesgo genético conferido por el conjunto de estas variantes para desencadenar cáncer de mama u ovario se calcula mediante lo que se conoce como PRS (*Score de Riesgo poligénico o Polygenic Risk Score*), que nos permite determinar el nivel de susceptibilidad poligénica en cada individuo y estimar el riesgo individual de cada persona en el desarrollo del cáncer considerando el resto de factores de riesgo genéticos y no genéticos.

Para ello, se creó 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 nos permite calcular el PRS en base al componente poligénico (que incorpora 313 SNVs para el cáncer de mama y 36 SNVs para el cáncer de ovario), y los factores de riesgo genéticos y no genéticos que engloban: antecedentes personales y familiares, estilo de vida, datos epidemiológicos y demográficos, densidad mamaria, antecedentes de endometriosis, perfil hormonal, perfil fenotípico de tumor y alguna VP/VPP en genes relacionados con cáncer de mama y ovario (*BRCA1/2, ATM, CHEK2, PALB2, RAD51C/D y BRIP1*). Este modelo ha permitido saber un 20% más sobre la heredabilidad del cáncer de mama y un 5 % más sobre la heredabilidad del cáncer de ovario epitelial (**Figura 10**) (73) (74).

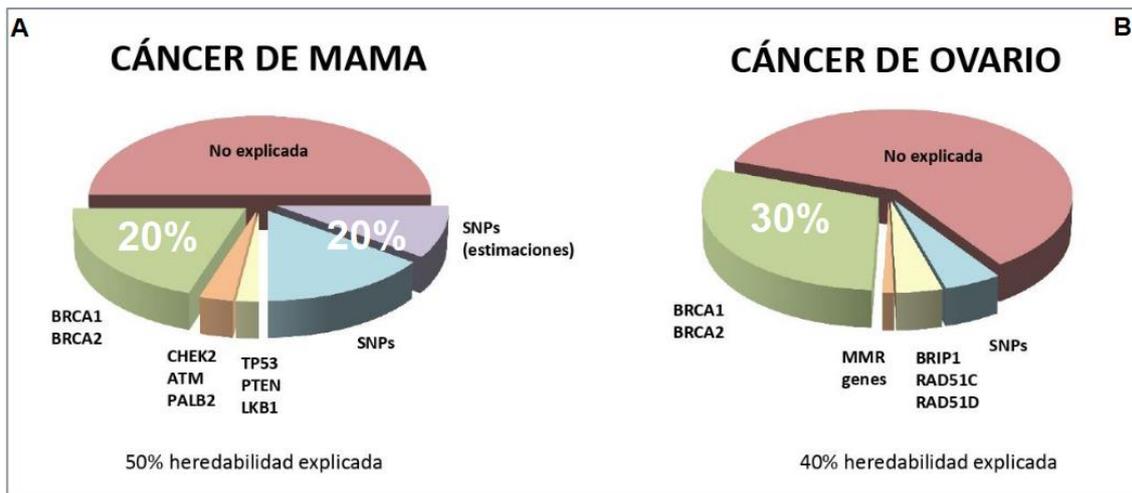


Figura 10: Estimación de la heredabilidad del cáncer de mama y ovario. Modificado de *Bahcall et al* (75). A) La suma de la contribución de los SNVs ya caracterizados (en azul) y los pendientes de determinar (en morado) iguala la contribución de los genes de alta penetrancia *BRCA1/2* en el desarrollo del cáncer de mama (aproximadamente 20% en ambos casos). B) La contribución de los Genes *BRCA1/2* en el cáncer de ovario es superior a la del cáncer de mama, sin embargo, en este caso, los SNVs aportan una contribución mínima (5%) a la heredabilidad del cáncer de ovario a diferencia del cáncer de mama. Probablemente esto se deba a que los estudios GWAS hechos en el cáncer de ovario no han alcanzado la suficiente potencia estadística.

## 9. CLASIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES

Una vez realizado el estudio genético, hay que clasificar las variantes obtenidas del mismo. Existen dos tipos de clasificaciones, la clasificación molecular que se basa en los cambios que ha sufrido el ADN (tipo de variante genética) y los consecuentes cambios en la proteína resultante. La clasificación clínica se basa en el grado de patogenicidad e implicación de la variante en el desarrollo de la enfermedad; ambas son necesarias para poder elaborar un informe y ofrecer el asesoramiento clínico más adecuado.

### 9.1. La clasificación molecular

El tipo de variante genética que sufre el ADN y su localización nos puede proporcionar información importante para poder interpretar el significado de la variante obtenida. A nivel molecular podemos distinguir variantes que se dan en la región exónica y otras en la región intrónica.

#### 9.1.1. Variantes en región exónica

Son variantes que se dan en los exones del gen, en las cuales puede estar involucrado uno o varios nucleótidos o incluso exones enteros. La **Figura 11** describe las mutaciones más frecuentes que se dan a nivel exónico.

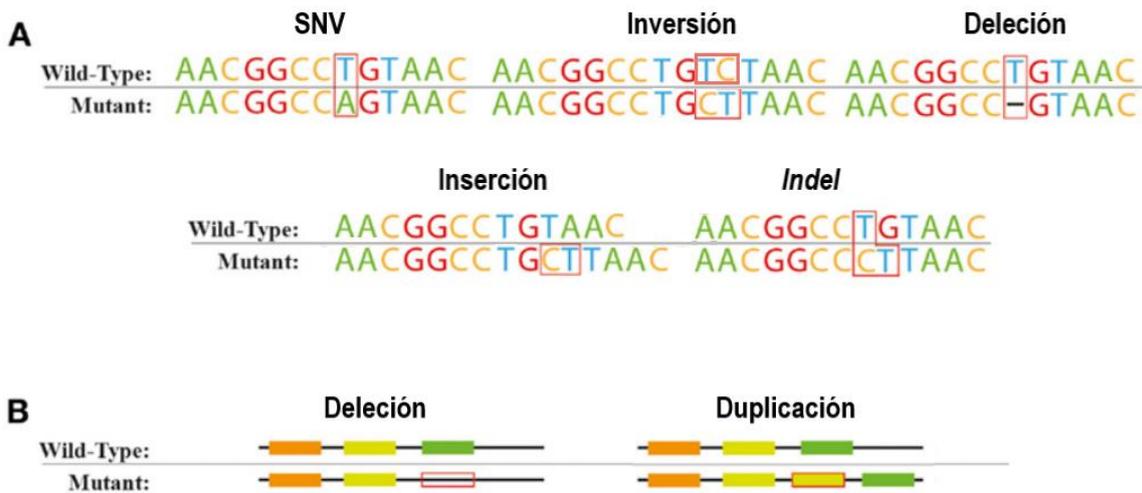


Figura 11: Tipos de variantes exónicas más frecuentes que puede sufrir el ADN. Modificado de *Cardoso et al* (76). A) SNV: una SNV es cuando se cambia un nucleótido por otro, hecho que puede dar lugar a distintas situaciones: variantes sinónimas: el aa generado es igual que el original; variante MS: el aa obtenido es distinto al inicial; variante NS: el aa original es cambiado por un codón de parada. Inversión: cuando una secuencia de nucleótidos cambia de sentido en la misma hebra de ADN. Delección: cuando se pierde un nucleótido o una secuencia de nucleótidos. Inserción: cuando se añade un nucleótido o un par de nucleótidos distintos a los que los precede, cuando el nucleótido o el par de nucleótidos añadidos son similares a los que los precede en estos casos se trata de una duplicación. *Indel*: cuando se produce una inserción y una delección a la vez. B) Son los RG más frecuentes (delección o duplicación de uno o varios exones).

En general, las inserciones o las delecciones, en las cuales el número de nucleótidos agregados o eliminados son distintos a múltiplos de tres, generan a nivel proteico variantes de tipo FS. Sin embargo, cuando los nucleótidos insertados o perdidos son iguales a múltiplos de tres en este caso la variante es de tipo IF. Las variantes de tipo FS y NS (sin sentido o *Nonsense*) producen una proteína truncada, por lo cual suelen ser patogénicas. Algunas variantes son más impredecibles en cuanto a su patogenicidad, como por ejemplo las variantes tipo MS.

### 9.1.2. Variantes espliceogénicas o intrónicas

Para entender lo que es una variante espliceogénica o intrónica o también conocida como variante de tipo *splicing*, en primer lugar, hay que entender cómo funciona el proceso de *splicing*. La **Figura 12** detalla el proceso de *splicing*.

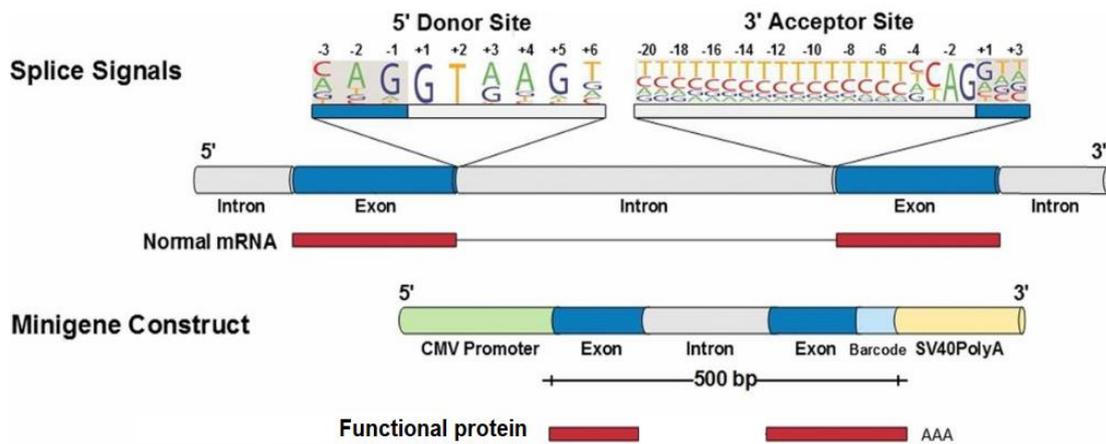


Figura 12: Proceso de *splicing*. Modifica de Ito et al (77). El *splicing* es un proceso que sufre el ARN mensajero para su maduración. Consiste en eliminar los intrones (secuencia de ADN no codificante) y pegar los exones (secuencia de ADN codificante), se lleva a cabo mediante el espliceosoma que es un complejo proteico que reconoce unas secuencias específicas del ARN mensajero que suelen encontrarse en los extremos 5' (sitios dadores) y 3' (sitios aceptores) de los intrones. Una vez esas secuencias detectadas por el espliceosoma se produce la eliminación de los intrones y el empalme de los exones que los flanquean para fabricar el ARN mensajero maduro o transcrito final que se traducirá en una proteína funcional.

Por lo cual, las variantes tipo *splicing*, son mutaciones que se producen en las secuencias específicas del ARN mensajero que se encuentran en los extremos 5' y 3' de los intrones, lo que hace que el espliceosoma no pueda reconocer a esas secuencias y no se pueda llevar a cabo de forma correcta el proceso de corte y empalme. Sin embargo, este concepto se debe de interpretar con cautela, ya que existen variantes de tipo MS o incluso variantes sinónimas que al estar localizadas en uno de los extremos del exón pueden producir una alteración del *splicing*, dando lugar a transcritos aberrantes y proteínas truncadas. La **Figura 13** esquematiza las distintas situaciones que pueden causar las variantes de tipo *splicing*.

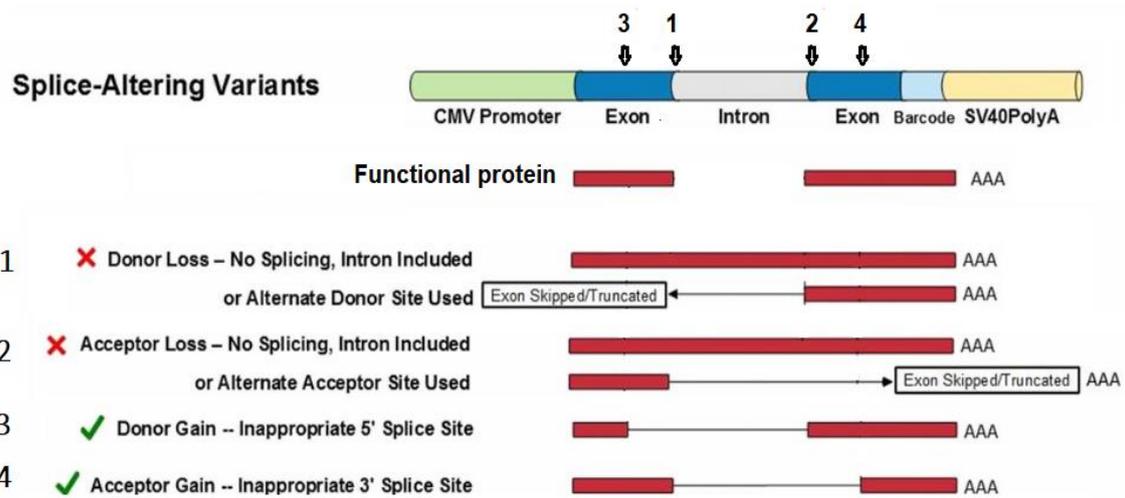


Figura 13: Distintas situaciones de alteración de *Splicing*. Modificado de Ito et al (77). 1) y 2) El *splicing* se da en un sitio dador o aceptor alterando el proceso de *splicing* haciendo que se produzcan dos situaciones: la primera en la cual se traducen tanto los exones como los intrones, la segunda en la cual se produce la delección parcial o completa de exones. 3) y 4) En este caso se produce una mutación que genera una nueva señal de iniciación de *splicing* en el sitio dador o aceptor, producen eliminaciones parciales de los exones donde se localizan.

## 9.2. Clasificación clínica

La clasificación clínica se basa en el grado de patogenicidad de la variante y su implicación en el desarrollo de la enfermedad.

Debido a la falta de estandarización en la clasificación clínica de las variantes obtenidas de los estudios genéticos, en el año 2013 Lindor y colaboradores (78) desarrollaron un modelo de clasificación de variantes que se muestra en la **Tabla 6**, y en el año 2015, el ACMG (Colegio Americano de genética Medica y Genómica o *American College of Medical genetics and Genomics*) junto con la AMP (Asociación de Patología Molecular) y el CAP (Colegio de Patólogos Americanos) establecieron una guía consenso para la clasificación clínica de las variantes en base a varios criterios de patogenicidad (**Tabla 7**) y de benignidad (**Tabla 8**). Las combinación de todos estos criterios permitiría la clasificación de la variante según el modelo de Lindor y colaboradores (**Tabla 9**) (79).

Definición cualitativa	Probabilidad de patogenicidad	Pruebas genéticas	Recomendaciones clínicas
VP	> 0,99	Test genético predictivo en familiares	Seguimiento y/o profilaxis a individuos de alto riesgo
VPP	0,95-0,99	Test genético predictivo en familiares	Seguimiento y/o profilaxis a individuos de alto riesgo
VUS (Variante de Significado clínico Incierto)	0,05-0,949	No realizar estudios predictivos en familiares	Asesoramiento en base a los antecedentes familiares y a otros factores de riesgo
VPB (Variante Probablemente Benigna)	0,001-0,049	No realizar estudios predictivos en familiares	Asesoramiento en base a los antecedentes familiares y a otros factores de riesgo
VB (Variante Benigna)	< 0,001	No realizar estudios predictivos en familiares.	Asesoramiento en base a los antecedentes familiares y a otros factores de riesgo

Tabla 6: Clasificación clínicas de las variantes genéticas. Modificada de *Lindor y Colaboradores (78)*.

Evidencia	Categoría
<b>Muy fuerte</b>	<p>PVS1: variante nula (sin sentido, con alteración del marco de lectura, se alteran <math>\pm 1</math> sitios de <i>splicing</i>, codón de inicio, delección 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"> <li>- Atención a los genes en los que la pérdida de función no es un mecanismo conocido de enfermedad.</li> <li>- Precaución a la hora de interpretar las variantes con pérdida de función en el extremo 3' o al final del gen.</li> <li>- Atención en las variantes de <i>splicing</i> que predicen la pérdida de un exón pero que dejan intacta el resto de la proteína.</li> <li>- Precaución cuando haya presencia de múltiples transcritos.</li> </ul>
<b>Fuerte</b>	<p>PS1: El mismo cambio de aa ha sido establecido como VP 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>
<b>Moderado</b>	<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/delecciones 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 VP.</p> <p>PM4: la longitud de la proteína cambia como resultado de inserción/delección en zonas no repetidas o por variantes con pérdida del codón de parada.</p> <p>PM5: Nueva variante de tipo MS en el mismo residuo donde un cambio MS 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>
<b>Secundario</b>	<p>PP1: Co-segregación de la variante con la enfermedad en varios familiares afectados en un gen relacionado con la enfermedad.</p> <p>PP2: Variante MS en un gen con una baja tasa de variantes MS benignas y en el que las variantes tipo MS 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 son altamente específicos 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 7: Criterios de grados de patogenicidad para clasificar las variantes genéticas (79).

Evidencia	Categoría
<b>Independiente</b>	BA1: La frecuencia alélica es >5% en el proyecto 1000 genomas, <i>Exome Sequencing Project</i> o en el <i>Exome Aggregation Consortium</i> .
<b>Fuerte</b>	BS1: La frecuencia alélica es mayor que la esperada para dicha enfermedad.
	BS2: Se ha observado en adultos sanos para enfermedades recesivas (en homocigosis), dominantes (en heterocigosis) o ligadas al cromosoma X (en hemocigosis) para las que se espera una penetrancia completa temprana.
	BS3: Estudios funcionales in vitro o in vivo muestran que no se produce un efecto dañino en la función de la proteína o <i>splicing</i> .
	BS4: Ausencia de segregación en miembros afectados de una familia. 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 VP que contribuyan a una enfermedad de herencia autosómica dominante, lo que también puede confundir sobre una aparente ausencia de segregación.
<b>Secundario</b>	BP1: Variante MS en un gen en el que las variantes truncadas son las que principalmente causan enfermedad.
	BP2: Se observa en <i>trans</i> con una VP en una enfermedad dominante de penetrancia completa o se observa en <i>cis</i> con una VP en una enfermedad con cualquier tipo de herencia.
	BP3: Inserciones/delecciones en regiones repetitivas sin función conocida.
	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....)
	BP5: Variante hallada en un individuo con base molecular alternativa para la enfermedad.
	BP6: Fuentes de confianza clasifican la variante como benigna, pero no hay evidencia disponible para realizar una evaluación independiente.
	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.

Tabla 8: Criterios de benignidad para clasificar las variantes genéticas (79).

<b>VP</b>	(i) Muy fuerte (PVS1) y a) $\geq 1$ Fuerte (PS1-PS4) o b) 2 Moderados (PM1-PM6) o c) 1 Moderado (PM1-PM6) y un Secundario (PP1-PP5) o d) $\geq 2$ Secundarios (PP1-PP5) (ii) $\geq 2$ Fuertes (PS1-PS4) o (iii) 1 Fuerte (PS1-PS4) y a) $\geq 3$ Moderados (PM1-PM6) o b) 2 Moderados (PM1-PM6) y $\geq 2$ Secundarios o c) 1 Moderado (PM1-PM6) y $\geq 4$ Secundarios
<b>VPP</b>	(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 $\geq 2$ Secundarios (PP1-PP5) o (iv) $\geq 3$ Moderados (PM1-PM6) o (v) 2 Moderados (PM1-PM6) y $\geq 2$ Secundarios (PP1-PP5) (vi) 1 Moderado (PM1-PM6) y $\geq 4$ Secundarios (PP1-PP5)
<b>VB</b>	(i) 1 Independiente (BA1) o (ii) $\geq 2$ Fuertes (BS1-BS4)
<b>VPB</b>	(i) 1 Fuerte (BS1-BS4) y 1 Secundario (BP1-BP7) o (ii) $\geq$ Secundarios (BP1-BP7)
<b>VUS</b>	(i) No se cumplen los criterios mencionados anteriormente (ii) Los criterios de benignidad y patogenicidad son contradictorios

Tabla 9: Reglas de combinación de criterios para clasificar las variantes genéticas obtenidas (79). VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; VB: Variante Benigna; VPB: Variante Probablemente Benigna; VUS: Variante de Significado clínico Incierto.

### 9.2.1. Variante de significado clínico desconocido o incierto

Las VUS (*Variant of Uncertain Significance*), son variantes cuya implicación clínica en el desarrollo de la enfermedad no está del todo establecida, siendo un reto para los laboratorios de genética, ya que no solo su detección en la mayoría de los casos es inevitable, si no que generan un grado de incertidumbre diagnóstico y complicaciones en el asesoramiento genético. Además, la introducción de la NGS en los laboratorios ha hecho que los hallazgos de VUS hayan incrementado de forma exponencial, pudiendo alcanzar el 41,7% de las variantes encontradas en un estudio, sobre todo si trata de incorporar nuevos genes en un síndrome hereditario (80). Sin embargo, este porcentaje baja a lo largo de los años gracias a los datos acumulados sobre los genes estudiados y las VUS halladas, por ejemplo en el caso de *BRCA1/2*, que son genes que llevan más de 20 años de estudio, se estima que el porcentaje de las VUS que se pueden encontrar en un estudio varía desde un 2% hasta un 5% (80). Por otra parte, los hallazgos de VUS comprometen al laboratorio de genómica en un seguimiento continuo de estas VUS mediante revaluaciones periódicas, ya que esas variantes pueden ser reclasificadas como benignas o patogénicas. En líneas generales, el porcentaje de las VUS que se reclasifican como VB/VPB es mucho más considerable que el porcentaje de VUS reclasificadas como patogénicas (81). Las variantes VUS reclasificadas como benignas no suponen ningún cambio de actitud en el manejo de los pacientes ni tampoco un seguimiento adicional, mientras que las VUS reclasificadas como patogénicas implicarían un cambio de actitud radical en el manejo de los pacientes e incluso la selección de los familiares, con potenciales cirugías profilácticas. De ahí surgió el concepto de las VUS priorizadas que son aquellas VUS con una mayor sospecha a ser reclasificadas como patogénicas. Para ello se elaboraron varios algoritmos que permitieron destacar las VUS priorizadas de las no priorizadas que mejoraron y evolucionaron con el tiempo, el primero publicado fue de *Gabaldó-Barrios et al* (82), seguido de *Sánchez-Bermúdez et al* (83), luego en el año 2019 se publicó el algoritmo de *Castillo-Guardiola et al* (84) basado en el algoritmo de *Bonache et al* (85), y el último publicado en el año 2022 fue el de *Rosado-Jiménez et al* (86). Dichos algoritmos se basan principalmente en herramientas bioinformáticas, bases de datos, frecuencia alélica y la bibliografía disponible sobre cada variante, entre otros.

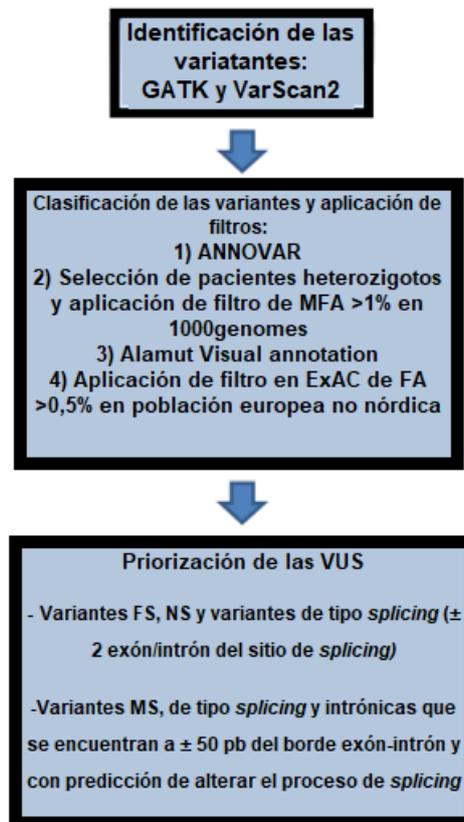


Figura 14: Ejemplo del algoritmo de clasificación de VUS de *Bonache et al* (85). MFA: Mínima Frecuencia Alélica; FA: Frecuencia Alélica; FS: *Frameshift*; NS: *Nonsense*; MS: *Missense*; pb: Pares de Bases.

### 9.2.2. Variantes con efecto fundador

El efecto fundador consiste en la pérdida de variación genética cuando se forma una nueva población a partir de un número pequeño de individuos que no son genéticamente representativos de la población de la que proceden (87). Como consecuencia puede cambiar la frecuencia mutacional de un gen de riesgo entre las distintas poblaciones siendo superior en una población con efecto fundador que en la población general. Cabe destacar que es posible encontrar una misma mutación fundadora en distintas localizaciones geográficas, hecho que se explica por eventos migratorios de parte de la población. Las mutaciones fundadoras se demuestran mediante la detección de un haplotipo común en todos los portadores de dicha mutación, usando marcadores genéticos tan cercanos a la mutación de tal forma que no puedan sufrir recombinación meiótica y alejarse de la mutación en estudio. Los microsatélites son marcadores genéticos muy empleados para este tipo de estudio.

## 10. RECURSOS DISPONIBLES PARA CLASIFICAR LAS VARIANTES

Las bases de datos clínicas y moleculares forman una parte fundamental en la caracterización de las variantes desde el punto de vista molecular y clínico. Sin embargo, existen otras herramientas

que contribuyen en la clasificación de las variantes como los programas predictivos *in silico*, frecuencia alélica de las variantes, estudios funcionales, estudio de co-ocurrencia, o estudios de cosegregación. Estas herramientas junto con la guía de consenso para la clasificación clínica de las variantes de la ACMG (citada en el apartado 9.2) nos permiten categorizar las variantes según la clasificación de *Lindor y colaboradores*.

### 10.1. Bases de datos clínicas y moleculares

Existen varias bases de datos que recogen información necesaria para clasificar o ayudar a clasificar las variantes desde punto de vista molecular y clínico. Entre estas bases de datos destacamos: ClinVar y dbSNP (base de datos de Polimorfismo de un Solo nucleótido o *data base of Single Nucleotide Polymorphism*), LitVar y Gene del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica o *National Center for Biotechnology Information*), HGMD (Base de Datos de Mutaciones Genéticas Humanas o *Human Gen Mutation Database*), Varsome, y Ensembl, entre otras.

- NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>): forma parte integrante de la librería nacional de medicina NLM (*National Library of Medicine*) del instituto nacional de salud NIH (*National Institutes of Health*) de los Estados Unidos. La NCBI es una fuente líder a nivel mundial de bases de datos bioinformática, es de acceso libre, integra y mantiene más de 40 bases de datos médicas que suministran la información necesaria para el trabajo diario de los laboratorios de genética y biología molecular. Destacamos: Gene, ClinVar, dbSNP, LitVar, entre otros.
  - o Gene: nos permite obtener información completa sobre el gen estudiado como la localización cromosómica, mecanismos fisiopatológicos en el cual está involucrado entre otras informaciones. Además, nos permite descargar *RefSeq* (transcrito de referencia) en formato *FASTA* (*Fast Alignment Sequence Test for Application*) o *Genbank*.
  - o ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Clinvar/>): nos proporciona la información genotipo-fenotipo de las variantes, además la clasificación clínica siempre viene respaldada con evidencia científica. Nos facilita también información molecular sobre las variantes como puede ser, posición del codificante con el cambio producido según HGVS (Sociedad de Variación del Genoma Humano o *Human Genome Variation Society*), tipo de mutación, el cambio proteico producido según nomenclatura HGVS.

- dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>): fundadora del número de identificación de variantes (*reference SNP o rs*), que es un código único que se asigna a cada una de las variantes registradas en esta base de datos, con el fin de facilitar y estandarizar la búsqueda de las variantes independientemente de las diferentes nomenclaturas con las cuales se puede identificar una misma variante, aunque no todas las bases de datos permiten la búsqueda con el rs, las más utilizadas sí que lo permiten como ClinVar, Varsome, LitVar y Ensembl. Por otra parte, la base de datos dbSNP nos facilita la información relacionada con variantes de tipo SNV, pequeñas deleciones o inserciones y microsatélites. La información proporcionada consiste en: la frecuencia de las variantes en distintas poblaciones, mapeo genómico de las variantes y la secuencia de referencia de los genes.
- LitVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/litvar2/>): nos permite obtener todos los artículos científicos relacionados con la variante en cuestión. Todos los artículos científicos disponibles en esta base de datos son extraídos de forma continua y regular (cada mes) de la base de datos *Pubmed*, con una ventaja que la desmarca de *Pubmed*, es que lleva un motor de búsqueda especializado que recoge toda la bibliografía relacionada con la variante independientemente de la forma por la cual se busca (transcrito, cambio proteico, rs, gene, variante, etc.). Así se evita la posible ambigüedad que puede causar el nombrar a una misma variante de distintas formas.
- Varsome (<https://varsome.com/>): es una potente herramienta bioinformática que incluye información de más de 140 bases de datos externas y que permite la búsqueda de cualquier variante génica mediante nomenclatura HGVS de la variante sea genómica o proteica, el nombre del gen, localización genómica de la variante o mediante el identificador rs. La información proporcionada para cada variante buscada es muy completa, esta información abarca lo siguiente:
  - información general sobre la variante: incluye información que nos permite clasificar la variante desde el punto de vista molecular como puede ser: posición del codificante con el cambio producido según HGVS, tipo de mutación, transcrito de referencia, cambio proteico producido. Además de esta información, nos proporciona otra información de interés tal como: identificador rs, localización cromosómica de la variante y frecuencia de la variante.

- Significado clínico de la variante según ACMG: Varsome incorpora un clasificador automático de las variantes según ACMG que nos categoriza las variantes como VP, VPP, VUS, VPB, VB. Además, contrasta esa información con la clasificación proporcionada por ClinVar.
- Predictores *in silico*: Varsome incorpora los “*Pathogenicity Scores*” que recopilan todas las interpretaciones y resultados de los predictores individuales *in silico* y los metapredictores que lleva incorporados en su plataforma, lo que nos permite evaluar la variante en cuestión, de forma más rápida y cómoda. En cuanto a los predictores incorporados se dividen en dos grupos:
  - los predictores individuales: Incluye los que predicen el impacto de las variantes MS sobre la proteína como: *FATHMM (Functional Analysis Through Hidden Markov Models)*, *MutationTaster*, *Align-GVGD (Alignment Grantham Variation and Grantham Deviation)*, *PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping v2)*, *SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)* y otros más.
  - Metapredictores: Incluye *BayesDel*, *MetaLR (Learning Regression)*, *MetaRNN (Reccurent Neural Network)*, *MetaSVM (Support Vector Machine)* y *REVEL (Rare Exome Variant Ensemble Learner)*, entre otros.
- HGMD (<https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>): (Human Gene Mutation Database) es una plataforma que recoge todas las publicaciones relacionadas con las variantes genéticas publicadas y relacionadas con enfermedades hereditarias. La versión profesional de pago acumula un total de 352.731 variantes de todo tipo destacando: MS, NS, *splicing*, pequeñas deleciones e inserciones, pequeñas ‘*Indel*’ y expansiones de repeticiones. La base de datos HGMD tiene la gran ventaja de ofrecer información que nos permite clasificar clínicamente los grandes RG.
- Ensembl: una base de datos que nos permite tener acceso al genoma humano, nos facilita información valiosa como los transcritos de referencia de cada gen (*MANE SELECT* transcrito de referencia compartido entre NCBI, Gene y Ensembl), luego para cada transcrito delimita los exones de los intrones, informa de la localización cromosómica de cada exón, da acceso a la secuencia de aa formados por cada exón, y clasifica las variantes desde el punto de vista clínico y molecular, entre otras numerosas funciones.

## 10.2. Programas predictivos o predictores *in silico*

Ayudan a predecir la patogenicidad de una variante, o sirven de apoyo para la interpretación o priorización de VUS, formando parte integrante de algunas bases de datos, como por ejemplo Varsome. Se dividen en dos grupos:

- Predictores de impacto: sirven para conocer el impacto que tienen las variantes MS sobre la proteína. A su vez se dividen en dos grupos:
  - o Los predictores individuales destacamos: *MutationTaster*, *Align-GVGD*, *PolyPhen2* y *SIFT* entre otros. Aunque cada predictor tiene un algoritmo propio todos se basan en mayor o menor medida en los siguientes criterios para predecir la patogenicidad de la variante sobre la proteína resultante:
    - La ubicación de la variante:
      - Si la variante MS afecta a una secuencia de ADN que codifica un dominio funcional que es primordial para el funcionamiento de la proteína, existe una elevada probabilidad de que esta variante sea patogénica.
      - Si la variante existe en un *hot spot*, zona de la secuencia de ADN en la cual las mutaciones son frecuentes, existe una elevada probabilidad de que sea patogénica.
      - Si la variante se encuentra en el mismo codón que otra variante ya conocida como patogénica, la probabilidad de que esta variante sea patogénica es alta.
    - Grado de conservación: si la mutación está en una zona altamente conservada a lo largo de la evolución, la probabilidad de ser patológica es elevada.
    - El tipo de mutación: si se trata de un SNV que da lugar a una mutación sinónima, la probabilidad de que la variante sea patogénica es baja (a menos que se localice en una zona de *splicing*), si el SNV da lugar a un cambio de aa con características fisicoquímicas distintas al original la probabilidad de patogenicidad es más alta.

- Metapredictores: Se desarrollaron a raíz de estudios que demostraron que el uso de un solo predictor podría falsear la interpretación clínica de una variante. Estos estudios comprobaron que una misma variante ya categorizada y bien conocida puede tener distintas interpretaciones clínicas según el predictor individual empleado (88), (89), y llegaron a la conclusión de que el uso de un solo predictor para orientar la clasificación clínica de una variante MS no sería el enfoque ideal. De ahí, el concepto de los metapredictores que consisten en la combinación de varios predictores individuales, los cuales mediante el empleo de algoritmos obtienen un *score* máximo y un *score* mínimo a partir del cual, si una variante supera el *score* máximo significa que esa variante tiene más probabilidad de ser patogénica que de ser benigna, y si la variante está por debajo del *score* mínimo, la probabilidad de ser benigna es mayor. Si la variante tiene un valor entre el *score* máximo y el mínimo se interpretaría como VUS. Este enfoque ha demostrado un rendimiento superior a la hora de analizar las variantes MS (88). Existen varios metapredictores: *BayesDel*, *MetaLR*, *MetaRNN*, *MetaSVM* y *REVEL* entre otros. Un estudio llevado a cabo por *Tian et al* (90) llegó a la conclusión de que los metapredictores con mayor rendimiento, tras compararlos con otros tres metapredictores, que son *CADD* (*Combined Annotation Dependent Depletion*), *MetaSVM* y *Eigen*, fueron el *REVEL* y *BayesDel* (aunque la diferencia entre ambos no fue significativa). En otro estudio llevado a cabo por *Loannidis et al*, se comparó *REVEL* con otros siete metapredictores (*MetaSVM*, *MetaLR*, *KGGSeq*, *Condel*, *CADD*, *DANN*) y llegó a la conclusión de que *REVEL* fue el metapredictor con mayor rendimiento para distinguir las variantes que patogénicas y las que no son cuando la frecuencia alélica de la variante es <0,5% (91).
- Predictores de impacto que tienen las variantes sobre el proceso de *splicing*: La alteración del *splicing* se ha relacionado con muchas enfermedades genéticas, por eso se han desarrollado predictores *in silico* para predecir si una variante puede alterar el proceso de *splicing* produciendo transcritos aberrantes. Los más usados son *GeneSplicer*, *NNSplice* (*Neural Network Splice*), *MaxEntScan* (*Maximum Entropy Scan*) y *Human Splicing Finder*.

### 10.3. Frecuencia alélica de la población control

La Frecuencia alélica es un dato valioso que se utiliza como criterio en la clasificación clínica de una variante. Una frecuencia alélica de <1% nos podría indicar que la variante estudiada es

patogénica, mientras que una frecuencia alélica de >5% indicaría que la variante en cuestión es benigna. Sin embargo, la interpretación siempre se debe hacer con cautela, ya que se puede dar el caso de VP que presentan frecuencias alélicas superiores al 1% en poblaciones específicas, eso se explicaría por la presencia de la variante en un punto caliente de mutación *hot spot* o un posible efecto fundador. Toda esta información se puede obtener a través de diversas bases de datos poblacionales como dbSNP, *1000 Genomes Project* o *Exome Aggregation Consorcio*, incluso en algunos casos forma parte integrante de algunas bases de datos clínico-moleculares como es el ejemplo de Varsome.

#### 10.4. Estudios funcionales

Los estudios funcionales se pueden hacer a nivel de la proteína como a nivel del ARN. En el primer caso, consiste en ver si la proteína ha sufrido algún cambio en un dominio funcional imprescindible para su funcionamiento; en el segundo caso, consiste en ver el efecto de una variante sobre el transcrito formado. Gracias a una RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa o *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), se averigua si la variante que se está estudiando genera un transcrito normal o aberrante y por lo tanto obtener información muy valiosa para poder clasificar la variante.

#### 10.5. Co-ocurrencia en *cis/trans*

Los términos *cis* o *trans* se refieren a la posición de las variantes en los alelos del gen, si ambas variantes se encuentran en el mismo alelo entonces estaríamos hablando de *cis*, si por lo contrario cada variante se encuentra en uno de los alelos del gen, se habla de *trans*. Este concepto tiene su importancia en las enfermedades de herencia autosómica dominante, como es el caso en la mayoría de los genes involucrados en el SCMOH, ya que, si la variante estudiada se encuentra en *trans* con una variante conocida como patogénica, es muy probable que esa variante sea benigna. Esto se explica partiendo del hecho de que los genes de SCMOH son de herencia autosómica dominante y suponiendo que la VP o VPP está en un alelo y la variante de estudio en el otro (configuración *trans*), si la variante de estudio fuese patogénica, obtendríamos una descendencia con un gen con mutación bialélica, lo que probablemente no sería compatible con la vida del feto. Por eso, se considera que cuando existe una mutación de estudio en configuración *trans* con una patogénica, la probabilidad de que esa variante sea benigna es elevada. Sin embargo, no siempre se cumple esa regla, ya que se han descrito casos de pacientes portadores de mutación bialélicas patogénicas en los genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* y *ATM*) pero que en vez de manifestar un SCMOH presentan un cuadro más grave conocido como la anemia de Fanconi caracterizado por fallo de médula ósea y desarrollo de

tumores sólidos (92) (79), por lo cual siempre hay que interpretar ese tipo de información con mucha cautela para clasificar las variantes.

### 10.6. Estudio de co-segregación

El estudio de co-segregación consiste en estudiar la presencia de una variante en los distintos miembros de la familia (tanto los sanos como los afectados) del caso índice (primer miembro diagnosticado del síndrome hereditario en una determinada familia). Si esa variante es detectada en los miembros afectados, pero no en los miembros sanos, se concluye que la variante co-segrega con la enfermedad. Dicho de otra forma, podríamos establecer una relación entre la variante y la enfermedad, pero no confirmar de forma sistemática que la variante es patogénica, ya que hay que tomar en cuenta más parámetros para poder confirmar dicha patogenicidad, como la penetrancia del gen en el síndrome hereditario estudiado o posibles casos de fenocopias que podrían dar lugar a falsos positivos.

## 11. ELABORACIÓN DEL INFORME GENÉTICO

Una vez el estudio genético del caso índice hecho y la variante caracterizada se elabora el informe genético. Dicho informe puede ser informativo o no informativo de tal forma que:

- Test informativo: indica la presencia de una VP/VPP que justifica dicha enfermedad, por lo cual en este caso hay que someter a los familiares del caso índice (si lo desean) al test genético. Dependiendo del resultado nos encontraríamos en el estudio familiar con:
  - o Verdadero positivo: familiar del caso índice portador de la misma variante que se está estudiando. En este caso, se le ofrecerá un asesoramiento genético y se estudiará el riesgo de desarrollar la enfermedad y las posibles medidas de seguimiento y de profilaxis.
  - o Verdadero negativo: cuando el familiar del caso índice no es portador de la misma mutación que se está estudiando. En este caso se considera que ese paciente tiene el mismo riesgo que la población general para el desarrollo de la enfermedad.
- Test no informativo: cuando no se detecta ninguna variante que podría justificar la clínica del paciente caso índice, en este caso podemos distinguir dos subtipos de test no informativos:

- Negativo no informativo: no se ha detectado ninguna variante relacionada con la clínica del paciente por lo cual no se puede ni confirmar ni descartar que dicha enfermedad sea de causa genética.
- Presencia de una VUS: no es informativo porque el hallazgo de una VUS no permite justificar la situación clínica de los pacientes. En este caso, se estudia el riesgo de cada paciente de forma individual según la edad, la historia familiar, antecedentes médicos y otros factores. No se debe de dar peso a las VUS para la toma de decisiones clínicas, ni tampoco se debe tener en cuenta la cosegregación de las VUS (79). No obstante, se aconseja informar las VUS de los genes de riesgo, tal como *BRCA1/2*, aunque no se debe de tomar como criterio para la toma de decisiones clínicas o estudio predictivo de los familiares (80).

## **II. Hipótesis y objetivo**



## 1. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado, con diferencia, en las mujeres a nivel mundial. El cáncer de ovario afecta a menos mujeres, pero es mucho más agresivo; de hecho, en nuestro país, en el 2020 la tasa de mortalidad por este cáncer fue de 63,45% comparando con la del cáncer de mama, que fue de 19,17%. No obstante, se sabe que en la mayoría de los casos ambos tipos de cáncer aparecen de forma esporádica y que hasta el 10% son de causa genética vinculados a VP/VPP en genes de herencia autosómica dominante de alta o moderada penetrancia; es lo que se conoce como SCMOH. En cifras, ese dato se traduciría supuestamente, y según nuestros cálculos, en que solo en España, en el año 2020, aproximadamente 3.406 casos de cáncer de mama y 351 casos de cáncer de ovario fueron debidos a una causa genética.

El SCMOH está en mayor parte relacionado con VP/VPP germinales en los genes *BRCA* (93). El abaratamiento del coste de secuenciación, con la aparición de NGS en los laboratorios de genética, ha permitido analizar simultáneamente junto con los genes *BRCA* otros genes involucrados en el SCMOH, destacando genes de alto riesgo para cáncer de mama (*TP53*, *PALB2* y *PTEN*) y otros de riesgo moderado (*CHEK2*, *ATM*, *NF1* y *NBN*), así como genes con alto riesgo para cáncer de ovario como *CDH1* y *STK11* y otros con menos riesgo, pero también importantes, como *RAD51D*, genes de MMR y *BRIP1* entre otros (93). Hasta la fecha actual, la NCCN incluye 20 genes clínicamente accionables para el estudio de casos índices que cumplen criterios de SCMOH. Sin embargo, esta estrategia ha provocado un aumento considerable de las VUS detectadas en los estudios genéticos.

## 2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta el aumento considerable de los genes estudiados en los diversos síndromes de cáncer hereditario y, consecuentemente, el alto número de VUS obtenidas, en este estudio se han utilizado dos estrategias: la aplicación de un algoritmo de priorización de VUS y la reevaluación de las VUS obtenidas inicialmente. Como resultado, se espera disminuir, de forma considerable, el porcentaje de variantes genéticas clasificadas previamente como VUS y realizar estudios adicionales en las VUS priorizadas, en concreto, aquellas que estén implicadas en una posible maduración aberrante del ARNm, con el fin de detectar posibles VP/VPP.

Por otro lado, teniendo en cuenta la correcta selección de pacientes realizada desde las consultas de asesoramiento genético en cáncer hereditario y la utilización de un panel de 20 genes clínicamente accionables, es de esperar que el rendimiento diagnóstico del SCMOH no aumente a pesar de incrementar el número de genes candidatos analizados.

### **3. OBJETIVOS**

Objetivo principal:

El objetivo principal de esta tesis fue valorar la utilidad clínica del análisis genético, mediante un panel de 50 genes, en pacientes con SCMOH.

Objetivos específicos:

- Determinar el rendimiento diagnóstico del análisis mediante un panel de 20 genes clínicamente accionables en pacientes con criterio de SCMOH.
- Evaluación de los rendimientos diagnósticos de cada uno de los criterios de selección propuestos por la SEOM.
- Contribución y categorización molecular de las VP/VPP identificadas en genes clínicamente accionables en pacientes con SCMOH.
- Estudio de correlación genotipo-fenotipo en aquellas VP/VPP encontradas en los genes clínicamente accionables.
- Reevaluación y priorización de las VUS detectadas en los genes clínicamente accionables mediante el uso de aplicaciones bioinformáticas, bases de datos, bibliografía y algoritmos de predicción de patogenicidad.
- Aplicación de la técnica molecular de RT-PCR en el estudio funcional de las variantes susceptibles de maduración alternativa del ARN mensajero.
- Rendimiento diagnóstico, clasificación molecular y clínica de 30 genes candidatos para el SCMOH.

### **III. Metodología**



## 1. PACIENTES Y ESTUDIO

En el estudio observacional descriptivo, aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HCUVA (**Anexo 1**), se utilizó una cohorte de 414 casos índices. Estos pacientes fueron seleccionados, según los criterios de la guía de la SEOM 2019 del SCMOH, en las consultas de asesoramiento genético de cáncer hereditario de los servicios de oncología médica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) y Hospital General Universitario Morales de Meseguer (HGUMM), entre abril del 2019 a febrero del 2021.

### 1.1. Selección de pacientes

Todos los pacientes que se les realizó el test genético para el diagnóstico del SCMOH cumplieron, por lo menos, un criterio de la última guía de la SEOM 2019 descritos en la **Tabla 10** (94).

<b>Criterios independientes de la historia familiar</b>	Mujeres con cáncer de mama y ovario sincrónico o metacrónico.
	Mujer con cáncer de mama antes de los 40 años.
	Cáncer de mama bilateral (el primero diagnosticado antes de los 50 años)
	Cáncer de mama TN diagnosticado antes de los 60 años.
	Diagnóstico de cáncer de ovario de alto grado epitelial no mucinoso (o de las trompas de Falopio o cáncer peritoneal primario).
	Ancestro con mutación fundadora
	Mutación somática en <i>BRCA</i> detectada en cualquier tipo de tumor con una frecuencia alélica >30% (si se conoce)
	Pacientes con cáncer de mama HER2 negativo metastásico y candidatos para la terapia con inhibidores de la <i>PARP</i>
<b>2 o más familiares de primer grado con una de estas combinaciones</b>	Cáncer de mama bilateral + otro cáncer de mama antes de los 60 años
	Cáncer de mama <50 años y cáncer de próstata o de páncreas < 60 años
	Cáncer de mama en el varón
	Cáncer de mama más cáncer de ovario
	Dos casos de cáncer de mama diagnosticados antes de los 50 años.
<b>3 o más familiares directos de la misma rama familiar con cáncer de mama (con uno como mínimo pre menopáusico) y/o cáncer de ovario y/o cáncer de páncreas o riesgo de Gleason de cáncer de próstata &gt;7</b>	

Tabla 10: Criterios establecidos por la SEOM (2019) para el diagnóstico genético de SCMOH (94). TN: Triple Negativo; *PARP*: Poly-ADP Ribose Polymerase.

Todos los pacientes seleccionados para el estudio fueron informados del principal objetivo del estudio y de su naturaleza, y firmaron el consentimiento informado (**Anexo 2**).

## 1.2. Características clínicas e inmunohistoquímicas de los pacientes

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes seleccionados (casos índices) para obtener la información de los siguientes parámetros:

- Edad
- Edad del diagnóstico
- Sexo
- Tipo e histología del cáncer
- Clasificación TNM
- Clasificación molecular gracias a la inmunohistoquímica (en casos de diagnósticos antiguos no se ha podido obtener este tipo de información)
- Otros posibles tumores (si los hay), y los casos de cáncer de mama y/u ovario bilateral

En cuanto al cáncer de mama bilateral, se consideró sincrónico en aquellos casos índices con intervalo de diagnóstico inferior a 3 meses, mientras que se consideró metacrónico, en aquellos casos índices con intervalo de diagnóstico superior a los 6 meses (95). La clasificación molecular del cáncer de mama se hizo en base a la clasificación de *Sabadell-Mercadal et al* (14).

La recogida de la información a partir de la historia clínica se realizó a través de los programas informáticos de la región de Murcia SELENE® y AGORA®. La información obtenida nos permitió efectuar el estudio de correlación genotipo-fenotipo de las VP/VPP detectadas de cada caso índice.

## 2. ANÁLISIS GENÉTICO

### 2.1. Secuenciación masiva

La secuenciación masiva se llevó a cabo en cinco pasos principales: fragmentación de ADN y preparación de librerías, ligación de adaptadores, amplificación, secuenciación y análisis bioinformático. Para ello se siguió el protocolo de trabajo elaborado por nuestro laboratorio.

Para el análisis genético por NGS se utilizó el kit *Hereditary OncoKitDx*® (REF: IMG-399) de *Imegen*®, y posterior secuenciación con la plataforma de *MiSeq* de *Illumina*® utilizando el reactivo *MiSeq*®v2 *Reagent Kit 300 Cycles PE – Box 1 of 2* (REF: 15033624) y *MiSeq*®v2 *Reagent Kit Box 2 of 2* (REF: 15033626). Dicho kit tiene una cobertura de 99,5% con una profundidad de

50X e incluye el análisis de 50 genes relacionados con el cáncer hereditario: *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* (*X-ray Repair Cross Complementing 2*), *STK11*, *TP53*, *PALB2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *CDH1*, *ATM*, *BARD1*, *CHEK2*, *NBN*, *MRE11* (*MRE11 homolog, double strand break repair nuclease*), *RAD50*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM* (*EPithelial Cell Adhesion Molecul*), *PMS2*, *BRIP1*, *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), *MUTYH* (*MUTY DNA glycosylase*), *SMAD4* (*Mothers Against Decapentaplegic homolog 4*), *POLD1* (*DNA POLymerase Delta 1 catalytic subunit*), *POLE* (*DNA POLymerase Epsilon, catalytic subunit*), *MLH3*, *MSH3* (*MutSHomolog3*), *NTHL1* (*NTH Like DNA glycosylase 1*), *CDKN2A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*), *MET* (*MET proto-oncogene*), *CDK4* (*Cyclin Dependent Kinase 4*), *FH* (*Fumarate Hydratase*), *MEN1* (*MENIN 1*), *RET* (*RET proto-oncogene*), *SDHB* (*Succinate DeHydrogenase complex subunit B*), *SDHC* (*Succinate DeHydrogenase complex subunit C*), *SDHA* (*Succinate DeHydrogenase complex subunit B*), *SDHAF2* (*Succinate DeHydrogenase complex Assembly Factor 2*), *VHL* (*Von Hippel-Lindau tumor suppressor*), *ABRAXAS1* (*BRCA1 A complex subunit*), *NF1*, *PIK3CA*, *RB1* (*RB transcriptional corepressor 1*), *KIF1B* (*kinesin family member 1B*), *MAX* (*Myc Associated factor X*), *TMEM127* (*transmembrane protein 127*).

A través de la plataforma de análisis bioinformático *DataGenomics*® (*Imegen*®), en primer lugar, se aplicó el filtro de la guía de la NCCN versión 3.2019, que incluye los siguientes genes considerados como clínicamente accionables: *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53*.

A continuación, se aplicó el filtro de los 30 genes restantes, que incluye: *APC*, *BMPR1A*, *CDK4*, *CDKN2A*, *ABRAXAS1*, *FH*, *KIF1B*, *MAX*, *MEN1*, *MET*, *MLH3*, *MRE11A*, *MSH3*, *MUTYH*, *NTHL1*, *PIK3CA*, *POLD1*, *POLE*, *RAD50*, *RB1*, *RET*, *SDHA*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SMAD4*, *TMEM127*, *VHL*, *XRCC2*.

Además, la plataforma nos permitió realizar una búsqueda pormenorizada para ver si las variantes encontradas en el análisis fueron descritas previamente y nos facilitó una clasificación preliminar de las variantes según su base de datos. La clasificación clínica final se realizó en base a las distintas bases de datos bioinformáticas (detalladas en el apartado 10.1 de la introducción): ClinVar y dbSNP de NCBI, Ensembl, HGMD y Varsome, principalmente. También se realizaron búsquedas bibliográficas en diversas plataformas como PubMed y LitVar. Para estimar el potencial efecto clínico de las variantes MS no descritas, se utilizó el metapredicador *REVEL*. Todas las variantes se clasificaron desde el punto de vista clínico siguiendo las recomendaciones ACMG (**Tabla 9**, apartado 9.2 de la introducción).

Las variantes génicas patogénicas de tipo SNV, se confirmaron mediante secuenciación de Sanger, y los RG, se confirmaron mediante MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) de MRC Holland® (siempre que exista la sonda correspondiente a la variante). En el caso de las variantes génicas con un probable efecto de *splicing* alternativo, se procedió a su confirmación molecular mediante RT-PCR utilizando el Kit de retrotranscripción *PrimeScript RT Reagent*® (*Perfect Real Time*) de la casa comercial TAKARA Biotechnologies®.

## 2.2. Secuenciación de Sanger

Todas las VP/VPP tipo SNV obtenidas por NGS se comprobaron por secuenciación de Sanger. A continuación, se detallan los pasos necesarios para llevar a cabo dicha técnica:

### 2.2.1 Selección de la región a amplificar

Para ello se recurrió a varias bases de datos destacando principalmente NCBI Gene y Ensembl. La primera permite obtener la secuencia completa del gen en formato FASTA incluyendo intrones y exones. Con la segunda plataforma es posible discernir entre los exones de los intrones, y de esta manera se facilitó la localización de la variante que se necesita comprobar. El **Anexo 3** detalla los transcritos de referencia (MANE Select) utilizados.

### 2.2.2 Diseño de los primers

El correcto diseño de los *primers* es un paso crucial para una buena amplificación de la secuencia diana, gracias al portal web *Primer3plus* por un lado y NCBI *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) por otro, se diseñaron los *primers* necesarios para comprobar las SNV patogénicas obtenidas por NGS. *Primer3plus* nos facilitó la secuencia de los cebadores más adecuados, tomando en cuenta el contenido de bases nitrogenadas de guanina y citosina, la autocomplementariedad y la temperatura de anillamiento (T<sub>a</sub>). A continuación, se comprobó la especificidad de los oligos con nuestras secuencias dianas, mediante la plataforma *BLAST*. De esa forma, nos aseguramos que los *primers* se van a unir exactamente a las secuencias dianas que queremos amplificar y no a otras secuencias de ADN. En el **Anexo 4** se detallan los *primers* utilizados para comprobar las SNV patogénicas obtenidas.

### 2.2.3 Amplificación de la secuencia diana

Se llevó a cabo mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction*) de tal forma que gracias a los *primers* se amplificaron las secuencias dianas de cada gen. Las condiciones de la PCR se detallan en la **Tabla 11**.

PCR	V ( $\mu$ l)	Concentración final
H <sub>2</sub> O (GBM)	Variable	-
Tampón (5x)	5	1x
DNTPs (2 mM)	2,5	0,2 mM
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	1.5-2.5	2 mM
Cebador F+R (10 $\mu$ M)	1+1	0,4 mM
Taq (5U/ $\mu$ l)	0,125	0,625 U
ADN (20 ng/ $\mu$ l) *	2,5	50 ng

Tabla 11: Reactivos y condiciones de PCR de amplificación. Volumen total de 25 $\mu$ l. \* Se puso agua en vez del ADN extraído de los pacientes como control negativo para la comprobación de la amplificación. GBM: Grado Biología Molecular (casa comercial SIGMA ®); F: *forward*; R: *reverse*

La PCR de amplificación se llevó a cabo en una cabina de PCR de UV para evitar posibles contaminaciones. Se utilizó el termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler* ® de *Applied Biosystems* ® y el kit de amplificación utilizado fue el *GoTaq* ® *Hot Start Polymerase* de la casa comercial *Promega* ®. Este kit tiene la ventaja de evitar amplificaciones inespecíficas, además los tampones contienen un compuesto que aumenta la densidad de las muestras y que permite que se hundan fácilmente en los pocillos del gel de agarosa para comprobar la amplificación. El termociclador se programó de la siguiente forma (Figura 15).

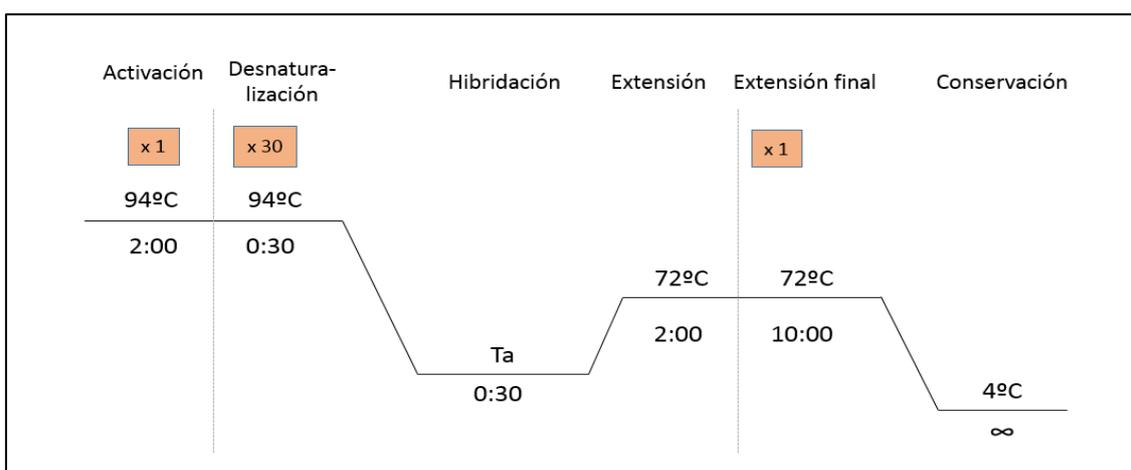


Figura 15: Fase de activación de la Taq polimerasa; 30 ciclos de desnaturalización de la hebra molde seguida de hibridación y extensión; 1 ciclo de extensión final seguido de enfriamiento de la muestra a 4°C; Ta: Temperatura de Anillamiento.

#### 2.2.4 Comprobación de la correcta amplificación

Para comprobar que las amplificaciones se hicieron correctamente, se realizó una electroforesis en gel agarosa al 2% con tampón TBE 1X (Tris 89mM-ácido bórico 89mM-EDTA 2mM) a pH 8.4 de la casa comercial *Bio-Rad* ®. El revelado se hizo con el *GelRed Nucleic Acid Gel Satin 10000X* en agua de *Biotium* ®, caracterizado por ser extremadamente sensible, estable y no tóxico. Se

cargaron 3 $\mu$ l del amplificado junto con 1 $\mu$ l de tampón de carga (compuesto por 0,25% W/V azul de bromofenol, 0,25% W/V cianol xileno, 30% V/V de glicerol en agua) y se depositaron en el gel en la cubeta de electroforesis. En la fuente de alimentación se aplicó una corriente de 80V durante 30 minutos.

La visualización del gel se hizo en el *T: Genius* de *Syngene*®, que es un sistema de captación de imágenes. La comprobación de la correcta amplificación consistió en la aparición de bandas en el carril de carga de las muestras, y de ninguna banda en el carril de carga del control negativo (agua) (Figura 16).

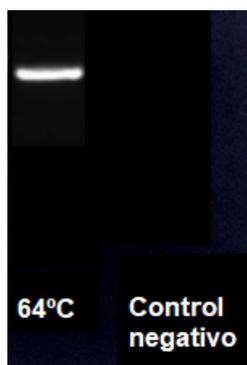


Figura 16: Ejemplo de revelado de gel de agarosa.

#### 2.2.5 Purificación de la PCR de amplificación

Los amplicones se purificaron con un método enzimático mediante el kit *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent*® (*Applied Biosystems*®). Este último está constituido por dos enzimas: exonucleasa I y fosfatasa alcalina, cada una con una función específica. La exonucleasa I elimina las potenciales cadenas simples de ADN de la PCR de amplificación y los posibles restos de *primers* mientras que la fosfatasa alcalina elimina los desoxinucleótidostrifosfatos (dNTP) no incorporados (Figura 17). Para ello se añadieron 2 $\mu$ l de EXOSAP a 5 $\mu$ l de cada producto de PCR de amplificación; tras la correcta mezcla se metieron las muestras en el termociclador *Thermal Cycler 2720* (*Applied Biosystems*®) para llevar a cabo una incubación a 37°C durante 15 minutos, seguidos de otros 15 minutos a 80°C.

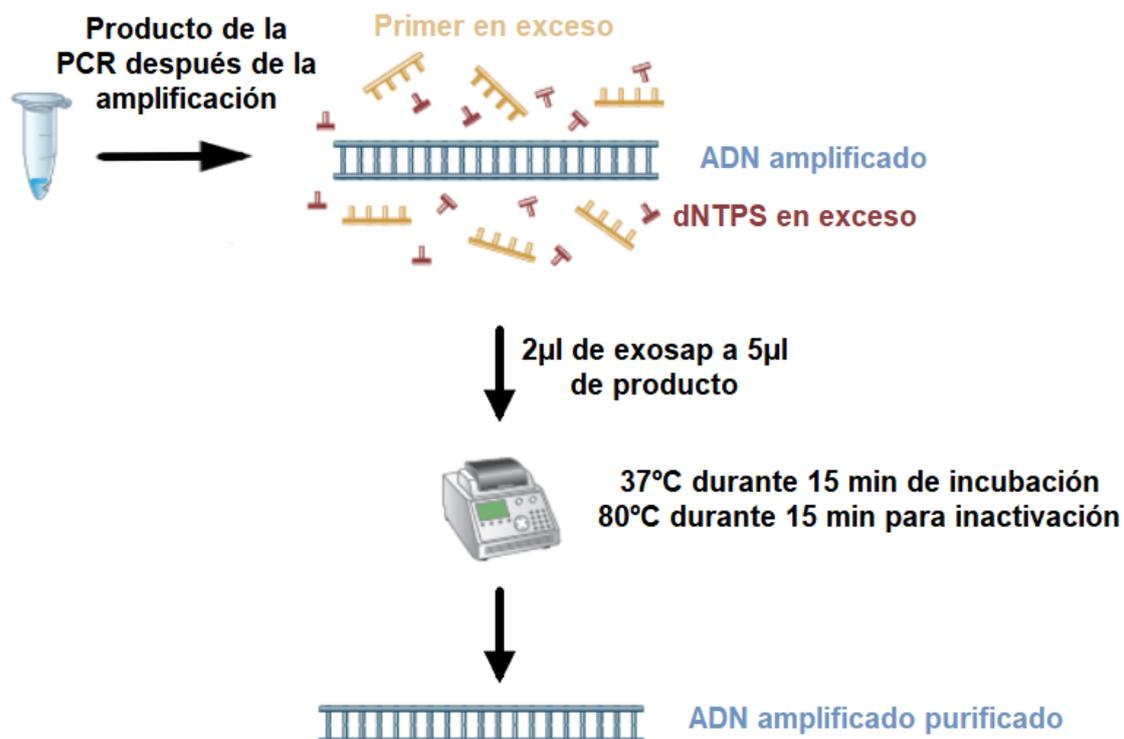


Figura 17: Purificación enzimática de la PCR de amplificación con ExoSAP-IT *PCR Product Cleanup Reagent*®. dNTPS: dinucleótidos trifosfato.

### 2.2.6 Reacción de secuenciación

Se utilizó el kit *BigDye*® *Terminator V1.1* de *Applied Biosystems*®, el cual se compone de una Taq polimerasa, dNTP y didesoxinucleótidostrifosfatos (ddNTP) ambos marcados con un fluorocromo. Las condiciones de la reacción se determinan en la **Tabla 12**.

Reacción de secuenciación	Volumen (µl)
H <sub>2</sub> O GBM	1,5
Tampón potenciador de la secuenciación (10x)	1,5
Big Dye	0,5
Cebador F+R (3,2 µM)	0,5
Amplicón purificado	1
Volumen total de la Mix	5

Tabla 12: Condiciones y reactivos de reacción de secuenciación. GBM: Grado Biología Molecular (casa comercial *SIGMA*®); F: *forward*; R: *reverse*.

El programa que se utilizó para la reacción de secuenciación consta de un ciclo de desnaturalización, seguido de 25 ciclos de tres temperaturas (desnaturalización, hibridación y extensión), terminando a 4°C indefinidamente (**Figura 18**).

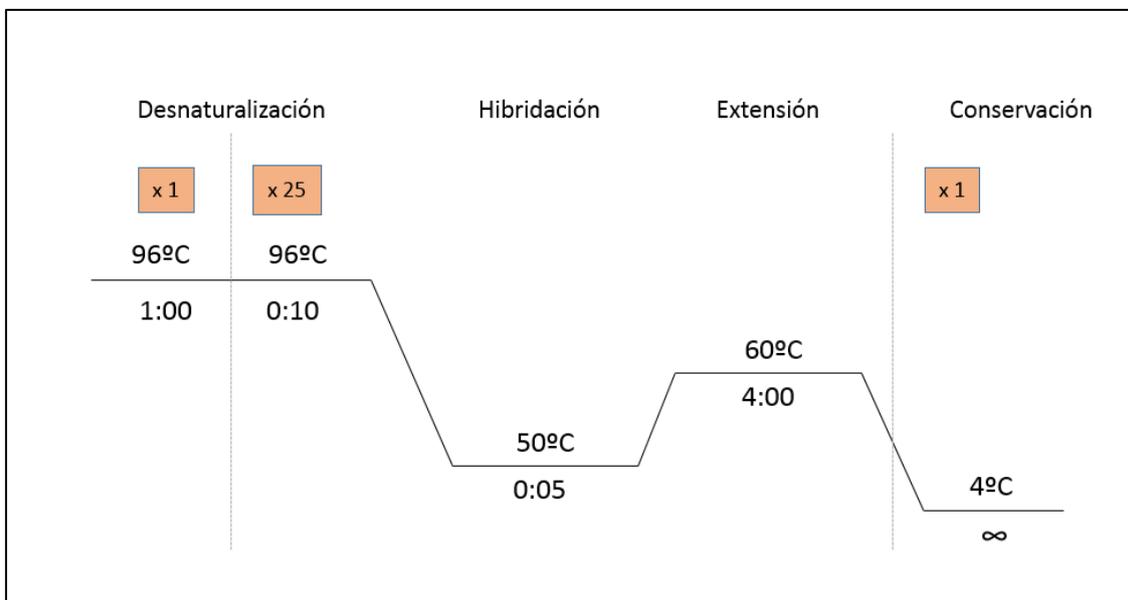


Figura 18: Programa empleado en la reacción de secuenciación.

### 2.2.7 Purificación de la reacción de secuenciación

Tras la reacción de secuenciación se eliminaron los restos de dNTPs sobrantes y las potenciales impurezas. Para ello, se utilizaron las columnas *Performa*® *DTR Gel Filtration* de la casa comercial *Edge Biosystems*®, las cuales tienen una excelente recuperación de fragmentos de ADN superiores a 15 pb además de eliminar más de 98% de sales, *primers* y dNTPs, terminadores marcados y otro tipo de impurezas no deseadas de bajo peso molecular. Para llevar a cabo la purificación se siguió el protocolo detallado a continuación:

- Centrifugación de las columnas a 3000 rpm durante 2 minutos, ya que las columnas están hidratadas con agua.
- Retirar el agua restante y colocar la columna en un nuevo vial de 1.5 ml.
- Añadir a los 5µl de la reacción de secuenciación 10µl de agua GBM; el volumen final (15µl) se depositó en el centro de la columna.
- Centrifugar de nuevo a 3000 rpm durante 2 minutos.
- Añadir 10µl de Formamida HI-DI (*Applied Biosystems*®) al producto eluido para desnaturalizar la doble hebra de ADN y llevar a cabo la electroforesis capilar.

- Traspasar las muestras purificadas en una placa de 96 pocillos (*MicroAmp™.Optical 96-Well ReactionPlate*® *AppliedBiosystems*®) adaptada al secuenciador.

### 2.2.8 Electroforesis capilar

El análisis de las secuencias dianas se hizo por electroforesis capilar automatizada con el equipo ABI3130 formado por cuatro capilares de 50 cm rellenos con el polímero POP7® (*Applied Biosystems*®) que actúa como matriz separadora. La electroforesis capilar se llevó a cabo en las siguientes condiciones: tiempo de carrera 45 minutos, temperatura de 60°C y el tipo de análisis se realizó con el *software Sequencing Analysis.v6* (*AppliedBiosystems*).

### 2.3. Amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación (MLPA)

La amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación (MLPA), es una técnica exclusiva de la casa comercial *MRC Holland*® que nos permitió comprobar los RG obtenidos por NGS. Es una técnica semicuantitativa que se basa en comparar las alturas de los picos generados por las sondas de las muestras con los picos generados por un ADN de referencia o control. Una disminución relativa de 0.65 respecto a la altura de los picos de referencia indica una delección de ADN, mientras que un aumento relativo de 1.25 respecto a la altura de los picos de referencia indica una duplicación del ADN.

A continuación, se detalla el protocolo que se siguió para llevar a cabo la técnica:

- Las muestras extraídas previamente y ajustadas a un volumen de 5µl y una concentración de 30ng/µl, se desnaturalizaron calentándolas a 98°C durante 5 minutos en el termociclador (*Thermal Cycler 2720*®).
- Para la hibridación de las muestras con las sondas de MLPA, previo enfriamiento de las muestras a temperatura ambiente, se abrieron los tubos y se añadieron a cada muestra 3µl de la *Master Mix* de hibridación (1.5µl de *SALSA Probemix*® + 1.5µl de *MLPA Buffer*®) y se incubaron de nuevo a 95°C durante 1 minuto seguido de 16 horas a 60°C de hibridación en el termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler*®.
- La ligación de las sondas se hizo con las muestras aún dentro del termociclador, de tal forma que se bajó la temperatura del termociclador a 54°C y se añadieron a cada muestra 32µl de la *Master Mix Ligase 65* (3µl de *LIGASE Buffer A*® + 3µl de *LIGASE Buffer B*® + 25µl de agua ultra pura + 1µl de *Ligase-65*®) y se incubaron a 54°C durante 15 minutos.

- Se desactivó la ligasa calentando las muestras a 98°C durante 5 minutos y luego se enfriaron las muestras a temperatura ambiente.
- Para amplificar las muestras se añadieron a temperatura ambiente y a cada muestra 10µl de la *Master Mix* de polimerasa (7.5µl de agua ultra pura + 2µl de *PCR Primer Mix* ® + 0.5µl de *Salsa polymerase* ®). La PCR de amplificación se hizo en las siguientes condiciones: 35 ciclos de amplificación de tal forma que cada ciclo fueron 30 segundos a 95°C para desnaturalización, 30 segundos a 60°C para hibridación, 1 minuto a 72°C para la elongación seguidos de una incubación final de 20 minutos a 72°C y enfriamiento a 15°C (Figura 19).

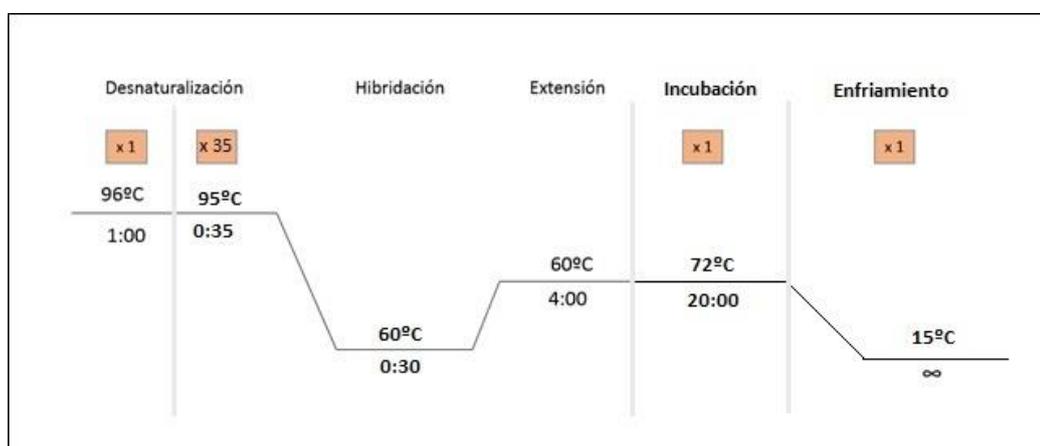


Figura 19: Condiciones de reacción de amplificación MLPA

- Se separaron los fragmentos mediante electroforesis capilar en ABI3130 con las siguientes condiciones: se añadieron a 0.7µl del producto de amplificación a 9.2µl de mezcla formada por 9µl de Formamida HI-DI (*Applied Biosystems* ®) y 0.2µl de marcador de peso molecular (*GeneScan* ® 500 LIZ suministrado por *Applied Biosystems* ®), se incubaron las muestras durante 3 minutos a 86°C y se enfriaron rápidamente durante 2 minutos en el frigo a 4°C. Directamente después se cargaron las muestras en la placa de 96 pocillos (*MicroAmp™.Optical 96-Well ReactionPlate* ® *AppliedBiosystems* ®) adaptada al secuenciador de electroforesis ABI3130, con las siguientes condiciones electroforéticas: 60 minutos de carrera a 60°C de temperatura. El método de análisis fue MLPA.
- Se transmitieron los resultados de la electroforesis al *software COFFALYSER* ® suministrado por la casa comercial *MRC Holland* ® y se obtuvieron las gráficas de proporciones de MLPA. En el **Anexo 5** se detallan las sondas utilizadas para el estudio de los RG obtenidos y la ficha técnica.

## 2.4. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

La RT-PCR permite obtener el ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero, con el fin de detectar variantes susceptibles de *splicing* alternativo en las secuencias transcritas. Se llevó a cabo en varios pasos que se pueden resumir de la siguiente forma (Figura 20).

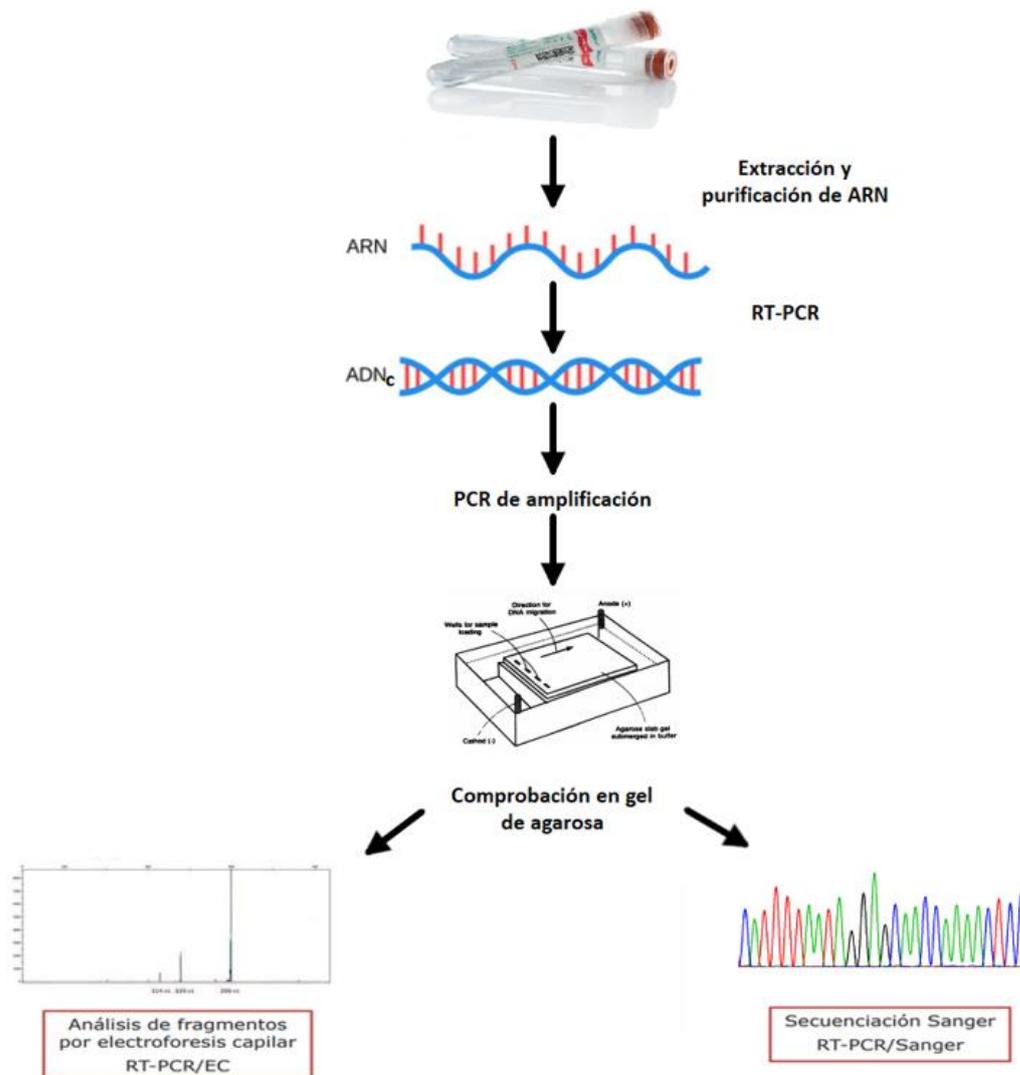


Figura 20: Proceso resumido de RT-PCR para el estudio de variantes de *splicing* alternativo. Se extrajo el ARN, se purificó y luego se hizo la RT-PCR. Se amplificó el ADN complementario (ADNc) obtenido en las regiones de interés y tras comprobación en gel de agarosa de la correcta amplificación se procedió al análisis de fragmentos por electroforesis capilar y/o secuenciación de Sanger para caracterizar los eventos de *splicing* con relevancia clínica en el gen estudiado.

#### 2.4.1 Extracción y purificación del ARN

La extracción del ARN se hizo con el kit *PAXgene Blood RNA Kit V 2*® (REF: 762174) de *Qiagen*®. Se extrajeron 2.5 ml de sangre en tubos de *PAXgene Blood RNA*® para garantizar la conservación y estabilidad de la muestra. A continuación, se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 2 horas para garantizar la lisis completa de las células y la liberación del ARN al exterior de las células y posteriormente, proceder a la extracción automatizada del ARN gracias al equipo *QIAcube*® de *Werfen*®. Para ello, se utilizó el reactivo *PAXgene Blood RNA Kit V 2*® (REF:762174) de *Qiagen*® y se procedió a la extracción automatizada del ARN siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La cuantificación de la concentración y pureza de ARN extraído se hizo gracias al sistema *NanoDrop 1000 system*® de *Thermo Scientific*®.

#### 2.4.2 Obtención de ADNc: RT-PCR

El ADNc de la secuencia diana se obtuvo por reacción de retrotranscripción empleando el kit *PrimeScript RT Reagent*® (*Perfect Real Time*) de la casa comercial *TAKARA Biotechnologies*® (CAT: RR037A). La RT-PCR se llevó a cabo en el termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler*®, mediante la selección del programa RT-PCR que consiste en una extensión a 37°C durante 15 minutos seguida de una inactivación de la retrotranscriptasa a 85°C durante 5 segundos. En cuanto a las condiciones de la reacción fueron las siguientes (**Tabla 13**).

Reactivos	μl
Buffer 5X PrimeScript	8
Random 6 mers (100μM)	4
PrimeScript RT Enzyme Mix I	2
ARN	*
H <sub>2</sub> O (GBM)	*
Volumen total	40

Tabla 13: Mezcla de la reacción RT-PCR con un volumen final 20μl. \*El volumen dependió de la concentración del ARN de partida de la muestra, de tal forma que hubo que añadir el volumen necesario para llegar a una cantidad equivalente de 1.000ng de ARN, la concentración inicial de nuestra muestra fue de 67ng/μl por lo cual el volumen necesario para obtener una cantidad necesaria de 1.000ng fue de 15μl y se añadieron 11μl de H<sub>2</sub>O GBM. GBM: Grado Biología Molecular (casa comercial *SIGMA*®).

#### 2.4.3 Amplificación del ADNc y comprobación en gel de agarosa

La secuencia diana del ADNc se amplificó siguiendo las mismas condiciones que el apartado 2.2.3. Para la comprobación del amplificado en gel de agarosa se realizó lo siguiente:

- Se cargaron 4μl del ADNc y 2μl de tampón de carga.

- Se agregó un marcador de peso molecular de referencia (*BenchTop 100 bp DNA Ladder*® de la casa comercial *Promega*®).
- Electroforesis de 90V durante 60 minutos.

#### 2.4.4 Análisis de fragmentos

La secuencia diana del ADNc se amplificó en las mismas condiciones que el apartado 2.2.3, pero con una ligera modificación, ya que el *primer Forward* estuvo marcado con un fluorocromo (FAM). En la **Tabla 14** se detallan el transcrito utilizado para estudiar la variante c.375+2T>C del intrón 4-5 del gen *TP53* que se detectó en la muestra estudiada, así como los *primers* empleados para amplificar la secuencia diana.

Gen	Variante génica	Ta	Descripción Primer	Secuencia primer
<i>TP53</i> (NM_000546.6)	c.375+2T>C	63°C	TP53-3F	5F[6FAM]ACAACGTTCTGTCCCCCTTG-3F
			TP53-6R	5R-TCGACATAGTGTGGTGGTGC-3R

Tabla 14: Secuencias de *primers* y transcrito empleado para la amplificación de la secuencia diana. Incluye en este caso exón3 (intrón4) para el *forward* y exón6 para el *reverse*. El primer *forward* va unido con fluorocromo FAM excepto en la reacción de secuenciación en la cual el primer *forward* no se une al fluorocromo.

El análisis de fragmentos se llevó a cabo con el secuenciador ABI3130 con las siguientes condiciones de trabajo: se añadieron 5µl del producto amplificado y una mezcla de 30µl de Formamida HI-DI (*Applied Biosystems*®) más 0.5µl de marcador de peso molecular (*GeneScan*® 500 LIZ suministrado por *Applied Biosystems*®) en una placa de 96 pocillos (*MicroAmp™.Optical 96-Well ReactionPlate*® *Applied Biosystems*®) adaptada al secuenciador ABI3130. A continuación, se incubó la placa a 86°C durante 3 minutos en termociclador *Veriti 96 well Thermal Cycler*® con la finalidad de desnaturalizar la muestra. Finalmente se introdujo la placa en el secuenciador con las siguientes condiciones electroforéticas: 60 minutos de carrera a 60°C de temperatura, el método de análisis fue MLPA. Los resultados obtenidos se analizaron con el *software Gene Mapper v 4.0*® facilitado por *Applied Biosystems*®. La **Figura 21** muestra un ejemplo de electroferograma de análisis de fragmentos.

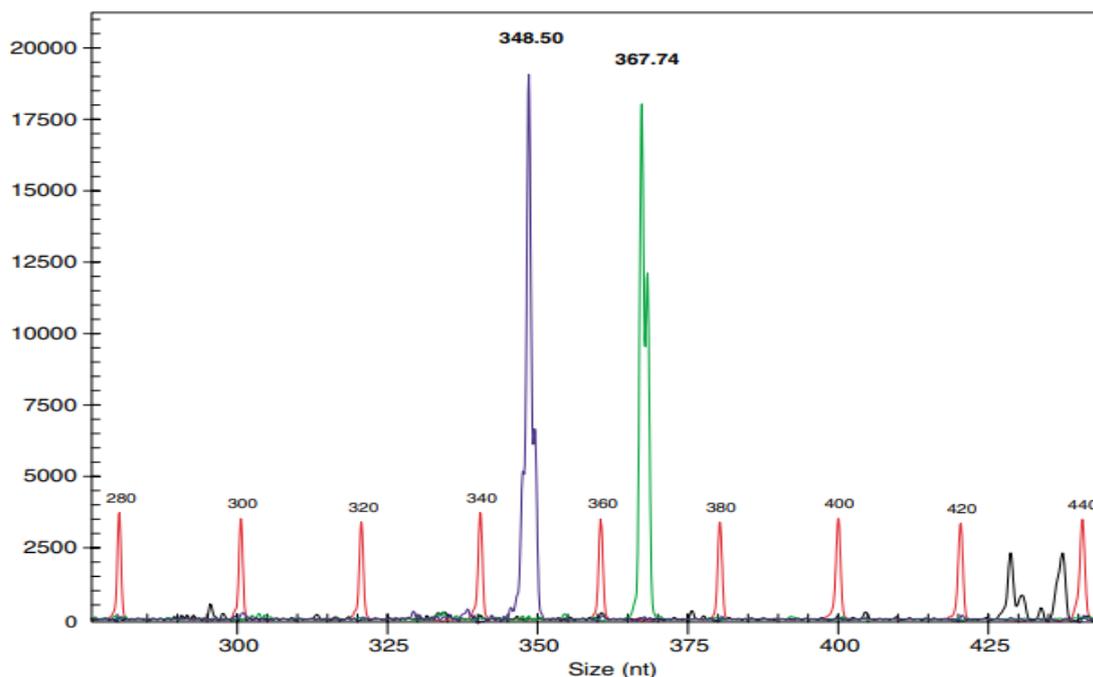


Figura 21: Electroferograma de análisis de fragmentos. Eje de abscisas representa el tamaño de los fragmentos en nucleótidos y el eje de ordenada, la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias.

#### 2.4.5 Secuenciación de Sanger

La Secuenciación de Sanger se hizo siguiendo el mismo protocolo que el apartado 2.2 de metodología, usando el *primer Forward* diseñado para el estudio de *splicing* pero sin que estuviera marcado con fluorocromo (Tabla 14).

Los resultados de análisis de fragmentos y los de la secuenciación de Sanger se interpretaron conjuntamente para el estudio de las variantes genéticas con posible *splicing* alternativo aberrante.

### 3. ANÁLISIS DE LAS VARIANTES GÉNICAS

Las variantes génicas obtenidas se clasificaron desde el punto de vista molecular y clínico.

#### 3.1. Análisis molecular

Para llevar a cabo el análisis molecular de cada variante obtenida, en primer lugar se recogió toda la información necesaria proporcionada por la plataforma de análisis bioinformático *Datagenomics*® de *Imegen*®, destacando: tipo de mutación, posición del codificante según HGVS (c.HGVS) con el cambio producido, cambio producido en la proteína según nomenclatura HGVS (p.HGVS), transcrito de referencia, exón donde se encontró la variante, y número de identificación rs de la variante (en caso de disponibilidad). A continuación, dicha información se comprobó con varias bases de datos destacando Varsome, ClinVar, Ensembl, dbSNP, entre otras.

### 3.2. Análisis clínico

El análisis clínico se hizo gracias a la clasificación de la ACMG (Apartado 9.2 de la introducción), como medidas de apoyo se recurrió a bases de datos como ClinVar y HGMD, entre otras.

### 3.3. Priorización de las VUS detectadas en el estudio

La priorización de las VUS es un proceso importante para poder llevar un estrecho control de aquellas VUS más susceptibles de convertirse en VP/VPP con las consecuencias que conlleva dicho cambio.

Para la elaboración del algoritmo de priorización de VUS detectadas en la tesis presente, se cogieron como base algunos criterios utilizados por *Bonache et al* (85) (**Figura 22**). Este algoritmo se aplicó a las variantes VUS detectadas en los genes con accionabilidad clínica demostrada para SCMOH: *ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, NF1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53*. Se clasificaron como VUS priorizada aquellas variantes que cumplan al menos uno de estos criterios:

- Variantes localizadas a ( $\pm 10$  pb) del borde exón-intrón que, además en los predictores *in silico* de *splicing* (*GeneSplicer, NNSplice, MaxEntScan, Human Splicing Finder*) y la base de datos Varsome predicen la formación de un transcrito aberrante.
- Variantes tipo MS con un *metascore* de *REVEL* > 0.7 con una sensibilidad de 0.5786 y especificidad de 0.9556 (86).
  - o El metapredictor *REVEL*, se basa en la combinación de 13 predictores individuales: *MutPred, FATHMM* versión 2.3, *VEST 3.0, PolyPhen-2, SIFT, PROVEAN, MutationAssessor, MutationTaster, LRT, GERP++, SiPhy, phyloP* y *phastCons*.
- Variantes potencialmente deletéreas según la bibliografía publicada en LitVar, Varsome Pubmed y HGMD.

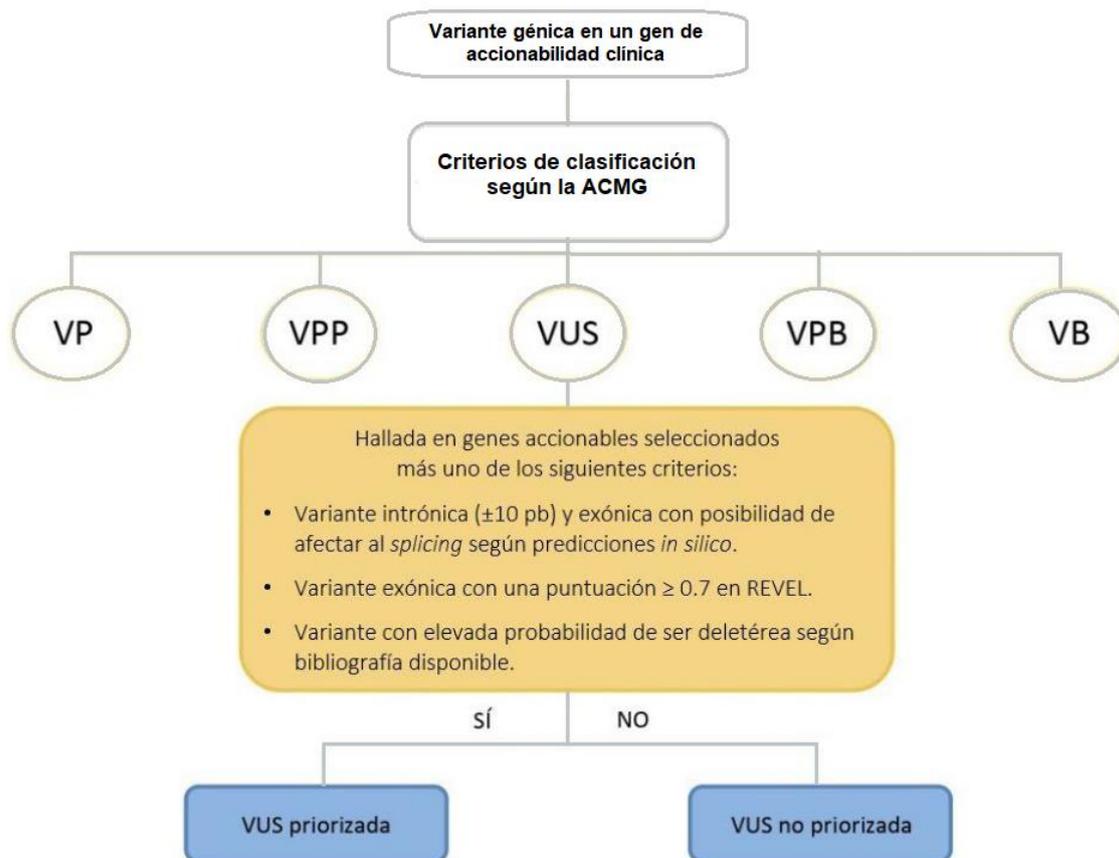


Figura 22: Algoritmo utilizado para priorizar las VUS en las variantes que se encuentran en genes cuya accionabilidad clínica ha sido demostrada. Tomado de Rosado-Jiménez et al (86).

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el *software* SPSS v.28 y las condiciones de aplicación del tratamiento estadístico se verificaron antes de la realización del mismo.

- Para el análisis descriptivo de las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión. En cuanto a las variables cualitativas se representaron en forma de tabla incluyendo las frecuencias relativas y absolutas.
- Para comprobar las posibles diferencias estadísticas de edad media entre casos índices portadores de VP/VPP y no portadores de VP/VPP se hizo un test T de Student de variantes independientes.
- Para llevar a cabo el contraste de hipótesis para las variables cualitativas se utilizó el test exacto de Fisher y el test de Chi cuadrado en función del número de casos, (el primero cuando el número de frecuencias esperadas es inferior a 5 y el segundo cuando es

superior a 5). Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de “*p*” asociado a la prueba estadística de contraste fue menor de 0.05.

## **IV. Resultados**



## 1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

El estudio se llevó a cabo partiendo de una cohorte de 414 casos índices que cumplían estrictamente al menos uno de los criterios de selección de la SEOM 2019 para el SCMOH. El 62% de los casos índices procedían del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) y el 38% del Hospital General Universitario Morales Meseguer (HGUMM). La edad media de la cohorte estudiada fue de  $47,4 \pm 12,6$  años mientras que la mediana fue de 46 años y el rango de edad fue comprendido entre 22 y 85 años. En cuanto a los casos índices con cáncer de mama la edad media fue 44,7 años mientras que la mediana fue de 44 años, para los casos índices con cáncer de ovario la edad media fue 59,5 años mientras que la mediana fue de 59 años. En cuanto a los casos índices varones con cáncer de mama la edad media fue de 55,8 años, mientras que la mediana fue de 60 años, y aquellos con cáncer de próstata, la edad media fue de 59,3 años mientras que la mediana fue de 57 años.

De los 414 casos el 76,81% tenían cáncer de mama (318/414), 18,84% cáncer de ovario (78/414), 1,21% cáncer de mama y ovario (5/414), 1,45% cáncer de próstata (6/414), 1,21% cáncer de mama en varón (5/414) y 0,48% cáncer de páncreas (2/414). De 414 casos índices 63 resultaron portadores de al menos una VP/VPP en alguno de los 20 genes accionables indicados en la guía clínica NCNN versión 3.2019. De ellos, un 44,45% (28/63) fueron diagnosticados de cáncer de mama unilateral, 20,63% (13/63) de cáncer de mama bilateral, 17,46% (11/63) de cáncer de ovario unilateral, 11,11% (7/63) de cáncer de ovario bilateral, 3,17% (2/63) de cáncer de mama y ovario, 1,59% (1/63) de cáncer de próstata y finalmente 1,59% (1/63) fue un hombre diagnosticado de cáncer de mama (**Figura 23**).

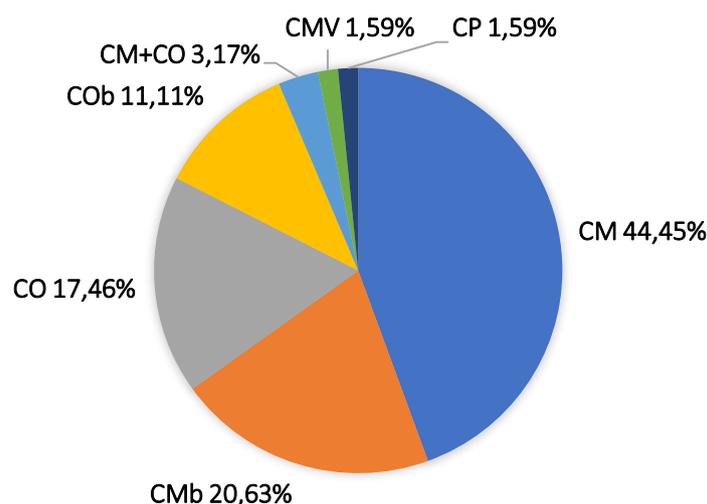


Figura 23: Distribución (%) de los distintos tipos de cánceres en los 63 casos índices en donde se ha identificado una alteración genética (VP/VPP) en la cohorte seleccionada. CO: Cáncer de Ovario; COb: Cáncer de Ovario Bilateral; CM: Cáncer de Mama; CMb: Cáncer de Mama Bilateral; CM+CO: Cáncer de Mama + Cáncer de Ovario; CMV: Cáncer de Mama en Varón; CP: Cáncer de Próstata.

De los cánceres de mama el tipo histológico más detectado fue el ductal (47/57; 82,46%), seguido del lobulillar (2/57; 3,51%) (Figura 24). En cuanto a la caracterización molecular del cáncer de mama, el tipo LB fue el mayoritario (22/57; 38,60%) seguido del TN (15/57; 26,31%) y del LA (8/57; 14,04%) (Figura 25).

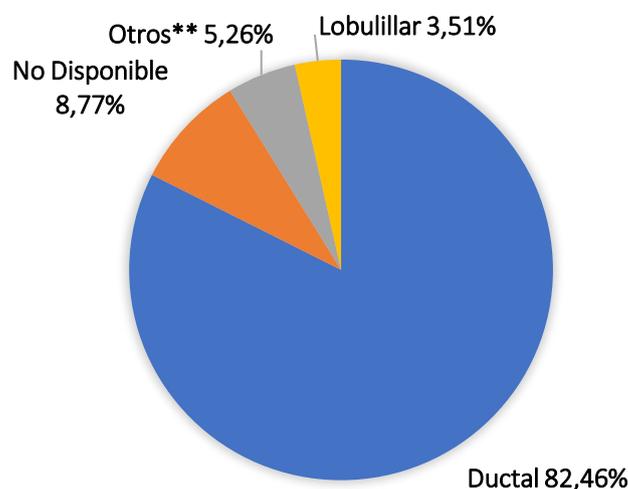


Figura 24: Distribución histológica de los 57 cánceres de mama\* en la muestra de estudio con diagnóstico molecular (VP/VPP). No disponible: 5 pacientes cuya información sobre histología de cáncer de mama no estuvo disponible en las bases de datos de Selene® y Agora®. \*El valor total de 57 cánceres de mama se obtuvo considerando cada cáncer de mama bilateral como dos cánceres de mama unilaterales, al cual se sumó el cáncer de mama en varón, el cáncer de mama en los dos pacientes diagnosticados de cáncer de mama y ovario y la totalidad de los cánceres de mama unilaterales. Otros\*\*: engloba un carcinoma medular de mama, un carcinosarcoma de mama, un multifocal (lobulillar+ductal).

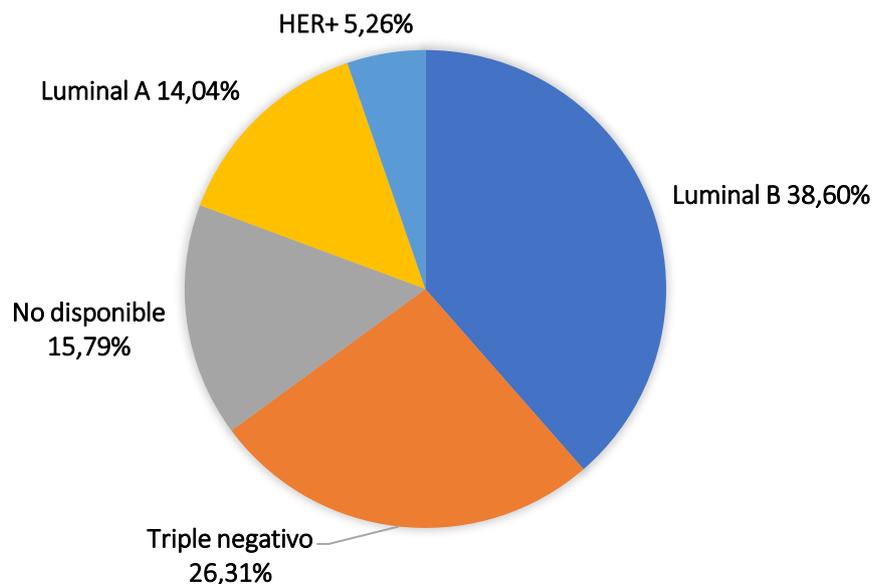


Figura 25: Distribución (%) de la clasificación molecular de los 57 cánceres de mama en la muestra de estudio con diagnóstico molecular (VP/VPP). No disponible: 9 pacientes cuya información sobre clasificación molecular de cáncer de mama no estuvo disponible en las bases de datos de Selene® y Agora®.

Histológicamente el cáncer de ovario predominante fue el cáncer de ovario seroso de alto grado (23/27; 85,18%) (Figura 26).

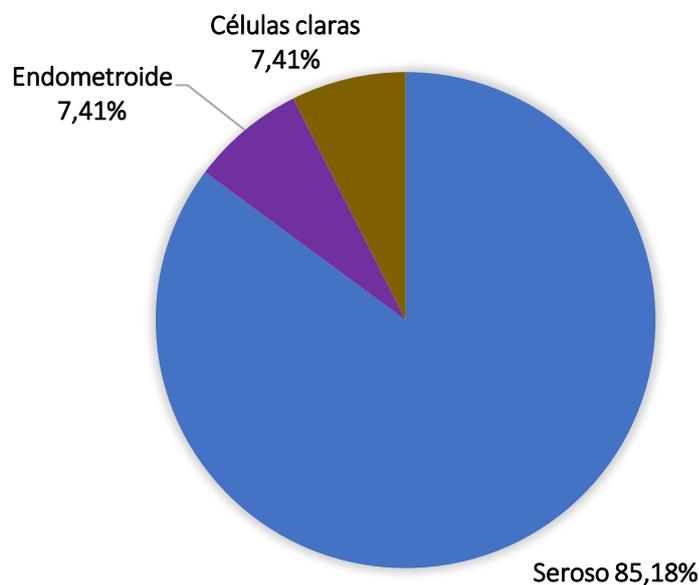


Figura 26: Distribución histológicas de los 27 cánceres de ovario\* en la muestra de estudio con diagnóstico molecular (VP/VPP). \*El valor total de los 27 cánceres de ovario se obtuvo considerando cada cáncer de ovario bilateral como dos cánceres de ovario unilaterales al cual, se sumó el cáncer de ovario en los dos pacientes diagnosticados de cáncer de mama y ovario y la totalidad de los cánceres de ovario unilaterales.

## 2. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL PANEL DE 20 GENES INDICADOS EN LA NCCN

De los 414 casos índices seleccionados, se estudiaron molecular y clínicamente los 20 genes accionables incluidos en la guía NCCN (versión 3.2019) y se pudo detectar un total de 65 VP/VPP en 63 casos índices, dos de ellos fueron portadores de dos VP/VPP, obteniéndose un rendimiento global de diagnóstico del 15,22% (63/414).

## 3. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LOS CRITERIOS DE LA SEOM 2019

Todos los casos índices seleccionados cumplieron al menos uno de los criterios de la SEOM 2019 (**Tabla 10** apartado 1.1 de metodología). Sin embargo, cabe destacar que la mayoría de los casos índices cumplieron más de un criterio llegando, a veces, a cumplir hasta cuatro criterios a la vez. Estos criterios se resumen en 3 grupos:

- Criterios individuales independientes de la historia familiar.
- Criterios familiares dependientes de familiares de 1er grado (padre, hijos, hermanos).
- Criterios familiares dependientes de familiares de segundo y tercer grado (primos, abuelos, nietos) de una misma rama familiar.

En la **Figura 27** se detalla el flujo de trabajo que se siguió para desglosar los criterios de selección de la SEOM 2019 (**Figura 27A**) así que el rendimiento diagnóstico de cada uno de los grupos de criterios de selección (**Figura 27B**).

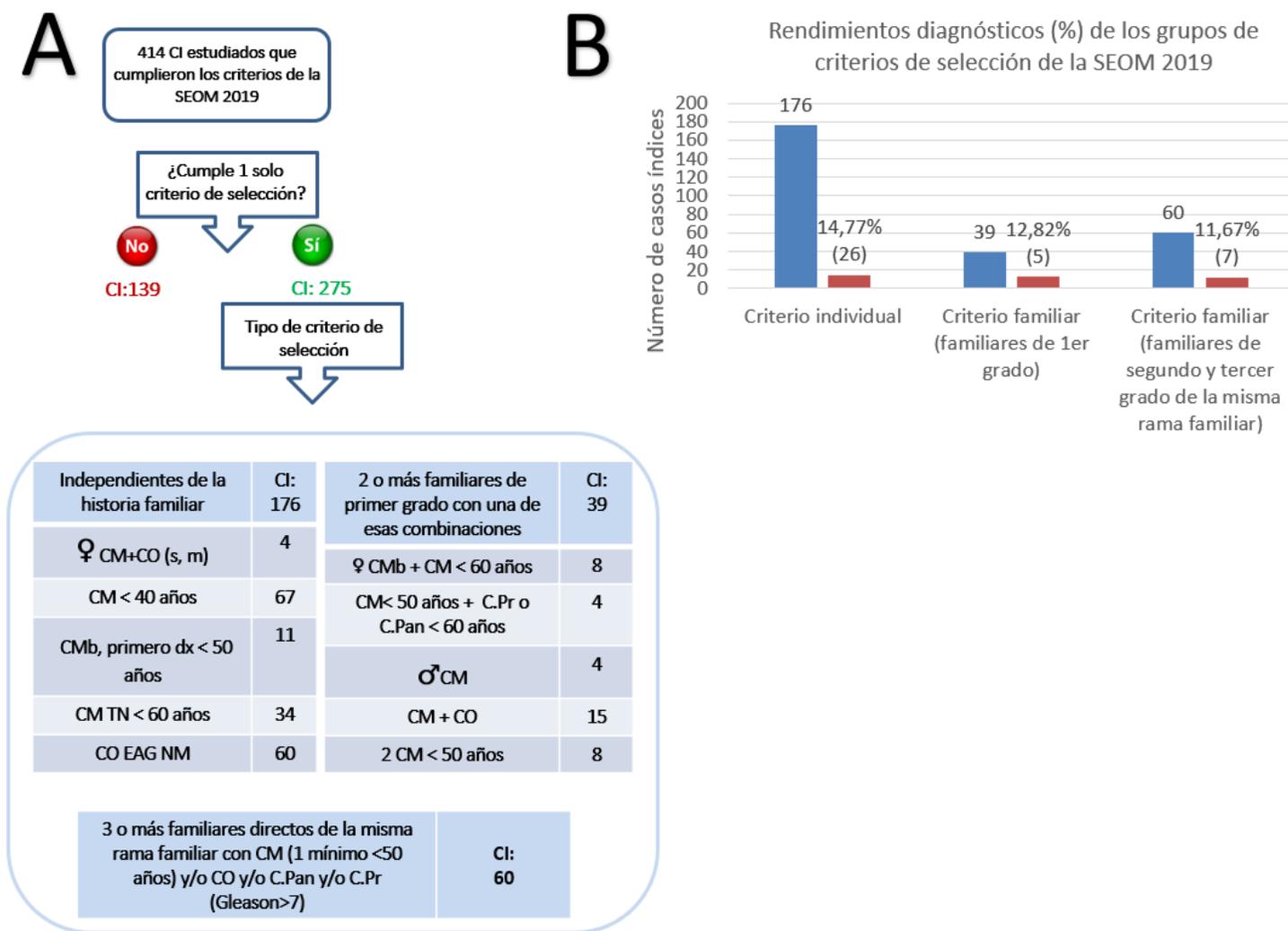


Figura 27: Flujo de trabajo y rendimiento de los grupos de los criterios de selección de la SEOM 2019. CI: Caso índice; CM: Cáncer de Mama; CO: Cáncer de Ovario; S: sincrónico; M: metacrónico; Cmb: Cáncer de Mama bilateral; Dx: diagnosticado; TN: Triple Negativo; CO EAG NM: Cáncer de Ovario Epitelial de Alto Grado No Mucinoso; C.Pr: Cáncer de Próstata; C.Pan: Cáncer de Páncreas \* Cáncer de mama premenopáusico: cáncer de mama diagnosticado <50 años.

Se seleccionaron aquellos casos índices que únicamente cumplieron un criterio de selección de la SEOM y, de esta forma, obtener el rendimiento diagnóstico de cada grupo de criterio. El grupo de criterio con mayor rendimiento diagnóstico fue el grupo de criterios individuales independientes de la historia familiar (26VP-VPP/176; 14,77%), seguido del grupo de criterios familiares dependientes de familiares de primer grado, y el grupo de criterio con el rendimiento diagnóstico más bajo fue el grupo de criterios dependientes de familiares de segundo y tercer grado de la misma rama familiar (7VP-VPP/60; 11,67%). Además, se evaluaron uno por uno, todos los criterios que forman los 3 grupos de criterios de la SEOM 2019. En este sentido, cabe destacar que los casos índices con cáncer de mama y ovario sincrónico o metacrónico fueron los pacientes con mayor rendimiento diagnóstico (2VP-VPP/4; 50%). El segundo criterio con mayor rendimiento diagnóstico se atribuyó a los casos índices con un familiar de primer grado (o más) con un cáncer de mama bilateral más otro cáncer de mama antes de 60 años (2VP-VPP/8; 25%) y aquellos casos índices con un familiar de primer grado varón diagnosticado de cáncer de mama (1VP-VPP/4; 25%). El tercer criterio con mayor rendimiento diagnóstico fue el de los pacientes con cáncer de ovario (14VP-VPP/60; 23,33%). Los casos índices con un cáncer de mama diagnosticados <50 años y un familiar de 1er grado con cáncer de mama diagnosticados <50 años tuvieron un rendimiento diagnóstico de 12,5% (1VP-VPP/8). En los criterios de selección individuales específicos del cáncer de mama, el rendimiento diagnóstico de los pacientes con cáncer de mama <40 años fue de 10,45% (7VP-VPP/67), mientras que con un rendimiento un poco más bajo, se situaron aquellos casos índices con cáncer de mama bilateral el primero diagnosticado <50 años (1VP-VPP/11; 9,09%). Por último, el rendimiento más bajo para esta subcategoría se halló en aquellos casos índices con cáncer de mama TN con < 60 años (2VP-VPP/34; 5,88%). Por otro lado, la presencia de un cáncer de mama y cáncer de ovario en dos familiares de primer grado supuso un rendimiento diagnóstico del 6,67% (1VP-VPP/15), mientras que la presencia de, por lo menos, un cáncer de mama premenopáusico (<50 años) y/o cáncer de ovario y/o cáncer próstata (Gleason>7) y/o cáncer de páncreas en el caso índice y 2 familiares de segundo y tercer grado de la misma rama familiar, implicó un rendimiento diagnóstico del 11,67% (7VP-VPP/60). No se detectó ninguna VP/VPP en casos índices con familiares de primer grado con cáncer de mama <50 años y cáncer de páncreas o próstata <60 años. Se descartaron los siguientes criterios individuales: mutación somática en *BRCA* frecuencia alélica >30%; cáncer de mama HER2- metastásico y *PARP*+; ancestro con mutación fundadora, puesto que no hubo ningún caso índice que cumplió uno de estos tres criterios. En la **Figura 28** se detallan las tasas de detección de cada uno de los criterios de la SEOM 2019.

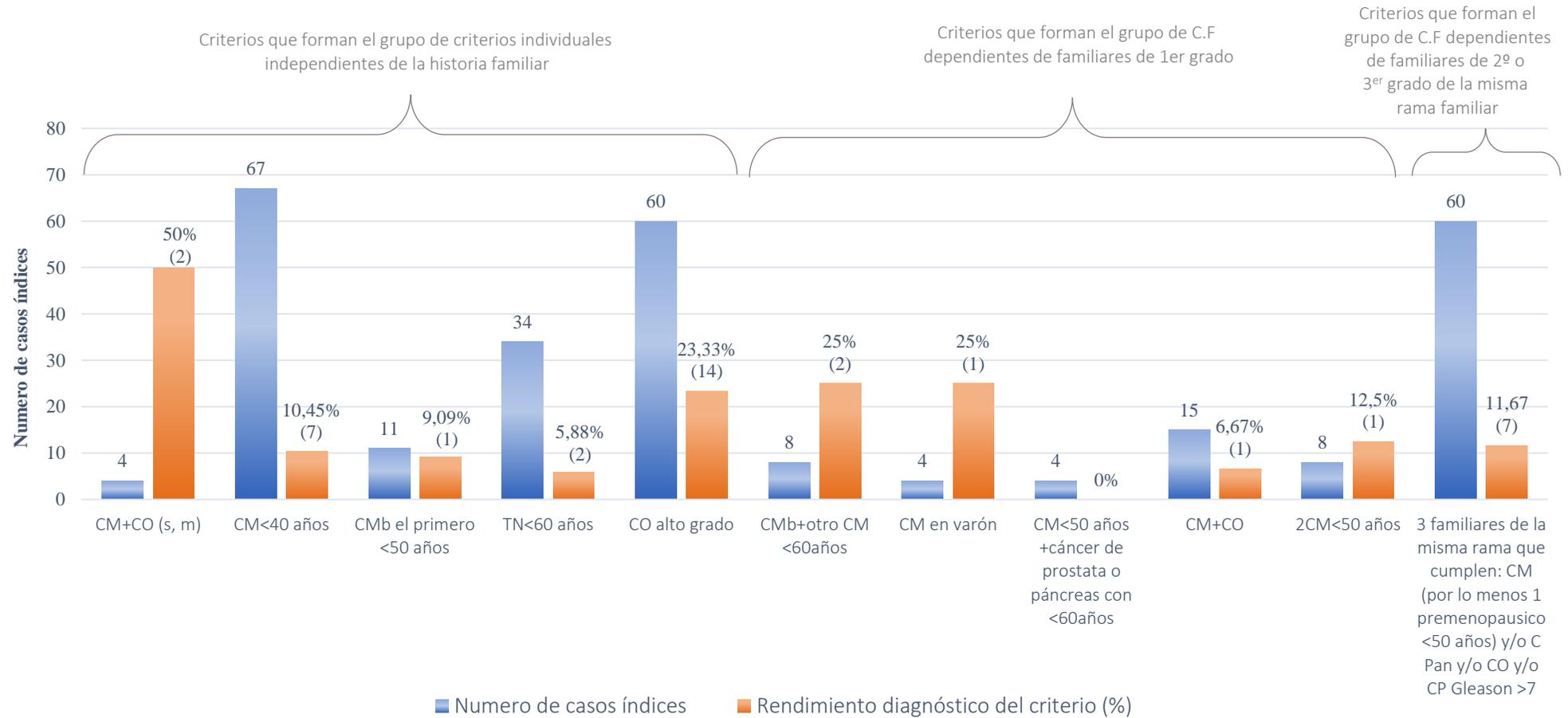


Figura 28: Tasa de detección (%) de cada uno de los criterios que forman los 3 grupos de criterios de selección de la SEOM 2019. CM: Cáncer de Mama; CMB: Cáncer de Mama Bilateral; TN: Triple Negativo; CO: Cáncer de Ovario, C Pan: Cáncer de Páncreas; CP: Cáncer de Próstata; s: sincrónico; m: metacrónico; C.F: Criterios Familiares. Número entre paréntesis corresponde a los casos índices que cumplen criterio y que son portadores de VP/VPP.

#### 4. CONTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS VP/VPP DETECTADAS EN LOS GENES CLÍNICAMENTE ACCIONABLES EN PACIENTES CON SCMOH

##### 4.1. Contribución de las VP/VPP identificadas en los genes clínicamente en pacientes con SCMOH

Se hallaron 49 VP/VPP distintas, de las cuales 11 fueron diagnosticadas en más de un caso índice. Así que, de los 414 casos índices seleccionados, 63 fueron portadores de VP/VPP, de los cuales dos fueron portadores de dos VP/VPP (*BRCA1* y *BRCA2* en uno de ellos, y *ATM* y *CHEK2* en el otro), por lo cual en total, se detectaron 65 VP/VPP. Los genes *BRCA1/2* sumaron más de la mitad de las VP/VPP, concretamente 37 (18 VP/VPP en *BRCA1* y 19 VP/VPP en *BRCA2*), lo que equivale a casi el 56,92% (37/65) del total de las VP/VPP detectadas, obteniéndose un rendimiento global de casi el 9% (37/414). En cuanto a los genes no *BRCA*, se detectaron 28 VP/VPP en los siguientes genes: *ATM* (10), *CHEK2* (7), *BRIP1* (2), *NF1* (1), *PMS2* (1), *RAD51C* (1), *PALB2* (1), *RAD51D* (3) y *TP53* (2). La **Figura 29** detalla el rendimiento (%) de cada gen detectado en el panel de 20 genes de la cohorte estudiada.

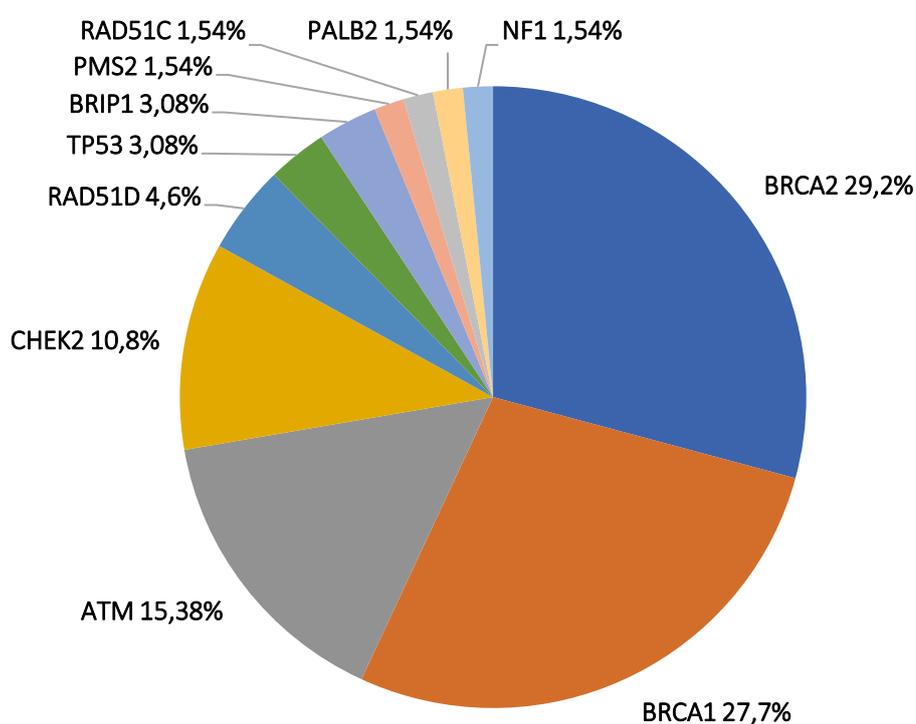


Figura 29: Rendimiento diagnóstico (%) de cada uno de los 20 genes de la NCCN versión 3.2019 estudiados en la muestra.

#### 4.2. Caracterización de las VP/VPP detectadas en los genes clínicamente accionables en pacientes con SCMOH

Las variantes de tipo FS fueron las más detectadas con un total de 29/65 (44,62%). Las variantes de tipo IF fueron las minoritarias ya que se detectó solo una en el gen *ATM*. En cuanto a los RG, se detectaron en total tres RG patogénicos: dos en el gen *BRCA1* (una deleción del exón 19 y otra deleción de los exones 16 al 23) y uno en el gen *PALB2* (deleción de exones 7-11). La **Figura 30** detalla los diferentes tipos de VP/VPP encontradas en el estudio.

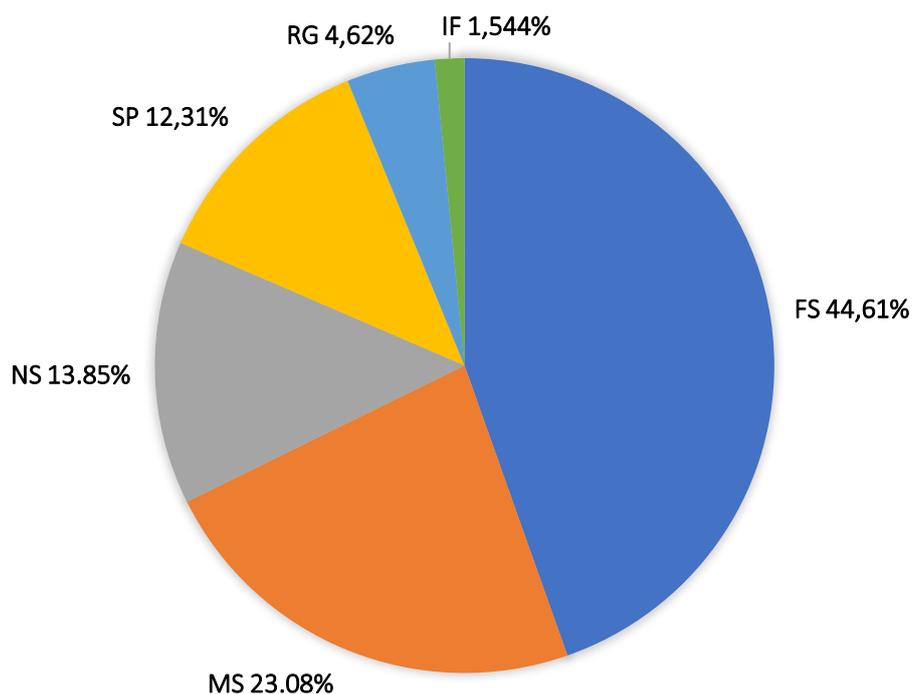


Figura 30: Distribución (%) de los diferentes tipos de VP/VPP detectadas en el estudio. FS: *Frameshift*; MS: *Missense*; NS: *Nonsense*; SP: *Splicing*; RG: Reordenamiento Génico; IF: *Inframe*.

En la **Tabla 15** se detalla para cada VP/VPP: el cambio de proteína generado, el exón donde se sitúa la variante o el intrón (en caso de variantes de tipo *splicing*), el tipo de mutación producida, criterios empleados para clasificación clínica de las variantes según la ACMG y clasificación clínica de ClinVar y HGMD.

Gen	VP/VPP detectadas	Proteína	Tipo de mutación	Exón/intrón	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación ClinVar / HGMD + ID
<b>BRCA1</b>	c.70_73dup	p.(Pro25LeufsTer17)	FS	Ex2	rs397509310	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CI994465
	c.181T>G *	p.(Cys61Gly)	MS	Ex4 (5)	rs28897672	PP5, PS3, PM5, PP3, PM1, PM2	VP*** / VP CM940172
	c.211A>G * <sup>o</sup> (2)	p.(Phe46_Arg71del) p.(Cys64Ter)	MS	Ex4 (5)	rs80357382	PP3, PP5, PM5, PM1, PM2	VP*** / VP CM994455
	c.212+1G>A <sup>1</sup> (2)	p.(Phe46_Arg71del) p.(Cys64Ter)	SP	In4-5 (5-6)	rs80358042	PP3, PP5, PM5, PM1, PM2	VP*** / VP CS951355
	c.798_799del *	p.(Ser267LysfsTer19)	FS	Ex10 (11)	rs80357724	PVS1, PM1, PM2, PP3, PP5	VP*** / VP CD951604
	c.835del (2)	p.(Hys279MetfsTer19)	FS	Ex10 (11)	rs80357523	PVS1, PM1, PM2, PP5	VP*** / VP CD109554
	c.1016dup *	p.(Val340GlyfsTer6)	FS	Ex10 (11)	rs80357569	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CI941840
	c.1651_1652ins	p.(Ser551ThrfsTer4)	FS	Ex10 (11)	rs886039961	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CI1828526
	c.3583del	p.(His1195IlefsTer15)	FS	Ex10 (11)	rs273900710	PVS1, PM1, PM2	VP*** / VP CI1828526
	c.3756_3759del	p.(Ser1253ArgfsTer10)	FS	Ex10 (11)	rs80357868	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CD941618
	c.4357+1del <sup>1</sup>	p.(Arg1397TyrfTer2) p.(Ala1453GlnfsTer3)	SP	In12-13 (13- 14)	rs397509165	PVS1, PP5, PM2	VP / VP CD057385
	c.(4675+1_4676- 1)_(5467+1_5468-1)del Ex16-23del	-	RG	Ex15-22 (16- 23)	-	-	ND / VP CG0910161
	c.5123C>A * <sup>o</sup>	p.(Asp1692Gly, Ala1693_Trp1718del) p.(Ala1708Glu)	MS	Ex17 (18)	rs28897696	PM1, PM5, PM2, PP3	VP*** / VP CM950153
	c.(5152+1_5153- 1)_(5193+1_5194-1)del ex19del	-	RG	Ex18 (19)	-	-	ND / VP CG094320
c.5324T>G	p.(Met1775Arg)	MS	Ex20 (21)	rs41293463	PM1, PM2, PP3, PP5, PM5, BP1	VP*** / VP CM950157	

Gen	VP/VPP detectadas	Proteína	Tipo de mutación	Exón/intrón	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación ClinVar / HGMD + ID
<b>BRCA2</b>	c.658_659del	p.(Val220IlefsTer4)	FS	Ex8	rs80359604	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CD984134
	c.1310_1313del *	p.(Lys437IlefsTer22)	FS	Ex10	rs80359277	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CD972071
	c.1608dup	p.(Glu537Ter)	NS	Ex10	rs276174811	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CI086614
	c.2701del (2)	p.(Ala902LeufsTer2)	FS	Ex11	rs397507637	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CD087314
	c.3847_3848del	p.(Val1283LysfsTer2)	FS	Ex11	rs80359405	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CD961852
	c.4631dup	p.(Asn1544LysfsTer4)	FS	Ex11	rs80359460	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CI076939
	c.4936_4939del	p.(Glu1646GlnfsTer23)	FS	Ex11	rs80359473	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CD043795
	c.5073dup (2)	p.(Trp1692MetfsTer3)	FS	Ex11	rs80359479	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CI011228
	c.6486_6489del	p.(Lys2162AsnfsTer5)	FS	Ex11	rs80359598	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CD982506
	c.7007G>A <sup>o</sup>	p.(Arg2336His) p.(Gly2313AlafsTer40)	MS	Ex13	rs28897743	PP5, PS3, PM5, PP3, PM2	VP*** / VP CM053138
	c.7234_7235insG *	p.(Thr2412SerfsTer2)	FS	Ex14	rs397507906	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CI122532
	c.9026_9030del * (2)	p.(Tyr3009SerfsTer7)	FS	Ex23	rs80359741	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CD961862
c.9117G>A <sup>o</sup> (4)	p.(Pro3039Pro) p.(Val2985GlyfsTer4)	MS	Ex23	rs28897756	PP5, PP3, PM2	VP / VP CM156808	
<b>ATM</b>	c.3402+3A>C	p.(Arg1095SerfsTer22)	SP	In23-24	rs786203688	PP3, PM2, PP5	VUS-VPP / VP CS228098
	c.3576G>A <sup>o</sup>	p.(Lys1192Lys) p.(Ser1135_Lys1192del)	MS	Ex24	rs587776551	PS3, PP5, PP3, PM2	VP / VP CS961477
	c.3802del	p.(Val1268Ter)	NS	Ex26	rs587779834	PVS1, PP5, PM2	VP / VP CD961800

Gen	VP/VPP detectadas	Proteína	Tipo de mutación	Exón/intrón	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación ClinVar / HGMD + ID
<b>ATM</b>	c.4396C>T	p.(Arg1466Ter)	NS	Ex29	rs730881369	PVS1, PP5, PM2	VP / VP CM990210
	c.5188C>T	p.(Arg1730ter)	NS	Ex35	rs764389018	PVS1, PP5, PM2	VP-VPP / VP CM990211
	c.7638_7646del	p.(Arg2547_Ser2549del)	IF	Ex52	rs587776547	PS3, PM4, PM2	VP-VPP / VP CD961812
	c.8251_8254del (4) *	p.(Thr2751SerfsTer54)	FS	Ex56	rs786202120	PVS1, PP5, PM2	VP / VP CD121260
<b>CHEK2</b>	c.349A>G (2)	p.(Arg117Gly)	MS	Ex3	rs28909982	PP5, PS3, PP3, PM2, BP1	VP-VPP / VP CM023898
	c.433C>T	p.(Arg145Trp)	MS	Ex3	rs137853007	PP5, PM5, PP3, PM2	VPP / VP CM013593
	c.470T>C	p.(Ile157Thr)	MS	Ex4	rs17879961	PS3, PP5, PM5, BS3, BS1, BP4	Conflict / VP CM194385
	c.715G>T	p.(Glu239Ter)	NS	Ex6	rs121908702	PVS1, PP5, PM2	VP / VP CM030422
	c.792_792+1insCT	p.(Asp265LeufsTer11)	FS	Ex6	ND	PVS1, PM2	ND / ND
	c.1100del*	p.(Thr367MetfsTer15)	FS	Ex11	rs555607708	PVS1, PP5, PM2	Conflict / VP CD993415
<b>PMS2</b>	c.400C>T	p.(Arg134Ter)	NS	Ex5	rs63750871	PVS1, PP5, PM2	VP*** / VP CM950967
<b>RAD51C</b>	c.905-2_905-1del	p.(Glu303Trpfster41)	SP	In6-7	rs587781995	PVS1, PP5, PM2	VP-VPP / VP CD159246
<b>RAD51D</b>	c.694C>T (3)	p.(Arg232Ter)	NS	Ex8	rs587780104	PVS1, PP5	VP / VP CM128411
<b>TP53</b>	c.334_364dup	p.(Val122GlyfsTer37)	FS	Ex4	rs1555526495	PVS1, PP5, PM2	VP / VP CN1819065
	c.375+2T>C	p.(Gly59ValfsTer23)	SP	In4-5	rs1555526469	PVS1, PP5, PM2	VPP / VP CS147127
<b>PALB2</b>	c.(2586+1_2587-1) (3201+1_3202-1)del ex7-11del	p.(Asn863_Met1067del)	RG	Ex7-11	-	-	ND / VP CG119359

Gen	VP/VPP detectadas	Proteína	Tipo de mutación	Exón/intrón	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación ClinVar / HGMD + ID
<b>BRIP1</b>	c.206-2A>G (2)	-	SP	In3-4	rs786203700	PVS1, PM2, PP5	Conflicto / VP CS1616248
<b>NF1</b>	c.4643_4644dup	p.(Glu1549LeufsTer5)	FS	Ex34	ND	PVS1, PM2	ND / ND

Tabla 15: Caracterización de las VP/VPP obtenidas en los genes clínicamente accionables en el estudio. VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; VP\*\*\*: Variante Patogénica confirmada por panel de expertos en ClinVar; FS: *Frameshift*; SP: *Splicing*; MS: *Missense*; NS: *Nonsense*; IF: *Inframe*; Ex: exón; In: intrón; ID: número de identificación en la base de datos HGMD; ND: No Disponible. Los transcritos empleados se encuentran en el **Anexo 3**. Los números entre paréntesis cerca de las VP/VPP indican el número de casos índices portadores de dichas VP/VPP. \*Mutaciones con efecto fundador (96) (97) (98) (99) (100) (101) (86) (102) (84) (103) (104); <sup>o</sup> las mutaciones de tipo MS pero que al estar en borde exón-intrón alteran el proceso de *splicing* (105) (106) (107) (108); <sup>1</sup> la mutaciones de tipo *splicing* que generan 2 transcritos aberrantes (105) (109). Los números entre paréntesis de los exones se refieren a la nomenclatura BIC (Núcleo de Información sobre cáncer de Mama o *Breast cancer Information Core*).

#### 4.3. Estudio de correlación genotipo-fenotipo de las VP/VPP detectadas en genes clínicamente accionable en pacientes con SCMOH

En el trabajo presente, se llevó a cabo un estudio genotipo-fenotipo para cada una de las VP/VPP detectada. En La **Tabla 16** se muestra para cada VP/VPP la edad media del cáncer diagnosticado, el tipo de cáncer, el subtipo molecular y la histopatológica cuando se trata de cáncer de mama y la clasificación histopatológica en el caso de cáncer de ovario, mientras que en la **Figura 31** se describe para cada gen el número de casos índices portadores de VP/VPP con el tipo de tumor desarrollado.





Gen	VP/VPP	Tipo de mutación	Numero de familia	Edad media		Tumor del caso índice						Histopatología del CM **				Subtipo molecular del CM				Histopatología del CO						
				CM	CO	Tipo de cáncer						Du	Me	Lo	Otro	LA	LB	HER2	TN	Ser	Otro					
						CM	CMb	CMV	CM+CO	CO	Otro tipo de cáncer															
<b>BRCA2</b>	c.9117G>A (4)	MS	F2066		74						1b										1 (papilar)					
			F1943	40		1							1									1				
			F2357			1								1								1				
			F2160			1								1								1				
<b>ATM</b>	c.3402+3A>C	SP	F2128	49		1										1										
	c.3576G>A	MS	F1963	36		1										1										
	c.3802del	NS	F2249 <sup>o</sup>	51			1 (sincrónico)									1										
																1										
	c.4396C>T	NS	F2286	29		1										1										
	c.5188C>T	NS	F2214	38		1										1										
	c.7638_7646del	IF	F2499		59						1											1				
	c.8251_8254del (4)	FS	F1957	45			1 (metacrónico)																			
							34 años								1				ND	ND	ND	ND				
							46 años																			
							1									1										
<b>CHEK2</b>	c.349A>G (2)	MS	F2232	52		1										1										
			F2441			1 (metacrónico)																				
						39 años																				
	c.433C>T	MS	F2487	41		1																				
c.470T>C	MS	F2045	50		1																1					

Gen	VP/VPP	Tipo de mutación	Numero De familia	Edad media		Tumor del caso índice						Histopatología del CM **				Subtipo molecular del CM				Histopatología del CO			
				CM	CO	Tipo de cáncer						Du	Me	Lo	Otro	LA	LB	HER2	TN	Ser	Otro		
						CM	CMb	CMV	CM+CO	CO	Otro tipo de cáncer												
<b>CHEK2</b>	c.715G>T	NS	F829	46,5		1 (metacrónico)																	
						40 años						ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				
	c.792_792+1insCT	FS	F2249 ♀	51		53 años																	
						1 (sincrónico)						1				1							
<b>PMS2</b>	c.1100del	FS	F1978	57		1																	
<b>PMS2</b>	c.400C>T	NS	F2004		43					1b												1	
<b>RAD51C</b>	c.905-2_905-1del	SP	F1883		62					1												1	
<b>RAD51D</b>	c.694C>T (3)	NS	F1789	54		1 (metacrónico)																	
						39 años						ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				
						80 años						1							1				
		F2513				1																	
	F1992				48					1												1 (papilar)	

Gen	VP/VPP	Tipo de mutación	Numero De familia	Edad media		Tumor del caso índice						Histopatología del CM **				Subtipo molecular del CM				Histopatología del CO		
				CM	CO	CM	CMB	CMV	CM+CO	CO	Otro tipo de cáncer	Du	Me	Lo	Otro	LA	LB	HER2	TN	Ser	Otro	
TP53	c.334_364dup	FS	F1969	35		1							1						1			
	c.375+2T>C	SP	F2408	30		1							1					1				
PALB2	c.(2586+1_2587-1)(3201+1_3202-1)del ex7-11del	RG	F2440		85						1									1		
BRIP1	c.206-2A>G (2)	SP	F2339	43		1							1						1			
			F2470			1 (sincrónico)							1					1				
													1					1				
NF1	c.4643_4644dup	FS	F2502		33						1b									1 (papilar)		

Tabla 16: Estudio genotipo-fenotipo de las VP/VPP detectadas en el panel de 20 genes. VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; CM: Cáncer de Mama; CO: Cáncer de Ovario; CMB: Cáncer de Mama Bilateral; CMV: Cáncer de Mama en Varón; CM+CO: Cáncer de Mama + Cáncer de Ovario; Du: ductal; Me: medular; Lo: lobulillar; LA: Luminal A; LB: Luminal B; TN: Triple negativo; Ser: seroso; FS: *Frameshift*; SP: *Splicing*; MS: *Missense*; NS: *Nonsense*; IF: *Inframe*; ND: No Disponible; 1b: cáncer de ovario bilateral; F: familia. Los números entre paréntesis cerca de las VP/VPP indican la frecuencia con la cual se ha encontrado dichas variantes. \* Este caso índice fue portador de dos mutaciones patogénicas una en *BRCA1* y otra en *BRCA2*. <sup>o</sup> Este caso índice fue portador de dos mutaciones patogénicas una en el gen *ATM* y otra en el gen *CHEK2*. \*\* Todos los cánceres de mama ductales como lobulillares fueron invasivos, a la excepción de la F2232, F2487 que fueron *in situ*.

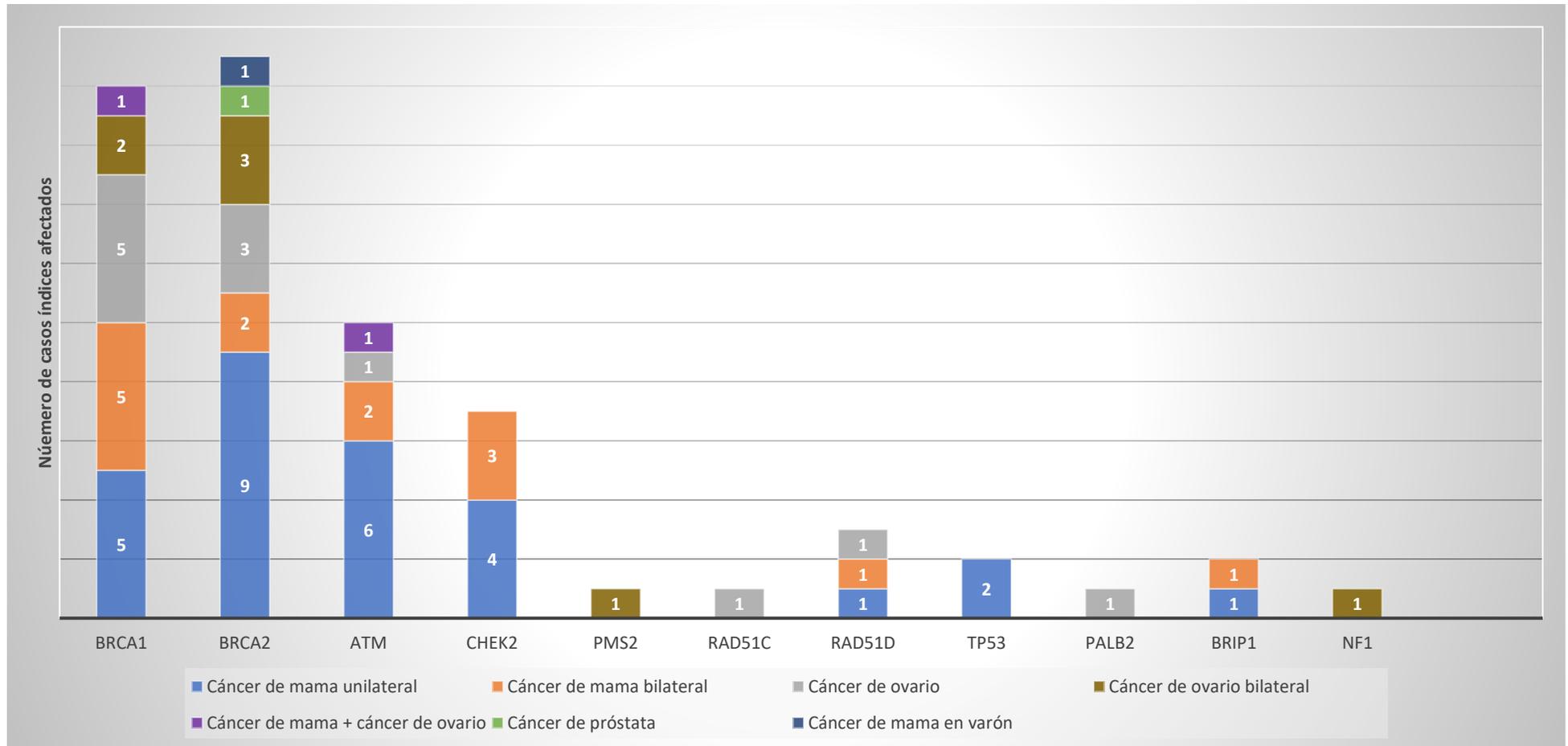


Figura 31: Fenotipo de los casos índices portadores de VP/VPP en los distintos genes de accionabilidad clínica detectados en la cohorte del estudio. Destacan dos casos índices con doble VP/VPP, el primero con cáncer de mama bilateral y portador de VP/VPP en *ATM* y *CHEK2*, el segundo con cáncer de ovario y portador de VP/VPP en *BRCA1* y *BRCA2*.

A continuación, para cada VP/VPP detectada en cada uno de los genes de accionabilidad clínica se llevará a cabo una descripción detallada de las características moleculares de estas variantes, de su categorización molecular y descripción fenotípica de los casos índices portadores de dicha VP/VPP así como un resumen genotipo-fenotipo.

#### *4.3.1 Variantes patogénicas detectadas en BRCA1*

El gen *BRCA1* fue el segundo gen más prevalente en el estudio, detectándose VP/VPP en 18 casos índices, las cuales fueron muy variadas desde punto de vista molecular destacando las de tipo FS, MS, NS, *splicing* y RG. Fenotípicamente el cáncer predominante fue el de mama. La **Figura 32** esquematiza todas las variantes encontradas en este gen.

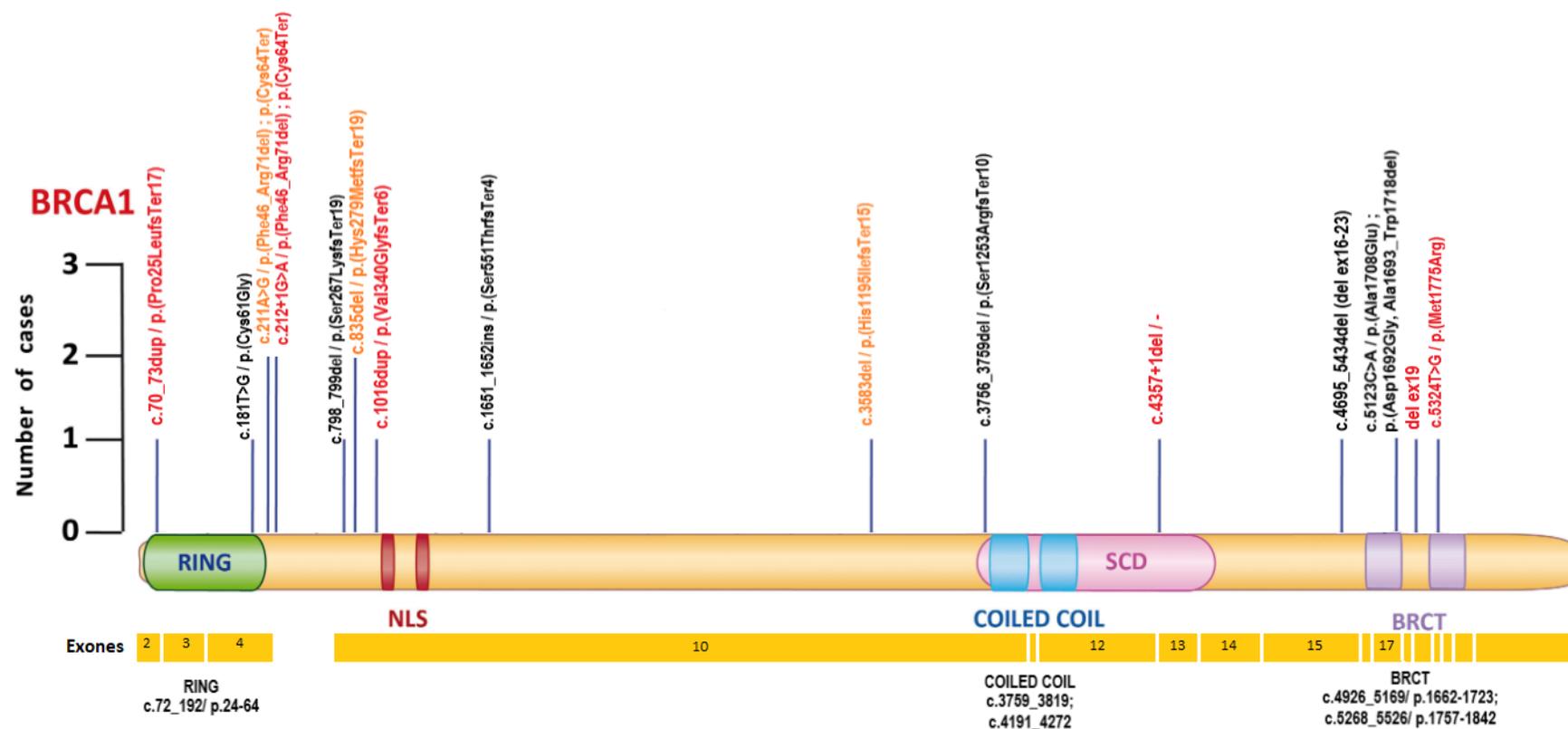


Figura 32: Distribución de las VP/VPP sobre el gen *BRCA1* y sus principales dominios. Las variantes en rojo indican expresión fenotípica de cáncer de mama, las variantes en negro indican expresión fenotípica de cáncer de ovario, las variantes en naranja indican expresión fenotípica de cáncer de mama y ovario. Figura modificada de *Stella et al* (110). Las localizaciones proteicas de los dominios *RING* y *BRCT* se obtuvieron de la herramienta informática *Mutation Mapper-cBioPortal for Cancer Genomics* ([https://www.cbioportal.org/mutation\\_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab](https://www.cbioportal.org/mutation_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab)), la localización genómica del dominio *COILED COIL* se obtuvo de *Rebbeck et al* (111).

- **c.70\_73dup**

- o Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.70\_73dup, conocida también como c.189insTGTC (según la nomenclatura BIC del Núcleo de Información sobre cáncer de Mama o *Breast Cancer Information Core*), consiste en una duplicación de la secuencia (ACAG) en el exón 2 del gen *BRCA1*, dando lugar a una alteración del marco de lectura generando un codón de parada en la posición 17, lo que induce a la formación de una proteína truncada con la consiguiente pérdida de todos los dominios funcionales de la proteína *BRCA1* (**Figura 32**).

Clasificada como VP según la ACMG ya que cumple los siguientes criterios: PVS1, PP5 y PM2 (**Tabla 15**). Además, ha sido clasificada por ClinVar como VP con 3 estrellas, lo que significa que ha sido revisada y confirmada como patogénica por un panel de expertos.

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer que desarrolló un cáncer de mama bilateral metacrónico, el primero a los 68 años de edad y fue de tipo ductal TN, el segundo a los 75 años y se clasificó como ductal LB (**Tabla 16**).

- **c.181T>G**

- o Descripción molecular y categorización clínica

También conocida como c.300T>G (BIC), es una mutación puntual en la cual una guanina reemplaza una timina en el exón 4 del gen *BRCA1*, haciendo que se produzca el cambio del aa original muy conservado que es la cisteína a glicina en la posición 61 (**Figura 32**). Estos dos aa tienen características bioquímicas distintas y, como consecuencia, se produce una alteración de la oligomerización del dominio *RING* de *BRCA1*, haciendo que por una parte, se produzca un fallo de reparación del ADN por recombinación homóloga, y por otra parte, se impida la unión de *BRCA1* a *BARD1* inhibiendo la actividad E3 ubiquitina ligasa y su papel como supresor tumoral (112) (113) (114).

Considerada como una mutación fundadora típica de la población judía askenazí y Europa del este y central (Polonia, República Checa, Austria, Hungría, Bela Rusia y Alemania) (110), esa variante ha sido clasificada como VP por ClinVar con 3 estrellas, y por Varsome también al cumplir con los siguientes criterios de ACMG: PP5, PS3, PM5, PP3, PM1, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer que fue diagnosticada a los 47 años de un cáncer de ovario de tipo epitelial de células claras de alto grado (**Tabla 16**).

- **c.211A>G**

- Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.211A>G o también c.330A>G (BIC), consiste en una mutación puntual en la cual se cambia una adenina por una guanina en el exón 4 del gen *BRCA1*; al encontrarse a -2 pb del sitio dador de *splicing*, tiene como resultado la producción de dos transcritos aberrantes. El primer transcrito se comprobó por RT-PCR que altera el proceso de *splicing* y genera la pérdida de 22 pb en el exón 4, dando lugar a un codón de parada en la posición 64; el segundo, produce la delección del exón 4 por completo con la pérdida de 25 aa que codifica, en concreto, desde la fenilalanina que se encuentra en la posición 46 hasta la arginina de la posición 71, afectando así al dominio *RING* (115) (97) (105) (**Figura 32**).

El cambio c.211A>G es una variante con efecto fundador de origen español (Galicia) (97), siendo clasificada como VP por ClinVar con 3 estrellas y por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PP3, PP5, PM5, PM1, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

En la muestra estudiada, dos casos índices fueron portadores de esa VP: el primero fue una mujer diagnosticada a los 42 años, de cáncer de mama medular TN, y el otro fue una mujer diagnosticada a los 67 años de un cáncer de ovario tipo epitelial seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **c.212+1G>A**

- Descripción molecular y categorización clínica

Conocida también como c.331+1G>A (BIC) o IVS4+1G>A, IVS5+1G>A; se produce en un sitio dador de *splicing*, concretamente en el primer nucleótido del intrón 4-5 (intrón entre el exón 4 y exón 5), donde se genera un cambio de guanina por adenina produciendo dos tipos de transcritos aberrante, el primero consiste en una pérdida de 22 pb en el exón 4, como resultado genera un codón de parada en la posición 64, mientras que el segundo implica la delección del exón 4 por completo con la pérdida de 25 aa, en concreto, desde la fenilalanina que se encuentra en la posición 46 hasta la arginina de la posición 71, alterando así el dominio *RING* (105) (**Figura 32**).

La variante c.212+1G>A ha sido clasificada como VP por ClinVar con 3 estrellas, y también ha sido clasificada por Varsome como VP al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PP3, PP5, PM5, PM1, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

Dos casos índices en nuestro estudio fueron portadores de esta VP, los dos fueron mujeres con cáncer de mama tipo ductal TN, la edad media de diagnóstico de cáncer de mama para esta VP fue de 33,5 años (**Tabla 16**).

- **c.798\_799del**

- Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.798\_799del se puede encontrar en la bibliografía de varias formas (916delTT, 917\_918delTT, 917delTT según nomenclatura BIC), consiste en la delección de dos timinas entre la posición 798 y 799, en el exón 10 del gen *BRCA1*, produciendo así una alteración del marco de lectura que genera un codón de parada en la posición 19 con la pérdida parcial de dominios funcionales de la proteína *BRCA1* o, incluso, ausencia total de la proteína por mecanismo NMD (*Nonsense Mediated Decay*) que consiste en la degradación del ARN mensajero generado (**Figura 32**).

Es una variante con efecto fundador de origen norte africano (98) (86) categorizada como VP por ClinVar con 3 estrellas, como por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PM1, PM2, PP3, PP5 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer de origen marroquí, diagnosticada a los 36 años de un cáncer de mama ductal LB (**Tabla 16**).

- **c.835del**

- Descripción molecular y categorización clínica

Conocida también como 954delC, consiste en la pérdida de una citosina en la posición 835 del exón 10 del gen *BRCA1*, lo que da lugar a una alteración del marco de lectura. Como consecuencia, se genera un codón de parada en la posición 19, lo que se traduce en una proteína *BRCA1* truncada y no funcional o incluso ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 32**).

Esa variante ha sido clasificada por ClinVar como VP con 3 estrellas. Por otra parte, ha sido categorizada como VP según la ACMG al cumplir los siguientes criterios: PVS1, PM1, PM2, PP5 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

Dos casos índices fueron portadores de esa VP, el primero una mujer diagnosticada a los 37 años de cáncer de mama bilateral sincrónico con clasificación histológica y molecular idéntica en ambos senos (ductal, TN). El segundo caso índice fue una mujer diagnosticada a los 40 años de cáncer de ovario bilateral de tipo seroso de alto grado (**Tabla 16**).

#### - c.1016dup

- Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.1016dup, publicada también como 1129insA, 1135insA o 1135dupA (según nomenclatura BIC), es una duplicación de una adenina en la posición 1016 del exón 10 del gen *BRCA1*, produce un cambio de marco de lectura que genera un codón de parada en el codón 6, para dar lugar a una proteína *BRCA1* truncada y no funcional o incluso ausencia total de la proteína por mecanismo NMD (**Figura 32**).

Es una variante con efecto fundador de origen sueco y noruego (99), ha sido clasificada como VP con 3 estrellas por ClinVar y por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esa VP fue una mujer diagnosticada a los 34 años de un cáncer de mama bilateral sincrónico con clasificación histológica y molecular similar en ambos senos (ductal, TN) (**Tabla 16**).

#### - c.1651\_1652ins

- Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante está publicada también como 1770insC (BIC), consiste en la inserción de una citosina entre la posición 1651 y 1652 del exón 10 del gen *BRCA1*, lo que produce una alteración del marco de lectura, dando lugar a un codón de parada en el residuo 4, generando una proteína *BRCA1* truncada sin los importantes dominios funcionales *COILED COIL* y *BRCT* (**Figura 32**).

Ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas, y también por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esa VP fue una mujer diagnosticada a los 66 años de un cáncer de ovario seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **c.3583del**

- Descripción molecular y categorización clínica

Conocida también como 3700delC (BIC), consiste en una deleción de una citosina en la posición 3583 del exón 10 del gen *BRCA1*, esa deleción produce una alteración del marco de lectura formando un codón de parada en la posición 15 dando lugar a una proteína *BRCA1* no funcional o incluso ausencia total de la proteína por mecanismo NMD (**Figura 32**).

Ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas y por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PM1, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esa VP fue una mujer diagnosticada de cáncer de mama seguido de un cáncer de ovario transcurridos 7 años después. El cáncer de mama se diagnosticó a los 78 años, fue un cáncer de mama de histología muy poco frecuente (carcinosarcoma de mama) de clasificación molecular TN. Mientras que el cáncer de ovario, que se diagnosticó a los 85 años, fue un cáncer de ovario seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **c.3756\_3759del**

- Descripción molecular y categorización clínica

En la bibliografía puede aparecer como 3874del4, 3875\_3878delGTCT, 3875del4 según nomenclatura BIC. Consiste en la deleción de dos timinas, una guanina y una citosina entre la posición 3756 y 3759 del exón 10 del gen *BRCA1*, esa deleción produce una alteración del marco de lectura produciendo un codón de parada en el residuo 10 dando lugar a una proteína *BRCA1* truncada o incluso ausencia total de la proteína por mecanismo NMD (**Figura 32**).

Esta variante ha sido categorizada como patogénica en ClinVar con 3 estrellas y como patogénica en Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 44 años de cáncer de ovario seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **c.4357+1del**

- Descripción molecular y categorización clínica

Conocida también como IVS13+1delG IVS12+1delG, es una variante de tipo *splicing* que se origina en un sitio dador de *splicing*, concretamente en el primer nucleótido del intrón 12-13, e implica la delección de una guanina. Esta variante causa la delección de la guanina y del exón 12 generando una alteración del marco de lectura que se traduce en dos codones de parada, el primero en la posición 2 y el segundo en el residuo 3 de la proteína *BRCA1* convirtiendo así la proteína *BRCA1* en una proteína truncada no funcional (109) (**Figura 32**).

La variante c.4357+1del ha sido clasificada como patogénica según los siguientes criterios de ACMG: PVS1, PP5, PM2. Además, en ClinVar la categoriza como patogénica con dos estrellas, lo que significa que varios autores la han considerado como patogénica sin que haya ninguna discrepancia entre ellos (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice de la VP descrita fue una mujer diagnosticada a los 49 años de un cáncer de mama ductal TN (**Tabla 16**).

- **exon16-23del**

- Descripción molecular y categorización clínica

Esa variante génica es un RG, implica la delección del exón 16 hasta el exón 23 con la pérdida del dominio funcional BRCT importante para la proteína *BRCA1* en su función de reparación de ADN (**Figura 32**).

Esta variante se ha considerado como patogénica al ser vinculada en familias con SCMOH. En la publicación de *del Valle et al*, se describe una familia portadora de esta VP en la cual, el caso índice es una mujer diagnosticada de cáncer de ovario a los 70 años y sus dos hermanas diagnosticadas de cáncer de mama a los 70 años y de cáncer de ovario a los 50 años respectivamente, lo que demuestra que esa variante produce cosegregación familiar (116).

- Descripción clínica

El caso índice de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 52 años de un cáncer de ovario bilateral endometroide de alto grado (**Tabla 16**).

- **c.5123C>A**

- Descripción molecular y categorización clínica

Puede aparecer en la literatura también como c.5242C>A (BIC), siendo una mutación puntual en la cual se cambia una citosina por una adenina en el exón 17 del gen *BRCA1*, lo que produce el cambio del aa original muy conservado que es la alanina por un glutamato en la posición 1708. Estos dos aa tienen características bioquímicas opuestas, ya que el primero es alifático y apolar y el segundo es ácido y polar. Esta mutación altera la función de la proteína *BRCA1* a través a dos mecanismos: el primero, en el que se ha visto que el cambio del aa alanina por glutamato afecta al dominio funcional BRCT impidiendo su unión con sus principales ligandos (117), y el segundo, consiste en la delección del exón 17 que codifica una parte del dominio BRCT de la proteína *BRCA1* sin que se produzca una alteración del marco de lectura (105) (**Figura 32**).

Esta variante con efecto fundador de origen español y colombiano (100) (101) ha sido categorizada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas y ha sido clasificada de la misma forma por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PM1, PM5, PM2, PP3 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 54 años de cáncer de ovario seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **exon19del**

- Descripción molecular y categorización clínica

Es un RG en la cual se produce la delección del exón 19, que codifica los primeros aa del dominio BRCT de la proteína *BRCA1* (**Figura 32**).

Considerada como VPP, este RG se ha vinculado a familias con SCMOH (118) (119), incluso se ha relacionado con cáncer de mama bilateral a edad temprana (119).

- Descripción clínica

El caso índice portador de este RG, fue una mujer diagnosticada de cáncer de mama bilateral metacrónico, el primero a los 39 años (no se encontró la información en la base de datos sobre la clasificación histológica y molecular de dicho tumor), el segundo a los 53 años fue un cáncer de mama ductal y tampoco se consiguió la información relativa a la clasificación molecular de dicho tumor (**Tabla 16**).

- **c.5324T>G**

- Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante se conoce también como c.5443T>G (BIC), es una mutación puntual que implica el cambio de una timina por una guanina en la posición 5324 en el exón 20 del gen *BRCA1*. Este cambio produce el cambio de una metionina conservada por una arginina en el codón 1775, afectando al dominio BRCT de la proteína *BRCA1* (**Figura 32**). Estos dos aa tienen características bioquímicas muy distintas de tal forma que se ha comprobado que este cambio produce una pérdida de la función del dominio BRCT debido a que, por un lado, se inhibe la unión del dominio BRCT a la proteína helicasa (120), y por otro, la arginina, y al tener un tamaño más grande que la metionina chocaría con el anillo de fenilo de la posición 330 de la proteína CtIP (*C terminus-binding protein-interacting protein*) impidiendo la unión de BRCT con CtIP (121); de esta forma, la proteína *BRCA1* no puede llevar a cabo su proceso de reparación de ADN.

Esta variante se ha clasificado como patogénica con 3 estrellas por ClinVar y se ha categorizado de la misma forma por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PM1, PM2, PP3, PP5, PM5, BP1 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada de cáncer de mama bilateral metacrónico, el primero a los 52 años (no se pudieron obtener las informaciones relativas a la clasificación histológica y molecular por la no disponibilidad en la base de datos), el segundo a los 66 años fue un cáncer de mama ductal TN. Además, a la paciente se le diagnosticaron otros dos cánceres distintos a cáncer de mama u ovario, el primero fue rectal y el segundo pulmonar (**Tabla 16**).

### - Relación genotipo-fenotipo del gen *BRCA1*

En los pacientes portadores de VP/VPP en *BRCA1*, el cáncer de mama fue el predominante, de tal forma que de las 18 VP/VPP *BRCA1* obtenidas, 10 fueron de cáncer de mama (de los cuales 5 fueron bilaterales), 7 fueron cáncer de ovario (de los cuales 2 bilaterales). Destacar la variante c.3583del, cuyo caso índice sufrió un cáncer de mama y de ovario.

En porcentaje sería: 55.6% de cáncer de mama (27.8% bilateral), 38.9% de cáncer de ovario (11.1% bilateral), 5.5% cáncer de mama y ovario.

#### o Clasificación histológica del cáncer de mama en *BRCA1*

Para estudiar la clasificación histológica de los cánceres de mama obtenidos en los pacientes portadores de VP/VPP en *BRCA1* consideramos que cada cáncer de mama bilateral equivale a 2 unilaterales, por lo cual, el total de los cánceres de mama detectados en los portadores de VP/VPP en *BRCA1* fue de 16 (5 unilaterales más 10 de los 5 bilaterales, más 1 cáncer de mama en la paciente con cáncer de mama y ovario). De estos 16 cánceres de mama doce fueron ductales, un medular, y un carcinosarcoma. En dos de ellos no se pudo obtener la información (**Figura 33**).

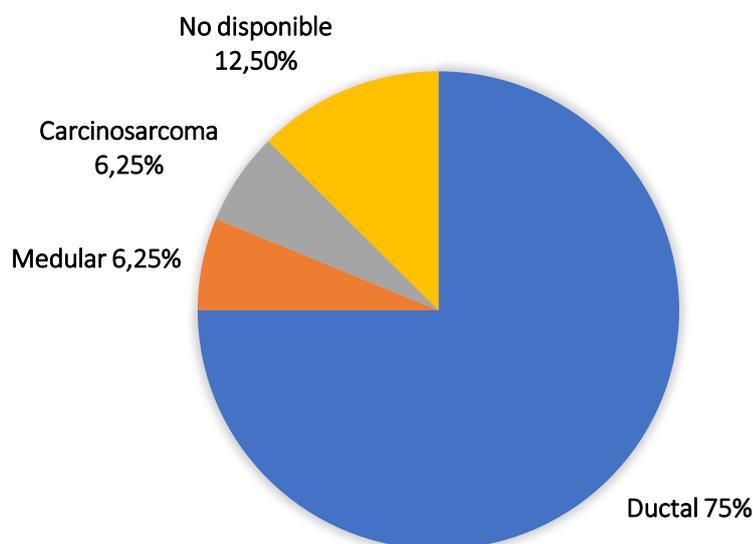


Figura 33: Distribución (%) de la clasificación histológica del cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en *BRCA1*.

#### o Clasificación molecular del cáncer de mama en *BRCA1*

Partiendo del mismo principio que el de la clasificación histológica, de los 16 cánceres de mama hallados en los casos índices portadores de VP/VPP en *BRCA1*, 11 fueron TN, 2LB y 3 no se consiguió obtener la información relativa por la no disponibilidad en la base de datos (**Figura 34**).

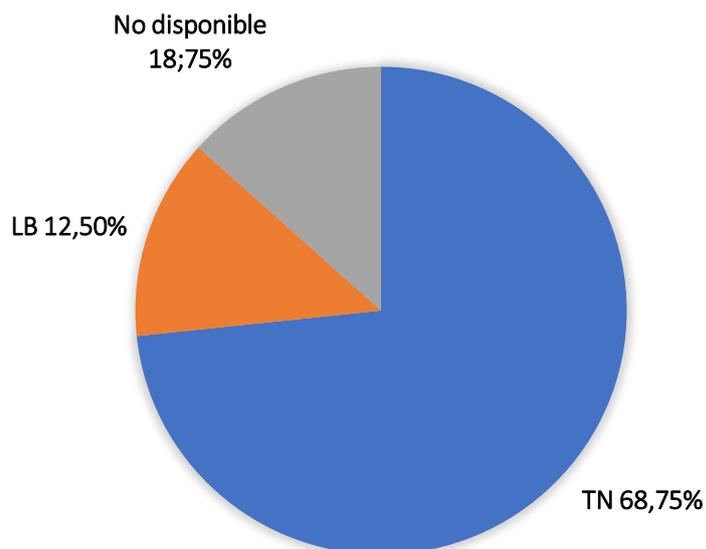


Figura 34: Distribución (%) de la clasificación molecular del cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en *BRCA1*.

- Clasificación histológica del cáncer de ovario en *BRCA1*

El tipo de cáncer de ovario predominante en los pacientes portadores de VP/VPP en *BRCA1* fue el seroso de alto grado que sumó un total de 6 (75%) de los 8 detectados. De los dos restantes, uno fue de células claras y el otro endometroide, ambos de alto grado.

#### 4.3.2 Variantes patogénicas detectadas en el gen *BRCA2*

Se detectaron 19 casos índices portadores de una VP en el gen *BRCA2*, siendo éste el gen con mayor representación en la población de estudio. Desde el punto de vista molecular, destacó un marcado predominio de las variantes tipo FS. Fenotípicamente hubo más diversidad en cuanto a los tipos de cánceres manifestados, destacando el cáncer de próstata que no se detectó en *BRCA1*. Sin embargo, al igual que *BRCA1* el cáncer de mama fue el mayoritario. La **Figura 35** esquematiza todas las VP encontradas en este gen.

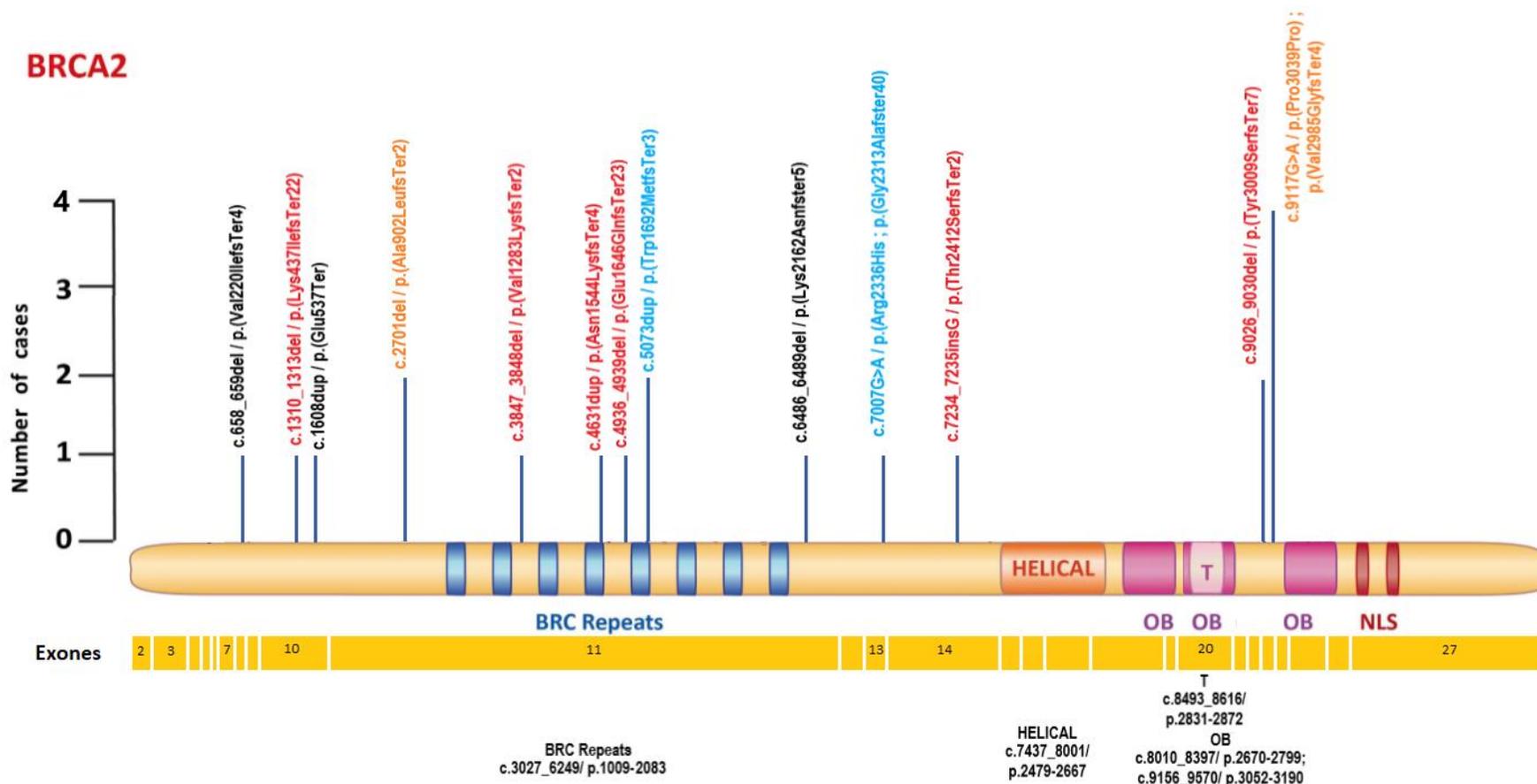


Figura 35: Distribución de las VP sobre el gen *BRCA2* y sus principales dominios. Las variantes en rojo indican expresión fenotípica de cáncer de mama, las variantes en negro indican expresión fenotípica de cáncer de ovario, las variantes en naranja indican expresión fenotípica de cáncer de mama y ovario. Figura modificada de *Stella et al* (110). Las localizaciones proteicas de los dominios funcionales se obtuvieron de la herramienta informática *Mutation Mapper-cBioPortal for Cancer Genomics* ([https://www.cbioportal.org/mutation\\_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab](https://www.cbioportal.org/mutation_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab)).

- **c.658\_659del**

- o Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.658\_659del aparece también en la bibliografía como 886delGT, 886\_887delGT (según BIC), consiste en una deleción de una guanina y una timina en las respectivas posiciones genómica 658 y 659 en el exón 8 del gen *BRCA2*. La pérdida de estos dos nucleótidos genera una alteración del marco de lectura que da lugar a un codón de parada prematuro en la posición 4 de la proteína *BRCA2* generando una proteína truncada o incluso la ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 35**).

Esta variante ha sido categorizada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas, además ha sido clasificada como patogénica en Varsome al cumplir con los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 44 años de cáncer de ovario seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **c.1310\_1313del**

- o Descripción molecular y categorización clínica

Se puede encontrar en la bibliografía de distintas formas según BIC (1529del4, 1537del4, 1537\_1540delAAAG, 1538del4, c.1301\_1304del4, 1310del4, 1538\_1541del4, 1538\_1541delAAGA). Se trata de una deleción de 3 adeninas y de una guanina entre la posición 1310 y 1313 en el exón 10 del gen *BRCA2*. Esa pérdida de nucleótidos genera una alteración del marco de lectura formando un codón de parada en la posición 22 de la proteína *BRCA2*, causando la pérdida de los principales dominios funcionales de la proteína *BRCA2*, transformándola en una proteína no funcional o incluso causa la ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 35**).

Esta variante con efecto fundador de origen norte africano (noroeste de Marruecos) (86) (102), ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas y ha sido categorizada por Varsome de la misma forma al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer de origen marroquí diagnosticada a los 38 años de cáncer de mama ductal TN (**Tabla 16**).

- **c.1608dup**

- Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.1608dup conocida también como 1835insT (BIC), consiste en una duplicación de una timina en la posición 1608 en el exón 10 del gen *BRCA2*, lo que genera un codón de parada en el lugar donde se duplica la timina, por lo cual no se trata de una variante de tipo FS si no de una variante tipo NS. La secuencia normal en la cual se duplica la timina es la siguiente: GCC-TCT-GAA-AG, la introducción de una timina en la posición 1608 da lugar a la siguiente secuencia: GCC-TCT-[T]GA-AAG, por lo cual se forma el codón TGA, que en la hebra hermana dará lugar al codón ACT que durante la traducción formará el codón de parada UGA en la posición 537 de la proteína *BRCA2*, generando así una proteína truncada no funcional, ya que los dominios claves de la proteína *BRCA2*, se encuentran en posiciones más avanzadas (**Figura 35**).

Esta variante ha sido categorizada como patogénica en ClinVar con 3 estrellas, y ha sido clasificada igualmente por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 51 años de un cáncer de ovario bilateral tipo seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **c.2701del**

- Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.2701del aparece también como c.2929delC (BIC) o p.(Leu901fsTer903) e implica la delección de una citosina en la posición 2701 en el exón 11 del gen *BRCA2*. Produce una alteración del marco de lectura dando lugar a un codón de parada prematuro en la posición 2 de la proteína *BRCA2*, formando una proteína *BRCA2* no funcional o incluso ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 35**).

Esta variante ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas y de la misma forma lo ha sido por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

Dos casos índices fueron portadores de esta VP, el primero fue una mujer diagnosticada de un cáncer de ovario seroso de alto grado. El segundo caso índice fue una mujer diagnosticada de cáncer de ovario bilateral seroso de alto grado y de un cáncer de pulmón. La edad media de diagnóstico de cáncer de ovario para esta VP fue de 55 años (**Tabla 16**).

- **c.3847\_3848del**

- Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.3847\_3848del se puede encontrar en la bibliografía como 4075\_4076delGT o 4075delGT (según BIC), consiste en la delección de una guanina en la posición 3847 y 3848 en el exón 11 del gen *BRCA2*. Esta pérdida de nucleótidos provoca una alteración del marco de lectura produciendo un codón de parada en el residuo 2 de la proteína *BRCA2*, dando lugar a una proteína truncada con la pérdida parcial de los dominios *BRC Repeats* (6 dominios) y completa del resto de los dominios funcionales claves o incluso, ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 35**).

Esta variante ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas y clasificada por Varsome como patogénica al cumplir con los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 40 años de cáncer de mama ductal LB (**Tabla 16**).

- **c.4631dup**

- Descripción molecular y categorización clínica

Conocida también como 4859insA (BIC), esta variante implica la duplicación de una adenina en la posición 4631 en exón 11 del gen *BRCA2*, lo que genera una alteración del marco de lectura, formando un codón de parada prematura en la posición 4 de la proteína *BRCA2*, y dando lugar a una proteína truncada o incluso ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 35**).

Categorizada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas, ha sido clasificada de la misma forma por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice de esta VP fue una mujer diagnosticada de un cáncer de mama bilateral metacrónico, el primero a los 40 años y fue de tipo ductal. Sin embargo, no se pudo obtener la clasificación molecular por no disponibilidad en la base de datos clínica. El segundo fue a los 49 años y fue un cáncer de mama ductal LB (**Tabla 16**).

- **c.4936\_4939del**

- Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante se puede encontrar de distintas formas en la literatura según BIC (5164del4, c.5164\_5167del y c.5164\_5167delGAAA). Consiste en la deleción de una guanina y tres adeninas entre la posición 4936 y 4939 en el exón 11 del gen *BRCA2*. Esa pérdida genera una alteración del marco de lectura produciendo un codón de parada en la posición 23 de la proteína *BRCA2*, dando lugar a una proteína truncada no funcional o incluso ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 35**).

Esta variante ha sido categorizada como patogénica en ClinVar con 3 estrellas y clasificada como patogénica por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 39 años de cáncer de mama ductal LB (**Tabla 16**).

- **c.5073dup**

- Descripción molecular y categorización clínica

Como forma alternativa la variante c.5073dup aparece en la bibliografía como 5301\_5302insA o como 5301insA (según BIC). Consiste en una duplicación de adenina en la posición 5073 de exón 11 del gen *BRCA2*; esta duplicación genera una alteración del marco de lectura que da lugar a un codón de parada en el residuo 3 de la proteína *BRCA2*, produciendo una proteína truncada o incluso ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 35**).

Esta variante ha sido clasificada como patogénica en ClinVar con 3 estrellas, ha sido también clasificada como patogénica por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

Dos casos índices fueron portadores de esta VP, el primero fue una mujer diagnosticada a los 37 años de un cáncer de mama ductal LB, mientras que el segundo fue un hombre diagnosticado a los 71 años de un cáncer de próstata (**Tabla 16**).

- **c.6486\_6489del**

- Descripción molecular y categorización clínica

Conocida también como (6714\_6717delACAA, 6714del4 o 6710delACAA según BIC). Consiste en la pérdida de tres adeninas y una citosina entre la posición 6486 y 6489 del exón 11 del gen *BRCA2*, como consecuencia se produce la alteración del marco de lectura generando un codón de parada en la posición 5 de la proteína *BRCA2*, obteniéndose una proteína truncada no funcional o incluso ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 35**).

Esta variante ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas y también por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 43 años de un cáncer de ovario seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **c.7007G>A**

- Descripción molecular y categorización clínica

Conocida también como 7235G>A (BIC), es una mutación puntual que produce el cambio de una guanina por una adenina en el exón 13 del gen *BRCA2*. Esta variante de tipo MS, por una parte, cambia un aa básico que es la arginina por otro de las mismas características bioquímicas que es histidina, lo cual, según un estudio funcional llevado por *Biswas et al* (122), causa una deficiencia en los mecanismos de reparación del ADN por recombinación homóloga ya que la mutación se localiza en un sitio de unión con proteínas que participan en dicho mecanismo. Por otra parte, esta mutación al localizarse en el último nucleótido del exón 13, produce una alteración de *splicing* que consiste en la eliminación del exón 13, que a su vez genera a un alteración del marco de lectura, lo que da lugar a un codón de parada en la residuo 40 de la proteína *BRCA2* (105), generando así un proteína truncada sin los dominios *BRC Repeats* (**Figura 35**).

Esta variante ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas y por Varsome también al cumplir con los siguientes criterios de la ACMG: PP5, PS3, PM5, PP3, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue un hombre diagnosticado a los 72 años de un cáncer de mama ductal LB (**Tabla 16**).

- **c.7234\_7235insG**

- Descripción molecular y categorización clínica

Existen en la literatura varias formas alternativas de nombrar esta variante según BIC (c.7462\_7463insG, c.7234insG, c.7235insG, c.7462insG y 7463insG), consiste en la inserción de una guanina en el exón 14 del gen *BRCA2*. Dicha inserción genera una alteración del marco de lectura que tiene como consecuencia la formación de un codón de parada en el segundo codón de la proteína *BRCA2*, dando lugar a una proteína truncada no funcional o incluso ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 35**).

Esta variante con efecto fundador de origen norte africano (86) ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas y ha sido categorizada de la misma forma por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 27 años de un cáncer de mama ductal LB (**Tabla 16**).

- **c.9026\_9030del**

Conocida también como 9254de5 (BIC), consiste en la delección de 5 nucleótidos (ATCAT) entre la posición 9026 y 9030 del exón 23 del gen *BRCA2*. Esta delección se traduce en una alteración del marco de lectura que genera un codón de parada en la posición 7 de la proteína *BRCA2*, dando lugar a una proteína truncada con la pérdida de los dominios OB y NLS o incluso ausencia total de la proteína por el mecanismo NMD (**Figura 35**).

Esta variante con efecto fundador de origen español (noreste de España) (103) ha sido categorizada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas y ha sido clasificada de la misma forma por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

Los dos casos índices portadores de esta VP fueron mujeres con cáncer de mama. En el caso de la primera mujer, fue un cáncer de mama ductal; sin embargo, no se pudo obtener la clasificación molecular por falta de información en la base de datos. La segunda mujer fue un cáncer de mama bilateral metacrónico, el primero diagnosticado a los 54 años fue ductal LB, mientras que el segundo diagnosticado a los 60 años fue ductal LA. La edad media de diagnóstico de cáncer de mama para esa VP fue de 48 años (**Tabla 16**).

- **c.9117G>A**

- Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.9117G>A o 9345G>A (BIC), es una variante que produce el cambio de una guanina por una adenina en la posición 9117 del exón 23 del gen *BRCA2*. Este cambio a nivel proteico no tiene ninguna relevancia ya que el codón generado sigue traduciendo una prolina. Sin embargo, a nivel de *splicing*, se ha visto que esta mutación origina su alteración, ya que afecta el último nucleótido del exón 23. Como consecuencia se produce la eliminación del exón 23 con la consiguiente alteración del marco de lectura, lo que da lugar a un codón de parada en la posición 4 de la proteína *BRCA2*, formando así, una proteína *BRCA2* no funcional (107) (106) (**Figura 35**).

Esta variante ha sido clasificada por ClinVar como patogénica con 3 estrellas y ha sido categorizada por Varsome como patogénica al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PP5, PP3, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

Cuatro casos índices fueron portadores de esta VP, todas fueron mujeres, de las cuales una fue diagnosticada a los 74 años de un cáncer de ovario bilateral seroso de alto grado. Las tres otras, fueron diagnosticadas de cáncer de mama ductal en los 3 casos; sin embargo, en cuanto a la clasificación molecular, dos fueron LB y uno LA. La edad media de diagnóstico de cáncer de mama para esta VP fue de 40 años (**Tabla 16**).

- **Relación genotipo-fenotipo del gen *BRCA2***

De los 19 casos índices portadores de VP en el gen *BRCA2*, 11 fueron diagnosticados de cáncer de mama en mujeres (de los cuales 2 fueron cáncer de mama bilateral) y 6 fueron diagnosticados de cáncer de ovario (entre ellos la mitad fueron bilaterales). Destaca 2 casos índices varones, uno diagnosticado de cáncer de próstata y el otro diagnosticado de cáncer de mama.

Los porcentajes que se obtuvieron fueron los siguientes: cáncer de mama en mujeres 58% (10.5% bilateral), 31.5% cáncer de ovario (15.75% bilateral), 5.25% cáncer de mama en varón y 5.25% cáncer de próstata.

- Clasificación histológica del cáncer de mama en *BRCA2*

Para estudiar la clasificación histológica de los cánceres de mama obtenidos en los pacientes portadores de VP en *BRCA2*, se consideró que cada cáncer de mama bilateral equivale a 2 unilaterales, por lo cual el total de casos cáncer de mama diagnosticados fue de 14, los cuales fueron todos ductales.

- Clasificación molecular del cáncer de mama en *BRCA2*

De los 14 cánceres de mama diagnosticados, el LB fue el mayoritario y el TN el menos detectado. En dos pacientes no se pudo obtener la clasificación molecular por falta de información en la base de datos (**Figura 36**).

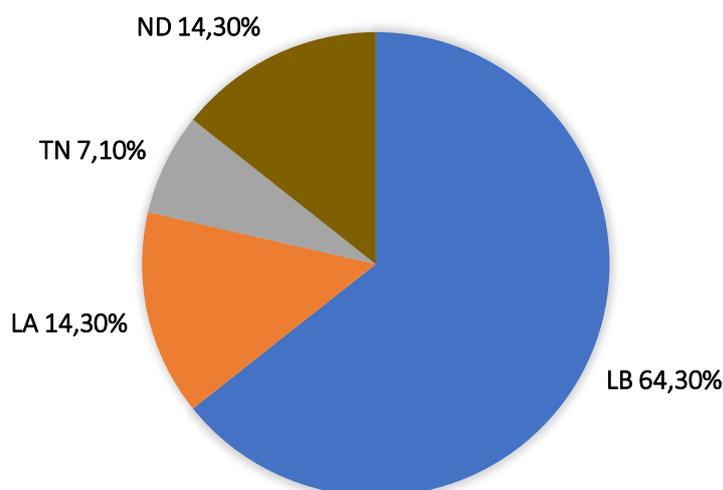


Figura 36: Distribución (%) de los tipos moleculares de cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en el gen *BRCA2*. ND: No Disponible; TN: Triple Negativo; LA: Luminal A; LB: Luminal B.

- Clasificación histológica del cáncer de ovario en *BRCA2*

El 100% de los cánceres de ovario diagnosticados en pacientes portadores de una VP en el gen *BRCA2* fueron de tipo seroso de alto grado.

#### 4.3.3 Variantes patogénicas detectadas en el gen *ATM*

El gen *ATM* fue el tercer gen más detectado en el estudio, con un total de 9 casos índices portadores de una VP/VPP en este gen. Desde el punto de vista molecular, hubo variedad en cuanto a los tipos de VP/VPP detectadas, destacó una variante de tipo IF, la única detectada en la totalidad de la muestra estudiada. Fenotípicamente, hubo un claro predominio de cáncer de mama, solo se detectó un caso índice con cáncer de ovario. La **Figura 37** muestra las VP/VPP detectadas en el gen.

## ATM

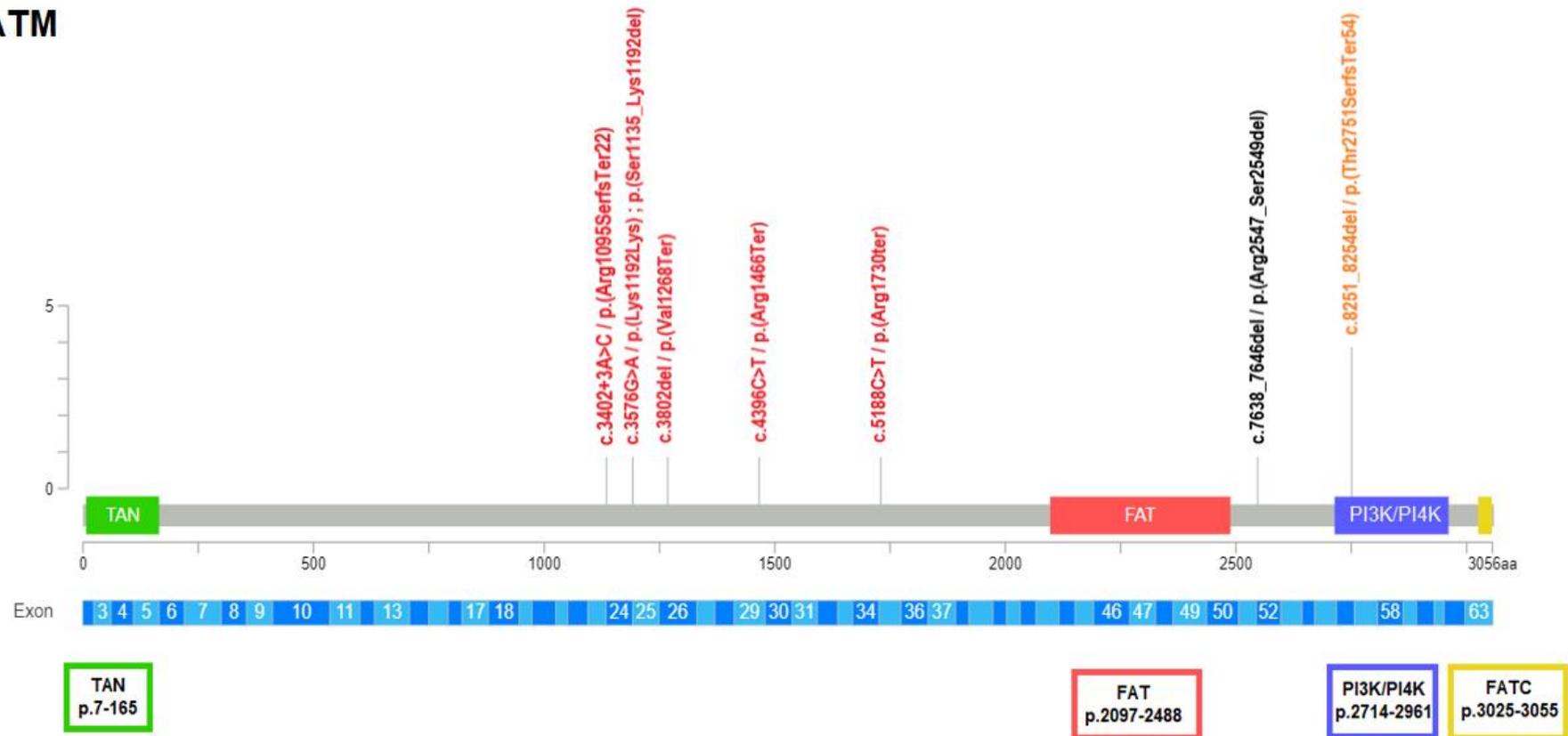


Figura 37: Distribución de las VP/VPP sobre el gen ATM y sus principales dominios. Las variantes en rojo indican expresión fenotípica de cáncer de mama, las variantes en negro indican expresión fenotípica de cáncer de ovario, las variantes en naranja indican expresión fenotípica de cáncer de mama y ovario. Las localizaciones proteicas de los dominios funcionales se obtuvieron de la herramienta informática *Mutation Mapper-cBioPortal for Cancer Genomics* ([https://www.cbioportal.org/mutation\\_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab](https://www.cbioportal.org/mutation_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab)).

- **c.3402+3A>C**

- o Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.3402+3A>C se produce en un sitio dador de *splicing*, específicamente en el tercer nucleótido del intrón 23. Según los experimentos realizados previamente por nuestro grupo de investigación (123), esta variante genética genera un cambio de adenina por citosina que da lugar a dos transcritos aberrantes diferentes: el primero produce la delección completa del exón 23, mientras que el segundo ocasiona la delección parcial del exón 23 y 24. La delección completa del exón 23 genera un codón de parada en la posición 22 de la proteína *ATM*, dando lugar a una proteína no funcional (**Figura 37**), mientras que la pérdida parcial del exón 23 y 24 da lugar a una proteína más corta pero que conserva todos sus dominios funcionales.

Esta variante ha sido clasificada por Varsome como probablemente patogénica al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PP3, PM2, PP5. En ClinVar ha sido clasificado como VUS y VPP (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VPP fue una mujer de 49 años diagnosticada de cáncer de mama tipo ductal LA (**Tabla 16**).

- **c.3576G>A**

- o Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.3576G>A o también conocida como 3403del174, es una variante que produce el cambio de una guanina altamente conservada por una adenina en la posición 3576 en el exón 24 del gen *ATM*. Esta variante no produce ningún cambio a nivel proteico de tal forma que el cambio producido en la posición 1192 es sinónimo. Sin embargo, esta mutación tiene 2 consecuencias, la primera a nivel proteico, se ha visto en pacientes homocigotos disminuida la capacidad de fosforilación de la proteína *ATM*, importante para activar los mecanismos de reparación de ADN (124). También se ha constatado que al ocurrir el cambio en el último nucleótido del exón 24, se produce una alteración del proceso de *splicing* con la eliminación del exón 24, generando la eliminación de 58 aa desde la posición 1135 hasta la posición 1192 de la proteína *ATM* sin alterar el marco de lectura (108) (**Figura 37**).

Esta variante ha sido clasificada por ClinVar como patogénica con 2 estrellas y ha sido clasificada también por Varsome como patogénica al cumplir con los siguientes criterios de la ACMG: PS3, PP5, PP3, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP, fue una mujer diagnosticada a los 36 años de un cáncer de mama tipo ductal LA (**Tabla 16**).

- **c.3802del**

- Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.3802del, implica la delección de una guanina en la posición 3802 en exón 26 del gen *ATM*, generando un codón de parada en la posición 1268 de la proteína *ATM*, lo que da lugar a una proteína truncada o ausencia total de traducción de la proteína debido a la activación del mecanismo NMD (**Figura 37**).

Esa variante ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 2 estrellas. Ha sido categorizada de la misma forma por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer que además de ser portadora de esa VP en *ATM*, también fue portadora de otra VP en el gen *CHEK2*. Desarrolló a los 51 años un cáncer de mama bilateral sincrónico, fue ductal en ambas mamas, pero de clasificación molecular distinta, uno fue LA y el otro HER2 (**Tabla 16**).

- **c.4396C>T**

- Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante produce el cambio de una citosina por una timina en la posición 4396 en el exón 29 del gen *ATM*. Este cambio genera un codón de parada prematuro en la posición 1466 de la proteína *ATM* dando lugar a una proteína truncada o incluso pérdida completa de la proteína por activación del mecanismo NMD (**Figura 37**).

Clasificada como patogénica por ClinVar con 2 estrellas, esta variante ha sido clasificada de la misma forma por Varsome al cumplir con los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 29 años de cáncer de mama ductal LB (**Tabla 16**).

- **c.5188C>T**

- Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.5188C>T, implica el cambio de una citosina por una timina en la posición 5188 en el exón 35 del gen *ATM*, lo que genera un codón de parada prematuro en la posición 1730 de la proteína *ATM*, dando lugar a una proteína truncada e incluso la ausencia total de la proteína por la activación del mecanismo NMD (**Figura 37**).

Esta variante ha sido clasificada por ClinVar como VP/VPP con 2 estrellas. En Varsome esta variante ha sido clasificada como patogénica al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP/VPP fue una mujer diagnosticada a los 38 años de cáncer de mama de clasificación histológica lobulillar y clasificación molecular LB (**Tabla 16**).

- **c.7638\_7646del**

- Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante aparece en la literatura de distintas formas (7636del9, 7637del9, 7639del9, 2546delSRI). Consiste en la eliminación de la secuencia 'TAGAATTC' del exón 52 en el gen *ATM*. Produce la eliminación de tres aa desde la posición 2547 hasta la posición 2549 en la proteína *ATM*, sin alterar el marco de lectura. Estudios funcionales han demostrado que esta mutación produce la disminución de la actividad quinasa crítica para el funcionamiento de la proteína *ATM* y su papel en la reparación del ADN (125) (**Figura 37**).

Esta variante ha sido clasificada como VP/VPP con dos estrellas por ClinVar, mientras que ha sido categorizada como patogénica por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PS3, PM4, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP/VPP, fue una mujer diagnosticada a los 59 años de un cáncer de ovario seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **c.8251\_8254del**

- Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.8251\_8254del implica la delección de 4 nucleótidos (2 adeninas, una citosina y una timina), entre la posición 8251 y 8254 del exón 56 del gen *ATM*, lo que produce la alteración del marco de lectura y da lugar a un codón de parada en la posición 54 de la proteína *ATM*, generando una proteína truncada no funcional (**Figura 37**).

Esta variante de origen fundador de la región de Murcia (84) ha sido clasificada por ClinVar como patogénica con una estrella lo que significa en este caso, que solo ha sido clasificada por un único laboratorio como patogénica sin que haya más propuestas de clasificación. Sin embargo, dicha clasificación es respaldada por la clasificación de Varsome que categoriza esta variante como patogénica al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- Descripción clínica

Cuatro casos índices fueron portadores de esta VP, todos fueron mujeres de las cuales tres con cáncer de mama y una con cáncer de mama y ovario. La primera mujer padeció de un cáncer de mama bilateral metacrónico: el primero, a los 36 años, fue de tipo ductal pero no se pudo obtener la clasificación molecular de la base de datos, el segundo fue invasivo multifocal (ductal y lobulillar) de tipo LA. La segunda mujer fue diagnosticada de un cáncer de mama ductal LA. En cuanto a la tercera mujer, con cáncer de mama, no se pudo obtener la clasificación histológica y tampoco la molecular debido a la no disponibilidad de información en la base de datos. La edad media de diagnóstico de cáncer de mama para esta variante fue de 45 años. La cuarta mujer fue diagnosticada a los 54 años de un cáncer de mama tipo ductal LB y a los 58 años de un cáncer de ovario de células claras de alto grado, además fue diagnosticada de un cáncer de cérvix (**Tabla 16**).

- **Relación genotipo-fenotipo del gen *ATM***

De los 10 casos índices portadores de VP/VPP en el gen *ATM*, 8 fueron diagnosticados de cáncer de mama lo que equivale a un 80% (de los cuales 2 bilaterales equivalente a 20%), uno de cáncer de ovario (10%) y otro de cáncer de mama y ovario (10%).

- Clasificación histológica del cáncer de mama en *ATM*

Para estudiar la clasificación histológica de los cánceres de mama obtenidos en los pacientes portadores de VP/VPP en *ATM*, se tuvo en cuenta que cada cáncer de mama bilateral equivale a 2 unilaterales. Se tomó en cuenta también las características del cáncer de mama de la paciente diagnosticada de cáncer de mama y ovario, por tanto se obtuvo un total de 11 cánceres de mama diagnosticados (**Figura 38**).

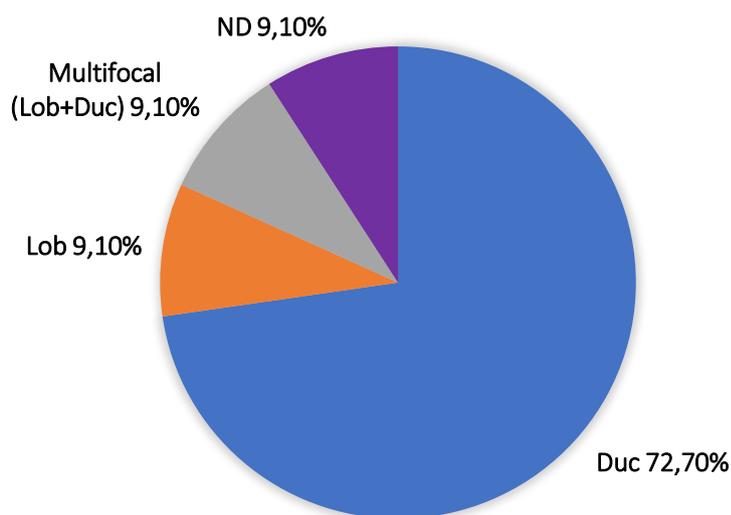


Figura 38: Distribución (%) de los diferentes tipos histológicos de cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en el gen *ATM*. Duc: ductal; Lob: lobulillar; ND: No Disponible.

- Clasificación molecular del cáncer de mama en *ATM*

En cuanto a la clasificación molecular, se detectaron 5 LA, 3 LB, 1 HER2, mientras que para dos casos índices no se pudo establecer una clasificación molecular debido a la no disponibilidad de la información en las bases de datos (**Figura 39**).

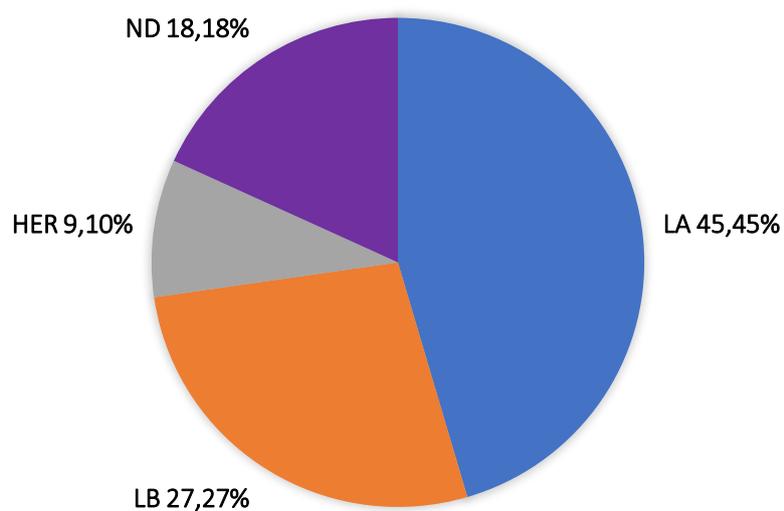


Figura 39: Distribución (%) de los diferentes tipos moleculares de cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en *ATM*. LA: Luminal A; LB: Luminal B; ND: No Disponible.

- Clasificación histológica del cáncer de ovario en *ATM*

De los dos cánceres de ovario detectados en pacientes portadores de VP/VPP en *ATM* (teniendo en cuenta el cáncer de ovario del caso índice diagnosticado de cáncer de mama y ovario), uno fue seroso de alto grado y el otro fue de células claras de alto grado.

#### 4.3.4 Variantes patogénicas detectadas en el gen *CHEK2*

Un total de 7 casos índices fueron portadores de alguna VP/VPP en el gen *CHEK2*. Desde el punto de vista molecular se identificó un predominio de variantes de tipo MS. Fenotípicamente ningún paciente desarrolló cáncer de ovario, todos los casos índices portadores de VP/VPP en *CHEK2* desarrollaron cáncer de mama. A continuación, la **Figura 40** muestra las variantes detectadas en el gen *CHEK2*.

## CHEK2

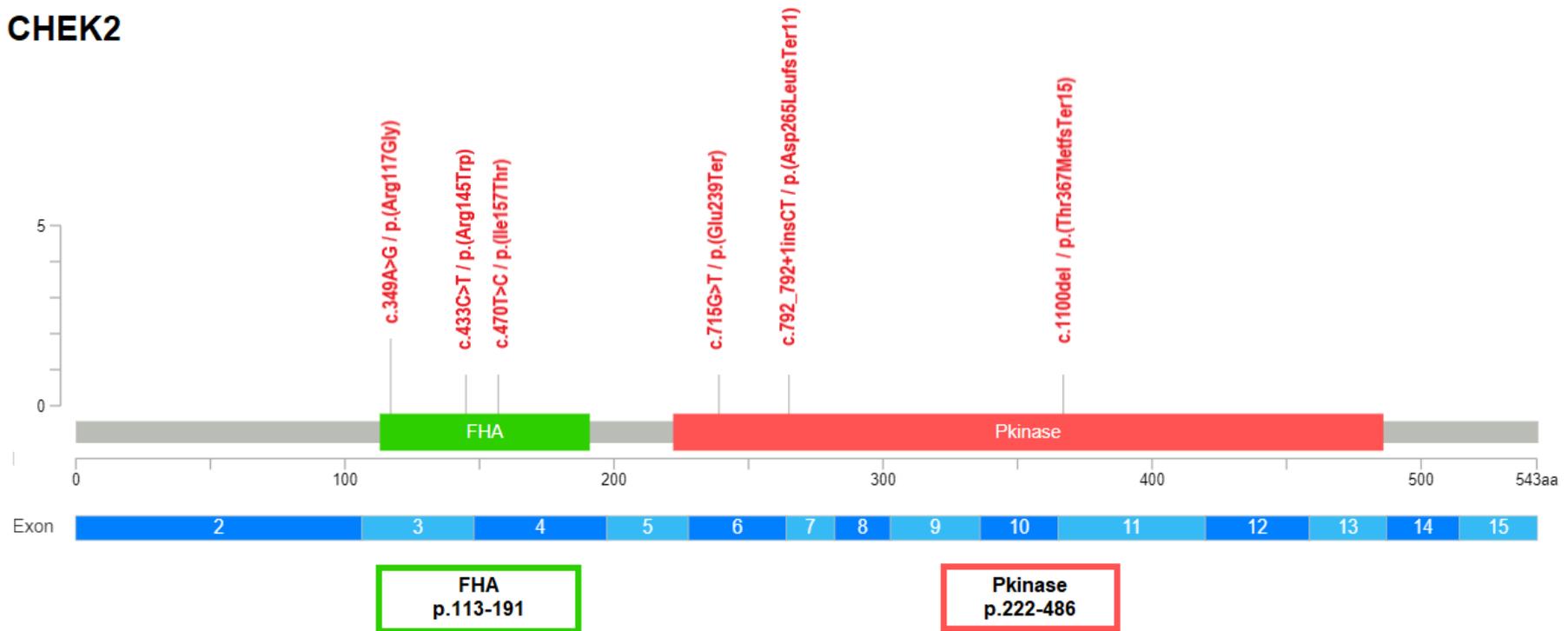


Figura 40: Distribución de las VP/VPP sobre el gen *CHEK2* y sus principales dominios. Las variantes en rojo indican expresión fenotípica de cáncer de mama. Las localizaciones proteicas de los dominios funcionales se obtuvieron de la herramienta informática *Mutation Mapper-cBioPortal for Cancer Genomics* ([https://www.cbioportal.org/mutation\\_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab](https://www.cbioportal.org/mutation_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab)). FHA: dominio asociado a *ForkHead*; *Pkinase*: dominio de la proteína quinasa.

- **c.349A>G**

- o Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante, implica el cambio de una adenina por una guanina en el exón 3 del gen *CHEK2*, lo que produce el cambio de una arginina conservada por una glicina en la posición 117 de la proteína *CHEK2*, dos aa con características bioquímicas distintas. Varios estudios funcionales han demostrado que por un lado, esta mutación impide la oligomerización de la proteína *CHEK2* necesaria para su activación (126); por otro lado, ese cambio afecta a la actividad quinasa del dominio FHA (*ForkHead Associated Domain*), esencial para fosforilar proteínas claves en el control del ciclo celular como *CD25A* (126) o *CD25C* (52) y otras imprescindibles para la reparación del ADN dañado como *BRCA1*, *KAP1* y *TP53* (52) (**Figura 40**).

La variante c.349A>G ha sido categorizada como VP/VPP por ClinVar con 2 estrellas. Ha sido también clasificada como patogénica por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PP5, PS3, PP3, PM2, BP1 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

Los dos casos índices portadores de esta VP/VPP, fueron mujeres diagnosticadas de cáncer de mama. La primera fue diagnosticada a los 60 años de un cáncer de mama lobulillar *in situ* LB, mientras que la segunda fue diagnosticada de un cáncer de mama bilateral metacrónico: el primero a los 39 años, fue ductal LB y el segundo, a los 45 años, fue también ductal LB. La edad media de diagnóstico de cáncer de mama para esta VP/VPP fue de 52 años (**Tabla 16**).

- **c.433C>T**

- o Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante implica el cambio una citosina por una timina en el exón 3 del gen *CHEK2*, produciendo el cambio de una arginina por un triptófano en la posición 145 de la proteína *CHEK2*, dos aa con características bioquímicas distintas. Muchos estudios funcionales han demostrado que esta mutación produce un profundo impacto en la estabilidad de la proteína y altera la actividad quinasa del dominio FHA, esencial para fosforilar las proteínas necesarias en el control del ciclo celular como *CD25A* (126) o *CD25C* (52) y otras imprescindibles para la reparación del ADN dañado como *BRCA1*, *KAP1* y *TP53* (52) (**Figura 40**).

Esta variante ha sido clasificada como VPP en ClinVar con 2 estrellas, de la misma forma ha sido categorizada en Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PP5, PM5, PP3, PM2 (Tabla 15).

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta VPP fue una mujer diagnosticada a los 41 años de un cáncer de mama ductal *in situ* LB y de un cáncer tiroideo (Tabla 16).

- c.470T>C

- Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante consiste en un cambio de una timina por una citosina en el exón 4 del gen *CHEK2*, lo que genera el cambio de una isoleucina por una treonina en la posición 157 de la proteína *CHEK2* (Figura 40). Esta variante es muy controvertida, ya que hay estudios funcionales que demuestran el impacto sobre la función de la proteína (127) y otros que no (52). Por otra parte, la frecuencia alélica de esta variante es muy elevada, casi 13 veces superior a lo que tendría que tener una VP en *CHEK2* causante de SCMOH; sin embargo, esta variante se ha detectado en varias familias con cáncer de mama en las cuales además, la variante co-segrega.

Esta variante en ClinVar no se ha podido caracterizar con unanimidad, de tal forma que 4 laboratorios la han clasificado como VP, 12 como VPP, 7 como VUS, y 1 como factor de riesgo y otro como VB (128). En Varsome esta variante ha sido clasificada como VUS al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PS3, PP5, PM5, BS3, BS1, BP4 (Tabla 15).

Un gran metaanálisis que incluyó un total de 15 estudios de casos y controles (19621 casos y 27001 controles), llevado a cabo por *Liu et al* (129) llegó a la conclusión de que existe una relación significativa entre esta variante y el riesgo de sufrir un cáncer de mama.

Teniendo en cuenta todo lo anterior se consideró esta variante como un alelo de riesgo para sufrir cáncer de mama.

- Descripción clínica

El caso índice portador de esta variante fue una mujer diagnosticada a los 50 años de un cáncer de mama ductal TN (Tabla 16).

- **c.715G>T**

- o Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.715G>T, conocida también como c.844G>T o p.(Glu282ter), implica el cambio de una guanina por una timina en la posición 715 en el exón 6 del gen *CHEK2*, lo que genera un codón de parada en la posición 239 de la proteína *CHEK2*, dando lugar a una proteína truncada con pérdida completa del dominio FHA y parcial de *Pkinase* (dominio de la proteína quinasa) o incluso, pérdida total de la proteína debido al mecanismo NMD (**Figura 40**).

Esta variante ha sido clasificada como VP con 2 estrellas por ClinVar y de la misma forma ha sido categorizada por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

El caso índice de esta VP fue una mujer diagnosticada de cáncer de mama bilateral metacrónico. El primero a los 40 años del cual no se pudo obtener la información necesaria para la clasificación histológica y tampoco la molecular debido a la no disponibilidad de información en la base de datos. El segundo se manifestó a los 53 años y fue ductal LB (**Tabla 16**).

- **c.792\_792+1insCT**

- o Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante consiste en la inserción de una citosina y una timina en el exón 6 del gen *CHEK2*, lo que alteraría el marco de lectura generando un codón de parada en la posición 11 del nuevo marco de lectura, dando lugar a una proteína truncada o incluso podría afectar al *splicing* del ARNm (**Figura 40**).

Esta variante no tiene registro en ClinVar, sin embargo ha sido clasificada en Varsome como patogénica al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1 PM2 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue la misma mujer portadora de la VP c.3802del en el gen *ATM* (**Tabla 16**).

- **c.1100del**

- o Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.1100del, implica la deleción de una citosina en el exón 11 del gen *CHEK2*, esa deleción produce una alteración del marco de lectura con la generación de un codón de parada prematura en el residuo 15 de la proteína *CHEK2*, dando lugar a una proteína truncada o incluso la ausencia total de la proteína por la activación del mecanismo NMD (**Figura 40**).

Esta variante con efecto fundador de origen europeo, sobre todo el norte de Europa (104), ha sido clasificada como patogénica en ClinVar con 1 estrella, debido a discrepancia de un laboratorio que clasificó la variante como VUS frente a 38 que la clasificaron como patogénica. Dicha clasificación es respaldada por la base de datos Varsome que clasifica la variante como patogénica al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 57 años de un cáncer de mama ductal LB (**Tabla 16**).

- **Relación genotipo-fenotipo del gen *CHEK2***

Todos los casos índices portadores de una VP/VPP en el gen *CHEK2* fueron diagnosticados de cáncer de mama, tres de ellos con cáncer de mama bilateral (equivalente al 43%). Desde el punto de vista histológico, el 80% de los cánceres de mama detectados fueron ductales y el 10% lobulillar mientras que el 10% restante no fue posible obtener información en la base de datos. En cuanto a la clasificación molecular el 10% fueron LA, 60% LB, 10% TN, 10% HER2 y el 10% no se encontró información en la base de datos.

#### 4.3.5 Variantes patogénicas detectadas en el gen *PMS2*

Solo un caso índice fue portador de un VP de tipo NS en este gen, la **Figura 41** esquematiza la VP detectada en el gen.

## PMS2

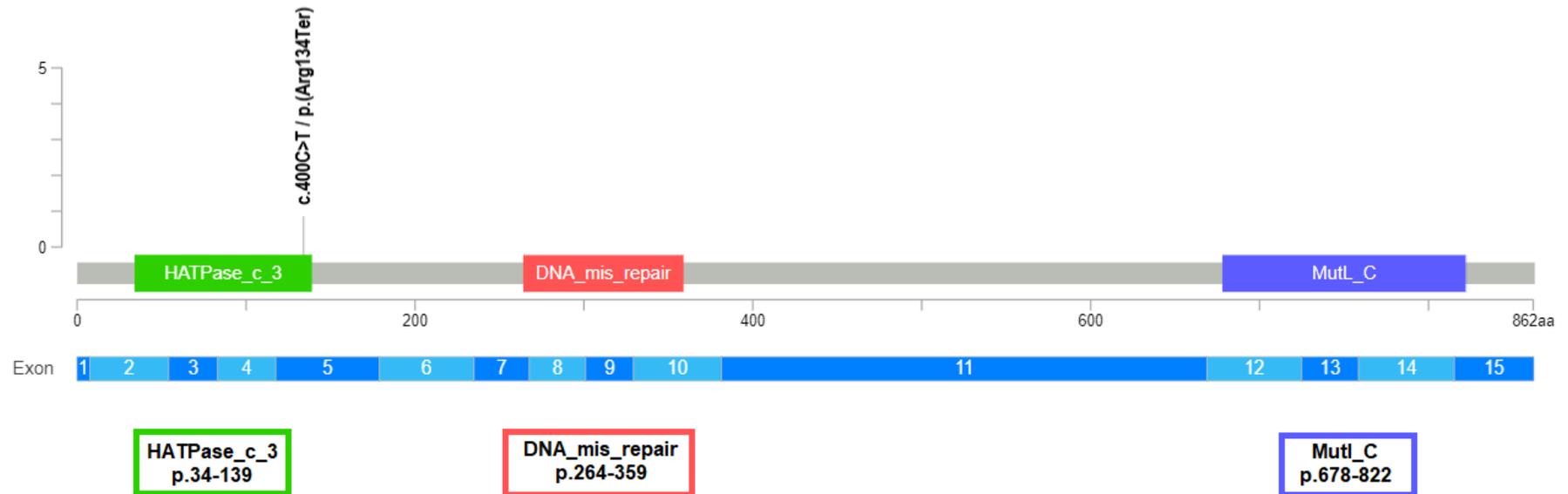


Figura 41: Localización de la VP sobre el gen *PMS2* y sus principales dominios. La variante en negro indica expresión fenotípica de cáncer de ovario. Las localizaciones proteicas de los dominios funcionales se obtuvieron de la herramienta informática *Mutation Mapper-cBioPortal for Cancer Genomics* ([https://www.cbioportal.org/mutation\\_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab](https://www.cbioportal.org/mutation_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab)). HATPase\_c\_3: hisitidin-quinasa, ADN girasa, y HSP90 (proteína de shock térmico 90). DNA\_mis\_repair: proteína de reparación por desajuste del ADN; MutL\_c: proteína MutL en posición c-termina

- **c.400C>T**

- o Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.400C>T, consiste en un cambio de una citosina por una timina en la posición 400 del exón 5 del gen *PMS2*, lo que produce un codón de parada en la posición 134 de la proteína *PMS2*, dando lugar a una proteína truncada o incluso ausencia total de la proteína por activación del mecanismo NMD (**Figura 41**).

Esta variante ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 3 estrellas, de la misma forma lo ha sido por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 43 años de un cáncer de ovario bilateral seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **Relación genotipo-fenotipo del gen *PMS2***

En la literatura las VP detectada en el gen *PMS2* han sido relacionadas con el síndrome de Turcot en pacientes homocigotos, con el síndrome de Lynch, cáncer colorrectal y cáncer de ovario. En nuestro caso fue una mujer con cáncer de ovario bilateral y fue de tipo seroso de alto grado.

#### 4.3.6 Variantes patogénicas detectadas en *RAD51C*

Se detectó un único caso índice portador de una VP/VPP de tipo *splicing* en el gen *RAD51C*. La **Figura 42** esquematiza la variante detectada.

## RAD51C

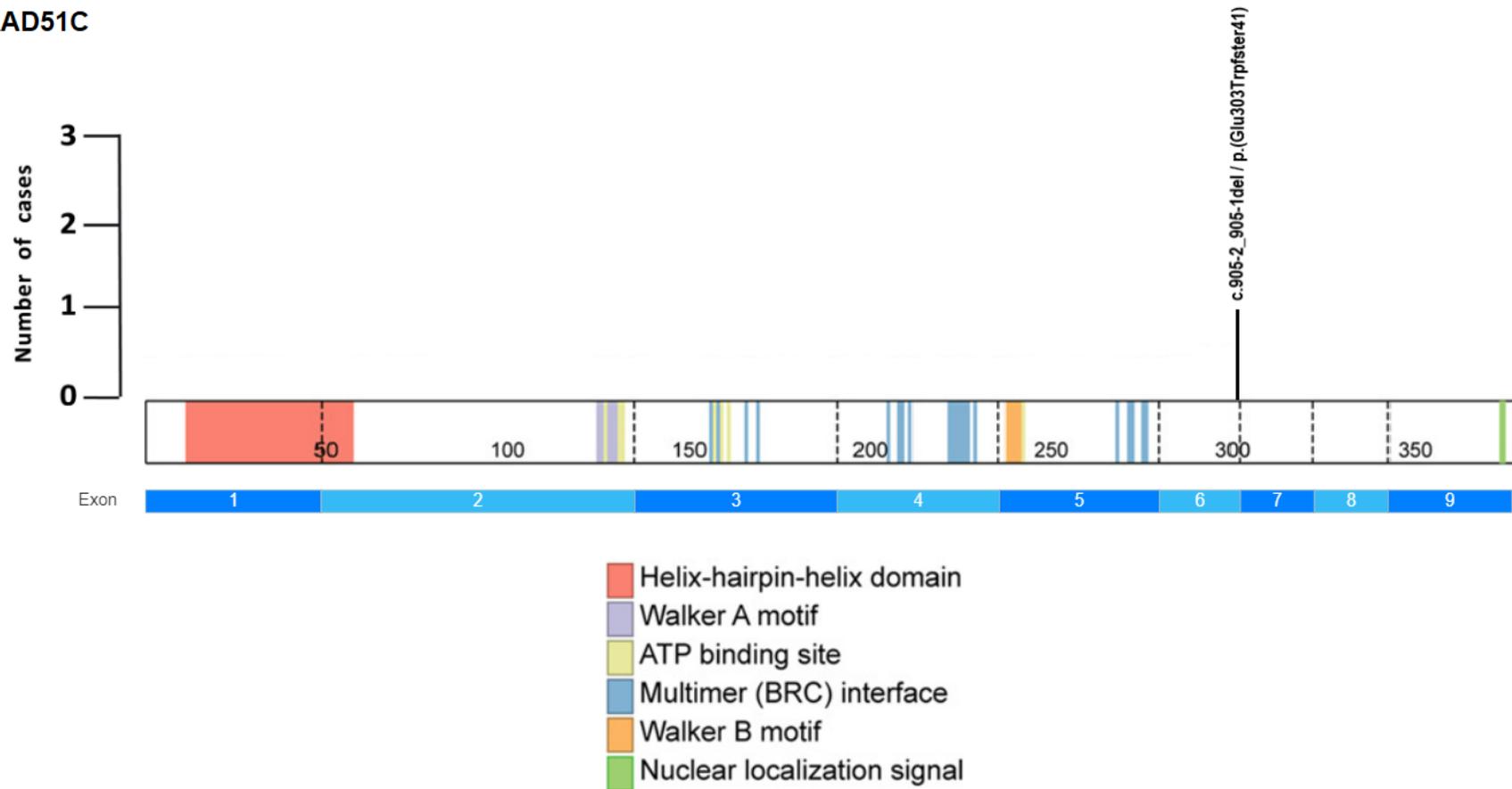


Figura 42: Localización de la VP/VPP sobre el gen *RAD51C* y sus principales dominios. La variante en negro indica expresión fenotípica de cáncer de ovario. Las localizaciones proteicas de los dominios se obtuvieron de la herramienta bioinformática *ProteinPaint* (<https://proteinpaint.stjude.org/>).

- **c.905-2\_905-1del**

- o Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante puede aparecer en la literatura como 905-2delAG o 905\_2\_1delAG. Produce la eliminación de los dos últimos nucleótidos (adenina y guanina) del intrón 6 del gen *RAD51C*, lo que produce la alteración del proceso de *splicing* y eliminación del exón 7 con alteración del marco de lectura generando un codón de parada en el residuo 41 dando lugar a una proteína truncada no funcional (130) (**Figura 42**).

Esta variante ha sido categorizada como VP/VPP por ClinVar con 2 estrellas. En Varsome ha sido categorizada como patogénicas al cumplir con los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP/VPP fue una mujer diagnosticada a los 62 años de un cáncer de ovario seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **Relación genotipo-fenotipo del gen *RAD51C***

Según la NCCN (V2.2023), las VP/VPP en el gen *RAD51C* se asocian principalmente al cáncer de mama y ovario epitelial, y no hay evidencia científica suficiente para asociar VP/VPP de este gen al cáncer de páncreas u otro tipo de cáncer. En nuestro estudio la paciente portadora de la VP/VPP en *RAD51C* desarrolló un cáncer de ovario seroso de alto grado.

#### 4.3.7 Variantes patogénicas detectadas en *RAD51D*

Tres casos índices fueron portadores de una única VP de tipo NS en *RAD51D*, sin embargo, desarrollaron distintos tipos de cánceres (un cáncer de mama bilateral, un cáncer de mama unilateral y uno de ovario). La **Figura 43** esquematiza la variante detectada en el gen *RAD51D*.

## RAD51D

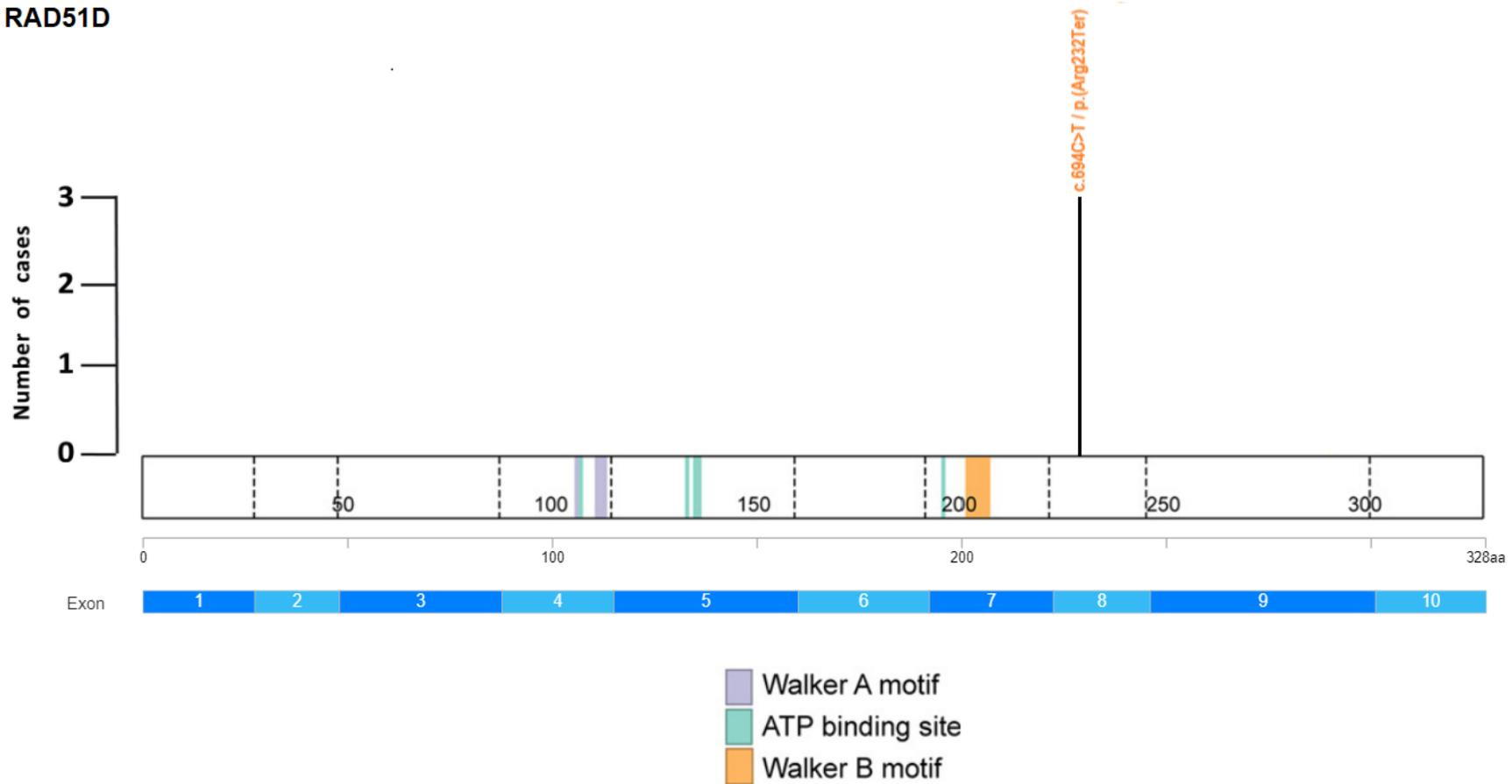


Figura 43: Localización de la VP sobre el gen *RAD51D* y sus principales dominios. La variante en naranja indica expresión fenotípica de cáncer de mama y ovario. Las localizaciones proteicas de los dominios se obtuvieron de la plataforma *ProteinPaint* (<https://proteinpaint.stjude.org/>).

- **c.694C>T**

- o Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante consiste en un cambio de una citosina por una timina en la posición 694 en exón 8 del gen *RAD51D*, lo que produce un cambio de una arginina por un codón de parada en la posición 232 de la proteína *RAD51D*, dando lugar a una proteína truncada o incluso una proteína que no se traduce por degradación del ARN mensajero debido al mecanismo NMD (**Figura 43**).

Esa variante ha sido clasificada como patogénica por ClinVar con 2 estrellas. De la misma forma ha sido categorizada por Varsome al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

Tres casos índices fueron portadores de esta VP, el primero fue una mujer diagnosticada de un cáncer de mama bilateral metacrónico; el primero, a los 39 años, no se pudo clasificar histológicamente y tampoco molecularmente, debido a la no disponibilidad de información en la base de datos, el segundo diagnosticado a los 80 años y fue ductal LB. El segundo caso índice, fue una mujer diagnosticada a los 43 años de un cáncer de mama ductal TN. La edad media de diagnóstico de cáncer de mama para esta VP fue de 54 años. Finalmente, el tercer caso índice fue una mujer diagnosticada a los 43 años de cáncer de ovario seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **Relación genotipo-fenotipo del gen *RAD51D***

Las VP del gen *RAD51D* han sido consideradas con fuertes evidencias como un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama y ovario. En cuanto a su papel para el desarrollo de otros tipos de cánceres no se han encontrado suficientes pruebas científicas al respecto. En nuestro caso, la misma VP detectada se ha expresado fenotípicamente en dos pacientes en forma de cáncer de mama ductal, pero con clasificación molecular distinta (uno LB y otro TN) y en una paciente en forma de cáncer de ovario seroso de alto grado.

#### 4.3.8 Variantes patogénicas detectadas en el gen *TP53*

Se detectaron dos VP/VPP en el gen *TP53*, una de tipo FS y otra de tipo *splicing*. El único tipo de cáncer desarrollado fue el cáncer de mama. La **Figura 44** esquematiza las dos variantes detectadas.

## TP53

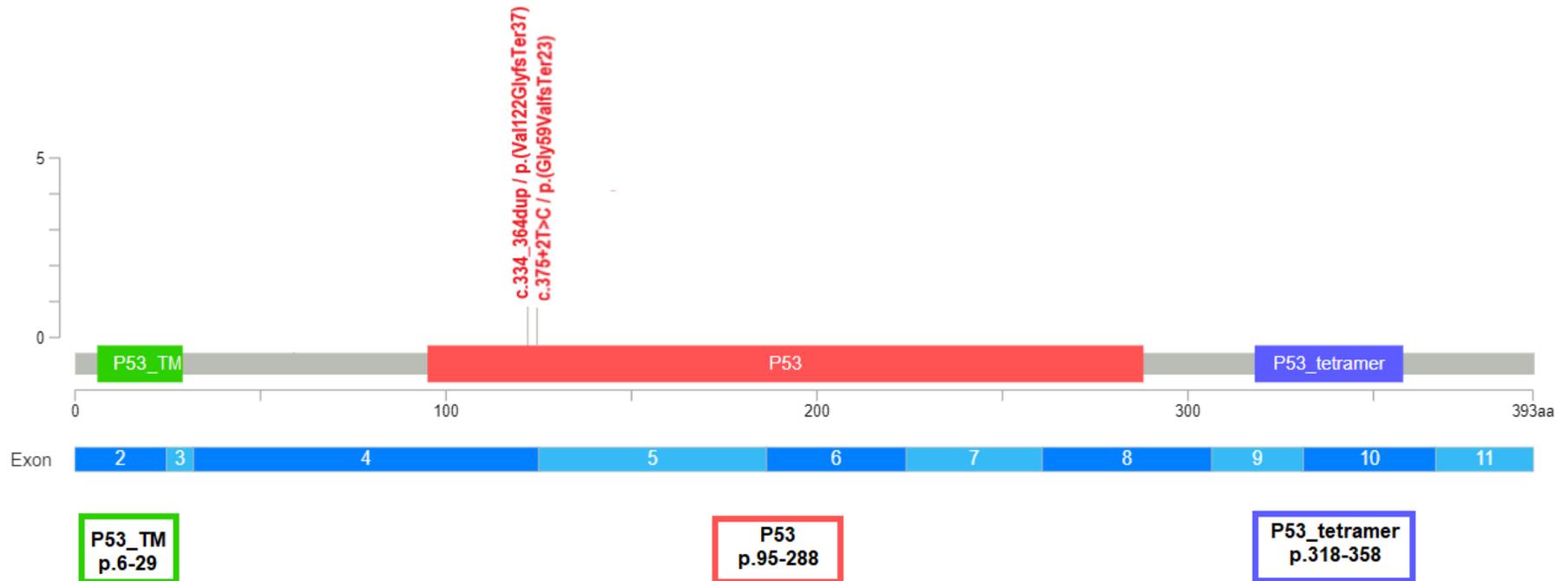


Figura 44: Localización de las dos VP/VPP sobre el gen *TP53* y sus principales dominios. Las variantes en rojo indican expresión fenotípica de cáncer de mama. Las localizaciones proteicas de los dominios funcionales se obtuvieron de la herramienta informática *Mutation Mapper-cBioPortal for Cancer Genomics* ([https://www.cbioportal.org/mutation\\_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab](https://www.cbioportal.org/mutation_mapper?standaloneMutationMapperGeneTab)). P53\_TM: dominio de transactivación; P53: dominio de unión al ADN; P53\_tetramer: dominio de tetramerización.

- **c.334\_364dup**

- o Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.334-364dup, implica la duplicación de una secuencia de 31 nucleótidos (TTGGCTGTCCCAGAATGCAAGAAGCCAGAC) entre la posición 334 y 364 en el exón 4 del gen *TP53*, lo que produce la alteración del marco de lectura y genera un codón de parada prematuro en el residuo 37 de la proteína *TP53*, dando lugar a una proteína trunca no funcional (**Figura 44**).

Esta variante ha sido clasificada por ClinVar como patogénica. Por Varsome ha sido categorizada como patogénica al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VP fue una mujer diagnosticada a los 35 años de un cáncer de mama ductal TN (**Tabla 16**).

- **c.375+2T>C**

- o Descripción molecular y categorización clínica

Esta variante ocurre en un sitio dador de *splicing*, concretamente en el segundo nucleótido del intrón 4 del gen *TP53* y produce el cambio de una timina por una citosina. En este estudio se comprobó *in vitro* (ver **apartado 6** de resultados) que altera el proceso de *splicing* y genera un codón de parada prematura en la posición 23 de la proteína *TP53*, dando lugar a una proteína trunca no funcional (**Figura 44**).

La variante c.375+2T>C ha sido clasificada por ClinVar como VPP y por Varsome como VP al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PP5, PM2 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VPP fue una mujer diagnosticada a los 30 años de un cáncer de mama ductal LB (**Tabla 16**).

- **Relación genotipo-fenotipo del gen *TP53***

Los dos casos índices portadores de VP/VPP fueron diagnosticados de cáncer de mama, ambos fueron ductales, pero de clasificación molecular distinta: uno fue LB y el otro TN.

#### 4.3.9 Variantes patogénicas detectadas en el gen *PALB2*

Se detectó solo un caso índice con cáncer de ovario portador de una VPP de tipo RG en el gen *PALB2*. La **Figura 45** esquematiza la variante hallada.

## PALB2

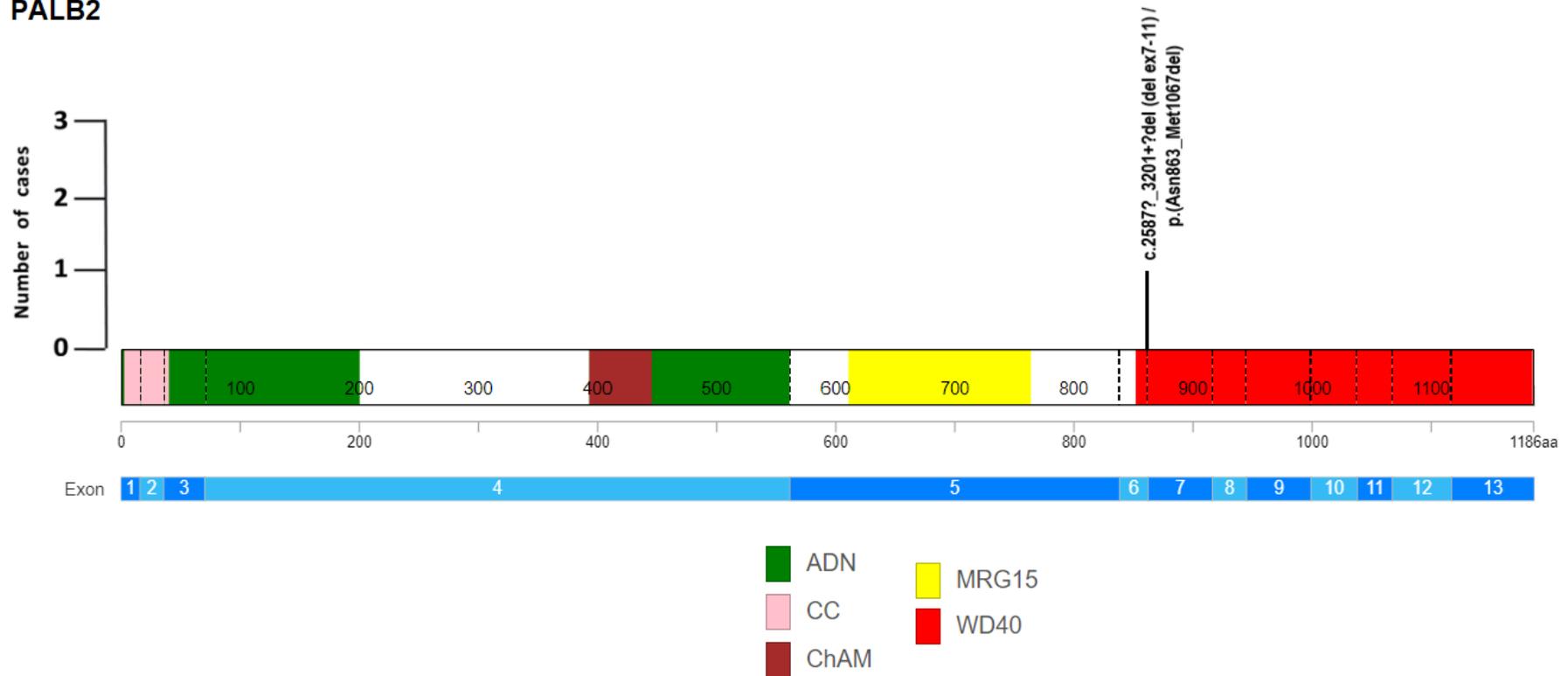


Figura 45: Localización de la VPP sobre el gen *PALB2* y sus principales dominios. La variante en negro indica expresión fenotípica de cáncer de ovario. Las localizaciones proteicas de los dominios se obtuvieron de la plataforma *ProteinPaint* (<https://proteinpaint.stjude.org/>) y de *Ducy et al* (131). ADN: dominio de unión al ADN, CC: *Coiled Coil* dominio de unión *BRCA1* a *PALB2*; ChAM: dominio de unión a la cromatina; MRG15: gen asociado a MORF en el cromosoma 15; WD40: dominio WD40 principal dominio de unión con *BRCA2* y *RAD51C*.

- **c.2587?\_3201+?del (exon7-11del)**

- o Descripción molecular y categorización clínica

Este RG produce la eliminación del exón 7 hasta el exón 11 del gen *PALB2* y la pérdida del dominio funcional WD40 (*Beta Transducin Repeat*), dominio de unos 40 aa, a través del cual se une *PALB2* a *BRCA2* para la reparación del ADN por recombinación (**Figura 45**).

Considerada como VPP, esta variante fue relacionada con SCMOH y descrita por *Blanco et al* (132), el cual describe una mujer de 70 años y su hermano diagnosticados de cáncer de mama, ambos portadores de la misma variante, lo que significa que la variante co-segregó con la enfermedad.

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VPP fue una mujer diagnosticada a los 85 años de cáncer de ovario seroso de alto grado (**Tabla 16**).

- **Relación genotipo-fenotipo del gen *PALB2***

Las VP/VPP en el gen *PALB2*, se han relacionado con el cáncer de ovario y con el cáncer de mama tanto en mujeres como en hombres. En cuanto al cáncer de páncreas las evidencias son limitadas. Nuestro caso índice fue una mujer diagnosticada de cáncer de ovario de tipo seroso de alto grado.

#### 4.3.10 Variantes patogénicas detectadas en el gen *BRIP1*

Se detectaron dos casos índices portadores de una misma VP/VPP de tipo *splicing*, el primero con cáncer de mama unilateral y el segundo con cáncer de mama bilateral. La **Figura 46** esquematiza la variante detectada.

## BRIP1

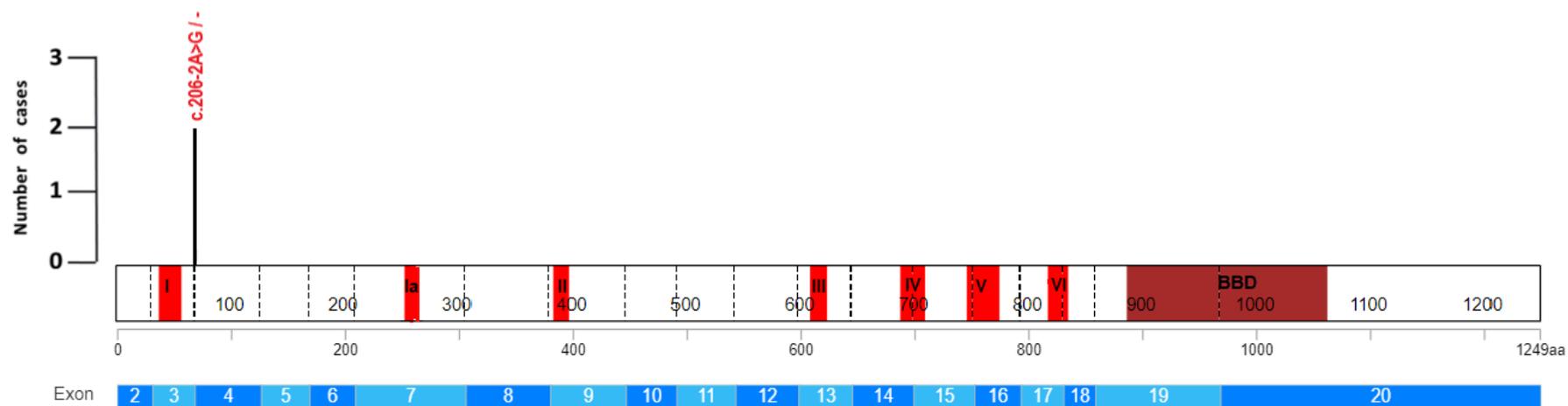


Figura 46: Localización de la VP/VPP sobre el gen *BRIP1* y sus principales dominios. Las variantes en rojo indican expresión fenotípica de cáncer de mama. Las localizaciones proteicas de los dominios se obtuvieron de Moyer et al (133). I: dominio de helicasa I; Ia: dominio de helicasa Ia; II: dominio de helicasa II; III: dominio de helicasa II; IV: dominio de helicasa IV; V: dominio de helicasa V; VI: dominio de helicasa VI; BBD: Dominio de unión *BRIP1* a *BRCA1*.

- **c.206-2A>G**

- o Descripción molecular y categorización clínica

La variante c.206-2A>G, ocurre en un sitio aceptor de *splicing* y produce el cambio de una adenina por una guanina en el penúltimo nucleótido del intrón 3 del gen *BRIP1* (**Figura 46**). Los análisis predictivos *in silico* predicen un impacto de la variante sobre el proceso de *splicing*; sin embargo, no se hicieron estudios funcionales de RT-PCR que confirmen la consecuencia sobre la proteína resultante. Esta variante se ha detectado en pacientes con cáncer de ovario y mama y con una frecuencia alélica en gnomAD de 0.0009 < 1%.

Esta variante no ha sido clasificada por unanimidad en ClinVar, ya que tres laboratorios la clasificaron como VPP y otros 3 como VUS. En Varsome ha sido clasificada como VP al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PM2, PP5 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

Dos casos índices fueron portadores de esta VP/VPP, el primero fue una mujer diagnosticada de cáncer de mama ductal HER2. El segundo fue otra mujer diagnosticada de un cáncer de mama bilateral sincrónico tipo ductal LA en un seno y ductal LB en el otro. La edad media de diagnóstico del cáncer de mama para esta VP/VPP fue de 43 años (**Tabla 16**).

- **Relación genotipo-fenotipo del gen *BRIP1***

Según la NCCN (V2.2023), las VP/VPP en el gen *BRIP1* han sido relacionadas con el cáncer de ovario. Sin embargo, para el cáncer de mama, dicha relación no está del todo bien establecida, pero existe un riesgo incrementado cuando el portador de la VP/VPP es de sexo femenino. Los casos índices de nuestro estudio fueron dos mujeres diagnosticadas de cáncer de mama, la primera con cáncer de mama bilateral ductal (LA en una mama y LB en la otra) y la segunda con cáncer de mama unilateral ductal HER2.

#### 4.3.11 Variantes patogénicas detectada en el gen *NF1*

Se detectó una VPP cuyo caso índice fue diagnosticado de cáncer de ovario, la **Figura 47** esquematiza la variante detectada.

## NF1

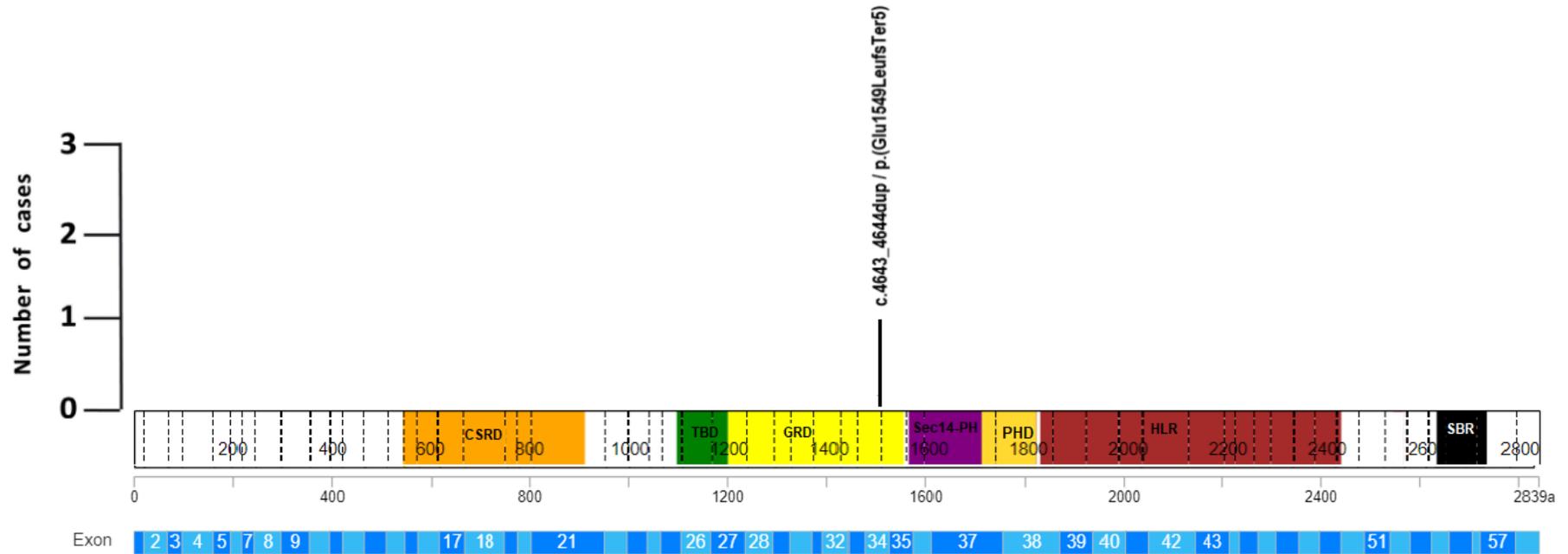


Figura 47: Localización de la VPP sobre el gen *NF1* y sus principales dominios. La variante en negro indica expresión fenotípica de cáncer de ovario. Las localizaciones proteicas de los dominios funcionales se obtuvieron de *Napolitano et al* (134). CSRD: *Cysteine/Serine-Rich Domain*; TBD: *Tubulin-Binding Domain*; GRD: *GAP Related Domain*; Sec14-PH: *Sec14-Homologous Domain*; PHD: *Pleckstrin Homology Domain*; HLR: *HEAT-Like repeat Region*; SBR: *Syndecan-Binding Region*.

- **c.4643\_4644dup**

- o Descripción molecular y categorización clínica

Esta VPP implica la inserción de una citosina y una timina entre la posición 4643 y 4644 en el exón 34 del gen *NF1*, lo que produce una alteración del marco de lectura dando lugar a un codón de parada prematuro en la posición 5 de la proteína *NF1*, generando una proteína truncada no funcional (**Figura 47**).

Esta variante ha sido clasificada por Varsome como VPP al cumplir los siguientes criterios de la ACMG: PVS1, PM2 (**Tabla 15**).

- o Descripción clínica

El caso índice portador de esta VPP, fue una mujer diagnosticada a los 33 años de un cáncer de mama bilateral seroso de alto grado (**Tabla 16**).

#### **4.4. Características clínicas de cáncer de mama en casos índices portadores de VP/VPP en BRCA1/2, ATM y CHEK2**

En el presente estudio se llevó a cabo estudio estadístico sobre las características genotipo-fenotipo en los genes donde se detectaron mayor número de casos índices con cáncer de mama (**Tabla 17**):

		<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>ATM</i>	<i>CHEK2</i>	No portadores de VP/VPP
Totalidad de CI con CM*		N=11	N=11	N=9	N=7	N=279
EDAD media /SD (Rango de edad)		47,3 ± 16 (33-79)	40,1 ± 7,1 (27-57)	42,4 ± 8,7 (29-54)	49,9 ± 7,7 (41-62)	44,2 ± 10,4 (22-85)
CI con CMU **		6	9	7	4	245
Edad media / SD (Rango de edad) <i>P</i>		45,5 ± 17,5 (33-79) 0,618	37,8 ± 4,38 (27-43) 0,004	41,6 ± 9,4 (29-54) 0,659	52,5 ± 9,1 (41-62) 0,069	43,4 ± 10,1 (22-80) -
CMB** <i>P</i>		5 0,043	2 1	2 0,271	3 0,004	34
Clasificación molecular de la totalidad de los CM detectados***	LA <i>P</i>	0/16 0,103	2/13 0,293	5/11 0,056	1/10 0,834	64/313 -
	LB <i>P</i>	2/16 0,099	8/13 0,094	3/11 0,831	6/10 0,074	107/313 -
	HER2+ <i>P</i>	0/16 0,541	0/13 0,246	1/11 0,687	1/10 0,538	15/313 -
	TN <i>P</i>	11/16 0,019	1/13 0,105	0/11 0,193	1/10 0,723	70/313 -
	ND	3/16	2/13	2/11	1/10	57/313

Tabla 17: Características clínicas de cáncer de mama en portadores de VP/VPP y no portadores de VP/VPP. CI: Caso Índice; CM: Cáncer de mama; SD: desviación estándar; CMU: Cáncer de Mama Unilateral; CMB: Cáncer de Mama Bilateral; LA: Luminal A; LB: Luminal B; TN: Triple Negativo; ND: No Disponible. \* incluye CI con cáncer de mama unilateral, cáncer de mama bilateral 2 casos índices con cáncer de mama y ovario portador de VP/VPP en *BRCA1*, *ATM* y 3 casos índices con cáncer de mama y ovario no portadores de VP/VPP. \*\* incluye un caso índice con cáncer de mama bilateral y cáncer de ovario en pacientes no portadores de VP/VPP. \*\*\* Para llevar a cabo la estadística de la clasificación molecular de CM, se consideró cada CMB como dos cánceres de mama unilateral. La *p* se obtuvo comparando las características del cáncer de mama de los casos índices portadores de una VP/VPP con los no portadores de VP/VPP.

Los casos índices portadores de una VP/VPP en el gen *BRCA2* tuvieron una edad media más baja estadísticamente significativa comparando con los no portadores de VP/VPP ( $p=0,004$ ). En cuanto a la bilateralidad fue estadísticamente relacionada con portadores de VP/VPP en el gen *BRCA1* ( $p=0,043$ ) y *CHEK2* ( $p=0,004$ ), y en lo concerniente a la clasificación molecular del cáncer de mama, el TN fue estadísticamente relacionado con portadores de VP/VPP en el gen *BRCA1* ( $p=0,019$ ).

#### 4.5. Características clínicas de cáncer de ovario en casos índices portadores de VP/VPP en *BRCA1/2* y *ATM*

Con respecto al cáncer de ovario, la principal característica sobre la cual se estudió una posible diferencia significativa entre los portadores de VP/VPP y los no portadores VP/VPP fue la edad media, ya que en nuestro estudio se seleccionaron únicamente casos índices con cáncer de ovario epitelial no mucinoso y de alto grado.

No se encontró ninguna diferencia significativa entre la edad media de cáncer de ovario en casos índices portadores de VP/VPP en los genes *BRCA1/2* y *ATM* y los no portadores de VP/VPP (Tabla 18):

	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>ATM</i>	No portadores de VP/VPP
Totalidad de CI con CO *	8	6	2	62
EDAD media /SD (Rango de edad) <i>P</i>	56,1 ± 13,4 (40-79) 0,616	53,7 ± 11,7 (43-74) 0,369	58,5 ± 0,7 (58-59) 0,713	60 ± 12,3 (38-82) -

Tabla 18: Edad media de casos índices con cáncer de ovario portadores de VP/VPP y no portadores de VP/VPP. \* Incluye 2 casos índices con cáncer de mama y ovario portador de VP/VPP en *BRCA1*, *ATM* y 3 casos índices con cáncer de mama y ovario no portadores de VP/VPP. La *p* se obtuvo comparando la edad media de los casos índices portadores de VP/VPP en los genes *BRCA1/2* y *ATM* y los no portadores de VP/VPP.

## 5. VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO INCIERTO DETECTADAS EN GENES CLÍNICAMENTE ACCIONABLES

### 5.1. Reclasificación de las VUS detectadas

Tras la primera categorización de las variantes detectadas se obtuvieron 129 VUS distintas, de las cuales 23 fueron detectadas en más de un caso índice. Transcurridos 2 años y, tras de nuevo, consultar en las bases de datos y la bibliografía disponible, el 25,6% (33/129) de las VUS detectadas inicialmente se reclasificaron como VB/VPB, mientras que el 74,4% (96/129) se mantuvieron la misma clasificación clínica. Cabe destacar que ninguna de las VUS detectadas se tuvo que reclasificar como VP/VPP.

### 5.2. Categorización molecular de las VUS reclasificadas

De las 96 VUS obtenidas, según su clasificación molecular, se detectaron: 85 MS, 7 de tipo *splicing*, 2 IF, 1 sinónima y 1 FS. Estas variantes se distribuyeron en 18 de los 20 genes de la NCCN versión 3.2019. En la **Figura 48**, se detalla la distribución de estas VUS por genes, el principal gen en el que se detectaron más VUS fue el gen *ATM*.

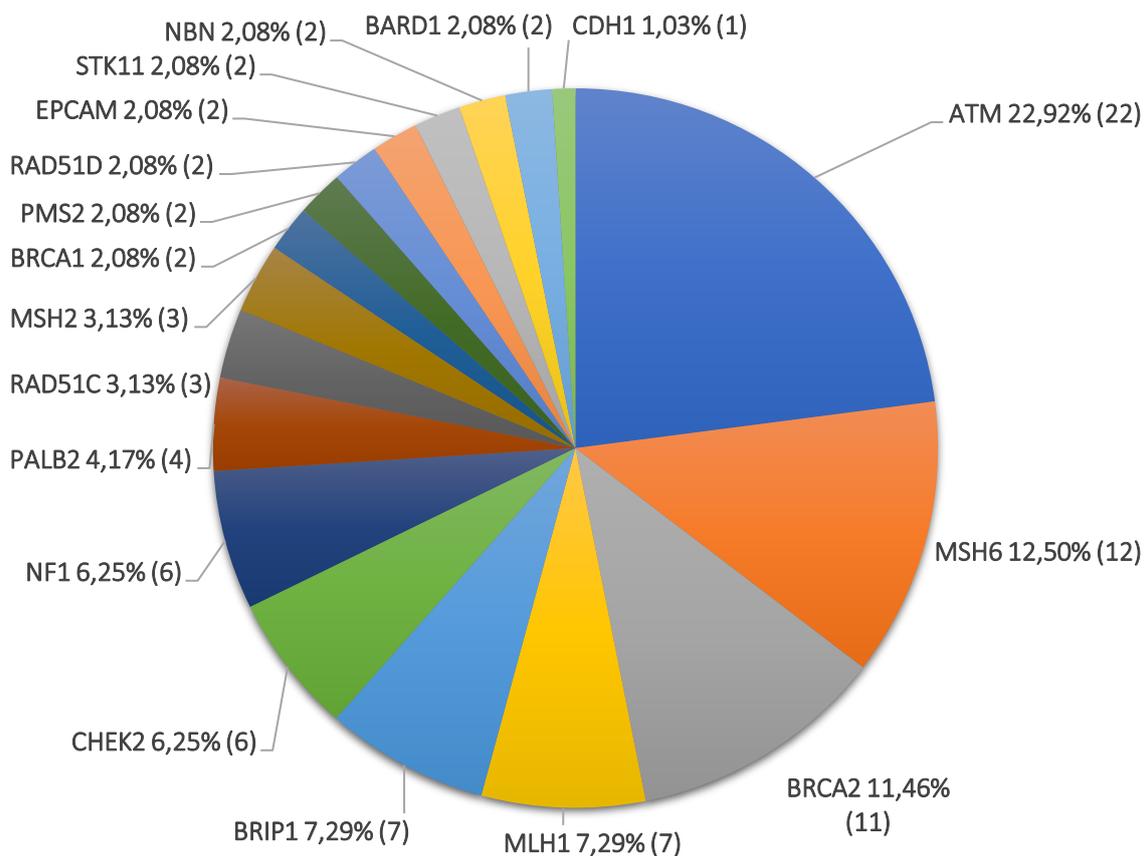


Figura 48: Distribución (%) de las VUS halladas en los 20 genes de la NCCN versión 3.2019 (n=96) en la muestra de estudio. Entre paréntesis se indica el número de variantes.

### 5.3. Priorización de las VUS

Tras la aplicación del algoritmo de priorización, de las 96 VUS detectadas, 18 se priorizaron (18,75%). De ellas, 15 fueron de tipo MS, de las cuales 13 fueron priorizadas gracias al metapredicador *REVEL*, lo que equivale a un 13,54 % de la totalidad de las VUS detectadas (13/96). El gen con más VUS priorizadas fue el gen *BRIP1*. La **Tabla 19** detalla para cada VUS priorizada su clasificación molecular, el exón o intrón (en caso de variantes de tipo *splicing*) dónde se sitúa, sus diferentes clasificaciones clínicas según cada base de datos y el criterio por el cual fue priorizada. El 81,25% de las VUS restantes (78/96) se consideraron como no priorizadas, fue en el gen ATM donde se detectaron un mayor número. La **Tabla 20** detalla para cada VUS no priorizada su clasificación molecular, el exón o intrón (en caso de variantes de tipo *splicing*) donde se sitúa, sus diferentes clasificaciones clínicas según cada base de datos y clasificación final como VUS no priorizada al no cumplir con ninguno de los criterios del algoritmo de priorización.

En total fueron 178 variantes diferentes las que se detectaron (49VP/VPP y 129 VUS). La **Figura 49A** representa la proporción de los distintos tipos de variantes detectadas según su clasificación clínicas después de la reclasificación y priorización de las 129 VUS iniciales. La **Figura 49B** detalla

para cada gen el número de VP/VPP, VUS no priorizadas y VUS priorizadas detectadas en los 20 genes de accionabilidad clínica después de la reclasificación y priorización de las 129 VUS detectadas inicialmente.

Gen	c.HGVS	p.HGVS	Tipo de mutación	Ex/Int	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación Varsome	Clasificación ClinVar	Clasificación HGMD / ID	Reclasificación Según algoritmo
<b>BRCA2</b>	c.9205T>C	p.(Cys3069Arg)	MS	Ex24	rs398122611	PP3, PM2, BP1	VUS	VUS/VPB	ND	VUS-P (REVEL)
	c.10043dup	p.(Asn3348LysfsTer20)	FS	Ex27	ND	PVS1, PM2	VPP	ND	ND	VUS-P (ACMG*)
<b>ATM</b>	c.7375C>T	p.(Arg2459Cys)	MS	Ex50	rs730881383	PM2, BP1	VUS	VUS	VUS / CM186167	VUS-P (REVEL)
	c.8560C>T	p.(Arg2854Cys)	MS	Ex58	rs201958469	PM1, PP3, PM2	VUS	VUS/VB	VUS / CM092588	VUS-P (REVEL)
<b>CHEK2</b>	c.1427C>T	p.(Thr476Met)	MS	Ex13	rs142763740	PS3, PP5, PM5, PM2, BP4	VP	VPP/VUS	VPP CM119709	VUS-P (123)
<b>RAD51C</b>	c.3G>A	p.(Met1Ile)	MS	Ex1	rs769053886	PVS1, PM2	VPP	VUS	VUS / CM2210533	VUS-P (135)
<b>PALB2</b>	c.2514+3A>G	ND	SP	In5-6	rs515726088	PP3, PM2	VUS	VUS	ND	VUS-P (Algoritmo)**
<b>BRIP1</b>	c.848G>C	p.(Cys283Ser)	MS	Ex7	ND	PP3, PM2, BP1	VUS	ND	ND	VUS-P (REVEL)
	c.2308G>T	p.(Asp770Tyr)	MS	16	ND	PP3, PM2, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-P (REVEL)
	c.2446T>C	p.(Trp816Arg)	MS	Ex17	rs1338241931	PP3, PM2, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-P (REVEL)

Gen	c.HGVS	p.HGVS	Tipo de mutación	Ex/Int	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación Varsome	Clasificación ClinVar	Clasificación HGMD / ID	Reclasificación Según algoritmo
<b>MLH1</b>	c.91G>T	p.(Ala31Ser)	MS	Ex1	rs749671520	PM1, PM5, PP3, PM2	VP	VUS/VPB	ND	VUS-P (REVEL)
	c.92C>G	p.(Ala31Gly)	MS	Ex1	rs730882127	PM1, PM5, PP3, PM2	VP	VUS	ND	VUS-P (REVEL)
<b>MSH2</b>	c.568C>T	p.(Leu190Phe)	MS	Ex3	rs763459034	PM1, PM2, PP3	VUS	VUS	VUS / CM2220670	VUS-P (REVEL)
	c.2777T>A	p.(Ile926Asn)	MS	Ex16	rs199747712	PP3, PM2, BP1	VUS	VUS/VPB	ND	VUS-P (REVEL)
<b>MSH6</b>	c.1894A>G	p.(Lys632Glu)	MS	Ex4	rs755847154	PM2, BP1	VUS	VUS/VPB	VUS / CM2221387	VUS-P (REVEL)
	c.2231A>T	p.(Glu744Val)	MS	Ex4	ND	PP3+PM2+BP1	VUS	ND	ND	VUS-P (REVEL)
<b>BARD1</b>	c.152C>T	p.(Ser51Leu)	MS	Ex1	rs766788652	PM2, PP3, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-P (REVEL)
<b>EPCAM</b>	c.491+1G>A	ND	SP	In4-5	rs606231203	PVS1, PM2, PP5	VP	VP	VP / CS083989	VUS-P (30)***

Tabla 19: VUS priorizadas en función del algoritmo de priorización. Ex: exón; In: intrón; ID: número de identificación en la base de datos HGMD; VUS-P: VUS Priorizada; VUS-no P: VUS no Priorizada; FS: *Frameshift*; MS: *Missense*; SP: *Splicing*; ND: No Disponible. VPB: Variante Probablemente Benigna; VB: Variante Benigna; VPP: Variante Probablemente Patogénica. \*La variante c.10043dup del gen *BRCA2*, se clasificó como VUS-P según la ACMG, al ser una variante que se encuentra en el extremo 3' y no afectar a ningún dominio funcional. \*\* La variante c.2514+3A>G se priorizó para poder realizar el estudio de cosegregación y el estudio de *splicing* por RT-PCR ya que los predictores de *splicing in silico* predicen un *splicing* aberrante. \*\*\* La variante c.491+1G>A ha sido clasificada como VP y causante de enteropatía congénita en penacho en pacientes pediátricos. Se ha visto que únicamente la VP/VPP en el gen *EPCAM* localizada en el extremo 3' son causantes de cáncer de ovario.

Gen	c.HGVS	p.HGVS	Tipo de mutación	Ex/Int	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación Varsome	Clasificación ClinVar	Clasificación HGMD / ID	Reclasificación Según algoritmo
<b>BRCA1</b>	c.727A>G	p.(Asn243Asp)	MS	Ex10	rs587782123	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
	c.2666C>T	p.(Ser889Phe)	MS	Ex10	rs587782123	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	VUS / CM2021162	VUS-no P
<b>BRCA2</b>	c.535C>T	p.(His179Tyr)	MS	Ex7	ND	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
	c.1598C>T	p.(Thr533Ile)	MS	Ex10	rs781763239	BP4, BP1, BP3, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
	c.2119G>A	p.(Asp707Asn)	MS	Ex11	rs80358487	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
	c.4316C>A	p.(Ala1439Asp)	MS	Ex11	rs80358667	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	VUS / CM1715022	VUS-no P
	c.5723T>C	p.(Leu1908Pro)	MS	Ex11	rs80358797	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS/VPB	ND	VUS-no P
	c.6613G>A	p.(Val2205Met)	MS	Ex11	rs80358889	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS/VPB	VUS / CM180656	VUS-no P
	c.7928C>G	p.(Ala2643Gly)	MS	Ex17	rs80359018	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS/VPB	ND	VUS-no P
	c.8080A>G	p.(Ile2694Val)	MS	Ex18	ND	BP4, BP1, PM2	VPB	ND	ND	VUS-no P
	c.10151G>A	p.(Arg3384Gln)	MS	Ex27	rs80358397	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
<b>ATM</b>	c.610G>A (3)	p.(Gly204Arg)	MS	Ex6	rs147915571	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS/VPB	VUS / CM1810910	VUS-no P
	c.662+9A>G	ND	SP	In6-7	rs1392370340	BP4, PM2	VPB	ND	ND	VUS-no P

Gen	c.HGVS	p.HGVS	Tipo de mutación	Ex/Int	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación Varsome	Clasificación ClinVar	Clasificación HGMD / ID	Reclasificación Según algoritmo
ATM	c.946T>A (2)	p.(Tyr316Asn)	MS	Ex8	rs142317485	PM2, PP3, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-no P
	c.946T>C	p.(Tyr316His)	MS	Ex8	rs142317485	PM2, BP1	VUS	VUS/VPB	VUS / CM1927300	VUS-no P
	c.1132A>G	p.(Ser378Gly)	MS	Ex9	rs587779811	BP4, BP6, BP1, PM2	VPB	VUS/VPB	VUS / CM0910484	VUS-no P
	c.2353C>T	p.(Arg785Cys)	MS	Ex15	rs587778065	PM2, PP5, BP1, BP4	VUS	VUS	VP / CM990204	VUS-no P
	c.2492A>G	p.(Asp831Gly)	MS	Ex17	rs587781352	PM2, BP4, BP1	VPB	VUS	VUS / CM1710902	VUS-no P
	c.2494C>T (2)	p.(Arg832Cys)	MS	Ex17	rs2229022	BP4, BP1, PM2	VUS	VUS/VPB	VUS / CM1620446	VUS-no P
	c.2542G>A	p.(Glu848Lys)	MS	Ex17	rs879254046	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
	c.3242A>G	p.(Asn1081Ser)	MS	Ex22	rs368111672	BP4, BP1, PM2	VPB	VPB/VUS	ND	VUS-no P
	c.4909G>T	p.(Asp1637Tyr)	MS	Ex32	rs753870656	PP3, PM2, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-no P
	c.5185G>C	p.(Val1729Leu)	MS	Ex35	rs3092907	BP1, BP4, BP6, PM2	VPB	VUS/VPB	VUS / CM186814	VUS-no P
	c.5890A>G	p.(Lys1964Glu)	MS	Ex39	rs201963507	PM2, BP1	VUS	VUS/VPB	VUS / CM910514	VUS-no P
	c.5975A>C	p.(Lys1992Thr)	MS	Ex40	rs150757822	BS3, BP4, BP1, PM2	VB	VUS/VPB	VUS / CM1715617	VUS-no P
	c.6848C>T	p.(Ser2283Leu)	MS	Ex47	rs876660730	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	VUS / CM2210240	VUS-no P
	c.7187C>G	p.(Thr2396Ser)	MS	Ex49	rs370559102	PM2, BP4, BP1	VPB	VUS/VPB/VB	VUS / CM092586	VUS-no-P
	c.7566A>G	p.(Gln2522Gln)	SYN	Ex51	rs775621333	BP4, BP7, PM2	VPB	VUS/VPB	VUS / CM181575	VUS-no P
c.7788+8G>T	ND	SP	In52-53	rs112775908	BP4, PM2	VPB	VUS	VUS / CS014123	VUS-no P	

Gen	c.HGVS	p.HGVS	Tipo de mutación	Ex/Int	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación Varsome	Clasificación ClinVar	Clasificación HGMD / ID	Reclasificación Según algoritmo
<i>ATM</i>	c.8311A>G	p.(Thr2771Ala)	MS	Ex57	rs876660587	BP1, BP4, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
	c.9119T>C	p.(Ile3040Thr)	MS	Ex63	rs369870357	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
<i>CHEK2</i>	c.246_260del (2)	p.(Asp82_Glu86del)	IF	Ex2	rs587780181	PM4, PM2	VUS	VUS/VPB	VUS/VP/CD030580	VUS-no P
	c.313A>C	p.(Asn105His)	MS	Ex2	rs1010061908	PM2, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-no P
	c.320-5T>A (3)	ND	SP	In2-3	rs121908700	PM2, PP5	VUS	VUS/VPB/VB	VUS / CS086685	VUS-no P (86)
	c.906A>C	p.(Glu302Asp)	MS	Ex8	rs587780190	PM2, PP3, BP1	VUS	VUS	VUS / CM199474	VUS-no P
	c.1325G>A	p.(Ser442Asn)	MS	Ex12	rs779383555	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
<i>PMS2</i>	c.572A>G	p.(Tyr191Cys)	MS	Ex6	rs375289386	PM2, PP3, BP1	VUS	VUS/VPB	VUS / CM2210499	VUS-no P
	c.668T>C	p.(Ile223Thr)	MS	Ex6	rs771834092	PM2, BP1	VUS	ND	ND	VUS-no P
<i>RAD51C</i>	c.19C>G	p.(Arg7Gly)	MS	Ex1	rs759759863	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
	c.746G>A	p.(Arg249His)	MS	Ex5	rs730881925	PM2, PP3, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-no P
<i>RAD51D</i>	c.26G>C	p.(Cys9Ser)	MS	Ex1	rs140825795	BS1, BP4, BP1, BP6	VB	VUS/VPB	VUS / CM128416	VUS-no P
	c.715C>T	p.(Arg239Trp)	MS	Ex8	rs770250516	BP1	VPB	VUS	VUS CM128414	VUS-no P
<i>PALB2</i>	c.664_666del	p.(Leu222del)	IF	Ex4	rs1400223274	PM4, PM2, BP4	VUS	VUS	ND	VUS-no P
	c.2897T>C	p.(Ile966Thr)	MS	Ex9	rs587780214	PM2, BP1	VUS	VUS/VPB	VUS / CM151906	VUS-no P
	c.3356T>C	p.(Leu1119Pro)	MS	Ex13	rs515726116	PM2, PP3, BP1	VUS	VUS/VPB	VUS / CM1210627	VUS-no P
<i>EPCAM</i>	c.344T>A (2)	p.(Met115Lys)	MS	Ex3	ND	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	VB / CM1110060	VUS-no P

Gen	c.HGVS	p.HGVS	Tipo de mutación	Ex/Int	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación Varsome	Clasificación ClinVar	Clasificación HGMD / ID	Reclasificación Según algoritmo
<b>BRIP1</b>	c.316C>T	p.(Arg106Cys)	MS	Ex4	rs587780247	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS/VPB	VUS / CM179129	VUS-no P
	c.868G>A	p.(Gly290Ser)	MS	Ex7	rs145601931	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	VUS / CM2210346	VUS-no P
	c.2220G>T (4)	p.(Gln740His)	MS	Ex15	rs45589637	BS3, BP4, BP1, PM2	VB	VUS/VPB	VUS / CM160119	VUS-no P
	c.2393G>A	p.(Arg798Gln)	MS	Ex17	rs375082407	PM2, PP3, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-no P
<b>NF1</b>	c.2188A>T	p.(Asn730Tyr)	MS	Ex18	rs758893131	BS1, BS2, BP4, BP1	VB	VUS/VPB	ND	VUS-no P
	c.2585C>G	p.(Thr862Ser)	MS	Ex21	rs200302954	BS2, BP4, BP1	VB	VUS	VUS / CM143347	VUS-no P
	c.3436G>A	p.(Val1146Ile)	MS	Ex26	rs201047812	BS1, BS2, BP4, PM1	VB	VUS	VUS / CM143376	VUS-no P
	c.4515-8G>C	ND	SP	In34-35	rs375758486	BP4, PM2	VPB	VUS/VPB	ND	VUS-no P
	c.5126C>G (2)	p.(Thr1709Ser)	MS	Ex37	rs772831692	PM2, PP3, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-no P
	c.8213C>G	p.(Thr2738Arg)	MS	Ex57	ND	BP1, BP4, PM2	VUS/VPB	ND	ND	VUS-no P
<b>MLH1</b>	c.157G>A (2)	p.(Glu53Lys)	MS	Ex2	rs63751199	PM1, PM2	VUS	VUS	VUS / CM228106	VUS-no P
	c.976G>T (2)	p.(Val326Leu)	MS	Ex11	ND	PM1, PM5, PM2	VUS	VUS	ND	VUS-no P
	c.1360G>C	p.(Gly454Arg)	MS	Ex12	rs63750527	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS/VPB/VB	VUS / CM068363	VUS-no P
	c.1852A>G (6)	p.(Lys618Glu)	MS	Ex16	rs35001569	BP6, BS1, BS2, BP4, PM5, PM2	VB	VPB/VB	VUS CM973729	VUS-no P
	c.1989+7G>A	ND	SP	In17-18	ND	BP4, PM2	VPB	ND	ND	VUS-no P

Gen	c.HGVS	p.HGVS	Tipo de mutación	Ex/Int	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación Varsome	Clasificación ClinVar	Clasificación HGMD / ID	Reclasificación Según algoritmo
<b>MSH2</b>	c.1787A>G (3)	p.(Asn596Ser)	MS	Ex12	rs41295288	BP4, BP6, PM1, PM2	VPB	VUS/VPB/VB	VUS / CM994603	VUS-no P
<b>MSH6</b>	c.106G>T	p.(Ala36Ser)	MS	Ex1	rs759589301	PMS, BP4, BP1	VPB	VUS/VB	ND	VUS-no P
	c.884A>G	p.(Lys295Arg)	MS	Ex4	rs267608051	BP4, BP1, BP6, PM2	VUS	VUS/VPB	VUS / CM1718250	VUS-no P
	c.1127A>G	p.(Glu376Gly)	MS	Ex4	rs764150912	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS/VPB	ND	VUS-no P
	c.1871G>T	p.(Glu624Val)	MS	Ex4	rs763606858	PM2, PP3, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-no P
	c.2281A>G	p.(Arg761Gly)	MS	Ex4	rs199876321	PM2, BP1, BP4	VPB	VUS/VPB	VUS / CM228109	VUS-no P
	c.3046G>T	p.(Ala1016Ser)	MS	Ex4	ND	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
	c.3203G>A	p.(Arg1068Gln)	MS	Ex5	rs398123230	PM2, BP4, BP1	VPB	VUS/VPB/VB	VUS / CM157949	VUS-no P
	c.3235A>C	p.(Ile1079Leu)	MS	Ex5	rs587779933	BP1, BP4, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
	c.3727A>T (2)	p.(Thr1243Ser)	MS	Ex8	rs147453999	PM1, PM2, BP4	VUS	VUS/VPB	VUS CM179242	VUS-no P
c.4004A>C	p.(Glu1335Ala)	MS	Ex10	rs564434147	BP4, BP1, PM2	VPB	VUS/VPB	VP/VUS CM136611	VUS-no P	
<b>STK11</b>	c.124C>T	p.(Arg42Trp)	MS	Ex1	rs765367492	PM2, BP1	VUS	VUS	ND	VUS-no P
	c.992G>A	p.(Arg331Gln)	MS	Ex8	rs371264852	BS1, BS2, BP4, BP1	VB	VUS/VPB	VUS / CM1711274	VUS-no P
<b>NBN</b>	c.721G>A	p.(Ala241Thr)	MS	Ex7	rs587781333	PM2, BP1	VUS	VUS	VUS / CM1816193	VUS-no P
	c.1925A>G	p.(Lys642Arg)	MS	Ex13	rs587781547	BP4, BP1, BP3, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P
<b>BARD1</b>	c.976A>G	p.(Asn326Asp)	MS	Ex4	rs587780038	BP4, BP1, BP3, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P

Gen	c.HGVS	p.HGVS	Tipo de mutación	Ex/Int	RefSNP	Criterios ACMG	Clasificación Varsome	Clasificación ClinVar	Clasificación HGMD / ID	Reclasificación Según algoritmo
<b>CDH1</b>	c.674T>C	p.(Ile225Thr)	MS	Ex5	rs786203207	BP1, BP4, PM2	VPB	VUS	ND	VUS-no P

Tabla 20: VUS no priorizada detectadas en el estudio. Ex: exón; In: intrón; ID: número de identificación en la base de datos HGMD; VUS-P: VUS Priorizada; VUS-no P: VUS no Priorizada. FS: *Frameshift*; SYN: *Synonymous*; MS: *Missense*; IF: *Inframe*; SP: *Splicing*; ND: No Disponible; VPB: Variante Probablemente Benigna; VB: Variante Benigna; VPP: Variante Probablemente Patogénica. El número entre paréntesis de la segunda columna indica el número de casos índices portadores de la VUS

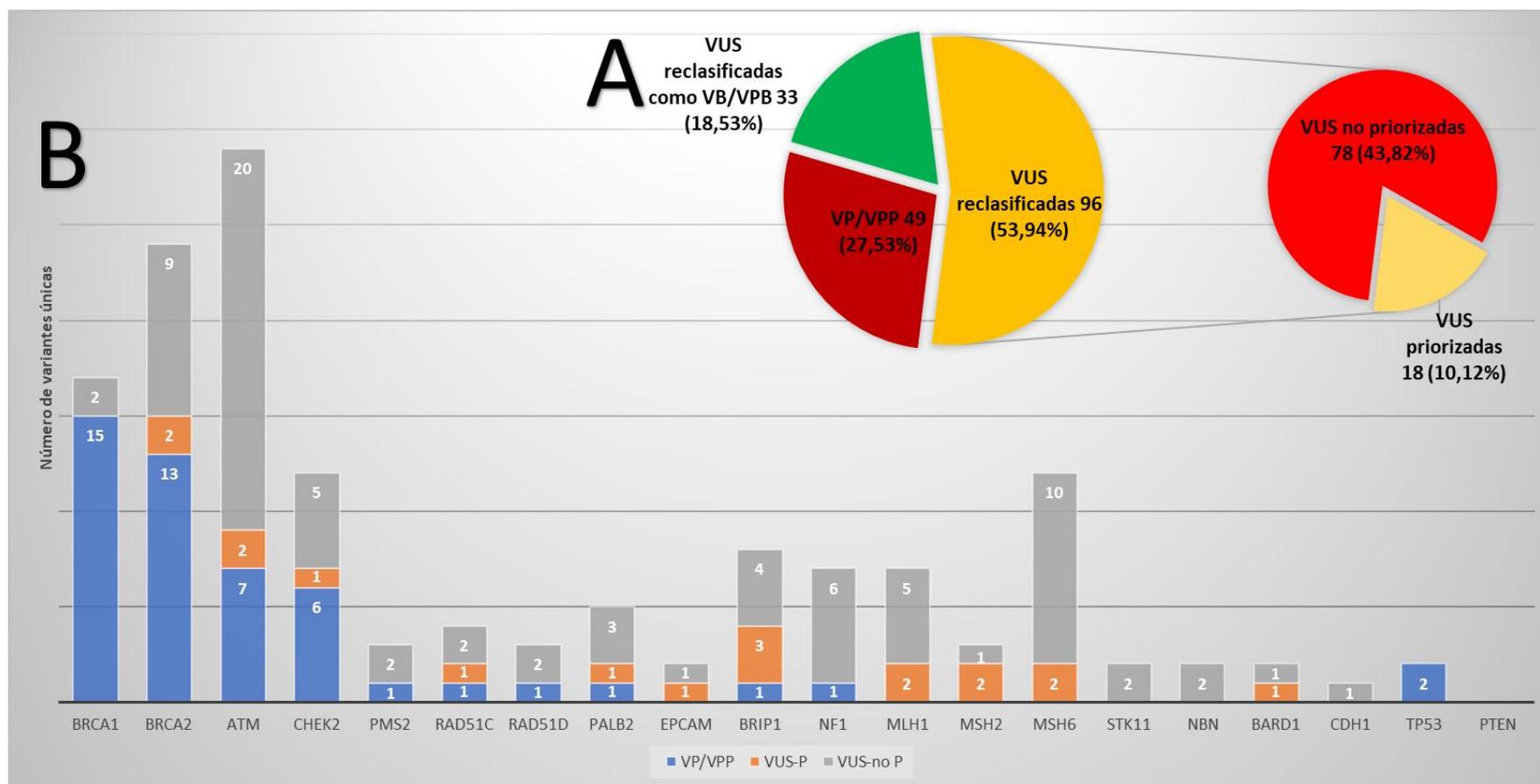


Figura 49: Las distintas VUS detectadas tras la reclasificación y priorización de las VUS halladas al inicio del estudio. **A)** Distribución de todas las distintas variantes detectadas según su clasificación clínica (n=178). **B)** Distribución por genes de las distintas variantes detectadas tras la reclasificación y priorización de las VUS en los genes de accionabilidad clínica. VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; VUS-P: Variante de Significado clínico Incierto Priorizada; VUP-no P: Variante de Significado clínico Incierto no Priorizada.

La reclasificación de las VUS a VPB/VB se llevó a cabo en todos los genes excepto en el gen *CHEK2* y *RAD51D* figura 50.

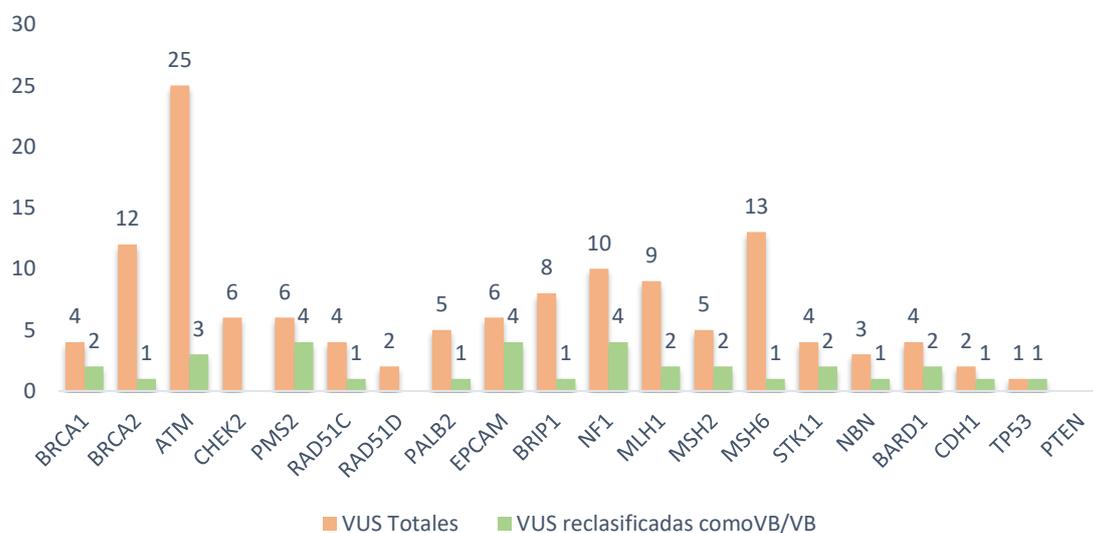


Figura 50: VUS reclasificadas como VB/VPB.

En lo concerniente a los casos índices, al principio del estudio, 63 casos índices fueron portadores de al menos una VP/VPP, 126 portadores con un mínimo de una VUS y 226 casos índices fueron no informativos. Tras la reclasificación y priorización de las VUS, en total, 63 casos índices fueron portadores de al menos una VP/VPP (no se reclasificó ninguna VUS a VP/VPP), 17 casos índices fueron portadores siquiera de una VUS priorizada, 76 casos índices fueron portadores de al menos una VUS no priorizada, y 259 casos índices fueron no informativos con VB/VPB **Figura 51**.

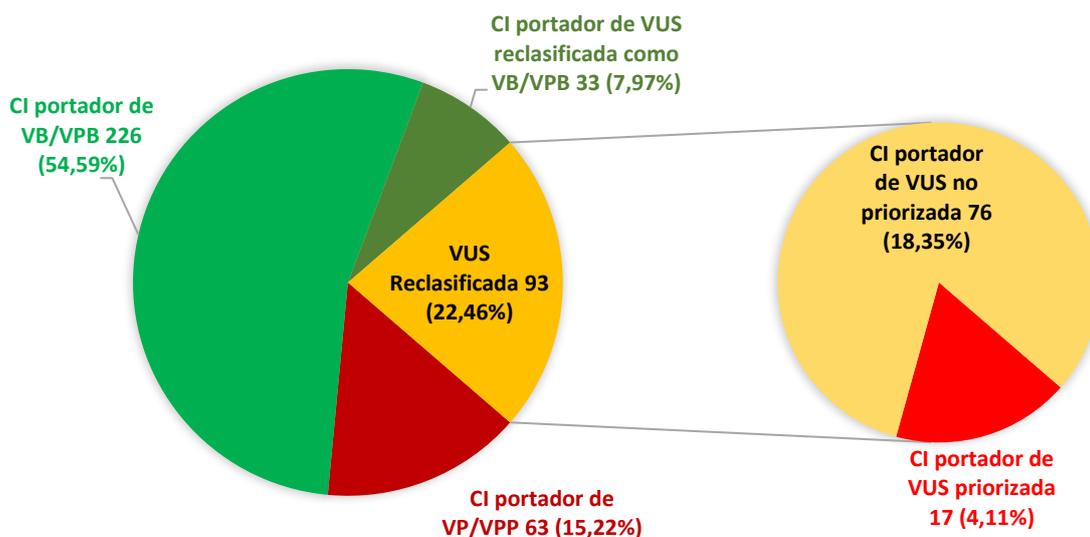


Figura 51: Estado mutacional de la totalidad de la cohorte (n=414) tras la reclasificación y priorización de las 129 VUS iniciales.

## 6. ESTUDIO DE SPLICING DE LA VARIANTE c.375+2T>C EN EL GEN TP53

En el presente estudio tras comprobar en los programas de predicción de *splicing in silico* que la variante c.375+2T>C en el gen *TP53* era susceptible de alterar el proceso de *splicing* y no encontrar en la bibliografía ningún estudio *in vitro* que lo confirmase, se decidió estudiar el efecto de esta variante sobre el proceso de *splicing* mediante la técnica de RT-PCR. Para ello, a partir de la sangre periférica de nuestro caso índice y un portador sano que sirvió de control, se extrajo el ARN de ambas muestras y se sometieron a la técnica de RT-PCR para obtener el ADNc a partir del cual por un lado se hizo un análisis de fragmentos por electroforesis capilar (RT-PCR/EC) y, por otro, una secuenciación de Sanger (RT-PCR/Sanger).

En cuanto a la RT-PCR/EC (**figura 52**) se observaron diferencias cualitativas y cuantitativas significativas entre el caso índice y la muestra de control, ya que en el caso índice se observó además del transcrito de referencia, representado por el pico de 570,22 nucleótidos, otro pico de 367,27 nucleótidos que probablemente corresponde al resultado de una delección parcial del exón 4. Para confirmar dichos resultados se secuenció el fragmento amplificado mediante metodología Sanger. Por tanto, se comprobó que efectivamente la variante c.375+2T>C origina que el espliceosoma no reconozca el sitio donador de *splicing* en el intrón 4, por lo cual se activa un dador críptico en el propio exón 4 (**figura 52**), lo que conlleva a la pérdida parcial del exón 4 (r.176\_375del), lo cual se confirmó por el tamaño del nuevo transcrito aberrante formado. Por otra parte, se comprobó a nivel proteico que esta pérdida parcial del exón 4 genera una alteración del marco de lectura con la formación de un codón de parada prematuro (TGA) en el residuo 23, lo que produce probablemente la pérdida del dominio P53 (dominio de unión al ADN) y el dominio P53\_tetramer (dominio de tetramerización) (**figura 52**).

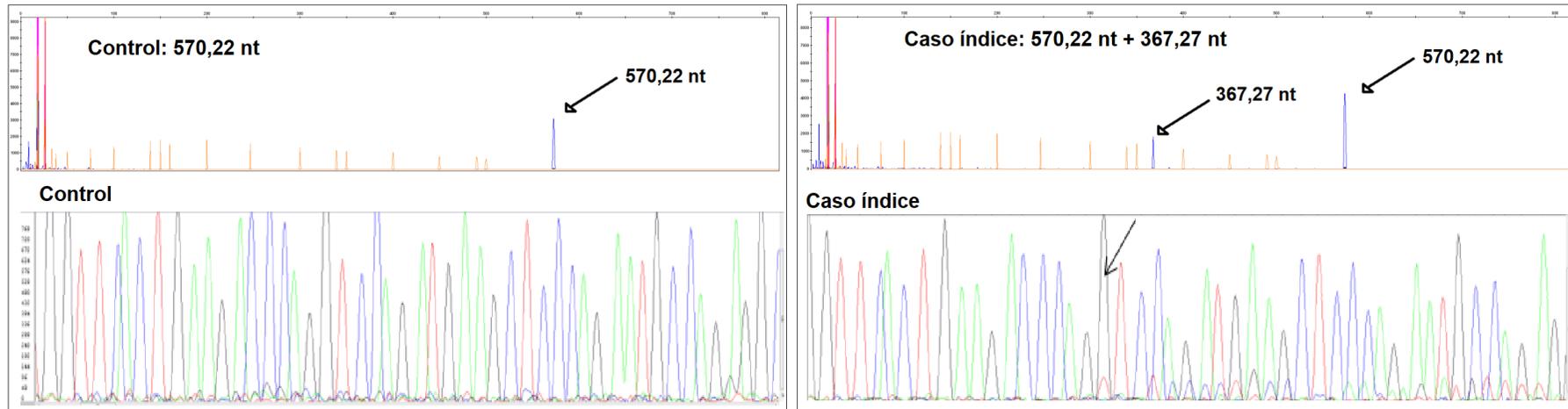


Figura 52: Análisis por RT-PCR/EC y RT-PCR/Sanger de la VP c.375+2T>C. P53: dominio de unión al ADN; P53\_tetramer: dominio de tetramerización.

La mujer portadora de dicha VPP, fue una mujer diagnosticada a los 30 años de cáncer de mama ductal LB. Al ser portadora de una VPP se estudiaron los padres y los hermanos que resultaron no portadores de la VPP, por lo cual se dedujo que la paciente fue portadora de una VPP de *novo*. La **Figura 53** detalla el árbol familiar del caso índice.

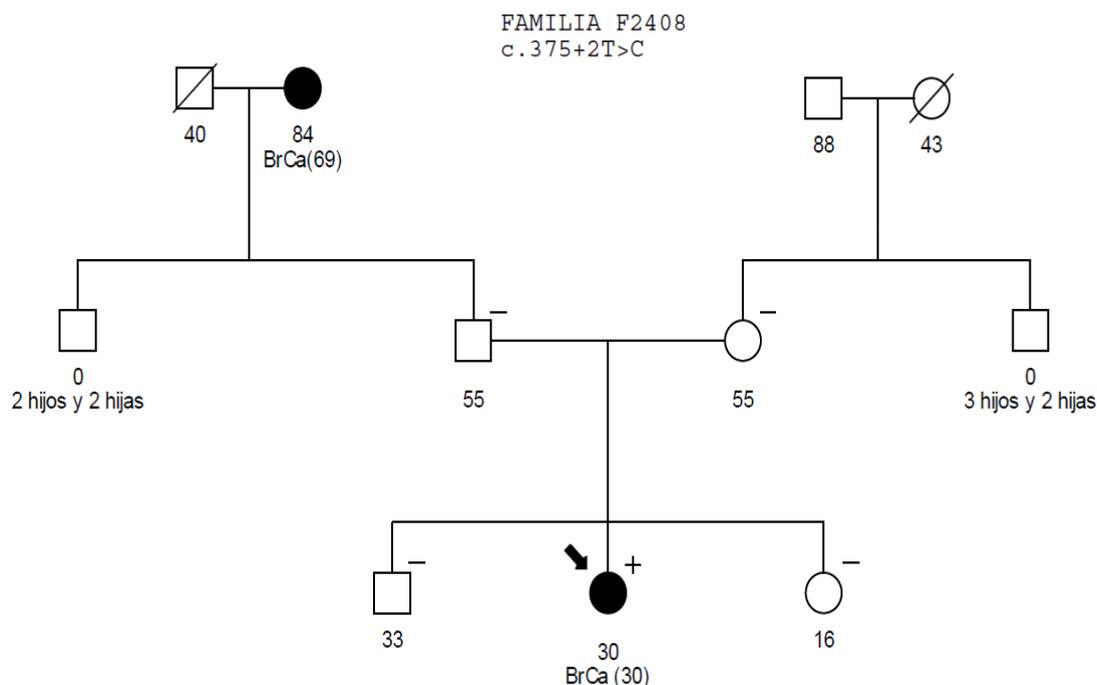


Figura 53: Árbol familiar del caso índice portadora de la VPP c.375+2C>T en el gen *TP53*. La flecha indica el caso índice. BrCa: cáncer de mama.

## 7. CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES DETECTADAS EN GENES SUSCEPTIBLES DE SCMOH

### 7.1. Variantes patogénicas detectadas en genes susceptibles de SCMOH

Tras aplicar la técnica de secuenciación masiva, utilizando el panel de 50 genes descrito en Metodología, y realizar el estudio bioinformático de los 20 genes clínicamente accionables recomendados por la guía clínica NCCN v3.2019, se decidió ampliar el estudio bioinformático a los 30 genes restantes, con el fin de detectar VP/VPP en el resto de genes disponibles, y establecer posibles genes candidatos para el SCMOH.

Tras este estudio, se detectaron 9 VP/VPP distintas, de las cuales 1 fue detectada en 2 casos índices. Las variantes genéticas se distribuyeron en los siguientes genes: *MRE11* (1/9), *TMEM127* (1/9), *NTHL1* (1/9), *SDHA* (1/9), *RET* (1/9), *POLE* (1/9), *RAD50* (1/9), *XRCC2* (1/9). En cuanto a la caracterización molecular un 44,44 % de las variantes identificadas fueron de tipo FS (4VP-VPP/9),

un 33,33% de tipo NS (3VP-VPP/9), un 11,11% (1VP-VPP/9) de tipo MS y finalmente un 11,11% (1VP-VPP/9) de tipo *splicing*. De los 414 casos índices estudiados, 10 fueron portadores de una VP/VPP en los 30 genes analizados por lo cual el rendimiento obtenido fue de 2,41%. En la **Tabla 21** se detallan las VP/VPP obtenidas.

Gen	Familia	Variantes patogénicas detectadas	Proteína	Tipo de mutación	Exón/intrón	RefSNP	Criterios ACMG / Clasificación Varsome	Clasificación ClinVar
<b>MRE11</b>	F1996	c.963del	p.(Phe321LeufsTer8)	FS	Ex9	ND	PVS1, PM2 / VPP	ND
<b>TMEM127</b>	F1953	c.117_120del	p.(Ile41ArgfsTer39)	FS	Ex2	rs121908816	PVS1, PP5, PM2 / VP	VP
<b>NTHL1</b>	F1927	c.268C>T	p.(Gln90Ter)	NS	Ex2	rs150766139	PVS1, PP5, PM2 / VP	VP
	F2489	c.550-1G>A	ND	SP	In3-4	rs779757251	PVS1, PP5, PM2 / VP	VP
<b>SDHA</b>	F2152 F2267	c.91C>T (2)*	p.(Arg31Ter)	NS	Ex2	rs142441643	PVS1, PP5, PM2 / VP	VP
<b>RET</b>	F2251	c.2370G>T	p.(Leu790Phe)	MS	Ex13	rs75030001	PS1, PP3, PM2, PP5 / VP	VP
<b>POLE</b>	F2444	c.3957dup	p.(Arg1320AlafsTer35)	FS	Ex31	ND	PVS1, PM2 / VPP	ND
<b>RAD50</b>	F2331	c.2165dup	p.(Glu723GlyfsTer5)	FS	Ex13	rs397507178	PVS1, PP5, PM2 / VP	VP
<b>XRRC2</b>	F2224	c.643C>T	p.(Arg215Ter)	NS	Ex3	rs143153871	PVS1, PP5, PM2 / VP	VPP/VUS

Tabla 21: Caracterización de las VP/VPP detectadas en los genes susceptibles de SCMOH en el estudio. VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; VUS: Variante de Significado clínico Incierto; FS: *Frameshift*; SP: *Splicing*; MS: *Missense*; NS: *Nonsense*; ND: No Disponible; F: familia; Ex: exón; In: Intrón. \* Esta misma VP se detectó en dos probandos.

## 7.2. VUS detectadas con el panel de 30 genes

De los 30 genes analizados, se identificaron un total de 124 VUS diferentes en los 24 genes siguientes: *POLE* (20/124), *MET* (13/124), *MLH3* (8/124), *MSH3* (11/124), *RET* (10/124), *APC* (7/124), *BMPR1A* (1/124), *CDK4* (2/124), *CDKN2A* (1/124), *FH* (3/124), *KIF1B* (6/124), *MAX* (1/124), *MEN* (5/124), *MRE11* (5/124), *MUTYH* (1/124), *NTHL1* (4/124), *POLD1* (4/124), *RAD50* (4/124), *RB1* (3/124), *SDHA* (7/124), *SDHB* (2/124), *VHL* (1/124), *SMAD4* (3/124), *TMEM* (2/124). En el **Anexo 6** se detalla las variantes VUS detectadas, clasificación de las variantes según la nomenclatura c.HGVS, el cambio proteico (p. HGVS) producido y el tipo de variante. En la **Figura 54** se describe para cada uno de los genes susceptibles estudiado las VUS y VP/VPP detectadas.

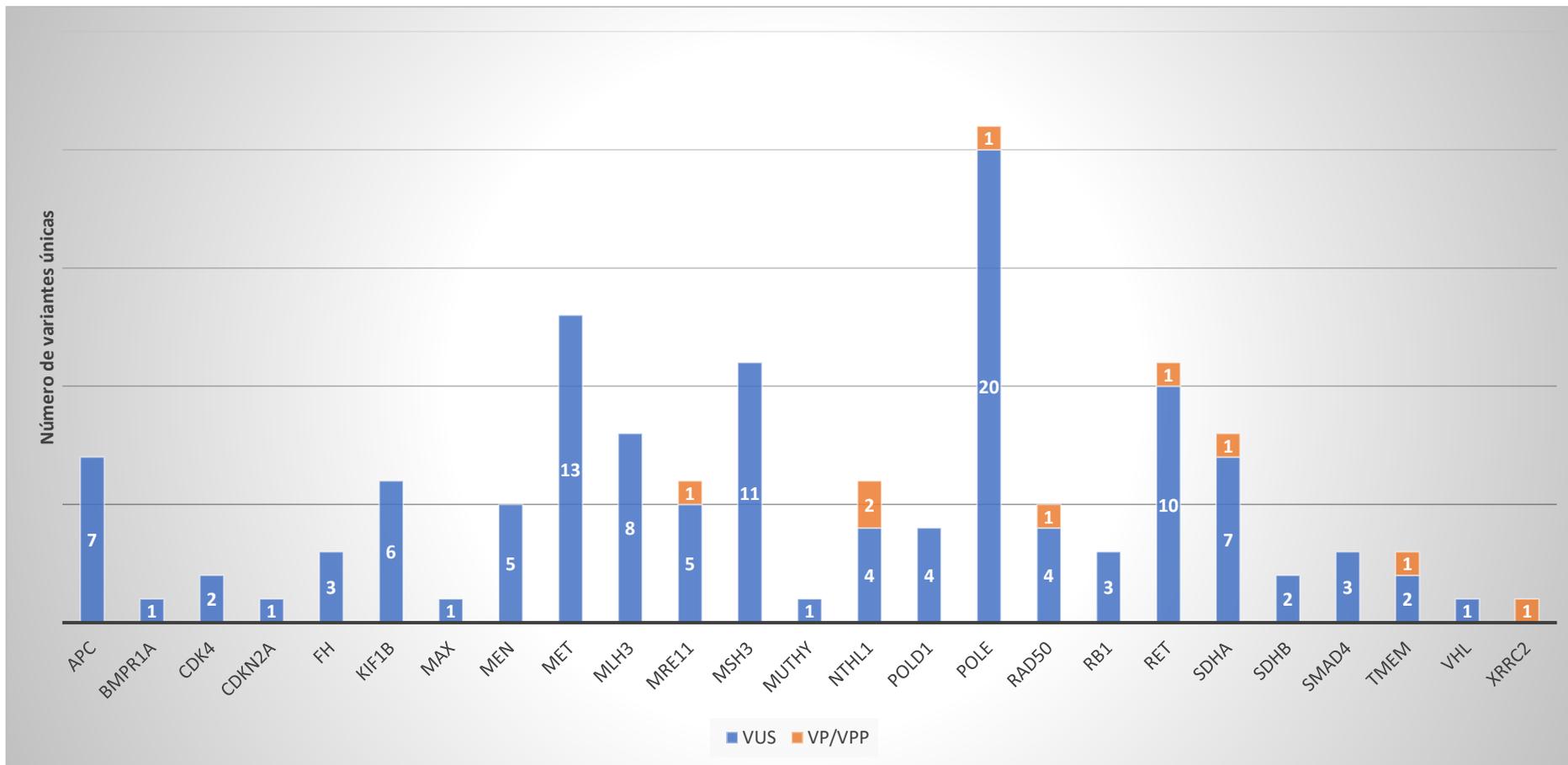


Figura 54: Distintas variantes VUS y VP/VPP detectadas en los 30 genes candidatos estudiados.



## **V. Discusión**



## 1. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL PANEL DE LOS 20 GENES DE ACCIONABILIDAD CLÍNICA

El estudio desarrollado en la presente tesis doctoral es, según nuestro conocimiento, el primer trabajo a nivel nacional en donde la totalidad de los casos índices se seleccionaron según las últimas recomendaciones descritas por la SEOM (2019) para el SCMOH (136). Con respecto al tamaño muestral, es el segundo estudio nacional con mayor número de casos índices estudiados después del estudio de *Adamo et al* (137). Finalmente, al igual que en los trabajos de *Molina-Zayas et al* (138) y *Adamo et al* (137), en los casos índices seleccionados no se realizó un estudio previo para detectar VP en genes BRCA, sino que se analizó un panel completo de genes (genes *BRCA* y no *BRCA*) mediante NGS desde el inicio del mismo, con la peculiaridad de que en nuestro estudio se analizaron los 20 genes recomendados por la NCCN versión 3.2019, en comparación con los 16 genes estudiados en los dos estudios citados.

Con la intención de comparar los resultados de rendimiento diagnóstico obtenidos en nuestro estudio se recopilaron los resultados de diferentes estudios nacionales (**Tabla 22**), europeos (**Tabla 23**) y a nivel mundial (**Tabla 24**).

Localización geográfica / Referencia bibliográfica	nº de CI	nº de genes	Genes estudiados	Rendimiento diagnóstico global (número de casos índices con VP/VPP)	Criterios de selección
<b>Estudio actual Murcia</b>	414	20	<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, NF1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53</i>	15,22% (63)	SEOM 2019 (136)
<b>Granada / Molina-Zayas et al (138)<sup>1</sup></b>	386	16	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53</i>	13,21% * (51)	SEOM 2016 (93)
<b>Barcelona / Adamo et al (137)</b>	451	16	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PTEN, RAD51D, RAD51C, STK11, TP53.</i>	13,3% * (60)	ND

Tabla 22: Comparativa de resultados de rendimiento global (%) por caso índice con otros estudios nacionales. ND: No Disponible. Para los genes no *BRCA* no se tomaron en cuenta portadores de VP/VPP detectadas en el gen *MUTYH*. <sup>1</sup> Se compararon solo los resultados obtenidos por NGS en este estudio y se descartaron los resultados obtenidos por secuenciación Sanger. \* Rendimiento calculado.

Localización geográfica / Referencia bibliográfica	nº de CI	nº de genes	Rendimiento diagnóstico global (número de casos índices con VP/VPP)	Criterios de selección
Estudio actual Murcia	414	20	15,22% (63)	SEOM 2019
Francia / <i>Eliade et al</i> (139)	583	25	14,58% * (85)	Criterios propios del estudio
Alemania / <i>Schroeder et al</i> (140)	620	10	12,1% (75)	Consorcio alemán para el cáncer de mama y ovario versión S3 (GC-HBOC) (141)
Alemania / <i>Kraus et al</i> (142)	581	14	18,07% * (105)	Consorcio alemán para el cáncer de mama y ovario versión S3 (GC-HBOC) (141)
Italia / <i>Tedaldi et al</i> (143)	255	94	29,02% * (74)	Guía de la sociedad italiana de cáncer de mama (F.O.N.CA.M)
Portugal / <i>Pinto et al</i> (144) <sup>1</sup>	80	17	28,75 % * (23)	Pacientes con numerosos antecedentes familiares de cáncer de mama y ovario y/o con una probabilidad de 20% de encontrar una mutación en los genes <i>BRCA</i> utilizando el programa BRCAPRO
Serbia / <i>Krivokuca et al</i> (145) <sup>2</sup>	348	20	21,26% * (74)	Criterios de sistema nacional de salud para el diagnóstico de pacientes con SCMOH a los cuales se añadieron algunos criterios propios del estudio.

Tabla 23: Comparativa de resultados de rendimiento global por caso índice con otros estudios europeos. No se tomaron en cuenta portadores de VP/VPP detectadas en el gen *MUTYH*. <sup>1</sup> Se descartaron dos pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal. <sup>2</sup> Para el cálculo del rendimiento global no se tomó en cuenta el grupo 1 de los pacientes sanos. \* Rendimiento calculado.

Localización geográfica / Referencia bibliográfica	nº de CI	nº de genes	Rendimiento diagnóstico global (número de casos índices con VP/VPP)	Criterios de selección
Estudio actual Murcia	414	20	15,22% (63)	SEOM 2019
Estados Unidos / <i>Kurian et al</i> (146) <sup>1</sup>	31404**	25	10,83% * (3402)	Se seleccionaron pacientes con cáncer de mama ≥ de 20 años o cáncer de ovario a cualquier edad. Se excluyeron mujeres con cáncer de mama bilateral o cáncer de mama y ovario.
Canadá / <i>Lerner-Elis et al</i> (147) <sup>2</sup>	2585**	20	9,20% * (234)	Criterios del ministerio de sanidad (MOHLTC)
Caribe / <i>George et al</i> (148)	1015	30	14,21% * (144)	Criterios propios del estudio
China / <i>Shao et al</i> (149) <sup>3</sup>	709**	21	21,44% * (152)	NCCN versión 2.2017
África del sur / <i>Van der Merwe et al</i> (150)	319	15	15,05% * (46)	Criterios propios del estudio

Tabla 24: Comparativa de resultados de rendimiento global por caso índice con otros estudios mundiales. No se tomaron en cuenta portadores de VP/VPP detectadas en el gen MUTYH. <sup>1</sup> Se tomaron en cuenta solo pacientes afectados con cáncer de mama o cáncer de ovario. <sup>2</sup> Se tomaron en cuenta para el cálculo de las frecuencias mutacionales y el rendimiento global solo pacientes afectados con cáncer de mama en mujeres y varones, cáncer de ovario, cáncer de mama y ovario, cáncer de páncreas y cáncer de próstata. <sup>3</sup> Se excluyeron los pacientes sin diagnóstico de cáncer, pero con antecedentes familiares de cáncer mama y/o cáncer de ovario. \* Rendimiento calculado. \*\* Número de casos índices calculado.

A nivel nacional, la metodología y los criterios de selección utilizados en los distintos estudios son adecuados, ya que todos los rendimientos globales obtenidos fueron superiores al rendimiento global mínimo de 10% recomendado por la SEOM (151).

A nivel europeo, el rendimiento global que se obtuvo en nuestro estudio (15,22%) fue similar a los rendimientos obtenidos tanto en Francia como en Alemania e inferior al de Serbia (21,26%). Sin embargo, llamó la atención el mayor rendimiento obtenido en el estudio de Portugal (30%), el cual podría estar influenciado por el pequeño tamaño muestral, los criterios de selección, y la utilización de la herramienta bioinformática BRCAPRO. Con respecto, al elevado rendimiento obtenido en el estudio de Italia (29,02%) no se ha podido conocer la causa y habría que confirmar este resultado con otros estudios de diseños similares.

A nivel mundial, todos los estudios alcanzaron el rendimiento diagnóstico global mínimo recomendado para el diagnóstico de pacientes con SCMOH, con la excepción del estudio de *Lerner-Elis et al* (147) que es ligeramente inferior (9,2%). Cabe destacar el estudio de *Kurian et al* (146), en el cual el rendimiento global de diagnóstico superó apenas el 10% recomendado, a pesar de aplicar criterios de selección menos selectivos que la SEOM. Por tanto, el diseño de este estudio, en población estadounidense, permitió aumentar la sensibilidad diagnóstica manteniendo un rendimiento diagnóstico satisfactorio. No obstante, esta estrategia diagnóstica supone un mayor número de recursos económicos y humanos.

## 2. EVALUACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS DE LOS CRITERIOS DE SELECCIÓN

El grupo con mayor rendimiento diagnóstico fue el de los criterios individuales (26VP-VPP /176; 14,77%). El segundo grupo de criterio con mayor rendimiento fue el basado en los antecedentes oncológicos de familiares de primer grado (5VP-VPP/39; 12,82%). El grupo con el rendimiento más bajo fue el basado en los antecedentes oncológicos de familiares de segundo o tercer grado de la misma rama familiar (7 VP-VPP/60; 11,67%). Los resultados obtenidos coincidieron con el estudio de *Molina-Zayas et al* (138) en cuanto al orden de clasificación, es decir, el de mayor rendimiento fue criterio individual y el de menor rendimiento fue el basado en la historia familiar de familiares de segundo y tercer grado, Sin embargo, en el grupo de criterios individuales su rendimiento fue relativamente superior al nuestro (18,1% vs 14,77%). Esa discrepancia se debió probablemente a la forma con la cual se calcularon los rendimientos. En nuestro estudio se procuró sacar los rendimientos teniendo en cuenta solo los casos índices que cumplieron un solo y único criterio para evitar sesgos a la hora de calcular el rendimiento de cada grupo de criterio, en cambio en el estudio de *Molina-Zayas et al*, probablemente los rendimientos de cada grupo

de criterio se tuvieron en cuenta casos índices que cumplieron más de un criterio, hecho que habrá probablemente sobreestimado el rendimiento del grupo de criterio individual.

En segundo lugar, se procedió a evaluar de forma individual cada uno de los criterios que formaron los 3 grupos de criterios de selección. Uno de los criterios con mayor rendimiento fue el de pacientes con cáncer de mama y ovario sincrónico o metacrónico (2VP-VPP/4; 50%) hallazgo que coincidió con la literatura (149) (152). Sorprendentemente uno de los criterios con tasa de detección muy baja fue el de pacientes <60 años con cáncer de mama TN (2VP-VPP/34; 5,88%) hallazgo que no coincidió con la literatura, ya que el rendimiento diagnóstico para pacientes diagnosticados de cáncer de mama TN antes de los 60 años en el estudio de *Krivokuca et al* fue del 20,5% (145), incluso alcanzó el 40% cuando no se aplicó límite de edad a este criterio de selección y sin tener en cuenta los antecedentes oncológicos familiares (153). Otro criterio que no coincidió con la literatura fue el criterio de cáncer de mama bilateral con el primero diagnosticado antes de los 50 años (1 VP-VPP/12; 8,33%), rendimiento más bajo que el obtenido en *LaDuca et al* (14,1%); algunos estudios incluso llegaron a rendimientos que oscilaron entre 16,8% y 38,5%, al no aplicar límites de edad para este criterio de selección (154) (143). La tasa de detección en los casos índices diagnosticados de cáncer de mama antes de los 40 años en la literatura consultada varió entre 19,9% y 37% (145) (155), valores bastante más superiores a los detectados en nuestro estudio (7VP-VPP/12; 10,45%). Estos hallazgos confirman los estudios publicados en la bibliografía que consideran como factor limitante a la hora de detectar pacientes con SCMOH la aplicación de criterios de selección (156) (157) (158). Además, otro hallazgo que apoyó aún más el hecho de que los factores de selección podrían infra diagnosticar pacientes con SCMOH fue la detección de dos casos índices de la cohorte seleccionada y portadores de una VP/VPP, que tuvieron un diagnóstico previo de cáncer de mama a los 78 años, pero que no se les hizo el test genético inicialmente por no cumplir criterios; sin embargo, cuando fue diagnosticada de cáncer de ovario a los 85 años y por tanto cumplir un criterio de la SEOM 2019, se procedió a realizar el estudio, que resultó ser informativo con una VP/VPP en el gen *BRCA1*. En cuanto a la segunda paciente, tuvo un cáncer de mama a los 54 años, pero al no cumplir ninguno de los criterios de la SEOM 2019 relacionados con cáncer de mama no se le hizo el test genético hasta que padeció un cáncer de ovario a los 58 años y resultó ser portadora de una VP/VPP en el gen *ATM*. Ambos casos fueron oportunidades perdidas de diagnóstico genético temprano y seguimiento sobre los probables familiares portadores de VP/VPP de estos casos índices. Por esa razón, los criterios de selección de la SEOM individuales relacionados con el cáncer de mama podrían ser un factor limitante para el diagnóstico de nuevos casos de SCMOH en nuestra población.

Sobre el rendimiento de los criterios de selección, vinculados a los antecedentes oncológicos de familiares, dos criterios destacaron por su elevado rendimiento. El primero fue el criterio de un cáncer de mama en varón dentro de familiares de primer grado (1VP-VPP/4; 25%) que fue el propio caso índice; este rendimiento coincidió perfectamente con lo publicado en la literatura, ya que el 15-20% de hombres con cáncer de mama forman parte de familias con cáncer de mama y ovario (159). El segundo criterio fue el de un cáncer de mama bilateral más otro cáncer de mama antes de los 60 años en familiares de primer grado (2VP-VPP/ 8; 25%); este criterio no se pudo comparar con la bibliografía al ser un criterio específico de la SEOM y no haberse encontrado ninguna publicación al respecto.

### **3. CONTRIBUCIÓN Y CATEGORIZACIÓN MOLECULAR DE LAS VP/VPP DETECTADAS EN LOS GENES CLÍNICAMENTE ACCIONABLES EN PACIENTES CON SCMOH**

#### **3.1. Contribución de cada uno de los 20 genes de la NCCN en el SCMOH**

De los 414 casos índices, dos de ellos (0,5%) fueron portadores de dos VP/VPP, el primero en los genes *ATM* y *CHEK2*, mientras que el segundo en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. La detección de pacientes portadores de doble VP/VPP se ha incrementado en los últimos años gracias a la NGS. Hasta el momento, predominan los pacientes portadores de una doble VP/VPP en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, aunque cada vez son más los casos descritos con doble VP en otros genes (160). Se estima que la frecuencia global de pacientes portadores de doble VP/VPP en los genes *BRCA1* y *BRCA2* es de 0,3% (161). Con la intención de comparar los rendimientos diagnósticos por gen y la distribución de las VP/VPP por genes obtenidos en nuestro estudio, se recopilaron los resultados estudios nacionales (Tabla 25) (Tabla 26), europeos (Tabla 27) (Tabla 28) y mundiales (Tabla 29) (Tabla 30).

Localización geográfica / referencia bibliográfica	Rendimiento de genes BRCA1/2 (número de VP/VPP)	Rendimiento de genes no BRCA (número de VP/VPP)	Rendimiento diagnóstico por gen (número de casos índices)										
			BRCA1	BRCA2	ATM	CHEK2	PMS2	RAD51C	RAD51D	TP53	PALB2	BRIP1	NF1
<b>Estudio actual</b>	8,94% (37)	6,76% (28)	4,35% (18)	4,59% (19)	2,42% (10)	1,70% (7)	0,24% (1)	0,24% (1)	0,72% (3)	0,48% (2)	0,24% (1)	0,48% (2)	0,24% (1)
<b>Granada / Molina-Zayas et al (138)</b>	6,22% * (24)	6,99% * (27)	1,30% (5)	4,92% (19)	1,81% (7)	1,55% (6)	NDe	0,52% (2)	NDe	0,52% (2)	2,07% (8)	NDe	NI
<b>Barcelona / Adamo et al (137)</b>	8,65% * (39)	4,65% * (21)	3,77% (17)	4,88% (22)	0,44% (2)	0,22% (1)	NI	NDe	0,22% (1)	0,89% (4)	2% (9)	0,44% (2)	NI

Tabla 25: Comparativa de rendimientos diagnósticos de estudios nacionales. VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; NDe: no detectado; NI: no incluido en panel de genes estudiado. \* Rendimientos de genes BRCA y no BRCA y rendimientos diagnósticos por gen calculado.

Localización geográfica / referencia bibliográfica	Distribución de VP/VPP por genes (número de VP/VPP)												
	Genes <i>BRCA1/2</i>	Genes no <i>BRCA</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>ATM</i>	<i>CHEK2</i>	<i>PMS2</i>	<i>RAD51C</i>	<i>RAD51D</i>	<i>TP53</i>	<i>PALB2</i>	<i>BRIP1</i>	<i>NF1</i>
<b>Estudio actual</b>	56,92% (37)	43,08% (28)	27,70%	29,20%	15,38%	10,80%	1,54%	1,54%	4,60%	3,08%	1,54%	3,08%	1,54%
<b>Granada / Molina-Zayas et al (138)</b>	47,10% ** (24)	52,90% ** (27)	9,80%	37,30%	13,70%	11,80%	NDe	3,90%	NDe	3,90%	15,70%	NDe	NI
<b>Barcelona / Adamo et al (137)</b>	65% * (39)	35% * (21)	28,33%	36,67%	3,33%	1,67%	NI	NDe	1,67%	6,67%	15%	3,33%	NI

Tabla 26: Comparativa de distribución de las VP/VPP por genes en los estudios nacionales. VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; NDe: no detectado; NI: no incluido en panel de genes estudiado. \* Rendimientos de genes *BRCA* y no *BRCA* y distribución de VP/VPP por genes calculados. \*\* Solo se calculó la distribución de VP/VPP por genes en genes *BRCA* y genes no *BRCA*. NDe: no detectado; NI: no incluido en panel de genes estudiado.

Localización geográfica / referencia bibliográfica	Rendimiento de genes <i>BRCA1/2</i> (número de VP/VPP)	Rendimiento de genes no <i>BRCA</i> (número de VP/VPP)	Rendimiento diagnóstico por gen (número de casos índices)										
			<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>ATM</i>	<i>CHEK2</i>	<i>PMS2</i>	<i>RAD51C</i>	<i>RAD51D</i>	<i>TP53</i>	<i>PALB2</i>	<i>BRIP1</i>	<i>NF1</i>
<b>Estudio actual</b>	8,94% (37)	6,76% (28)	4,35% (18)	4,59% (19)	2,42% (10)	1,70% (7)	0,24% (1)	0,24% (1)	0,72% (3)	0,48% (2)	0,24% (1)	0,48% (2)	0,24% (1)
Francia / <i>Eliade et al</i> (139)	8,75% * (51)	6,35% * (37)	ND	ND	1,54% (9)	2,06% (12)	0,51% (3)	NDe	NI	0,34% (2)	0,69% (4)	0,17% (1)	NI
Alemania / <i>Schroeder et al</i> (140)	9,20% (57)	2,90% (18)	4,84% (30)	4,35% (27)	0,65% (4)	0,97% (6)	NI	NDe	NDe	0,16% (1)	0,32% (2)	NI	NI
Alemania / <i>Kraus et al</i> (142)	12,39% * (72)	5,85% * (34)	6,71% (39)	5,68% (33)	0,51% (3)	1,72% (10)	NDe	0,86% (5)	0,17% (1)	0,34% (2)	1,03% (6)	NI	NI
Italia / <i>Tedaldi et al</i> (143)	22,75% * (58)	9,02% * (23)	12,55% (32)	10,20% (26)	1,17% (3)	NDe	NDe	NDe	0,40% (1)	NDe	2,34% (6)	0,80% (2)	NDe
Portugal / <i>Pinto et al</i> (144)	21,25% * (17)	7,50% * (6)	12,50% (10)	8,75% (7)	1,25% (1)	1,25% (1)	NDe	NDe	NDe	NDe	5% (4)	NDe	NI
Serbia / <i>Krivokuca et al</i> (145)	10,63% * (37)	10,63% * (37)	6,03% (21)	4,60% (16)	1,72% (6)	3,73% (13)	NDe	0,29% (1)	NDe	0,57% (2)	3,45% (12)	NDe	NDe

Tabla 27: Comparativa de rendimientos diagnósticos de estudios europeos. VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; ND: No Disponible; NDe: no detectado; NI: no incluido en panel de genes estudiado. \* Rendimientos de genes *BRCA* y no *BRCA* y rendimientos diagnósticos por gen calculados.

Localización geográfica / referencia bibliográfica	Distribución de VP/VPP por genes (número de VP/VPP)												
	Genes BRCA1/2	Genes no BRCA	BRCA1	BRCA2	ATM	CHEK2	PMS2	RAD51C	RAD51D	TP53	PALB2	BRIP1	NF1
<b>Estudio actual</b>	56,92% (37)	43,08% (28)	27,70%	29,20%	15,38%	10,80%	1,54%	1,54%	4,60%	3,08%	1,54%	3,08%	1,54%
Francia / <i>Eliade et al</i> (139)	57,95%* (51)	42,05%* (37)	ND	ND	10,23%	13,64%	3,41%	NDe	NI	2,27%	4,55%	1,14%	NI
Alemania / <i>Schroeder et al</i> (140)	76% (57)	24% (18)	40%	36%	5%	8%	NI	NDe	NDe	1%	3%	NI	NI
Alemania / <i>Kraus et al</i> (142)	67,92%* (72)	32,08%* (34)	36,79%	31,13%	2,83%	9,43%	NDe	4,72%	0,94%	1,89%	5,66%	NI	NI
Italia / <i>Tedaldi et al</i> (143)	71,60%* (58)	28,40%* (23)	39,50%	32,10%	3,70%	NDe	NDe	NDe	1,23%	NDe	7,41%	2,47%	NDe
Portugal / <i>Pinto et al</i> (144)	73,91%* (17)	26,09%* (6)	44,48%	30,43%	4,35%	4,35%	NDe	NDe	NDe	NDe	17,39%	NDe	NI
Serbia / <i>Krivokuca et al</i> (145) *	50%* (37)	50%* (37)	28,38%	21,62%	8,11%	17,57%	NDe	1,35%	NDe	2,70%	16,21%	NDe	NDe

Tabla 28: Comparativa de distribución de las VP/VPP por genes en los estudios europeos. VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; ND: no disponible; NDe: no detectado; NI: no incluido en panel de genes estudiado. \* Rendimientos de genes BRCA y no BRCA y distribución de VP/VPP por genes calculados.

Localización geográfica / referencia bibliográfica	Rendimiento de genes <i>BRCA1/2</i> (número de VP/VPP)	Rendimiento de genes no <i>BRCA</i> (número de VP/VPP)	Rendimiento diagnóstico por gen (número de casos índices)										
			<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>ATM</i>	<i>CHEK2</i>	<i>PMS2</i>	<i>RAD51C</i>	<i>RAD51D</i>	<i>TP53</i>	<i>PALB2</i>	<i>BRIP1</i>	<i>NF1</i>
<b>Estudio actual</b>	8,94% (37)	6,76% (28)	4,35% (18)	4,59% (19)	2,42% (10)	1,70% (7)	0,24% (1)	0,24% (1)	0,72% (3)	0,48% (2)	0,24% (1)	0,48% (2)	0,24% (1)
Estados Unidos / <i>Kurian et al</i> (146) <sup>1</sup>	6,04% * (1896)	5,04% * (1583)	3,17% (994)	2,87% (902)	0,91% (287)	1,09% (343)	0,26% (81)	0,24% (76)	0,08% (26)	0,08% (26)	0,88% (278)	0,35% (110)	NI
Canadá / <i>Lerner-Elis et al</i> (147) <sup>2</sup>	4,02% * (104)	5,18% * (134)	1,89% (49)	2,13% (55)	0,66% (17)	1,24% (32)	0,54% (14)	0,15% (4)	0,08 (2)	0,30% (8)	0,89% (23)	0,30% (8)	NI
Caribe / <i>George et al</i> (148)	12,31% * (125)	1,90% * (19)	9,06% (92)	3,25% (33)	0,10% (1)	0,10% (1)	NDe	0,10% (1)	NDe	0,10% (1)	1,28% (13)	ND	NI
China / <i>Shao et al</i> (149) <sup>3</sup>	18,05% * (128)	3,95% * (28)	11,85% (84)	6,20% (44)	NDe	0,85% (6)	0,14% (1)	0,42% (3)	NI	0,28% (2)	0,14% (1)	0,99% (7)	NI
África del sur / <i>Van der Merwe et al</i> (150)	10,66% * (34)	4,39% * (14)	3,76% (12)	6,90% (22)	1,25% (4)	1,25% (4)	NDe	NDe	NDe	0,31% (1)	0,31% (1)	0,63% (2)	NDe

Tabla 29: Comparativa de rendimientos diagnósticos de estudios mundiales. VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; NDe: no detectado; NI: no incluido en panel de genes estudiado. \* Rendimientos de genes *BRCA* y no *BRCA* y rendimientos diagnósticos por gen calculados. <sup>1</sup> Se tomaron en cuenta solo pacientes afectados con cáncer de mama o cáncer de ovario. <sup>2</sup> Se tomaron en cuenta para el cálculo de las frecuencias mutacionales y el rendimiento global solo pacientes afectados con cáncer de mama en mujeres y varones, cáncer de ovario, cáncer de mama y ovario, cáncer de páncreas y cáncer de próstata. <sup>3</sup> Se excluyeron los pacientes sin diagnóstico de cáncer, pero con antecedentes familiares de cáncer mama y/o cáncer de ovario

Localización geográfica / referencia bibliográfica	Distribución de VP/VPP por genes (número de VP/VPP)												
	Genes BRCA1/2	Genes no BRCA	BRCA1	BRCA2	ATM	CHEK2	PMS2	RAD51C	RAD51D	TP53	PALB2	BRIP1	NF1
<b>Estudio actual</b>	56,92% (37)	43,08% (28)	27,70%	29,20%	15,38%	10,80%	1,54%	1,54%	4,60%	3,08%	1,54%	3,08%	1,54%
Estados Unidos / <i>Kurian et al</i> (146) <sup>1</sup>	54,50% * (1896)	45,50% * (1583)	28,57%	25,93%	8,25%	9,86%	2,33%	2,18%	0,75%	0,75%	8%	3,16%	NI
Canadá / <i>Lerner-Elis et al</i> (147) <sup>2</sup>	43,70% * (104)	56,30% * (134)	20,59%	23,11%	7,14%	13,45%	5,88%	1,68%	0,84%	3,36%	9,66%	3,36%	NI
Caribe / <i>George et al</i> (148)	86,81% * (125)	13,19% * (19)	63,89%	22,92%	0,69%	0,69%	NDe	0,69%	NDe	0,69%	9,03%	ND	NI
China / <i>Shao et al</i> (149) <sup>3</sup>	82,05% * (128)	17,95% * (28)	53,84%	28,21%	NDe	3,85%	0,64%	1,92%	NI	1,28%	0,64%	4,49%	NI
África del sur / <i>Van der Merwe et al</i> (150)	70,83% * (34)	29,17% * (14)	25%	45,83%	8,33%	8,33%	NDe	NDe	NDe	2,08%	2,08%	4,17%	NDe

Tabla 30: Comparativa de distribución de las VP/VPP por genes en los estudios mundiales. VP: Variante Patogénica; VPP: Variante Probablemente Patogénica; NDe: no detectado; NI: no incluido en panel de genes estudiado. \* Rendimientos de genes *BRCA* y no *BRCA* y distribución de VP/VPP por genes calculados. <sup>1</sup> Se tomaron en cuenta solo pacientes afectados con cáncer de mama o cáncer de ovario. <sup>2</sup> Se tomaron en cuenta para el cálculo de las frecuencias mutacionales y el rendimiento global solo pacientes afectados con cáncer de mama en mujeres y varones, cáncer de ovario, cáncer de mama y ovario, cáncer de páncreas y cáncer de próstata. <sup>3</sup> Se excluyeron los pacientes sin diagnóstico de cáncer, pero con antecedentes familiares de cáncer mama y/o cáncer de ovario

Los rendimientos obtenidos en los genes *PMS2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *TP53* en nuestro estudio fueron similares a los encontrados en otros estudios. A continuación, se discuten los resultados de rendimientos que no coincidieron con los obtenidos en nuestro estudio:

### 3.1.1. Genes *BRCA*

A nivel nacional, los resultados de rendimiento obtenidos en los genes *BRCA* en nuestro estudio coincidieron con el estudio catalán de *Adamo et al* (137); sin embargo, no coincidieron con los del estudio de *Molina-Zayas et al* (138) en el cual el rendimiento de los genes *BRCA* fue inferior al nuestro, a expensas de una baja tasa de detección en el gen *BRCA1* respecto a la obtenida en nuestro estudio (9,2% vs 27,7%). Esta diferencia se podría explicar por las distintas poblaciones estudiadas, y el fenotipo de los casos índices seleccionados.

A nivel europeo, destacan el estudio de *Schroeder et al* (140), de *Tedaldi et al* (143) y el estudio de *Pinto et al* (144) por una tasa de detección de VP/VPP en los genes *BRCA* que supera el 70% (**Tabla 28**). En el caso del estudio de Portugal, la elevada distribución de las VP/VPP en los genes *BRCA* se debió probablemente al empleo de la herramienta bioinformático BRCAPRO, mientras que en el estudio alemán podría ser relacionado con el número reducido de genes estudiados. Con respecto al estudio italiano se obtuvo rendimiento en genes *BRCA* superiores al nuestro a pesar de tener criterios de selección parecidos a los empleados en nuestro estudio.

A nivel mundial, señalar tres estudios con una distribución de VP/VPP en los genes *BRCA* que superó el 70%. En el estudio de *George et al* (148) la tasa de detección de VP/VPP en los genes *BRCA* alcanzó casi el 87%; este hallazgo se debió a dos VP/VPP de efecto fundador en el gen *BRCA1* (c.4357+1G>A y la c.4611\_4612insG) que sumaron casi la mitad de todas la VP/VPP detectadas en el gen *BRCA1* (45/92). En cuanto al estudio de *Van der Merwe et al* (150), la elevada tasa de detección de VP/VPP en los genes *BRCA* se justificó por la presencia de 3 VP/VPP de efecto fundador en el gen *BRCA2* (c.582G>A, c.5771\_5774delTTCA y c.7934del) que fueron encontradas en un total de 10 casos índices. Por otro lado, en el estudio de *Shao et al* (149), la elevada tasa de detección de VP/VPP en los genes *BRCA* se justificó por una población con un número elevado de pacientes con cáncer de ovario (casi el 50% de la población seleccionada) en donde los genes *BRCA* sumaron el 86% (99/115) de la totalidad de la VP/VPP identificadas, con un predominio de VP/VPP en el gen *BRCA1* (57%; 66/115).

### 3.1.2. Genes no BRCA

#### - Gen *ATM*

El tercio de las VP/VPP detectadas en los genes no *BRCA* en nuestro estudio fue atribuido al gen *ATM*, de tal forma que el rendimiento diagnóstico del gen *ATM* obtenido (2,42%) fue superior a los rendimientos obtenidos tanto a nivel nacional como los obtenidos a nivel europeo y mundial. Este hecho se explicaría por la presencia de la variante genética c.8251\_8254del, en la que fue demostrado su efecto fundador en la región de Murcia por *Castillo-Guardiola et al* (84), la cual fue detectada en 4/63 casos índices portadores de VP/VPP en nuestro estudio y fue casi la mitad de todas las VP/VPP detectadas en el gen *ATM* (4/10). Por otro lado, es importante destacar la diferencia de frecuencia mutacional que se detectó en el gen *ATM* entre el estudio presente y el de *Castillo-Guardiola et al*, que a pesar de que ambos estudios se llevaron a cabo en la misma región, el estudio de *Castillo-Guardiola et al* detectó una frecuencia mutacional en el gen *ATM* de 4,34% (casi el doble de la encontrada en nuestro estudio). Esta diferencia se debió fundamentalmente a que toda la cohorte estudiada en el estudio de *Castillo-Guardiola et al*, fue seleccionada con resultados previos de *BRCA* negativos.

#### - Gen *CHEK2*

El gen *CHEK2*, fue el segundo gen más detectado en nuestro estudio (7VP-VPP/414; 1,70%). Este rendimiento coincidió con el estudio mundial de *Couch et al* (162) en el cual se analizaron 58.798 mujeres con historias individuales o familiares de cáncer de mama y se obtuvo una tasa mutacional del gen *CHEK2* de 1,73%. Sin embargo, en el estudio de *Krivokuca et al* (145), se obtuvo un rendimiento de casi el doble (3,73%). Esta diferencia de rendimiento se explicaría por la elevada prevalencia de la variante c.470T>C en los países de Europa del Este (163); de hecho, en el estudio de *Krivokuca et al*, la variante c.470T>C constituyó el 78,5% de la totalidad de las VP/VPP detectadas en el gen *CHEK2*.

Por otro lado, cabe destacar que no se pudo comparar el rendimiento diagnóstico del gen *CHEK2* obtenido en nuestro estudio con el resto de los estudios en los cuales se detectaron VP/VPP en el gen *CHEK2*, debido principalmente a la discrepancia de categorización de las dos variantes conflictivas c.470T>C y c.1427C>T, a pesar de los esfuerzos realizados en los últimos años por la ACMG para la estandarización de la interpretación de las variantes detectadas en los laboratorios clínicos. En nuestro estudio, la variante c.470T>C fue categorizada como VP/VPP y c.1427C>T como VUS priorizada.

- Gen *PALB2*

El gen *PALB2*, fue uno de los genes que sorprendentemente tuvo un rendimiento diagnóstico muy bajo comparado con el resto de los estudios nacionales, europeos y mundiales. De hecho a nivel nacional, el gen *PALB2* fue el gen más detectado tanto en el estudio de *Molina-Zayas et al* (138) como en el estudio de *Adamo et al* (137), y el rendimiento obtenido en nuestro estudio (1VP-VPP/414; 0,21%), fue casi 10 veces inferior al obtenido en los dos estudios citados. Esta diferencia probablemente se justificaría por las distintas poblaciones estudiadas. De hecho, el estudio murciano de *Castillo-Guardiola et al* (84) reitera los hallazgos de nuestro estudio, puesto que no se llegó a detectar ninguna VP/VPP en el gen *PALB2* a pesar de que el diseño del estudio fue dirigido a la detección de VP/VPP en genes no *BRCA*.

- Gen *NF1*

El gen *NF1* es un gen claramente involucrado en el SCMOH, el riesgo relativo de sufrir cáncer de mama en los portadores de VP/VPP hasta los 50 años es de 40% (30). Sin embargo, a pesar de su papel importante en el desarrollo del SCMOH, y la recomendación de la NCCN de incluirlo en el panel de genes, de los 13 estudios comparativos encontrados en la bibliografía, solo 3 lo incluyeron en su panel, sin llegar a detectar ninguna VP/VPP por lo cual no se pudieron comparar los resultados obtenidos en nuestro estudio.

### 3.2. Caracterización molecular de las VP/VPP detectadas

En cuanto a la caracterización molecular en los genes *BRCA*, las VP/VPP de tipo FS fueron las predominantes, hallazgo que coincidió con la bibliografía (149), (150), (138), (147). En lo concerniente a los RG, se detectaron únicamente en el gen *BRCA1*, por lo cual la contribución de los RG detectados en los genes *BRCA* en pacientes con SCMOH en nuestro estudio (2/65; 3,07%) fue inferior a la del estudio español de la *Hoya et al* (8,1%) (164). En cuanto a los genes no *BRCA*, en general las VP/VPP de tipo FS fueron las predominantes, a la excepción del gen *PALB2* en el cual se detectó un RG (del ex7-11) descrito por primera vez a nivel nacional en el estudio de *Blanco et al* (132), este hallazgo no coincidió con los estudios comparativos, ya que en su mayoría se detectaron VP/VPP de tipo FS (138), (147), (150).

## 4. ESTUDIO GENOTIPO-FENOTIPO EN LAS VP/VPP DETECTADAS EN LOS 20 GENES DE LA NCCN

### 4.1. Estudio genotipo-fenotipo en las VP/VPP detectadas en los genes *BRCA1/2*

El cáncer de mama TN fue el cáncer de mama más diagnosticado en los casos índices portadores de VP/VPP en el gen *BRCA1* ( $p=0,019$ ) mientras que el LB fue el más diagnosticado en los pacientes portadores de VP/VPP en el gen *BRCA2*. Estos resultados coincidieron con lo publicado en la bibliografía (165). La edad media de los casos índices con cáncer de mama unilateral portadores de VP/VPP en *BRCA2* fue más baja que la de los casos índices portadores de VP/VPP en *BRCA1* y más baja que aquellos casos índices con cáncer de mama unilateral no portadores de VP/VPP ( $p=0,004$ ). Estos hallazgos no coincidieron con la literatura (166). Sin embargo, es importante destacar que la edad de aparición de cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en los genes *BRCA* depende de varios otros factores como la historia familiar de los casos índices, la localización de la VP/VPP en el gen, la lactancia materna o la menarquia precoz (167) (44) (45), hechos que podrían justificar esa discrepancia de resultados. En cuanto a la bilateralidad del cáncer de mama, fue más relacionada con los casos índices portadores de VP/VPP en *BRCA1* ( $p=0,043$ ) que aquellos portadores de VP/VPP en *BRCA2* ( $p=1$ ). Con respecto a las edades de diagnóstico, aquellos pacientes con VP/VPP en *BRCA1* tuvieron una edad media de diagnóstico de cáncer de mama bilateral más baja que aquellos portadores de VP/VPP en *BRCA2* (49,5 vs 50,75). Estos hallazgos coincidieron con lo publicado en el estudio de *Gabaldó Barrios et al* (168) y con otros estudios mundiales (169) (170) (154). Sin embargo, cabe destacar que la aparición del cáncer de mama bilateral no depende solo del factor genético, si no que de otros factores importantes como la edad de diagnóstico del primer cáncer de mama, los antecedentes oncológicos de cáncer de mama en los familiares y el tipo de tratamiento al cual se ha sometido el paciente (tratamiento con tamoxifeno o incluso la mastectomía contralateral profiláctica) (169). En cuanto al caso índice varón afectado de cáncer de mama y el paciente diagnosticado de cáncer de próstata fueron portadores de VP/VPP únicamente en el gen *BRCA2*, hallazgos que coincidieron con la literatura publicada (171) (172). En lo concerniente a los casos índices diagnosticados de cáncer de ovario unilateral y bilateral, casi el 72% (13/18) de ellos fueron portadores de VP/VPP en los genes *BRCA*, rendimiento que se acercó al obtenido en el estudio de *Yao et al* (173), estudio en el cual se analizaron 273 casos índices con cáncer de ovario de alto grado, de los cuales, 93/273 resultaron portadores de alguna VP/VPP en la totalidad de los genes estudiados y el 81,7% (76/93) fueron portadores de VP/VPP en los genes *BRCA*. Sin embargo, no se pudo comparar los resultados histopatológicos obtenidos con los disponibles en la bibliografía,

ya que nuestro estudio tiene como limitación la inclusión de pacientes únicamente diagnosticados de cáncer de ovario epitelial no mucinoso y de alto grado.

La aparición de cáncer de mama y ovario es un hallazgo muy poco frecuente. En un estudio llevado a cabo por *Nyqvist et al* (174), de 5132 pacientes diagnosticados de cáncer de mama, solo 34 tuvieron además del cáncer de mama un cáncer de ovario (0,7%), una frecuencia aproximada a la nuestra (5/414; 1,2%). Por otra parte, muchos estudios asociaron la aparición del cáncer de mama y ovario con pacientes portadores de VP/VPP en los genes *BRCA*, sobre todo en el gen *BRCA1*, con una tasa de detección que avcina el 80% (175), (176), (177). En nuestro estudio esta tasa de detección fue más baja, ya que de los dos casos índices portadores de VP/VPP y con cáncer de mama y ovario, a solo uno de ellos se le detectó una VP/VPP en el gen *BRCA1* lo que se tradujo en un rendimiento del 50%. Esa discrepancia se justificaría principalmente por el hecho de que estos estudios se enfocaron exclusivamente en el análisis de los genes *BRCA* en este tipo de pacientes sin tomar en cuenta los 18 genes restantes recomendados por la NCCN. En cuanto a las características histopatológicas y moleculares de cáncer de mama en los pacientes diagnosticados de cáncer de mama y ovario, se ha visto que predomina el tipo ductal TN (175). Nuestro caso índice, sí que coincidió con la literatura en cuanto a la clasificación molecular ya que fue un cáncer de mama TN; sin embargo, histológicamente el cáncer de mama detectado fue un carcinosarcoma, que es un tipo histológico que se detecta solo en el 0,2% de todos los tipo histológicos de cáncer de mama (178), y que hasta la fecha, según la literatura consultada solo se ha publicado un caso de una mujer que fue diagnosticada a los 35 años de un carcinosarcoma de mama y la vez portadora de una VP/VPP en *BRCA1* (179). Así que, el conjunto de ambas circunstancias (cáncer de mama y ovario) y cáncer de mama de tipo carcinosarcoma hace que el caso clínico de esta paciente sea un caso extremadamente poco frecuente.

#### **4.2. Estudio genotipo-fenotipo en las VP/VPP detectadas en los genes no *BRCA***

##### *4.2.1. ATM*

En lo concerniente al cáncer de mama, de los 28 casos índices portadores de VP/VPP con cáncer de mama unilateral, 21,43% (6/28) fueron portadores de VP/VPP en el gen *ATM*, lo que supuso una tasa de detección superior a la del gen *BRCA1* (5/28; 17,86%). Por otro lado, en lo concerniente a la tasa de detección de cáncer de mama bilateral, de los 13 casos índices portadores de VP/VPP, 15,38% (2/13) fueron portadores de VP/VPP en el gen *ATM*, una tasa de detección similar a la del gen *BRCA2*. Estos hallazgos demuestran la importante contribución del gen *ATM* en el cáncer de mama en los pacientes con SCMOH de nuestra región. La edad media de diagnóstico de los pacientes con cáncer de mama (unilateral y bilateral) portadores de una

VP/VPP en el gen *ATM* fue de 42,5 años, lo que significa que las recomendaciones de la NCCN de diagnóstico de pacientes portadores de VP/VPP en el gen *ATM* a partir de los 40 años serían aplicables a nuestra población (30). Sin embargo, cabe destacar que esta edad media de diagnóstico de cáncer de mama fue ligeramente más baja que la obtenida en el estudio español de *Tavera-Tapia et al* (47,42 años) (180). En cuanto a la clasificación histológica y molecular del cáncer de mama, en los pacientes con VP/VPP en el gen *ATM*, el tipo ductal fue el más detectado (72,73%), aunque destaca un 9,10% de tipo lobulillar, mientras que el subtipo molecular predominante fue el LA. No se detectó ningún cáncer de mama TN. Estos hallazgos coincidieron con la bibliografía publicada (163) (181).

La contribución del gen *ATM* en el cáncer de ovario (unilateral y bilateral) fue inferior a la de los genes *BRCA*, solo se detectó una paciente con cáncer de ovario unilateral portadora de una VP/VPP en el gen *ATM* lo que equivale a un rendimiento global de 5,56% (1VP-VPP/18). Este rendimiento fue similar al obtenido en el estudio de *Yao et al* (5,37%) (173).

Respecto al cáncer de mama y ovario en pacientes portadores de VP/VPP en el gen *ATM*, sigue habiendo pocos estudios, ya que la gran mayoría de los estudios publicados sobre pacientes diagnosticados de cáncer de mama y ovario fueron diseñados únicamente para el estudio de los genes *BRCA* por secuenciación de Sanger (176), (177), (175). En los últimos años con la aparición de la NGS, se fueron publicando poco a poco casos de cáncer de mama y ovario en pacientes portadores de VP/VPP en genes distintos a los *BRCA*. En cuanto al gen *ATM*, destacan a nivel nacional dos trabajos (180) (182). En el primero, la variante detectada fue la c.8122G>A, y la paciente portadora de esta VP/VPP fue diagnosticada de cáncer de mama bilateral y cáncer de ovario, con una tasa de detección de pacientes con cáncer de mama y ovario portadores de VP/VPP en el gen *ATM* del 12,5% (1/8). Mientras que en el segundo estudio, la variante detectada fue la c.4776+2T>C cuya paciente fue diagnosticado de cáncer de mama y ovario, y la tasa de detección de pacientes portadores de VP/VPP en el gen *ATM* con cáncer de mama y ovario fue de 33% (1/3). En nuestro estudio, la VP/VPP en el gen *ATM* detectada en el paciente con cáncer de mama y ovario fue la variante con efecto fundador c.8251\_8254del, la tasa de detección obtenida en pacientes con cáncer de mama y ovario portadores de VP/VPP en el gen *ATM* fue de 10% (1/10), rendimiento que se acercó al obtenido en el estudio *Tavera-Tapia et al* (180). La contribución del gen *ATM* en el desarrollo de cáncer de mama y de ovario en pacientes con SCMOH, en nuestro caso fue de 50%, un rendimiento similar al del gen *BRCA1*, sin embargo, hace falta más estudios dirigidos a este tipo de pacientes para poder determinar realmente la contribución de los 20 genes accionables en el desarrollo de cáncer de mama y ovario en la población española.

#### 4.2.2. *CHEK2*

Según la guía de la NCCN versión 2.2023 del SCMOH, no existe asociación de riesgo entre el gen *CHEK2* y el cáncer de ovario. Dicha afirmación coincidió con los resultados obtenidos en el presente estudio ya que la totalidad de los casos índices portadores de VP/VPP en el gen *CHEK2* fueron diagnosticados de cáncer de mama. La edad media de diagnóstico de cáncer de mama (unilateral y bilateral) en pacientes portadores de VP/VPP en el gen *CHEK2* fue de 49,9 años, ligeramente más alta comparado a la bibliografía publicada (46 años) (163) (55), pero compatible con las recomendaciones de la NCCN para el diagnóstico de pacientes portadores de VP/VPP en el gen *CHEK2* con cáncer de mama (40 años) (30). En cuanto al cáncer de mama bilateral, al igual que en el gen *BRCA1*, se detectó una asociación estadísticamente significativa entre el gen *CHEK2* y el cáncer de mama bilateral ( $p=0.004$ ). De hecho, el 43% (3/7) de los casos índices portadores de VP/VPP en *CHEK2* fueron diagnosticados de cáncer de mama bilateral, estos hallazgos coincidieron con la bibliografía publicada (163) (169).

#### 4.2.3. *RAD51D/C*

El gen *RAD51D* empezó a formar parte de los genes accionable relacionados con el SCMOH en los 10 últimos años (183), y su implicación en el cáncer de mama y ovario ya está bien establecido por la NCCN (30). A nivel nacional, hasta la fecha, la variante c.649C>T, fue detectada exclusivamente en pacientes con cáncer de ovario unilateral o bilateral (184), (85), (185). Nuestro estudio aporta un nuevo fenotipo a esta variante, ya que se detectaron dos casos índices portadores de esta variante diagnosticados de cáncer de mama. El primero, fue una mujer diagnosticada de un cáncer de mama bilateral metacrónico, de los cuales el primero detectado a los 39 años (no fue posible determinar las características histopatológicas ni las moleculares debido a la falta de información en la base de datos) y el segundo fue detectado a los 80 años y fue ductal LB. Mientras que el segundo caso índice fue una mujer diagnosticada a los 48 años de un cáncer de mama ductal TN. El tercer caso índice portador de esta VP/VPP fue diagnosticado de cáncer de ovario a los 48 años lo que coincidió con lo publicado (184) y la franja de edad recomendada por la NCCN para plantear ooforectomía (45-50 años) (30).

Al igual que el gen *RAD51D*, el gen *RAD51C* empezó a formar parte de los genes accionables relacionados con el SCMOH en los 10 últimos años (183) y su papel en desarrollo del SCMOH está bien definido por la NCCN (30). En la bibliografía, la variante que se detectó en nuestro estudio, la c.905-2\_905-1del, fue asociada al cáncer de ovario (186), cáncer de mama unilateral (187) (188) y cáncer de mama en varón (189). El caso índice de nuestro estudio, fue una mujer diagnosticada a los 62 años de un cáncer de ovario.

#### 4.2.4. *PMS2*

La variante c.400C>T en heterocigosis fue detectada en la bibliografía en los siguientes casos: paciente con cáncer de mama ductal TN sin historia familiar diagnosticada a los 80 años (190), paciente con cáncer de ovario seroso de alto grado diagnosticada a los 51 años (191), paciente con cáncer de ovario y portadora de doble VP/VPP (gen *PMS2* y *PALB2*) (192) y por último, al compartirse genes en el SCMOH y síndrome de Lynch, se detectó también en una paciente con cáncer colorrectal (193). En nuestro caso, la paciente portadora de esta VP fue diagnosticada a los 43 años de un cáncer de ovario bilateral seroso de alto grado.

Llamó la atención la edad muy temprana en la cual la paciente fue diagnosticada de cáncer de ovario porque, no coincidió en absoluto con la edad de diagnóstico de cáncer de ovario en pacientes portadores de VP/VPP en el gen *PMS2* estimada por la NCCN (51-59 años) (64). Además, el caso índice se distinguió por la ausencia de antecedentes familiares tanto de cáncer de mama como de cáncer de ovario. Estos acontecimientos, resaltan la importancia de considerar como criterio único de inclusión en el diagnóstico del SCMOH aquellas pacientes con cáncer de ovario de alto grado independientemente de la edad de diagnóstico.

#### 4.2.5. *PALB2*

El único estudio a nivel nacional, en cual se detectó una delección del exón 7-11 fue el estudio de *Blanco et al* cuyo paciente fue un hombre diagnosticado de cáncer de mama (59). De hecho, se estima que la frecuencia de detección de RG en *PALB2* en familias con historia de cáncer de mama es de 0.1% (194). En nuestro estudio, la paciente portadora de este RG, fue una mujer diagnosticada de cáncer de ovario a los 85 años, por lo cual nuestro estudio aporta un nuevo fenotipo relacionado con este RG poco frecuente.

#### 4.2.6. *TP53*

Los dos casos índices portadores de VP/VPP en el gen *TP53* fueron dos mujeres, ambas diagnosticadas de cáncer de mama. La edad media de diagnóstico de cáncer de mama en las pacientes portadoras de VP/VPP en este gen (32,5 años), fue particularmente baja respecto al resto de los casos índices diagnosticados de cáncer de mama y portadores de VP/VPP en el resto de los genes no *BRCA*, hallazgo que coincidió con la bibliografía, ya que la edad media de diagnóstico de cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en el gen *TP53* fue de 35 años (55), lo cual se justifica por el hecho de que este gen está relacionado con el síndrome de Li-Fraumeni. Por otra parte, esta edad media, confirmó que las recomendaciones de la NCCN para

el diagnóstico de pacientes con cáncer de mama portadores de VP/VPP en el gen *TP53* a partir de los 20 años serían aplicables a nuestra población (30).

El síndrome de Li-Fraumeni se caracteriza por el desarrollo de varios tumores: tumores cerebrales, tumores de tejidos blandos, leucemias y cáncer de mama, entre otros. Afortunadamente, nuestras dos pacientes, hasta la fecha, han sido diagnosticadas únicamente de cáncer de mama. Ambas pacientes tuvieron un cáncer de mama ductal; sin embargo, de subtipos moleculares distintos, LB en la primera paciente y TN en la segunda. Este último hallazgo, se consideró como muy poco frecuente, ya que se estima que solo entre 4-9,2% de los pacientes con cáncer de mama portadores de VP/VPP en *TP53* desarrollan cáncer de mama TN y que los subtipos moleculares predominantes en estos pacientes suelen ser cánceres de mama con receptores hormonales positivos o en mayor proporción HER2+ (195) (196).

#### 4.2.7. *BRIP1*

A nivel nacional, la variante c.206-2A>G fue detectada solo en un estudio en el cual el paciente fue diagnosticado de cáncer de mama sin especificar ni la edad de diagnóstico ni las características histopatológicas y moleculares de dicho cáncer (197). No obstante, existen varios estudios nacionales en los cuales se detectaron pacientes portadores de otras VP/VPP en el gen *BRIP1* en los cuales cuyos portadores fueron diagnosticados de cáncer de mama unilateral a los 62 años, cáncer de mama unilateral a los 32 años, cáncer de mama bilateral a los 18 años y glioblastoma (198), (85), (123). Incluso en el estudio de *Rodríguez-Balada et al*, se detectó un caso índice con doble VP/VPP en los genes *BRIP1* y *BRCA2* con cáncer de mama bilateral a los 44 años (199). En estos estudios, el tipo histológico predominante fue ductal, y en cuanto a la clasificación molecular, predominó el cáncer de mama con receptores hormonales positivos o HER2+, hallazgos que coincidieron con nuestro estudio, en el cual el primer caso índice fue diagnosticado de un cáncer de mama unilateral ductal HER2+ y el otro caso índice fue diagnosticado de un cáncer de mama bilateral ductal con distintos subtipos moleculares uno fue LA y el otro LB. Sin embargo, tanto los hallazgos encontrados a nivel nacional como los de nuestro estudio, no coincidieron con el estudio mundial de *Buys et al*, en el cual el cáncer de mama en pacientes portadores de VP/VPP en el gen *BRIP1* fue principalmente TN ( $p < 0.001$ ) (200). Esta discrepancia podría estar relacionada, por una parte, por los pocos casos índices con cáncer de mama portadores de VP/VPP en *BRIP1* detectados en nuestro estudio que fueron 2 frente a 110 detectados en el estudio de *Buys et al* y, por otra parte, la diversidad de orígenes de la población estudiada en el estudio de *Buys et al*. La edad media de diagnóstico de cáncer de mama fue de 43 años, lo que coincidió con la bibliografía (201).

#### 4.2.8. *NF1*

El caso índice portador de la VP/VPP en el gen *NF1* fue diagnosticado de cáncer de ovario bilateral. El papel de las VP/VPP en el gen *NF1* para el desarrollo del cáncer de ovario no ha sido del todo establecido por la NCCN, a diferencia del cáncer de mama. Sin embargo, se sabe que es frecuente encontrar a nivel somático VP/VPP en el gen *NF1* de pacientes con cáncer de ovario (202). Además, el estudio de *Ece Solmaz et al* (203) publicado recientemente, detectó un caso de una paciente con cáncer de ovario con una mutación germinal en el gen *NF1* sin que exista co-ocurrencia de otra VP/VPP como en otras publicaciones (204) (205). Nuestro caso y el de *Ece Solmaz et al* demuestran el potencial papel que podría tener el gen *NF1* en el desarrollo de cáncer ovario, a la espera de más estudios que acrediten dicho papel en pacientes con SCMOH.

### 4.3. Estudio genotipo-fenotipo en pacientes portadores de 2VP/VPP

La doble heterocigosis es un hallazgo poco habitual, aunque en los últimos años está aumentando el número de publicaciones al respecto debido al uso más generalizado de la NGS en los laboratorios de diagnóstico genético (160).

#### 4.3.1. *Pacientes portadores de doble VP/VPP en los genes BRCA1 y BRCA2*

Se estima que la frecuencia de pacientes portadores de doble VP/VPP en los genes *BRCA1* y *BRCA2* es de 0,3% (161). En nuestro estudio solo un caso índice fue portador de una doble VP/VPP en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, y la frecuencia obtenida fue del 0,24% (1/414). Ambas variantes fueron de tipo FS, de tal forma que la variante que se detectó en el gen *BRCA1* fue la c.3756\_3759del y en el gen *BRCA2* fue la c.658\_659del. En la bibliografía consultada, la mayoría de los casos con doble heterocigosis en los genes *BRCA1* y *BRCA2* fueron pacientes diagnosticados de cáncer de mama unilateral o bilateral (206), (207), (208), (150), (209), (210). De hecho, el estudio de *Palmirotta et al*, en el cual se recopiló un total de 34 casos índices con doble VP/VPP en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, solo una mujer fue diagnosticada a los 50 años de un cáncer de ovario (211). El caso índice detectado en nuestro estudio fue una mujer diagnosticada a los 44 años de un cáncer de ovario seroso de alto grado, con una edad de diagnóstico más baja que la edad media de diagnóstico de cáncer de ovario de casos índices portadores de VP/VPP solo en el gen *BRCA1* o en el gen *BRCA2* por separado (52,9 y 53,7 años respectivamente). Este hallazgo no coincidió con lo publicado en el estudio de *Le Page et al*, en el cual la edad media de las pacientes con cáncer de ovario y portadoras de doble VP/VPP en los genes *BRCA1* y *BRCA2* fue similar a la de las pacientes con cáncer de ovario portadoras de VP/VPP solo en el gen *BRCA1* (212). En cuanto al comportamiento del cáncer de ovario en los pacientes con doble VP/VPP en los genes *BRCA1*

y *BRCA2*, se asemejaría más al de los pacientes con VP/VPP en el gen *BRCA1* (peor pronóstico); sin embargo, se necesitan más estudios con un mayor número de pacientes para llegar a conclusiones estadísticamente concluyentes.

#### 4.3.2. Pacientes portadores de doble VP/VPP en los genes *ATM* y *CHEK2*

El caso índice portador de doble VP/VPP en los genes *CHEK2* y *ATM* fue una mujer diagnosticada a los 51 años de un cáncer de mama bilateral sincrónico. A nivel nacional, el único estudio publicado en el cual se detectó esta doble mutación fue el estudio de *Fonfria et al* en el cual el caso índice portador de esta doble VP/VPP fue una mujer diagnosticada a los 48 años de cáncer de mama unilateral con receptores hormonales positivos (198). La falta de publicaciones sobre casos índices con este perfil mutacional dificulta el poder establecer una relación genotipo-fenotipo clara para este tipo de pacientes. Lo único que se puede predecir según lo publicado (192), (213), (214), es un probable predominio de cáncer de mama en este tipo de pacientes a falta de más estudios que confirmen dicha suposición.

## 5. VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO

### 5.1. Reclasificación de las VUS

La incorporación de la NGS en los laboratorios clínicos permitió aumentar los rendimientos diagnósticos, pero, como contrapartida conllevó a un aumento exponencial del número de las VUS detectadas. Aunque las recomendaciones de expertos y la declaración europea de consenso recientemente publicado aconsejan no tomar ninguna decisión clínica ni hacer estudios en los familiares de los casos índices con VUS (215), el hallazgo de una VUS no deja de ser un reto para los clínicos y el laboratorio clínico, debido al desconocimiento de su implicación en el desarrollo de la enfermedad y por el cambio de clasificación clínica al cual están sometidas este tipo de variantes. De hecho, tras la reclasificación de las VUS obtenidas al principio del estudio, el 25,58% (33/129) se reclasificaron como VB/VPB, dato más elevado que el obtenido el estudio internacional de *Mersch et al* (81), en el cual de las 26670 VUS detectadas inicialmente, 1867 (7%) se reclasificaron como VB/VPB en un periodo de 10 años de seguimiento. Esta diferencia podría estar justificada por los diferentes criterios empleados para la reclasificación y el mayor número de publicaciones e información respecto a las variantes a medida que transcurre el tiempo.

Por otro lado, según las recomendaciones de expertos y la declaración europea de consenso recientemente publicada, se recomienda informar las VUS detectadas en los genes *BRCA* y otros genes de riesgo relativo alto (215). Sin embargo, el mismo consenso aconseja no tomar ninguna decisión clínica ni hacer estudios en los familiares de los casos índices con VUS. Como estrategia,

el Comité de Asesoramiento Genético Cáncer Hereditario de la Región de Murcia ha decidido de forma consensuada no informar todas las VUS, si no que únicamente aquellas VUS priorizadas, para por un lado, no incrementar de forma innecesaria la incertidumbre de los pacientes portadores de una VUS y la de los clínicos y, por otro lado, poder realizar estudios adicionales sobre los familiares y los casos índices portadores de una VUS priorizada. Además, de esta forma, la reclasificación de una VUS a VB/VPB no tendría ninguna repercusión sobre el caso índice o los clínicos responsables de la consulta de asesoramiento genético. Sin embargo, la reclasificación de las VUS es un proceso que permite descargar la carga de trabajo a nivel del laboratorio, ya que el cambio de una VUS a VB/VPB implica generalmente una reclasificación definitiva de la variante (81), y por lo tanto el cese de su seguimiento por parte del personal facultativo del laboratorio.

A diferencia de las VUS reclasificadas como VB/VPB, una VUS reclasificada como VP/VPP sí que tiene repercusión clínica sobre los casos índices y sus familiares. Afortunadamente, el porcentaje de las VUS reclasificadas a VP/VPP es muy bajo (147), pero esta reclasificación tiene trascendencias clínicas y psicológicas sobre los casos índices y los familiares portadores de la supuesta variante reclasificada. Las repercusiones clínicas consisten en someter a los portadores de la VP/VPP a varias pruebas diagnósticas con relativa frecuencia como mamografías o resonancias magnéticas entre otras, además, del planteamiento de cirugías profilácticas, según las recomendaciones de la guía clínica de la NCCN, que a su vez varían dependiendo de la edad de los pacientes y del gen mutado (30). En cuanto al impacto psicológico, suele evidenciarse más a largo plazo, y se resume en la inseguridad de estos pacientes sobre su estado de salud, el miedo aumentado de padecer el cáncer o de sufrir nuevo cáncer y un elevado riesgo de sufrir una depresión (216).

## **5.2. Distribución y categorización molecular de las VUS detectadas en los 20 genes de la NCCN**

En total, después de la reclasificación, se detectaron 96 VUS distintas, distribuidas en 18 genes. El gen con más VUS detectadas fue el gen *ATM*, hallazgo que coincidió con los estudios nacionales (84), (85), europeos (201), e internacionales (149). Por otra parte el tipo de mutación predominante en las VUS fue el tipo MS (89/96; 88,5%) lo que coincidió con la bibliografía (149), y se explicaría por la difícil interpretación de dichas variantes, ya que su patogenicidad depende de la localización de la variante, es decir, si se localiza en un dominio funcional o no, y si es el caso, el efecto que puede causar dicha variante sobre el dominio funcional y como consecuencia, la función de la proteína.

### 5.3. Priorización de las VUS

La aparición de la NGS, el cambio continuo de clasificación clínica al cual están sometidas las VUS y los criterios de selección de los pacientes para el diagnóstico genético cada vez más inclusivos, han hecho aumentar considerablemente la carga de trabajo y el número de que se tienen que revisar periódicamente por el personal facultativo del laboratorio clínico y el de las consultas de asesoramiento genético. Con el fin de optimizar los recursos y hacer frente a esta elevada carga de trabajo, surgió el concepto de las VUS priorizadas que son aquellas VUS susceptibles de ser reclasificadas como VP/VPP. Este concepto permitió establecer un sistema de revisión eficiente gracias al cual se enfocarían más los esfuerzos sobre las VUS priorizadas haciendo estudios adicionales que permitirían determinar su efecto clínico y su implicación en el SCMOH, sin dejar de lado las VUS no priorizadas. Para ellos en los últimos años se diseñaron varios algoritmos de priorización de VUS por nuestro grupo de trabajo, que se han ido modificando según las evidencias científicas publicadas, el último publicado y el empleado en nuestro estudio, fue el algoritmo de *Rosado-Jiménez et al* (86) que tiene como modelo de base el algoritmo de *Bonache et al* (85) y el de *Castillo-Guardiola et al* (123), los cuales se aplicaron varias modificaciones basadas en las últimas publicaciones científicas relacionadas con la predicción de patogenicidad de las variantes genéticas (217), (218), (91), (219), (220) **Figura 55**. En cuanto al algoritmo de *Bonache et al* destacamos tres diferencias respecto al algoritmo empleado en nuestro estudio. La primera fue que el algoritmo de nuestro estudio se aplicó únicamente sobre genes clínicamente accionables a diferencia del algoritmo de *Bonache et al*. La segunda implicó las variantes de tipo *splicing* con predicción de *splicing* aberrante, de tal forma que el algoritmo que usamos consideró solo aquellas variantes que estuvieran alrededor de  $\pm 10$  pb del sitio de *splicing* mientras que el algoritmo de *Bonache et al* tomó en cuenta aquellas variantes que estuvieran alrededor de  $\pm 50$  pb de bases del sitio de *splicing*. Finalmente, la tercera diferencia estuvo relacionada con las variantes de tipo MS, de modo que la principal herramienta empleada en el algoritmo de nuestro estudio para priorizar este tipo de variantes fue el metapredicador *REVEL*, una herramienta no empleada en el algoritmo de *Bonache et al*, y que hoy en día, es considerada como una de las mejores herramientas *in silico* para categorizar este tipo de variantes (90) (91). En cuanto al algoritmo de *Castillo-Guardiola et al*, la única diferencia entre ambos fue el *score* del metapredicador *REVEL* empleado para discriminar entre benignidad y patogenicidad, que en el caso del estudio de *Castillo-Guardiola et al* fue de 0,58 mientras que el empleado en nuestro estudio fue de 0,7, con el consiguiente aumento de la especificidad en la clasificación de variantes genéticas.

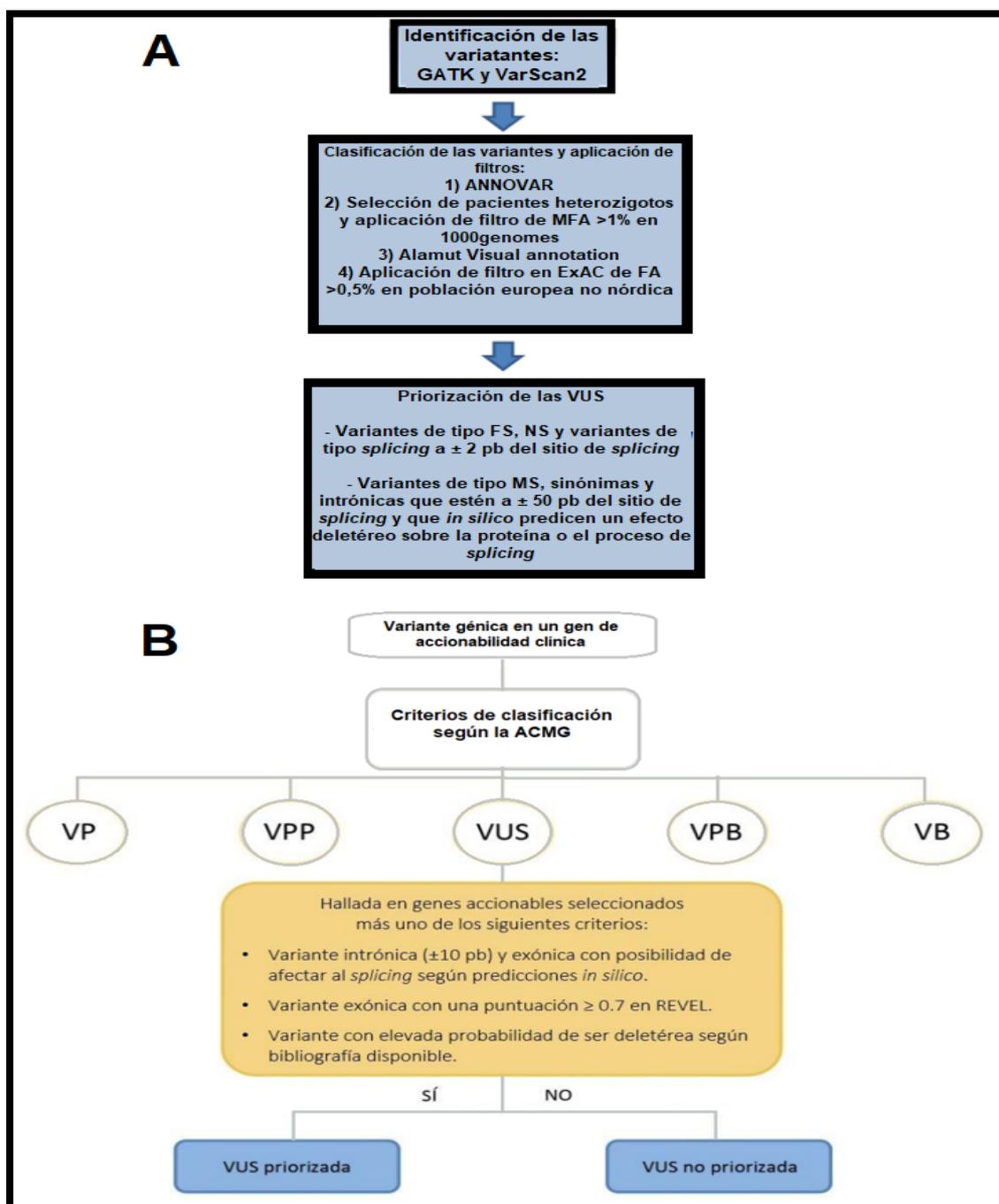


Figura 55: Algoritmos de priorización de las VUS. **A:** algoritmo de priorización de *Bonache et al* (85). **B:** algoritmo empleado en nuestro estudio desarrollado por *Rosado-Jiménez et al* (86). MFA: Mínima Frecuencia Alélica; FA: Frecuencia Alélica; FS: *Frameshift*; NS: *Nonsense*; MS: *Missense*; pb: Pares de Bases.

Tras la aplicación del algoritmo de priorización se pudieron priorizar el 18,75% (18/96) de las VUS detectadas, mientras que en el estudio de *Bonache et al*, se priorizaron solo el 9,13% (35/383) de las VUS detectadas. Esta diferencia, se debió probablemente a que en el estudio de *Bonache et al* se aplicó el algoritmo a las VUS detectadas en todos los genes analizados en el panel y no solo a los genes de accionabilidad clínica y por otra parte el empleo del soporte informático (Alamut),

que emplea algoritmos de priorización distintos al metapredicador *REVEL* empleado en nuestro estudio. En cuanto al estudio de *Castillo-Guardiola et al*, el 24% (19/79) de las VUS fueron priorizadas, un porcentaje superior al obtenido en nuestro estudio. Esta diferencia se debe probablemente a los diferentes umbrales empleados en cada estudio para discriminar la patogenicidad de la benignidad al emplear el metapredicador *REVEL*. El *score* de 0.58 empleado en el estudio de *Castillo-Guardiola et al*, aumenta la sensibilidad a costa de una disminución de la especificidad lo que se traduce en la priorización de un mayor número de VUS. Por esta razón y, en consonancia con lo descrito por diversos laboratorios clínicos, se decidió en el algoritmo empleado en nuestro estudio, desarrollado por *Rosado-Jiménez et al* (86), subir el *score* a 0,7. Este *score* se asocia a una sensibilidad de 0,5786, más baja y una especificidad más alta, de 0,9556, que la del algoritmo de *Castillo-Guardiola et al*. De esta forma se consiguió reducir el número de VUS priorizadas, lo que permitió optimizar los recursos del laboratorio clínico para poder llevar a cabo estudios complementarios necesarios para dilucidar el efecto clínico y la implicación en el SCMOH, únicamente, en aquellas VUS más susceptibles de patogenicidad.

Finalmente, cabe destacar el papel fundamental del metapredicador *REVEL* en la priorización de las VUS detectadas en el estudio; en efecto, el 88,5% (89/96) de estas VUS fueron de tipo MS de las cuales, gracias al empleo del metapredicador *REVEL*, el 14,6% (13/89) se pudieron priorizar.

## 6. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA MOLECULAR RT-PCR EN EL ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS VARIANTES SUSCEPTIBLES DE MADURACIÓN ALTERNATIVA DEL ARN MENSAJERO

La contribución de las VP/VPP de tipo *splicing* en SCMOH es considerable ya que 12,31% de las VP/VPP detectadas en los genes de accionabilidad clínica en nuestro estudio fueron de tipo *splicing*. En el estudio de *Castillo-Guardiola et al* (84), el 9% de las VP/VPP en los genes no *BRCA* fueron de tipo *splicing* y el estudio de *Gabaldó Barrios et al* (82), el 21,61% de las VP/VPP en los genes *BRCA* fueron de tipo *splicing*. Ambos estudios se llevaron a cabo en la región de Murcia, lo que nos indica la importante contribución de las VP/VPP de tipo *splicing* en nuestra región y demuestran la necesidad de estudiar mediante RT-PCR aquellas VUS y, sobre todo, aquellas VUS priorizadas susceptibles de alterar el proceso de *splicing*, para poder categorizarlas desde el punto de vista clínico de la forma más adecuada.

Nuestro grupo de trabajo gracias al empleo de la RT-PCR ha podido clasificar cuatro variantes susceptibles de alterar el proceso de *splicing* que se resumen en la siguiente **Tabla 31**:

Variante	Gen	Clasificación clínica antes de la RT-PCR	Clasificación clínica después de la RT-PCR	Justificación	Referencia
c.3402+3A>C	ATM	VUS-P	VPP	La delección del exón 23 produce un codón de parada prematuro en la posición 22 y como consecuencia una proteína no funcional, mientras que la delección parcial del ex 23 y 24 produce una proteína más corta, pero con todos los dominios funcionales.	(123)
c.1008G>A	CHEK2	VUS-P	VUS-no P	Al no alterar el proceso de <i>splicing</i> esta variante tiene menos probabilidad de ser patogénica por lo cual se reclasificó como VUS-no P debido a la ausencia de datos complementarios	(86)
c.8488-1_8489delinsTCCATTACA	BRCA2	VUS-P	VUS-P	Altera el proceso de <i>splicing</i> sin producir la alteración del marco de lectura, por lo cual se mantiene como VUS-P hasta que se puede completar el estudio de cosegregación para su clasificación definitiva	(86)
c.375+2T>C	TP53	VUS-P	VPP	Delección parcial del exón 4 que produce un codón de parada en la posición 23 y como consecuencia una proteína no funcional	Este estudio

Tabla 31: Variantes susceptibles de *splicing* aberrante comprobadas por RT-PCR. VUS-P: Variante de Significado clínico Incierto Priorizada; VUS-no P: Variante de Significado clínico Incierto no Priorizada; VPP: Variante Probablemente Patogénica.

## 7. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO, CLASIFICACIÓN MOLECULAR Y CLÍNICA DE GENES SUSCEPTIBLES DE SCMOH

Al aplicar el filtro de los 30 genes investigados, detectamos 9 distintas VP/VPP. Sin embargo, 7 de ellas detectadas en los genes (*TMEM127*, *SDHA*, *NTHL1*, *POLE*, *RET*) fueron un hallazgo incidental ya que no correlacionaban ni con la clínica de los casos índices portadores de dichas VP/VPP ni con su historia familiar.

En cuanto las tres otras VP/VPP, se detectaron en los siguientes genes susceptibles: *MRE11*, *XRCC1* y *RAD50*. Considerando que estos 3 genes pudiesen tener un papel en el desarrollo de cáncer de mama u ovario, se incrementaría el rendimiento en un 0,72% (3 casos índices/414).

El desarrollo de la NGS en los laboratorios clínicos ha hecho que aumente de forma drástica la asociación entre genes detectados y determinadas entidades clínicas, a pesar, de la falta de evidencia científica que pueda respaldar dicha relación (221). Estas asociaciones genotipo-fenotipo no justificadas, pueden influir en la toma de decisión de los clínicos de forma negativa en lo concerniente al manejo de los pacientes. Para ello, ClinGen (*Clinical Genome Resource*) plataforma patrocinada por la NIH (accesible en el siguiente enlace <https://clinicalgenome.org/>) desarrolló en su página *web* un apartado específico dedicado al estudio de la relación genotipo-fenotipo (*Gene-Disease Validity*), en el cual se desarrolló un *framework* que proporciona una medida semicuantitativa que permite saber tal como es de fuerte la relación entre un gen y el desarrollo de la enfermedad. Lo hace basándose en los últimos estudios y artículos publicados sobre el gen desde el punto de vista genético (estudios de cosegregación, estudios de caso-control entre otros) que suman un total de 12 puntos y desde el punto de vista experimental (alteración de la función de la proteína, cultivos celulares entre otros) sumarían un total de 6 puntos. Según la puntuación obtenida la relación entre el gen y el desarrollo de la enfermedad se categorizaría en: definitivamente demostrada, fuerte, moderada, limitada, sin evidencia o asociación genotipo-fenotipo conflictiva que puede ser disputada o refutada (222). Para ello se formaron varios comités de expertos dentro de los cuales el comité especializado de cáncer de mama y ovario, el GCEP (*ClinGen Breast/Ovarian Gene Curation Expert Panel*) responsable por un lado de la clasificación final de la relación genotipo-fenotipo en los genes susceptibles del desarrollo del SCMOH y por el otro, de revisar periódicamente dicha relación en base a los estudios que se vayan publicando. A continuación, y en base a esta plataforma y la última guía clínica de la NCCN V2.2023, se discute la implicación de las 3 VP/VPP detectadas en los 3 siguientes genes de baja penetrancia *MRE11*, *XRCC2*, *RAD50*:

### 7.1. MRE11

El gen *MRE11* forma parte del complejo MRN que reconoce los sitios de rotura de ADN y fosforila el gen *ATM* para desencadenar el procesos de reparación de las DSB por recombinación homóloga (223). La variante detectada en este estudio, fue la c.963del, una variante de tipo FS cuyo caso índice fue una mujer diagnosticada a los 68 años de un cáncer de mama bilateral sincrónico ductal en ambas mamas, pero con subtipos moleculares distintos, LA en la mama derecha y HER2+ en la mama izquierda. Por otro lado, la paciente destacó por sus numerosos antecedentes oncológicos familiares.

No se pudo hacer el estudio de cosegregación, pero existen estudios en la bibliografía que demuestran la cosegregación de VP/VPP en el gen *MRE11* en familias con cáncer de mama (224), (223). Sin embargo, en la última revisión del GCEP del año 2023 el gen *MRE11* sufrió un cambio de clasificación genotipo-fenotipo drástico, pasando de tener una asociación limitada con el cáncer de mama a ser categorizada como refutado, lo que significa que no hay evidencias científicas actuales que respalden la relación genotipo-fenotipo. Mientras que su relación con el cáncer de ovario hoy en día está cuestionada. Según la NCCN, se puede incluir en un panel de genes el gen *MRE11*, a pesar de ser un gen de baja penetrancia y que las evidencias científicas de su asociación al cáncer de mama u ovario son insuficientes; sin embargo, subraya que el manejo de estos pacientes se haga de forma personalizado según la historia familiar de cada paciente y otros factores clínicos. Por lo cual, no consideramos oportuno incluir este gen en el diagnóstico del SCMOH en la práctica asistencial debido a las bajas evidencias científicas que vinculan este gen al SCMOH, a la inseguridad tanto del paciente como del clínico que podría generar el hallazgo de una VP/VPP en este gen y, finalmente, a la sobrecarga innecesaria de los recursos debido al elevado número de VUS que se detectarían y, a las cuales habrá que hacer frente en cuanto a seguimiento y reevaluación.

### 7.2. XRCC2

El gen *XRCC2* participa en la reparación de las DSB por recombinación homóloga (225). La VP/VPP detectada en este estudio fue la c.643C>T, una variante de tipo NS cuyo caso índice fue una mujer diagnosticada a los 53 años de cáncer de mama unilateral, no encontrándose información relacionada ni con el tipo histológico ni el subtipo molecular del cáncer de mama. El único antecedente oncológico familiar fue su madre diagnosticada de un cáncer de mama bilateral metacrónico. Al igual que el gen *MRE11*, el gen *XRCC2* en la última revisión del GCEP del año 2023 sufrió un cambio de clasificación genotipo-fenotipo importante, ya que en cuanto al cáncer de mama cambió de una asociación genotipo-fenotipo limitada a refutada, y respecto al cáncer de

ovario a día de hoy, se desconoce la relación genotipo-fenotipo. Al igual que el gen *MRE11*, la NCCN considera que se puede incluir el gen *XRCC2* en un panel de genes, a pesar de ser un gen de baja penetrancia y que las evidencias científicas de su asociación al cáncer de mama u ovario son insuficientes. Sin embargo, resalta que el manejo de estos pacientes se tendría que hacer de forma personalizado según la historia familiar de cada paciente y otros factores clínicos. Por lo cual por las mismas razones citadas en el gen *MRE11* se considera innecesaria la inclusión del gen *XRCC2* en el diagnóstico de SCMOH en la práctica asistencial.

### 7.3. RAD50

El gen *RAD50* forma parte del complejo MRN, al igual que el gen *MRE11* participa en el reconocimiento de los sitios de rotura de ADN y desencadena los procesos de reparación de las DSB por recombinación homóloga (226). La VP/VPP detectada fue la c.2165dup cuya portadora fue diagnosticada a los 74 años de cáncer de ovario de células claras. En cuanto a los antecedentes oncológicos familiares, destaca una sobrina diagnosticada de cáncer de mama a los 55 años y una prima hermana materna también diagnosticada de cáncer de mama. Hasta la fecha, el GCEP, clasifica la relación genotipo-fenotipo del gen *RAD50* con el cáncer de ovario como una relación cuestionada, y en cuanto a la relación genotipo-fenotipo con el cáncer de mama se caracteriza como refutada. Aunque el gen *RAD50* forma parte de los genes de baja penetrancia que considera la NCCN que se pueden incluir en un panel de genes para el diagnóstico de SCMOH, debido a la falta de evidencia científica actual que vincula el gen *RAD50* al SCMOH, no se considera en este trabajo aconsejable la inclusión de este gen en la práctica asistencial por la posible inquietud que podría generar una VP/VPP tanto al clínico como al paciente, y la sobrecarga innecesaria que implicaría el análisis de este gen en cuanto a las VUS que se tendrían que reevaluar de forma periódica.

## **VI. Conclusiones**



**Conclusión 1**

En este estudio, con un rendimiento diagnóstico obtenido del 15,22%, se confirma la necesidad de incorporar en el análisis genético el panel de genes clínicamente accionables recomendado por la guía clínica NCCN, seleccionando de forma adecuada a los pacientes candidatos a estudio, a través de una consulta de asesoramiento genético en cáncer hereditario.

**Conclusión 2**

El fenotipo de cáncer de ovario epitelial de alto grado es el que presenta un mayor rendimiento diagnóstico dentro del SCMOH, por lo que se confirma la importancia de seleccionar a este grupo de pacientes independientemente de su historia familiar. Sin embargo, el empleo de los criterios de selección individuales de la SEOM 2019, relacionados con el cáncer de mama es un factor limitante a la hora de detectar pacientes con cáncer SCMOH portadores de una VP/VPP.

**Conclusión 3**

En este estudio, y en concordancia con lo descrito en la bibliografía, las VP/VPP detectadas en los genes *BRCA* presentan una mayor contribución en el SCMOH que las VP/VPP de los genes no *BRCA*, con un 56,9% frente al 43,1% respectivamente. No obstante, la aportación de estos últimos es considerable, destacando en nuestro estudio la elevada contribución del gen *ATM*, que fue superior al resto de los estudios europeos y mundiales, debido a la VP c.8251\_8254del, en donde se ha demostrado previamente su efecto fundador en población murciana.

**Conclusión 4**

Existe una asociación estadísticamente significativa entre el cáncer de mama triple negativo y el gen *BRCA1*, y el cáncer de mama bilateral y los genes *BRCA1* y *CHEK2*. Con respecto a la edad media de diagnóstico de cáncer de mama unilateral, esta es más baja en aquellos pacientes portadores de una VP/VPP en *BRCA2*.

**Conclusión 5**

La reevaluación de las VUS consigue disminuir de forma considerable el número de éstas, siendo recomendable que los laboratorios asistenciales utilicen esta estrategia de reevaluación periódicamente. De forma complementaria, el algoritmo de priorización de VUS permite a los laboratorios clínicos gestionar de forma más eficiente sus recursos y hacer frente al número elevado de VUS que se detectan diariamente tras el análisis de paneles de genes en la práctica asistencial.

**Conclusión 6**

La metodología basada en la técnica RT-PCR es una herramienta fundamental en la clasificación de aquellas variantes genéticas susceptibles de generar un *splicing* aberrante según los programas de predicción bioinformáticos. De hecho, esta técnica ha servido para demostrar que la variante genética c.375+2T>C en el gen *TP53* produce una maduración aberrante del transcrito que, en el caso de síntesis proteica, generaría una proteína truncada.

**Conclusión 7**

En el estudio de genes candidatos para el SCMOH cabría destacar las VP obtenidas en los genes de baja penetrancia *MRE11*, *RAD50* y *XRCC2*. Sin embargo, y según la evidencia actual, en estos casos sólo es posible realizar el seguimiento de los casos índices y familiares portadores de las VP/VPP detectadas. Por tanto, estos genes solo se deberían de usar para fines de investigación hasta que haya una mayor evidencia científica. Mientras tanto, en la práctica asistencial es recomendable utilizar únicamente paneles que incorporen todos los genes clínicamente accionables descritos por las sociedades científicas para cada síndrome hereditario.

## **VII. Anexos**



 <p>Servicio <b>Murciano</b> de Salud</p>	<p><i>Arrixaca</i> <b>Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca"</b> Ctra. Madrid - Cartagena • Telf. 968 36 95 00 30120 El Palmar (Murcia)</p>
<p>Dr. D. Antonio Piñero Madrona Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca</p>	
<p><b>CERTIFICA</b></p>	
<p>Que el CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 30/03/2015, acta 03/15 ha evaluado la propuesta de la investigadora <b>Dra. M<sup>a</sup> Desamparados Sarabia Meseguer</b> referida al estudio:</p>	
<p><b>Título:</b> Nuevos genes en el Síndrome de Cáncer de mama y ovario hereditario</p>	
<p><b>1º.</b> Considera que</p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- El ensayo se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.</li> <li>- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.</li> <li>- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.</li> <li>- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.</li> <li>- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.</li> </ul>	
<p><b>2º.</b> Por lo que este CEIC emite un <b>DICTAMEN FAVORABLE</b> y acepta que dicho estudio sea realizado por la Dra. M<sup>a</sup> Desamparados Sarabia Meseguer en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.</p>	
<p>Lo que firmo en Murcia, a 30 de marzo de 2015</p>	
<p>Fdo:</p>	
<p>Dr. D. Antonio Piñero Madrona Presidente del CEIC Hospital Virgen de la Arrixaca</p>	

Anexo 1: Certificado de Comité Ético de Investigación Clínica del HCUVA



## DOCUMENTO DE INFORMACION AL PACIENTE PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIO GENÉTICO.

### Información

Según los criterios clínicos actuales se le ofrece la posibilidad de realizar un análisis genético a fin de determinar si es portador de una variante génica asociada a la enfermedad que padece.

En función de los resultados obtenidos en el análisis genético, se le puede indicar la necesidad de realizar el análisis genético a sus familiares directos, y así poder aplicar medidas preventivas en el desarrollo de la enfermedad en éstos.

### Muestra obtenida

Para el estudio genético será necesario que se le realice una extracción de sangre periférica. En algunas ocasiones, el laboratorio podría tener dificultades en analizar la muestra y podría pedirle una nueva extracción, o realizarla a través de una muestra de saliva. La extracción de sangre puede ser incómoda, ocasionalmente puede producir cierto dolor y, raramente, desmayo.

### Análisis genético

La muestra obtenida será analizada por la técnica de secuenciación masiva (en el caso índice) o metodología Sanger (en el caso de los familiares).

Las variantes génicas obtenidas serán analizadas utilizando las bases de datos y publicaciones disponibles en el momento del estudio.

La muestra será conservada en el Laboratorio de Genómica del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, como material necesario ante la necesidad de posteriores estudios, siempre que usted lo autorice.

### Información de los resultados

Tras el análisis de la muestra se redactará un informe en el cual se le informará de aquellas variantes génicas detectadas asociadas a la enfermedad que padece.

No se le informará de aquellos hallazgos que no estén relacionados directamente con la enfermedad que padece.

Si las evidencias científicas que aparezcan en el transcurso de los próximos años llevan a modificaciones significativas en el significado clínico de una variante, el estudio será revisado y se le enviará un nuevo informe actualizado.

### Confidencialidad y datos personales

La confidencialidad y privacidad serán respetadas.

Sus datos genéticos se conservarán en el Laboratorio de Genómica del Servicio de Análisis Clínicos de este hospital. Si así lo consiente, estos datos podrán ser utilizados en diversas investigaciones y publicaciones con el fin de aportar nuevos datos en el mayor conocimiento de la enfermedad.

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_



## FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(marcar con una x donde proceda)

- He recibido una copia del documento de información al paciente y he comprendido la información.
- Autorizo a mi médico a obtener una muestra y la información clínica relevante para su procesamiento.
- Comprendo que los datos que se obtengan a partir de mí serán estrictamente confidenciales y tratados de acuerdo con la ley Orgánica, 15/1999 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y legislación que la desarrolla, así como la conformidad a la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica.
- Comprendo que, en el interés de la ciencia, resúmenes de los resultados de este análisis podrían ser publicados en ámbitos científicos. No obstante, en ningún caso será posible identificar en ellos información confidencial relativa a mi persona.
- Autorizo a que mi muestra pueda conservarse en el Laboratorio de Genómica para futuros estudios.

Nombre y apellidos del/la paciente: \_\_\_\_\_

Firma del/la paciente:

En el caso de un menor de edad o con capacidades intelectuales disminuidas:

Nombre del representante legal: \_\_\_\_\_

Firma del representante legal:

Nombre del médico que solicita el estudio:

Firma del médico:

Murcia, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

GEN	Transcrito <i>MANE Select</i>
<i>BRCA1</i>	NM_007294.4
<i>BRCA2</i>	NM_000059.4
<i>CHEK2</i>	NM_007194.4
<i>ATM</i>	NM_000051.4
<i>PMS2</i>	NM_000535.7
<i>RAD51C</i>	NM_058216.3
<i>RAD51D</i>	NM_002878.4
<i>TP53</i>	NM_000546.6
<i>EPCAM</i>	NM_002354.3
<i>BRIP1</i>	NM_032043.3
<i>NF1</i>	NM_001042492.3
<i>NTHL1</i>	NM_002528.7
<i>MRE11</i>	NM_005591.4
<i>RAD50</i>	NM_005732.4
<i>TMEM127</i>	NM_017849.4
<i>POLE</i>	NM_006231.4
<i>XRCC2</i>	NM_005431.2
<i>RET</i>	NM_020975.6
<i>SDHA</i>	NM_004168.4

Anexo 3: Transcritos de secuencias de referencia utilizados y longitud de aa de proteínas que codifican.

Gen	Variante génica	Exón	Ta (°C)	Primers
<b>BRCA1</b>	c.70_73dup	2	T60	5F-GACTGTTGTCTTAGTTCTTT-3F 5R-GGTACAATTCTGTTCATTG-3R
	c.181T>G	4 (5)	TD 55-45	5F- GGCTATTTGCCTTTTGAGTA-3F 5R- TTTTCCTACTGTGGTTGCTT-3R
	c.211A>G	4 (5)	TD 55-45	5F- GGCTATTTGCCTTTTGAGTA-3F 5R- TTTTCCTACTGTGGTTGCTT-3R
	c.212+1G>A	4 (5)	TD 55-45	5F- GGCTATTTGCCTTTTGAGTA-3F 5R- TTTTCCTACTGTGGTTGCTT-3R
	c.798_799del	10.2 (11.2)	T55	5F-GGCATCCAGAAAAGTATCAGG-3F 5R-TTTTTTCTGTGCTGGGAGTC-3R
	c.835del	10.2 (11.2)	T55	5F-GGCATCCAGAAAAGTATCAGG-3F 5R-TTTTTTCTGTGCTGGGAGTC-3R
	c.1016dup	10.3 (11.3)	T55	5F-GGGCTGGAAGTAAGGAAACAT-3F 5R-CTACTTTGGCATTGATTGATTGAGAC-3R
	c.1651_1652ins	10.5 (11.5)	TD 55-45	5F- AGGAGCATTGTTACTGAG-3F 5R- AGACTTCCTCAGCCTATT-3R
	c.3583del	10.11 (11.11)	T58	5F- GACATTAAGGAAAGTTCTGTGC-3F 5R- TTCCTGAGATGCCTTTGCCA-3R
	c.3756_3759del	10.11 (11.11)	T58	5F- GACATTAAGGAAAGTTCTGTGC-3F 5R- TTCCTGAGATGCCTTTGCCA-3R
	c.4357+1del	12 (13)	TD 60-50	5F-TTTAATGGAAAGCTTCTCAA-3F 5R-GATAAAGGGGAAGGAAAGAAT-3R
	c.5123C>A	17 (18)	T65	5F- GAGGCCCTTAGCTTCTTAGGACAGC-3F 5R- GAGACCCATTTCCAGCATCACCAGC-3R
	c.5324T>G	20 (21)	TD 55-45	5F-AAGCTCTCCTTTTAGAAAAGTC-3F 5R-GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT-3R
	<b>BRCA2</b>	c.658_659del	8	TD 55-45
c.1310_1313del		10.C	TD 55-45	5F-AGTGGAAAGTGACAAAATCTCCAAG-3F 5R-AGATATTGCCTGCTTACTGCAAG-3R
c.1608dup		10.D	TD 60-50	5F-CCATTAATGAGGAAACAGTGGTA-3F 5R- AGCTACAGAATTCTGTGTGGTGGT-3R
c.2701del		11.3	TD 55-45	5F- ACTTTTCTCAGACAATGAGA-3F 5R-CTAAGAGTCCTGCCATTTG-3R

Gen	Variante génica	Exón	Ta (°C)	Primers
<b>BRCA2</b>	c.3847_3848del	11.7	TD 55-45	5F-GCTGTGAAACTGTTTAGTGA-3F 5R-GCAAGTCCGTTACATCTTTA-3R
	c.4631dup	11.10	TD 55-45	5F-CAACCCGAACGTGATGAAAA-3F 5R-CTTAGGTGGCACCACAGTCT-3R
	c.4936_4939del	11.11	TD 55-45	5F-TCACAGCTGCCCCAAAGTGT-3F 5R-ATTCCTTTCTGGTTGACCATC-3R
	c.5073dup	11.11	TD 55-45	5F-TCACAGCTGCCCCAAAGTGT-3F 5R- ATTCCTTTCTGGTTGACCATC-3R
	c.6486_6489del	11.17	TD 55-45	5F-GAAACCCAGAGCACTGTGTA-3F 5R-CTACTGCTTCTGTTTCAAAG-3R
	c.7007G>A	13	TD 55-45	5F-CAGTAACATGGATATTCTCTTAG-3F 5R-AGTGTCAATTATTTTAGAAATGTTT-3R
	c.7234_7235insG	14.B	TD 55-45	5F- AATGAGACACTTGATTACTAC-3F 5R-AAAGGCCAAAAATTCATCACAC-3R
	c.9026_9030del	23	TD55-45	5F-CACTTCTCCATTGCATCTT-3F 5R- AACAAGCACTTATCAAAACTG-3R
	c.9117G>A	23	TD55-45	5F-CACTTCTCCATTGCATCTT-3F 5R-AACAAGCACTTATCAAAACTG-3R
<b>ATM</b>	c.3576G>A	24	T62	5F- TCTGGAGTTCAGTTGGGATTTT-3F 5R- GGAAGCTTCTAATAAAATACTCATCCA-3R
	c.3802del	26	T63 o T64	5F- TGGTGGTGGTATGTTCTAAGCT-3F 5R- TGCTAGATAATGATTACCACAAGCT-3R
	c.4396C>T	29	T63	5F- TTGTAGCCGAGTATCTAATTAACAAG-3F 5R- AGGTTGAGGATGCAGTGAGC-3R
	c.5188C>T	35	T63	5F- TGTGTACTTGATAGGCATTTGA-3F 5R- TGACCCACAGCAAACAGAAC-3R
	c.7638_7646del	52	T63	5F- CCCACTGCAGTATCTAGACAGTAA-3F 5R- AAAAGGTACGTATGTTAATCCAAA-3R
	c.8251_8254del	56	T63	5F- CTGGTTCTACTGTTTCTAAGTATGTGA-3F 5R- TGAAAACTGACAACAGGACCTT-3R
<b>CHEK2</b>	c.349A>G	3	T60	5F- ATCAACAGCCCTCTGATGC-3F 5R- GGGAAAATATCTAAAAACAATGACC-3R
	c.433C>T	3	T60	5F- ATCAACAGCCCTCTGATGC-3F 5R- GGGAAAATATCTAAAAACAATGACC-3R

Gen	Variante génica	Exón	Ta (°C)	Primers
<b>CHEK2</b>	c.470T>C	4	T63	5F- TCTGCTATTCAAAGTCTGAAACAA-3F 5R- CACTTAAACCATATTCTGTAAGGACA-3R
	c.715G>T	6	T64	5F- CCCAGGAGTGGTAGGTCTCA-3F 5R- AGGTGATCAGCCTTTTATTGG-3R
	c.792_792+1insCT	6	T64	5F-CCCAGGAGTGGTAGGTCTCA-3F 5R-AGGTGATCAGCCTTTTATTGG-3R
	c.1100del	11	T61	5F- TGGCAAGTTCAACATTATTCC-3F 5R- CCTACCAGTCTGTGCAGCAA-3R
<b>PMS2</b>	c.400C>T	5	T65	5F- ACGTCGAAAGCAGCCAATGGGAGTT-3F 5R-CTTCCACCTGTGCATACCACAGGCT-3R
			T60	5F- CTTGATTATCTCAGAGGGATCGTCA-3F 5R- TCTCACTGTGTTGCCAGTCCTAAT-3R
<b>RAD51C</b>	c.905-2_905-1del	7	T60	5F-TCTTGGAGAGAGAGAGCATTIT-3F 5R-GTCTGCTTTCATGAAGCGTATAGT-3R
<b>RAD51D</b>	c.694C>T	8	T58	5F- CCTCCCTCTGCTTCTCCT-3F 5R- TTTGGGGTTCAGAAGCTGAC-3R
<b>TP53</b>	c.334_364dup	4	T64	5F- GTCCAGATGAAGCTCCAGA-3F 5R- GCCAGGCATTGAAGTCTCAT-3R
	c.375+2T>C	3F 6R	T63	5F-ACAACGTTCTGTCCCCTTG-FAM-3F 5R-TCGACATAGTGTGGTGGTGC-3R
<b>EPCAM</b>	c.491+1G>A	4	T64	5F- CCTCCTGGGTGTGCCTTTA-3F 5R- ATGGAAGATTTGAGCCACCA-3R
<b>BRIP1</b>	c.206-2A>G	4	T64	5F- AGGAAACCTCCAATCCTGG-3F 5R- CAGATATCAACTGACCCAGGCA-3R
<b>NF1</b>	c.4643_4644dup	34	T62	5F- GCAACCAGTTACAAGTTAAAGAAATG-3F 5R- GCCTGGTGGCAAACCTCTC-3R
<b>NTHL1</b>	c.244C>T	2	T64	5F-GGACAGTTGTGGCATGAACG-3F 5R-CTGTAGCCACTCAGCAGGTC-3R
<b>MRE11</b>	c.963del	9	T64	5F-TGCACATCACCTGAGGAAA-3F 5R-AGAGTAGAGGGAAGCCTTTATGT-3R
<b>TMEM127</b>	c.117-12del	2	T60	5F-CCCCCTATCCTCTGGTGTCA-3F 5R-AGGAAACGGCCCCATAACTG-3R
<b>RAD50</b>	c.2707del	16	T63	5F-TAATTTGCAACGTCGTCAGC-3F 5R-CAGTCTCGTTCTGTACCCA-3R

Anexo 4: Secuencias de *primers* empleados para la amplificación de las secuencias dianas. F: *forward*; R: *reverse*; Ta: Temperatura de Anillamiento. Los números entre paréntesis de los exones se refieren a la antigua nomenclatura BIC.

Gen	RG	Sonda
<i>BRCA1</i>	Delección exón 16-23 Delección exón 19	P002-D2
<i>CDK4</i>	Duplicación exón 5-6	P419-B1
<i>MUTHY</i>	Duplicación exón 15	P072
<i>PALB2</i>	Delección exón 7-11	P260-C1
<i>RAD50</i>	Duplicación exón 16	No disponible
<i>RB1</i>	Duplicación exón 15-17	P047

Anexo 5: Sondas MLPA empleadas para comprobar los RG. RG: Reordenamiento Génico.

Gen	Variante c.HGVS	Proteina p.HGVS
<b>POLE</b>	c.3857G>A (3)	p.R1286H
	c.6049C>T	p.R2017C
	c.3245G>A	p.R1082H
	c.1852G>A	p.E618K
	c.2974G>A	p.A992T
	c.2645A>G	p.N882S
	c.4523G>A (2)	p.R1508H
	c.16G>C (5)	p.G6R
	c.3718G>A (3)	p.E1240K
	c.861T>A	p.D287E
	c.154C>T (3)	p.R52W
	c.3971G>A	p.R1324H
	c.6445C>T	p.R2149C
	c.4169G>A (2)	p.R1390H
	c.4145G>A	p.R1382H
	c.2510T>C	p.F837S
	c.5659G>A	p.V1887M
	c.2090C>G	p.P697R
	c.4168C>T	p.R1390C
	c.3082G>A	p.E1028K
<b>MET</b>	c.708T>G	p.D236E
	c.2638-10_2638-9del (10)	-
	c.3576T>C (2)	p.H1192H
	c.3029C>T (5)	p.T1010I
	c.607T>A (4)	p.S203T
	c.497T>C	p.I166T
	c.1451A>G (2)	p.H484R
	c.3290A>G	p.H1097R
	c.1489A>G	p.N497D
	c.2372C>T	p.P791L
	c.229G>A	p.D77N
	c.2962C>T	p.R988C
	c.1076G>T	p.R359L
<b>MSH3</b>	c.2262A>G	p.I754M
	c.353A>T	p.N118I
	c.3166C>T	p.L1056F
	c.203_204insGCCCCAGCGCCCCAGCGCCCCACC	-
	c.1400A>C	p.H467P
	c.692C>T	p.P231L
	c.1258A>G	p.S420G
	c.186_187insGCCGCAGCGCCGCAGCGCCCGCAGCG (2)	-
	c.1862T>C	p.I621T
	c.181delinsCCAGCGCCCCAGCGCCCCAGCGCCCC	-
c.97A>G	p.S33G	

Gen	Variante c.HGVS	Proteina p.HGVS
<b>RET</b>	c.1531G>A	p.E511K
	c.3243T>C	p.D1081D
	c.1529C>T (5)	p.A510V
	c.1642G>T (2)	p.G548C
	c.3112A>G	p.T1038A
	c.1699G>A	p.D567N
	c.2372A>T	p.Y791F
	c.3052C>T	p.L1018F
	c.1904G>A	p.R635H
	c.129C>A	p.D43E
<b>MLH3</b>	c.4289G>A	p.R1430H
	c.3440A>T (3)	p.N1147I
	c.4351G>A	p.E1451K
	c.2905C>T	p.P969S
	c.2775C>A	p.N925K
	c.2911G>A	p.V971I
	c.3752G>A	p.R1251Q
	c.2425A>G	p.M809V
<b>APC</b>	c.1441G>A	p.V481M
	c.2776T>C (2)	p.S926P
	c.2819C>T	p.S940L
	c.707A>G	p.Q236R
	c.1564A>G	p.M522V
	c.4372C>T	p.P1458S
	c.1240C>T	p.R414C
<b>SDHA</b>	c.-7A>C	-
	c.1367C>T	p.S456L
	c.1396G>A (2)	p.A466T
	c.17G>A	p.G6D
	c.1368G>A	p.S456S
	c.1382T>C	p.V461A
	c.1064+5G>A (2)	-
<b>KIF1B</b>	c.3866C>T	p.S1289F
	c.3422A>G	p.K1141R
	c.3202G>A	p.G1068S
	c.3649C>G	p.P1217A
	c.1633G>A	p.G545R
	c.2754C>T	p.Y918Y
<b>MEN1</b>	c.287A>C	p.Q96P
	c.1618C>T	p.P540S
	c.1405G>C	p.E469Q
	c.1296G>A	p.L432L
	c.762G>A	p.L254L

Gen	Variante c.HGVS	Proteína p.HGVS
<b>MRE11</b>	c.476T>C (2)	p.V159A
	c.726C>G	p.I242M
	c.1481A>G	p.E494G
	c.1483G>C	p.D495H
	c.118C>A	p.L40I
<b>POLD1</b>	c.521G>A	p.R174Q
	c.2959dup	p.D987Gfs*41
	c.2938G>A	p.E980K
	c.2821-4G>A	-
<b>RAD50</b>	c.214G>A	p.V72I
	c.980G>A (4)	p.R327H
	c.2548C>T (2)	p.R850C
	c.3036+5G>A	-
<b>NTHL1</b>	c.644C>T	p.P215L
	c.298C>T	p.R100C
	c.788G>A	p.R263H
	c.*6G>A (2)	-
<b>SMAD4</b>	c.677C>T (2)	p.A226V
	c.667+3G>A	-
	c.787+1_788-1del (2)	-
<b>FH</b>	c.1286C>T	p.S429F
	c.1048C>T	p.R350W
	c.616G>A	p.V206I
<b>RB1</b>	c.1499-10del (2)	-
	c.929G>A	p.G310E
	c.1422-8del	-
<b>CDK4</b>	c.245G>A	p.R82Q
	c.625C>T	p.R209C
<b>TMEM127</b>	c.292G>A	p.A98T
	c.662C>T	p.P221L
<b>SDHB</b>	c.752G>A	p.R251K
	c.11T>C	p.V4A
<b>MUTYH</b>	c.1276C>T	p.R426C
<b>BMPR1A</b>	c.1327C>T	p.R443C
<b>CDKN2A</b>	c.170C>T	p.A57V
<b>MAX</b>	c.37-3C>T	-
<b>VHL</b>	c.73C>G	p.P25A

Anexo 6: VUS detectadas tras el análisis de los 30 genes susceptibles. El número entre paréntesis indica el total de casos índices portadores de la VUS.

## **VIII. Bibliografía**



1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. European Cancer Information System [Internet]. [citado 7 de febrero de 2022]. Disponible en: [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?%0-0%1-AE27%4-1,2%3-All%6-0,85%5-2020,2020%7-7%CEstByCancer%X0\\_8-3%CEstRelativeCanc%X1\\_8-3%X1\\_9-AE27%CEstBySexByCancer%X2\\_8-3%X2\\_-1-1](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?%0-0%1-AE27%4-1,2%3-All%6-0,85%5-2020,2020%7-7%CEstByCancer%X0_8-3%CEstRelativeCanc%X1_8-3%X1_9-AE27%CEstBySexByCancer%X2_8-3%X2_-1-1)
3. Las\_cifras\_del\_Cancer\_en\_Espana\_2023.pdf [Internet]. [citado 12 de agosto de 2023]. Disponible en: [https://seom.org/images/Las\\_cifras\\_del\\_Cancer\\_en\\_Espana\\_2023.pdf](https://seom.org/images/Las_cifras_del_Cancer_en_Espana_2023.pdf)
4. Mortalidad Provincial [Internet]. [citado 12 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://ariadna.isciii.es/MapaP/>
5. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 29 de marzo de 2013;339(6127):1546-58.
6. Libro\_Cancer\_hereditario\_2019.pdf [Internet]. [citado 3 de febrero de 2023]. Disponible en: [https://seom.org/images/Libro\\_Cancer\\_hereditario\\_2019.pdf](https://seom.org/images/Libro_Cancer_hereditario_2019.pdf)
7. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers.* enero de 2021;13(17):4287.
8. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health.* 31 de diciembre de 2019;11:287-99.
9. Whelan E, Kalliala I, Semertzidou A, Raglan O, Bowden S, Kechagias K, et al. Risk Factors for Ovarian Cancer: An Umbrella Review of the Literature. *Cancers.* enero de 2022;14(11):2708.
10. Falzone L, Scandurra G, Lombardo V, Gattuso G, Lavoro A, Distefano AB, et al. A multidisciplinary approach remains the best strategy to improve and strengthen the management of ovarian cancer (Review). *Int J Oncol.* 1 de julio de 2021;59(1):1-14.
11. McCormack VA, dos Santos Silva I. Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* junio de 2006;15(6):1159-69.
12. 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.* 13 de julio de 2000;343(2):78-85.
13. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. 5.<sup>a</sup> ed. Vol. 2. IARC; 2019. 368 p.
14. Sabadell Mercadal MD, Izquierdo Sanz M, Prats de Puigs M, Modolell Roig A, Adrover Cebrián E. Factores pronósticos y predictivos en cáncer de mama: una visión evolutiva de la morfología a la genética. 2017.
15. Etapas del cáncer de ovario [Internet]. [citado 6 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-ovario/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-por-etapas.html>

16. Oaknin A, Guarch R, Barretina P, Hardisson D, González-Martín A, Matías-Guiu X, et al. Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en cáncer de ovario epitelial. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. *Rev Esp Patol.* 1 de abril de 2018;51(2):84-96.
17. Cáncer de ovario - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 [Internet]. [citado 5 de julio de 2022]. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/ovario?start=1>
18. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer.* 1 de noviembre de 2021;28(6):1167-80.
19. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a Breast Cancer Susceptibility Gene, BRCA2, to Chromosome 13q12-13. *Science.* 30 de septiembre de 1994;265(5181):2088-90.
20. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science.* 21 de diciembre de 1990;250(4988):1684-9.
21. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* octubre de 2008;26(10):1135-45.
22. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem.* abril de 2009;55(4):641-58.
23. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* octubre de 2017;18(10):610-21.
24. Sinicrope FA. Lynch Syndrome—Associated Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 23 de agosto de 2018;379(8):764-73.
25. Yang G, Zheng R yi, Jin Z shun. Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1 de diciembre de 2019;145(12):2891-9.
26. Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* noviembre de 2019;20(11):698-714.
27. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer.* enero de 2012;12(1):68-78.
28. modulo3.pdf [Internet]. [citado 28 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/infopublico/publicaciones/cancerHereditario/IIEdicion/modulo3.pdf>
29. Russi M, Marson D, Fermeglia A, Aulic S, Fermeglia M, Laurini E, et al. The fellowship of the RING: BRCA1, its partner BARD1 and their liaison in DNA repair and cancer. *Pharmacol Ther.* 1 de abril de 2022;232:108009.
30. genetics\_bop.pdf [Internet]. [citado 6 de febrero de 2023]. Disponible en: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_bop.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf)

31. Hartmann LC, Lindor NM. The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 4 de febrero de 2016;374(5):454-68.
32. Chen H, Wu J, Zhang Z, Tang Y, Li X, Liu S, et al. Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2018;9:909.
33. Ha SM, Chae EY, Cha JH, Kim HH, Shin HJ, Choi WJ. Association of BRCA Mutation Types, Imaging Features, and Pathologic Findings in Patients With Breast Cancer With BRCA1 and BRCA2 Mutations. *AJR Am J Roentgenol*. octubre de 2017;209(4):920-8.
34. Zhang Y, Lv F, Yang Y, Qian X, Lang R, Fan Y, et al. Clinicopathological Features and Prognosis of Metaplastic Breast Carcinoma: Experience of a Major Chinese Cancer Center. *PloS One*. 2015;10(6):e0131409.
35. 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*. octubre de 2017;16(4):477-89.
36. Park JS, Lee ST, Han JW, Kim TI, Nam EJ, Park HS. Difference in Risk of Breast and Ovarian Cancer According to Putative Functional Domain Regions in Korean BRCA1/2 Mutation Carriers. *Clin Breast Cancer*. octubre de 2018;18(5):362-373.e1.
37. de la Hoya M, Gutiérrez-Enríquez S, Velasco E, Osorio A, Sanchez de Abajo A, Vega A, et al. Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Clin Chem*. agosto de 2006;52(8):1480-5.
38. Krammer J, Pinker-Domenig K, Robson ME, Gönen M, Bernard-Davila B, Morris EA, et al. Breast cancer detection and tumor characteristics in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat*. junio de 2017;163(3):565-71.
39. Sønderstrup IMH, Jensen MBR, Ejlersen B, Eriksen JO, Gerdes AM, Kruse TA, et al. Subtypes in BRCA-mutated breast cancer. *Hum Pathol*. febrero de 2019;84:192-201.
40. Silvestri V, Barrowdale D, Mulligan AM, Neuhausen SL, Fox S, Karlan BY, et al. Male breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: pathology data from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. *Breast Cancer Res BCR*. 9 de febrero de 2016;18(1):15.
41. Rizzolo P, Silvestri V, Tommasi S, Pinto R, Danza K, Falchetti M, et al. Male breast cancer: genetics, epigenetics, and ethical aspects. *Ann Oncol*. 1 de noviembre de 2013;24:viii75-82.
42. Friebel TM, Domchek SM, Rebbeck TR. Modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. junio de 2014;106(6):dju091.
43. Milne RL, Antoniou AC. Genetic modifiers of cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. enero de 2011;22 Suppl 1:i11-17.
44. Kotsopoulos J, Lubinski J, Lynch HT, Kim-Sing C, Neuhausen S, Demsky R, et al. Oophorectomy after menopause and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. julio de 2012;21(7):1089-96.

45. Park B, Hopper JL, Win AK, Dowty JG, Sung HK, Ahn C, et al. Reproductive factors as risk modifiers of breast cancer in BRCA mutation carriers and high-risk non-carriers. *Oncotarget*. 24 de noviembre de 2017;8(60):102110-8.
46. Toss A, Grandi G, Cagnacci A, Marcheselli L, Pavesi S, De Matteis E, et al. The impact of reproductive life on breast cancer risk in women with family history or BRCA mutation. *Oncotarget*. 7 de febrero de 2017;8(6):9144-54.
47. Tavtigian SV, Chenevix-Trench G. Growing recognition of the role for rare missense substitutions in breast cancer susceptibility. *Biomark Med*. 2014;8(4):589-603.
48. A p53-regulated immune checkpoint relevant to cancer [Internet]. [citado 11 de julio de 2022]. Disponible en: [https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.aac8475?casa\\_token=LJ87tKSAYJMAAAA A%3AB\\_Or20cS6OfzeRVhCsaYBglQPrMlfrk0EJJREPSamjOVp3hBdsi3JAC\\_AltowXWzDrwrRW hjmcAuqA](https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.aac8475?casa_token=LJ87tKSAYJMAAAA A%3AB_Or20cS6OfzeRVhCsaYBglQPrMlfrk0EJJREPSamjOVp3hBdsi3JAC_AltowXWzDrwrRW hjmcAuqA)
49. Liu Z, Jiang Z, Gao Y, Wang L, Chen C, Wang X. TP53 Mutations Promote Immunogenic Activity in Breast Cancer. *J Oncol*. 2 de junio de 2019;2019:e5952836.
50. Gatz SA, Wiesmüller L. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ*. junio de 2006;13(6):1003-16.
51. Amadou A, Waddington Achatz MI, Hainaut P. Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome. *Curr Opin Oncol*. enero de 2018;30(1):23-9.
52. Boonen RACM, Vreeswijk MPG, Attikum H van. CHEK2 variants: linking functional impact to cancer risk. *Trends Cancer*. 1 de septiembre de 2022;8(9):759-70.
53. Shen T, Huang S. The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Agents Med Chem*. julio de 2012;12(6):631-9.
54. Jang SM, Kauzlaric A, Quivy JP, Pontis J, Rauwel B, Coluccio A, et al. KAP1 facilitates reinstatement of heterochromatin after DNA replication. *Nucleic Acids Res*. 28 de septiembre de 2018;46(17):8788-802.
55. Hauke J, Horvath J, Groß E, Gehrig A, Honisch E, Hackmann K, et al. Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Med*. abril de 2018;7(4):1349-58.
56. Pritzlaff M, Summerour P, McFarland R, Li S, Reineke P, Dolinsky JS, et al. Male breast cancer in a multi-gene panel testing cohort: insights and unexpected results. *Breast Cancer Res Treat*. febrero de 2017;161(3):575-86.
57. Schmidt MK, Hogervorst F, van Hien R, Cornelissen S, Broeks A, Adank MA, et al. Age- and Tumor Subtype-Specific Breast Cancer Risk Estimates for CHEK2\*1100delC Carriers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 de agosto de 2016;34(23):2750-60.
58. Schmidt MK, Tollenaar RAEM, de Kemp SR, Broeks A, Cornelisse CJ, Smit VTHBM, et al. Breast Cancer Survival and Tumor Characteristics in Premenopausal Women Carrying the CHEK2\*1100delC Germline Mutation. *J Clin Oncol*. enero de 2007;25(1):64-9.

59. Blanco A, de la Hoya M, Osorio A, Diez O, Miramar MD, Infante M, et al. Analysis of PALB2 gene in BRCA1/BRCA2 negative Spanish hereditary breast/ovarian cancer families with pancreatic cancer cases. *PloS One*. 2013;8(7):e67538.
60. Yehia L, Eng C. 65 YEARS OF THE DOUBLE HELIX: One gene, many endocrine and metabolic syndromes: PTEN-opathies and precision medicine. *Endocr Relat Cancer*. agosto de 2018;25(8):T121-40.
61. Loh A, Brennan R, Lang W, Hickey R, Malkas L, Sandoval J. Dissecting the PI3K Signaling Axis in Pediatric Solid Tumors: Novel Targets for Clinical Integration. *Front Oncol* [Internet]. 2013 [citado 10 de julio de 2022];3. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2013.00093>
62. Riegert-Johnson DL, Gleeson FC, Roberts M, Tholen K, Youngborg L, Bullock M, et al. Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. *Hered Cancer Clin Pract*. 17 de junio de 2010;8(1):6.
63. Zyla RE, Hahn E, Hodgson A. Gene of the month: STK11. *J Clin Pathol*. 1 de noviembre de 2021;74(11):681-5.
64. genetics\_colon.pdf [Internet]. [citado 6 de febrero de 2023]. Disponible en: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_colon.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf)
65. Lakshmaiah KC, Kumar AN, Purohit S, Viveka BK, Rajan KR, Zameer MAL, et al. Neurofibromatosis type I with breast cancer: not only for women! *Hered Cancer Clin Pract*. 24 de febrero de 2014;12(1):5.
66. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. enero de 2012;16(1):103-19.
67. Gall TMH, Frampton AE. Gene of the month: E-cadherin ( *CDH1* ). *J Clin Pathol*. noviembre de 2013;66(11):928-32.
68. Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, Woo M, Senz J, Pinheiro H, et al. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncol*. abril de 2015;1(1):23-32.
69. gastric.pdf [Internet]. [citado 6 de febrero de 2023]. Disponible en: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/gastric.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/gastric.pdf)
70. PMS2 PMS1 homolog 2, mismatch repair system component [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 29 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5395>
71. Evans DG, Woodward ER, Lalloo F, Møller P, Sampson J, Burn J, et al. Are women with pathogenic variants in PMS2 and MSH6 really at high lifetime risk of breast cancer? *Genet Med*. agosto de 2019;21(8):1878-9.
72. Campos FAB, Rouleau E, Torrezan GT, Carraro DM, Casali da Rocha JC, Mantovani HK, et al. Genetic Landscape of Male Breast Cancer. *Cancers*. 15 de julio de 2021;13(14):3535.
73. 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*. julio de 2022;59(7):632-43.

74. 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 Off J Am Coll Med Genet*. agosto de 2019;21(8):1708-18.
75. Bahcall O. Common variation and heritability estimates for breast, ovarian and prostate cancers. *Nat Genet*. 20 de marzo de 2013;1-1.
76. Cardoso JGR, Andersen MR, Herrgård MJ, Sonnenschein N. Analysis of Genetic Variation and Potential Applications in Genome-Scale Metabolic Modeling. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2015 [citado 7 de febrero de 2023];3. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2015.00013>
77. Ito K, Patel PN, Gorham JM, McDonough B, DePalma SR, Adler EE, et al. Identification of pathogenic gene mutations in LMNA and MYBPC3 that alter RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci*. 18 de julio de 2017;114(29):7689-94.
78. 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*. mayo de 2013;18(5):518-24.
79. 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*. mayo de 2015;17(5):405-24.
80. Manahan ER, Kuerer HM, Sebastian M, Hughes KS, Boughey JC, Euhus DM, et al. Consensus Guidelines on Genetic Testing for Hereditary Breast Cancer from the American Society of Breast Surgeons. *Ann Surg Oncol*. 1 de octubre de 2019;26(10):3025-31.
81. 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*. 25 de septiembre de 2018;320(12):1266-74.
82. 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. *Proy Investig* [Internet]. 11 de noviembre de 2014 [citado 19 de abril de 2023]; Disponible en: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/41370>
83. Bermúdez S, Isabel A. 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. *Proy Investig* [Internet]. 11 de julio de 2016 [citado 14 de enero de 2023]; Disponible en: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/50461>
84. 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. *Proy Investig* [Internet]. 17 de julio de 2019 [citado 14 de enero de 2023]; Disponible en: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/73883>
85. 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*. 1 de diciembre de 2018;144(12):2495-513.

86. Rosado Jiménez L. 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. *Proy Investig [Internet]*. 7 de diciembre de 2022 [citado 13 de enero de 2023]; Disponible en: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/126213>
87. Mayr E. *Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist: With a New Introduction by the Author*. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1999. 372 p.
88. Tian Y, Pesaran T, Chamberlin A, Fenwick RB, Li S, Gau CL, et al. REVEL and BayesDel outperform other in silico meta-predictors for clinical variant classification. *Sci Rep*. 4 de septiembre de 2019;9(1):12752.
89. Ghosh R, Oak N, Plon SE. Evaluation of in silico algorithms for use with ACMG/AMP clinical variant interpretation guidelines. *Genome Biol*. 28 de noviembre de 2017;18(1):225.
90. Tian Y, Pesaran T, Chamberlin A, Fenwick RB, Li S, Gau CL, et al. REVEL and BayesDel outperform other in silico meta-predictors for clinical variant classification. *Sci Rep*. 4 de septiembre de 2019;9(1):12752.
91. 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*. 6 de octubre de 2016;99(4):877-85.
92. Kottemann MC, Smogorzewska A. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature*. 17 de enero de 2013;493(7432):356-63.
93. 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*. diciembre de 2015;17(12):956-61.
94. SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer (2019) | SpringerLink [Internet]. [citado 1 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12094-019-02262-0#Tab1>
95. Schwentner L, Wolters R, Wischnewsky M, Kreienberg R, Wöckel A. Survival of patients with bilateral versus unilateral breast cancer and impact of guideline adherent adjuvant treatment: A multi-centre cohort study of 5292 patients. *The Breast*. 1 de abril de 2012;21(2):171-7.
96. Santonocito C, Rizza R, Paris I, Marchis LD, Paolillo C, Tiberi G, et al. Spectrum of Germline BRCA1 and BRCA2 Variants Identified in 2351 Ovarian and Breast Cancer Patients Referring to a Reference Cancer Hospital of Rome. *Cancers*. 19 de mayo de 2020;12(5):1286.
97. 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*. junio de 2001;17(6):520-1.
98. Laraqui A, Uhrhammer N, Rhaffouli HEL, 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;2015:194293.

99. Heramb C, Wangensteen T, Grindedal EM, Ariansen SL, Lothe S, Heimdal KR, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation spectrum - an update on mutation distribution in a large cancer genetics clinic in Norway. *Hered Cancer Clin Pract.* 2018;16:3.
100. Janavičius R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J.* septiembre de 2010;1(3):397-412.
101. Ferla R, Calò V, Cascio S, Rinaldi G, Badalamenti G, Carreca I, et al. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. *Ann Oncol.* junio de 2007;18:vi93-8.
102. 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.* 2 de junio de 2017;10(1):188.
103. 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.* 17 de mayo de 2013;13:243.
104. Cybulski C, Huzarski T, Górski B, Masojć B, Mierzejewski M, Debniak T, et al. A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res.* 15 de abril de 2004;64(8):2677-9.
105. 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.* 15 de marzo de 2010;16(6):1957-67.
106. 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.* febrero de 2015;36(2):210-21.
107. Colombo M, De Vecchi G, Caleca L, Foglia C, Ripamonti CB, Ficarazzi F, et al. Comparative In Vitro and In Silico Analyses of Variants in Splicing Regions of BRCA1 and BRCA2 Genes and Characterization of Novel Pathogenic Mutations. *PLoS ONE.* 22 de febrero de 2013;8(2):e57173.
108. Asadollahi R, Britschgi C, Joset P, Oneda B, Schindler D, Meier UR, et al. Severe reaction to radiotherapy provoked by hypomorphic germline mutations in ATM (ataxia-telangiectasia mutated gene). *Mol Genet Genomic Med.* 2020;8(10):e1409.
109. Menéndez M, Castellsagué J, Mirete M, Pros E, Feliubadaló L, Osorio A, et al. Assessing the RNA effect of 26 DNA variants in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast Cancer Res Treat.* abril de 2012;132(3):979-92.
110. Stella S, Vitale SR, Martorana F, Massimino M, Pavone G, Lanzafame K, et al. Mutational Analysis of BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Patients from Eastern Sicily. *Cancer Manag Res.* 5 de abril de 2022;14:1341-52.
111. 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.* 7 de abril de 2015;313(13):1347-61.

112. Ransburgh DJR, Chiba N, Ishioka C, Toland AE, Parvin JD. Identification of breast tumor mutations in BRCA1 that abolish its function in homologous DNA recombination. *Cancer Res.* 1 de febrero de 2010;70(3):988-95.
113. Fabbro M, Henderson BR. BARD1 regulates BRCA1-mediated transactivation of the p21WAF1/CIP1 and Gadd45 promoters. *Cancer Lett.* 18 de mayo de 2008;263(2):189-96.
114. Brzovic PS, Meza J, King MC, Kleivit RE. The cancer-predisposing mutation C61G disrupts homodimer formation in the NH2-terminal BRCA1 RING finger domain. *J Biol Chem.* 3 de abril de 1998;273(14):7795-9.
115. Santos C, Peixoto A, Rocha P, Vega A, Soares MJ, Cerveira N, et al. Haplotype and quantitative transcript analyses of Portuguese breast/ovarian cancer families with the BRCA1 R71G founder mutation of Galician origin. *Fam Cancer.* 2009;8(3):203-8.
116. del Valle J, Feliubadaló L, Nadal M, Teulé A, Miró R, Cuesta R, et al. Identification and comprehensive characterization of large genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast Cancer Res Treat.* 1 de agosto de 2010;122(3):733-43.
117. Lee MS, Green R, Marsillac SM, Coquelle N, Williams RS, Yeung T, et al. Comprehensive Analysis of Missense Variations in the BRCT Domain of BRCA1 by Structural and Functional Assays. *Cancer Res.* 15 de junio de 2010;70(12):4880-90.
118. 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.* 1 de mayo de 2009;115(2):315-23.
119. Kim DH, Chae H, Jo I, Yoo J, Lee H, Jang W, et al. Identification of large genomic rearrangement of BRCA1/2 in high risk patients in Korea. *BMC Med Genet.* 28 de marzo de 2017;18(1):38.
120. Structure and mechanism of BRCA1 BRCT domain recognition of phosphorylated BACH1 with implications for cancer | *Nature Structural & Molecular Biology* [Internet]. [citado 12 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nsmb775>
121. Varma AK, Brown RS, Birrane G, Ladias JAA. Structural basis for cell cycle checkpoint control by the BRCA1-CtIP complex. *Biochemistry.* 23 de agosto de 2005;44(33):10941-6.
122. Biswas K, Das R, Alter BP, Kuznetsov SG, Stauffer S, North SL, et al. A comprehensive functional characterization of BRCA2 variants associated with Fanconi anemia using mouse ES cell-based assay. *Blood.* 1 de septiembre de 2011;118(9):2430-42.
123. 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.* 1 de abril de 2022;65(4):104468.
124. Demuth I, Dutranoy V, Marques W, Neitzel H, Schindler D, Dimova PS, et al. New mutations in the ATM gene and clinical data of 25 AT patients. *neurogenetics.* 1 de noviembre de 2011;12(4):273-82.

125. G B, A G, A R, V S, Pj B, Am T. Modeling ATM mutant proteins from missense changes confirms retained kinase activity. *Hum Mutat* [Internet]. agosto de 2009 [citado 24 de enero de 2023];30(8). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19431188/>
126. Roeb W, Higgins J, King MC. Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer. *Hum Mol Genet*. 15 de junio de 2012;21(12):2738-44.
127. Bazinet A, Heath J, Chong AS, Simo-Cheyrou ER, Worme S, Rivera Polo B, et al. Common clonal origin of chronic myelomonocytic leukemia and B-cell acute lymphoblastic leukemia in a patient with a germline CHEK2 variant. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. junio de 2021;7(3):a006090.
128. Boonen RACM, Wiegant WW, Celosse N, Vroling B, Heijl S, Kote-Jarai Z, et al. Functional Analysis Identifies Damaging CHEK2 Missense Variants Associated with Increased Cancer Risk. *Cancer Res*. 15 de febrero de 2022;82(4):615-31.
129. Liu C, Wang Y, Wang QS, Wang YJ. The CHEK2 I157T variant and breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2012;13(4):1355-60.
130. Ogrodniczak A, Menkiszak J, Gronwald J, Tomiczek-Szwiec J, Szwiec M, Cybulski C, et al. Association of recurrent mutations in BRCA1, BRCA2, RAD51C, PALB2, and CHEK2 with the risk of borderline ovarian tumor. *Hered Cancer Clin Pract* [Internet]. 2022 [citado 27 de enero de 2023];20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8935754/>
131. Ducey M, Sesma-Sanz L, Guitton-Sert L, Lashgari A, Gao Y, Brahiti N, et al. The Tumor Suppressor PALB2: Inside Out. *Trends Biochem Sci*. 1 de marzo de 2019;44(3):226-40.
132. Blanco A, de la Hoya M, Balmaña J, Ramón y Cajal T, Teulé A, Miramar MD, et al. Detection of a large rearrangement in PALB2 in Spanish breast cancer families with male breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1 de febrero de 2012;132(1):307-15.
133. Moyer CL, Ivanovich J, Gillespie JL, Doberstein R, Radke MR, Richardson ME, et al. Rare BRIP1 Missense Alleles Confer Risk for Ovarian and Breast Cancer. *Cancer Res*. 14 de febrero de 2020;80(4):857-67.
134. Napolitano F, Dell'Aquila M, Terracciano C, Franzese G, Gentile MT, Piluso G, et al. Genotype-Phenotype Correlations in Neurofibromatosis Type 1: Identification of Novel and Recurrent NF1 Gene Variants and Correlations with Neurocognitive Phenotype. *Genes*. julio de 2022;13(7):1130.
135. French CA, Tambini CE, Thacker J. Identification of functional domains in the RAD51L2 (RAD51C) protein and its requirement for gene conversion. *J Biol Chem*. 14 de noviembre de 2003;278(46):45445-50.
136. 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*. 1 de febrero de 2020;22(2):193-200.
137. Adamo B, Moreno L, Gaba L, Vidal M, Pascual T, Chic N, et al. Multi-gene panel testing at the hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) unit of the Hospital Clinic of Barcelona. *Ann Oncol*. 1 de mayo de 2019;30:iii42-3.

138. Molina-Zayas M, Garrido-Navas C, García-Puche JL, Barwell J, Pedrinaci S, Atienza MM, et al. Identification of hereditary breast and ovarian cancer germline variants in Granada (Spain): NGS perspective. *Mol Genet Genomics*. 1 de mayo de 2022;297(3):859-71.
139. 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*. 15 de octubre de 2016;8(2):1957-71.
140. Schroeder C, Faust U, Sturm M, Hackmann K, Grundmann K, Harmuth F, et al. HBOC multi-gene panel testing: comparison of two sequencing centers. *Breast Cancer Res Treat*. 1 de julio de 2015;152(1):129-36.
141. Wöckel A, Kreienberg R. First Revision of the German S3 Guideline 'Diagnosis, Therapy, and Follow-Up of Breast Cancer'. *Breast Care*. 24 de abril de 2008;3(2):82-6.
142. 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*. 1 de enero de 2017;140(1):95-102.
143. Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, Danesi R, Arcangeli V, Ravegnani M, et al. Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. *Oncotarget*. 3 de abril de 2017;8(29):47064-75.
144. Pinto P, Paulo P, Santos C, Rocha P, Pinto C, Veiga I, et al. Implementation of next-generation sequencing for molecular diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer highlights its genetic heterogeneity. *Breast Cancer Res Treat*. 1 de septiembre de 2016;159(2):245-56.
145. Krivokuca A, Mihajlovic M, Susnjar S, Spasojevic IB, Minic I, Popovic L, et al. Mutational profile of hereditary breast and ovarian cancer – Establishing genetic testing guidelines in a developing country. *Curr Probl Cancer*. 1 de febrero de 2022;46(1):100767.
146. Kurian AW, Hughes E, Handorf EA, Gutin A, Allen B, Hartman AR, et al. Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women. *JCO Precis Oncol*. noviembre de 2017;(1):1-12.
147. Lerner-Ellis J, Mighton C, Lazaro C, Watkins N, Di Gioacchino V, Wong A, et al. Multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer in the province of Ontario. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1 de marzo de 2021;147(3):871-9.
148. George SHL, Donenberg T, Alexis C, DeGennaro V, Dyer H, Yin S, et al. Gene Sequencing for Pathogenic Variants Among Adults With Breast and Ovarian Cancer in the Caribbean. *JAMA Netw Open*. 1 de marzo de 2021;4(3):e210307.
149. Shao D, Cheng S, Guo F, Zhu C, Yuan Y, Hu K, et al. Prevalence of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) predisposition gene mutations among 882 HBOC high-risk Chinese individuals. *Cancer Sci*. febrero de 2020;111(2):647-57.
150. van der Merwe NC, Ntaita KS, Stofberg H, Combrink HM, Oosthuizen J, Kotze MJ. Implementation of multigene panel testing for breast and ovarian cancer in South Africa: A step towards excellence in oncology for the public sector. *Front Oncol*. 2022;12:938561.

151. 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 Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. febrero de 2020;22(2):193-200.
152. Sung PL, Wen KC, Chen YJ, Chao TC, Tsai YF, Tseng LM, et al. The frequency of cancer predisposition gene mutations in hereditary breast and ovarian cancer patients in Taiwan: From BRCA1/2 to multi-gene panels. *PLoS One*. 2017;12(9):e0185615.
153. Kurian AW, Ward KC, Howlander N, Deapen D, Hamilton AS, Mariotto A, et al. Genetic Testing and Results in a Population-Based Cohort of Breast Cancer Patients and Ovarian Cancer Patients. *J Clin Oncol*. 20 de mayo de 2019;37(15):1305-15.
154. Shin HC, Lee HB, Yoo TK, Lee ES, Kim RN, Park B, et al. Detection of Germline Mutations in Breast Cancer Patients with Clinical Features of Hereditary Cancer Syndrome Using a Multi-Gene Panel Test. *Cancer Res Treat*. julio de 2020;52(3):697-713.
155. 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*. julio de 2018;170(1):189-96.
156. Samadder NJ, Riegert-Johnson D, Boardman L, Rhodes D, Wick M, Okuno S, et al. Comparison of Universal Genetic Testing vs Guideline-Directed Targeted Testing for Patients With Hereditary Cancer Syndrome. *JAMA Oncol*. 1 de febrero de 2021;7(2):230-7.
157. Beitsch P, Whitworth P, Baron P, Rosen B, Compagnoni G, Simmons R, et al. Abstract P5-09-06: Underdiagnosis of HBOC in breast cancer patients: Are genetic testing guidelines a tool or an obstacle? *Cancer Res*. 15 de febrero de 2019;79(4\_Supplement):P5-09-06.
158. Andoni T, Wiggins J, Robinson R, Charlton R, Sandberg M, Eeles R. Half of germline pathogenic and likely pathogenic variants found on panel tests do not fulfil NHS testing criteria. *Sci Rep*. 21 de febrero de 2022;12(1):2507.
159. Korde LA, Zujewski JA, Kamin L, Giordano S, Domchek S, Anderson WF, et al. Multidisciplinary Meeting on Male Breast Cancer: Summary and Research Recommendations. *J Clin Oncol*. 20 de abril de 2010;28(12):2114-22.
160. McGuigan A, Whitworth J, Andreou A, Hearn T, Genomics England Research Consortium, Tischkowitz M, et al. Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome (MINAS): an update. *Eur J Hum Genet EJHG*. marzo de 2022;30(3):265-70.
161. Rebbeck TR, Friebel TM, Mitra N, Wan F, Chen S, Andrulis IL, et al. Inheritance of deleterious mutations at both BRCA1 and BRCA2 in an international sample of 32,295 women. *Breast Cancer Res*. 11 de noviembre de 2016;18(1):112.
162. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Polley EC, Na J, et al. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 1 de septiembre de 2017;3(9):1190-6.
163. Toss A, Tenedini E, Piombino C, Venturelli M, Marchi I, Gasparini E, et al. Clinicopathologic Profile of Breast Cancer in Germline ATM and CHEK2 Mutation Carriers. *Genes*. mayo de 2021;12(5):616.

164. de la Hoya M, Gutiérrez-Enríquez S, Velasco E, Osorio A, Sanchez de Abajo A, Vega A, et al. Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Clin Chem*. agosto de 2006;52(8):1480-5.
165. Sønderstrup IMH, Jensen MBR, Ejlersen B, Eriksen JO, Gerdes AM, Kruse TA, et al. Subtypes in BRCA-mutated breast cancer. *Hum Pathol*. febrero de 2019;84:192-201.
166. van der Kolk DM, de Bock GH, Leegte BK, Schaapveld M, Mourits MJE, de Vries J, et al. Penetrance of breast cancer, ovarian cancer and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 families: high cancer incidence at older age. *Breast Cancer Res Treat*. 1 de diciembre de 2010;124(3):643-51.
167. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 20 de junio de 2017;317(23):2402-16.
168. 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*. 1 de octubre de 2017;16(4):477-89.
169. Narod SA. Bilateral breast cancers. *Nat Rev Clin Oncol*. marzo de 2014;11(3):157-66.
170. Weitzel JN, Robson M, Pasini B, Manoukian S, Stoppa-Lyonnet D, Lynch HT, et al. A Comparison of Bilateral Breast Cancers in BRCA Carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 7 de junio de 2005;14(6):1534-8.
171. Pilarski R. The Role of BRCA Testing in Hereditary Pancreatic and Prostate Cancer Families. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. mayo de 2019;(39):79-86.
172. Campos FAB, Rouleau E, Torrezan GT, Carraro DM, Casali da Rocha JC, Mantovani HK, et al. Genetic Landscape of Male Breast Cancer. *Cancers*. enero de 2021;13(14):3535.
173. Yao Q, Liu Y, Zhang L, Dong L, Bao L, Bai Q, et al. Mutation Landscape of Homologous Recombination Repair Genes in Epithelial Ovarian Cancer in China and Its Relationship With Clinicopathological Characteristics. *Front Oncol [Internet]*. 2022 [citado 3 de abril de 2023];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.709645>
174. Nyqvist J, Parris TZ, Helou K, Sarenmalm EK, Einbeigi Z, Karlsson P, et al. Previously diagnosed multiple primary malignancies in patients with breast carcinoma in Western Sweden between 2007 and 2018. *Breast Cancer Res Treat*. 1 de noviembre de 2020;184(1):221-8.
175. Senkus E, Szade J, Pieczyńska B, Żaczek A, Brożek I, Radecka B, et al. Are bilateral breast cancers different from breast cancers coexisting with ovarian cancer? An immunohistochemical analysis aimed at intrinsic tumor phenotype. *The Breast*. 1 de agosto de 2013;22(4):425-30.
176. Einbeigi Z, Enerbäck C, Wallgren A, Nordling M, Karlsson P. BRCA1 gene mutations may explain more than 80% of excess number of ovarian cancer cases after breast cancer – a population based study from the Western Sweden Health Care region. *Acta Oncol*. 1 de enero de 2010;49(3):361-7.

177. Einbeigi Z, Bergman A, Meis-Kindblom JM, Flodin A, Bjursell C, Martinsson T, et al. Occurrence of both breast and ovarian cancer in a woman is a marker for the BRCA gene mutations: a population-based study from Western Sweden. *Fam Cancer*. 1 de marzo de 2007;6(1):35-41.
178. İlhan E, Vardar E, Ozkok G, Sezgin A, Sahin S, Teker K, et al. A Rare Tumour of the Breast: Carcinosarcoma. *J Clin Med Res*. 25 de marzo de 2010;2(2):96-8.
179. Ghilli M, Mariniello DM, Fanelli G, Cascione F, Fontana A, Cristaudo A, et al. Carcinosarcoma of the Breast: An Aggressive Subtype of Metaplastic Cancer. Report of a Rare Case in a Young BRCA-1 Mutated Woman. *Clin Breast Cancer*. 1 de febrero de 2017;17(1):e31-5.
180. 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*. 1 de febrero de 2017;161(3):597-604.
181. Lesueur F, Easton DF, Renault AL, Tavtigian SV, Bernstein JL, Kote-Jarai Z, et al. First international workshop of the ATM and cancer risk group (4-5 December 2019). *Fam Cancer*. 1 de abril de 2022;21(2):211-27.
182. Velázquez C, K. DL, Esteban-Cardesa EM, Avila Cobos F, Lastra E, Abella LE, et al. Germline Genetic Findings Which May Impact Therapeutic Decisions in Families with a Presumed Predisposition for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancers*. agosto de 2020;12(8):2151.
183. Boni J, Idani A, Roca C, Feliubadaló L, Tomiak E, Weber E, et al. A decade of RAD51C and RAD51D germline variants in cancer. *Hum Mutat*. 2022;43(3):285-98.
184. Sánchez-Bermúdez AI, Sarabia-Meseguer MD, García-Aliaga Á, Marín-Vera M, Macías-Cerrolaza JA, Henaréjos PS, et al. Mutational analysis of RAD51C and RAD51D genes in hereditary breast and ovarian cancer families from Murcia (southeastern Spain). *Eur J Med Genet*. 1 de junio de 2018;61(6):355-61.
185. Gutiérrez-Enríquez S, Bonache S, Ruíz de Garibay G, Osorio A, Santamariña M, Ramón y Cajal T, et al. About 1% of the breast and ovarian Spanish families testing negative for BRCA1 and BRCA2 are carriers of RAD51D pathogenic variants. *Int J Cancer*. 2014;134(9):2088-97.
186. Łukomska A, Menkiszak J, Gronwald J, Tomiczek-Szwiec J, Szwiec M, Jasiówska M, et al. Recurrent Mutations in BRCA1, BRCA2, RAD51C, PALB2 and CHEK2 in Polish Patients with Ovarian Cancer. *Cancers*. 18 de febrero de 2021;13(4):849.
187. Lhota F, Zemankova P, Kleiblova P, Soukupova J, Vocka M, Stranecky V, et al. Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in BRCA1/BRCA2/PALB2-negatively tested breast cancer patients. *Clin Genet*. 2016;90(4):324-33.
188. Schwartz M, Moncoutier V, Peytral A, Le Gall J, Suybeng V, Pagès M, et al. Hereditary cancer predispositions: Comparison of multigene panel sequencing on fresh-frozen breast/ovarian tumor versus blood. *Clin Genet* [Internet]. [citado 10 de abril de 2023];n/a(n/a). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cge.14327>

189. Rizzolo P, Zelli V, Silvestri V, Valentini V, Zanna I, Bianchi S, et al. Insight into genetic susceptibility to male breast cancer by multigene panel testing: Results from a multicenter study in Italy. *Int J Cancer*. 2019;145(2):390-400.
190. Table 1 Fifteen breast cancer patients with pathogenic germline variants in MMR genes identified from 8085 breast cancer patients. [citado 10 de abril de 2023]; Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41523-022-00417-x/tables/1>
191. Norquist BM, Harrell MI, Brady MF, Walsh T, Lee MK, Gulsuner S, et al. Inherited Mutations in Women with Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol*. 1 de abril de 2016;2(4):482-90.
192. Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R, Vogel Postula KJ, Weissman SM, Yackowski L, et al. Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med*. agosto de 2016;18(8):823-32.
193. Moreno E, Rosa-Rosa JM, Caniego-Casas T, Ruz-Caracuel I, Perna C, Guillén C, et al. Next generation sequencing to decipher concurrent loss of PMS2 and MSH6 in colorectal cancer. *Diagn Pathol*. 14 de julio de 2020;15:84.
194. Li N, Zethoven M, McInerney S, Healey E, DeSilva D, Devereux L, et al. Contribution of large genomic rearrangements in PALB2 to familial breast cancer: implications for genetic testing. *J Med Genet*. 1 de febrero de 2023;60(2):112-8.
195. Packwood K, Martland G, Sommerlad M, Shaw E, Moutasim K, Thomas G, et al. Breast cancer in patients with germline TP53 pathogenic variants have typical tumour characteristics: the Cohort study of TP53 carrier early onset breast cancer (COPE study). *J Pathol Clin Res*. 2019;5(3):189-98.
196. Kuba MG, Lester SC, Bowman T, Stokes SM, Taneja KL, Garber JE, et al. Histopathologic features of breast cancer in Li-Fraumeni syndrome. *Mod Pathol*. 1 de marzo de 2021;34(3):542-8.
197. Velázquez C, Lastra E, Avila Cobos F, Abella L, de la Cruz V, Hernando BA, et al. A comprehensive custom panel evaluation for routine hereditary cancer testing: improving the yield of germline mutation detection. *J Transl Med*. diciembre de 2020;18(1):1-12.
198. Fonfria M, de Juan Jiménez I, Tena I, Chirivella I, Richart-Aznar P, Segura A, et al. Prevalence and Clinicopathological Characteristics of Moderate and High-Penetrance Genes in Non-BRCA1/2 Breast Cancer High-Risk Spanish Families. *J Pers Med*. 12 de junio de 2021;11(6):548.
199. Rodríguez-Balada M, Roig B, Melé M, Albacar C, Serrano S, Salvat M, et al. Identification of germline pathogenic variants in DNA damage repair genes by a next-generation sequencing multigene panel in BRCA1 patients. *Clin Biochem*. 1 de febrero de 2020;76:17-23.
200. 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.
201. Castéra L, Harter V, Muller E, Krieger S, Goardon N, Ricou A, et al. Landscape of pathogenic variations in a panel of 34 genes and cancer risk estimation from 5131 HBOC families. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. diciembre de 2018;20(12):1677-86.

202. Patil S, Chamberlain RS. Neoplasms Associated with Germline and Somatic NF1 Gene Mutations. *The Oncologist*. 1 de enero de 2012;17(1):101-16.
203. Ece Solmaz A, Isik E, Atik T, Ozkinay F, Onay H. Mutation spectrum of the NF1 gene and genotype–phenotype correlations in Turkish patients: Seventeen novel pathogenic variants. *Clin Neurol Neurosurg*. 1 de septiembre de 2021;208:106884.
204. Norris EJ, Jones WD, Surleac MD, Petrescu AJ, Destephanis D, Zhang Q, et al. Clonal lineage of high grade serous ovarian cancer in a patient with neurofibromatosis type 1. *Gynecol Oncol Rep*. 1 de febrero de 2018;23:41-4.
205. Jeon YW, Kim RM, Lim ST, Choi HJ, Suh YJ. Early-Onset Breast Cancer in a Family with Neurofibromatosis Type 1 Associated with a Germline Mutation in BRCA1. *J Breast Cancer*. 1 de marzo de 2015;18(1):97-100.
206. Mampel A, Sottile ML, Denita-Juárez SP, Vargas AL, Vargas-Roig LM. Double heterozygous pathogenic variants in the BRCA1 and BRCA2 genes in a patient with bilateral metachronous breast cancer. *Cancer Genet*. 1 de enero de 2022;260-261:14-7.
207. D’Elia G, Caliendo G, Tzioni MM, Albanese L, Passariello L, Molinari AM, et al. Increased Risk of Hereditary Prostate Cancer in Italian Families with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome Harboring Mutations in BRCA and in Other Susceptibility Genes. *Genes*. octubre de 2022;13(10):1692.
208. Nomizu T, Matsuzaki M, Katagata N, Kobayashi Y, Sakuma T, Monma T, et al. A case of familial breast cancer with double heterozygosity for BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast Cancer*. 1 de septiembre de 2015;22(5):557-61.
209. Infante M, Arranz-Ledo M, Lastra E, Abella LE, Ferreira R, Orozco M, et al. Increased Co-Occurrence of Pathogenic Variants in Hereditary Breast and Ovarian Cancer and Lynch Syndromes: A Consequence of Multigene Panel Genetic Testing? *Int J Mol Sci*. enero de 2022;23(19):11499.
210. Noh JM, Choi DH, Nam SJ, Lee JE, Kim JW, Kim SW, et al. Characteristics of double heterozygosity for BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Korean breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. enero de 2012;131(1):217-22.
211. Palmirotta R, Lovero D, Stucci LS, Silvestris E, Quaresmini D, Cardascia A, et al. Double Heterozygosity for BRCA1 Pathogenic Variant and BRCA2 Polymorphic Stop Codon K3326X: A Case Report in a Southern Italian Family. *Int J Mol Sci*. enero de 2018;19(1):285.
212. Le Page C, Rahimi K, Rodrigues M, Heinzelmann-Schwarz V, Recio N, Tommasi S, et al. Clinicopathological features of women with epithelial ovarian cancer and double heterozygosity for BRCA1 and BRCA2: A systematic review and case report analysis. *Gynecol Oncol*. 1 de febrero de 2020;156(2):377-86.
213. Penkert J, Schmidt G, Hofmann W, Schubert S, Schieck M, Auber B, et al. Breast cancer patients suggestive of Li-Fraumeni syndrome: mutational spectrum, candidate genes, and unexplained heredity. *Breast Cancer Res*. 7 de agosto de 2018;20(1):87.
214. Sokolenko AP, Bogdanova N, Kluzniak W, Preobrazhenskaya EV, Kuligina ES, Iyevleva AG, et al. Double heterozygotes among breast cancer patients analyzed for BRCA1, CHEK2, ATM,

- NBN/NBS1, and BLM germ-line mutations. *Breast Cancer Res Treat.* 1 de junio de 2014;145(2):553-62.
215. 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 Oxf Engl* 1990. enero de 2019;106:54-60.
216. Esteban I, Vilaró M, Adrover E, Angulo A, Carrasco E, Gadea N, et al. Psychological impact of multigene cancer panel testing in patients with a clinical suspicion of hereditary cancer across Spain. *Psychooncology.* 2018;27(6):1530-7.
217. 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.* 11 de abril de 2016;9:19.
218. 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.* julio de 2016;37(7):640-52.
219. Morales A, Hershberger RE. Variants of Uncertain Significance: Should We Revisit How They Are Evaluated and Disclosed? *Circ Genomic Precis Med.* junio de 2018;11(6):e002169.
220. Mahecha D, Nuñez H, Lattig MC, Duitama J. Machine learning models for accurate prioritization of variants of uncertain significance. *Hum Mutat.* abril de 2022;43(4):449-60.
221. Strande NT, Riggs ER, Buchanan AH, Ceyhan-Birsoy O, DiStefano M, Dwight SS, et al. Evaluating the Clinical Validity of Gene-Disease Associations: An Evidence-Based Framework Developed by the Clinical Genome Resource. *Am J Hum Genet.* 1 de junio de 2017;100(6):895-906.
222. Lee K, Seifert BA, Shimelis H, Ghosh R, Crowley SB, Carter NJ, et al. Clinical Validity Assessment of Genes Frequently Tested on Hereditary Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Sequencing Panels. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet.* julio de 2019;21(7):1497-506.
223. Sharma Bhai P, Sharma D, Saxena R, Verma IC. Next-Generation Sequencing Reveals a Nonsense Mutation (p.Arg364Ter) in MRE11A Gene in an Indian Patient with Familial Breast Cancer. *Breast Care.* mayo de 2017;12(2):114-6.
224. Hirotsu Y, Nakagomi H, Sakamoto I, Amemiya K, Oyama T, Mochizuki H, et al. Multigene panel analysis identified germline mutations of DNA repair genes in breast and ovarian cancer. *Mol Genet Genomic Med.* septiembre de 2015;3(5):459-66.
225. García-Closas M, Egan KM, Newcomb PA, Brinton LA, Titus-Ernstoff L, Chanock S, et al. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland, and meta-analyses. *Hum Genet.* 1 de mayo de 2006;119(4):376-88.
226. Rahman S, Canny MD, Buschmann TA, Latham MP. A Survey of Reported Disease-Related Mutations in the MRE11-RAD50-NBS1 Complex. *Cells.* julio de 2020;9(7):1678.