



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**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.**

**D<sup>a</sup>. Ana Isabel Sánchez Bermúdez**

**2016**



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**



**TESIS DOCTORAL**

**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.**

Memoria para optar al grado de Doctor  
presentada por

**Ana Isabel Sánchez Bermúdez**

Bajo la dirección de los Doctores:

D<sup>a</sup>. María Desamparados Sarabia Meseguer

D. Francisco Ruíz Espejo

D. José Luis Alonso Romero



*A mis padres y hermanos*

*A Pablo*



## AGRADECIMIENTOS

*A Amparo Sarabia, Paco Ruiz y José Luis Alonso por la ayuda recibida en esta tesis que me ha permitido llevar este proyecto hacia su meta particular. Gracias por confiar en mí, por vuestro tiempo y dedicación.*

*A Xavi, mi "R mayor", mi compañero de andanzas, viajes y caminatas, gracias por abrir camino y darme la mano para que te siguiera, gracias por estar siempre ahí.*

*A todo el personal del laboratorio de diagnóstico genético, en especial a "Ángeles Junior", gracias por hacerme sentir bienvenida y querida.*

*A mis compañeros de residencia, por todos los momentos vividos durante estos años, por los consejos y la ayuda que me habéis prestado en este trabajo y en muchos otros, gracias por haber formado parte de estos años.*

*A mis amigas de toda la vida, en especial a las que me acompañaron durante los años de carrera en Alicante, porque esta profesión no sería la misma si no la hubiera aprendido con vosotras, gracias por preocuparos por mí y tener siempre un buen consejo.*

*A mi amiga Alicia, por tu alegría a carcajadas, gracias por estar siempre dispuesta.*

*A los pequeños de la casa, mis sobrinos Carlos y Jorge porque un rato con vosotros hace que todo empiece de nuevo. A Carlota, mi prima, mi hermana, mi vida, mi perdición.*

*A mis padres y mis hermanos, porque en este trabajo también está vuestro esfuerzo, sin vuestra ayuda no hubiera sido posible, gracias por vuestro cariño y apoyo.*

*A mi madre, porque siempre me enseñó a poner cariño y sencillez en cada aspecto de la vida.*

*A Pablo, mi compañero. Porque este proyecto y muchos otros de mi vida solo se entienden si tu estas a mi lado. Espero seguir caminando y descubriendo el mundo junto a ti. Gracias por tener fe en mí.*

*A cada uno de vosotros, GRACIAS*



# Índice

Abreviaturas .....	VI
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas.....	XII
<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1. Incidencia y factores de riesgo del cáncer de mama y de ovario.....	3
1.1 Incidencia .....	3
1.2 Factores de riesgo.....	4
2. Cáncer de mama y ovario hereditario.....	5
2.1 Genética del cáncer de mama y ovario hereditario. ....	6
3. Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH).....	10
3.1 Principales genes de susceptibilidad al SCMOH: <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	11
3.1.1 Estructura de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	12
3.1.2 Funciones de las proteínas <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	13
3.1.3 Frecuencia mutacional de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	14
4. La Recombinación homóloga (RH) .....	14
4.1 Genes de la RH relacionados con el SCMOH .....	20
4.1.1 ATM.....	21
4.1.2 <i>CHEK2</i> (Cell Cycle Checkpoint Kinase 2).....	22
4.1.3 Genes de la Anemia de Fanconi; <i>PALB2</i> , <i>BRIP1</i> y <i>RAD51C</i> .....	22
5. <i>RAD51</i> y parálogos de <i>RAD51</i> .....	27
5.1 Interacción <i>RAD51</i> - <i>BRCA2</i> .....	30
5.2 <i>RAD51C</i> .....	32
5.2.1 <i>RAD51C</i> como gen de susceptibilidad al cáncer .....	34
5.3 <i>RAD51D</i> .....	36

5.3.1	<i>RAD51D</i> como gen de susceptibilidad al cáncer.....	37
6.	Importancia del diagnóstico genético.....	38
6.1	El proceso del asesoramiento genético.....	38
6.2	Estudio genético.....	39
6.3	La genética como estrategia de tratamiento.....	41
7.	Clasificación de las variantes genéticas.....	43
7.1	Tipos de variantes según el efecto fisiológico.....	43
7.2	Herramientas de valoración clínica de variantes génicas.....	44
7.2.1	Bases de datos.....	44
7.2.2	Análisis de segregación en la familia.....	45
7.2.3	Estudio de caso-control.....	45
7.2.4	Historia personal y familiar.....	46
7.2.5	Co-ocurrencia en <i>trans</i> .....	46
7.2.6	Conservación evolutiva entre las especies.....	47
7.2.7	Estudios funcionales.....	47
7.2.8	Estudios <i>in silico</i> .....	48
<b>II.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>51</b>
1.	Justificación del estudio e hipótesis.....	53
1.	Objetivos.....	55
<b>III.</b>	<b>Material y métodos.....</b>	<b>57</b>
1.	Pacientes en estudio.....	59
1.1	Selección y clasificación de los pacientes.....	59
1.2	Características clínicas e inmunohistoquímicas de los pacientes.....	61
1.2.1	Información detallada de la historia oncológica del cáncer de mama y/u ovario del caso índice:.....	61
1.2.2	Información del tipo de cáncer de la historia familiar en los familiares.....	62
2.	Extracción de ADN.....	62

3. Amplificación y purificación de ADN genómico .....	64
3.1 Amplificación de los exones.....	64
3.2 Verificación de la amplificación .....	66
3.3 Purificación de los amplicones.....	67
4. Secuenciación automática directa .....	68
4.1 Purificación de los productos de secuenciación .....	69
5. Estudio de grandes reordenamientos .....	70
5.1 Análisis de fragmentos.....	72
6. Nomenclatura de las variantes y simbología de los árboles genealógicos .....	73
7. Análisis de las variantes.....	74
8. Análisis bioinformático: métodos <i>in silico</i> .....	78
8.1 Propiedades de los aminoácidos sustituidos.....	78
8.2 Métodos de análisis de conservación.....	78
8.3 Métodos bayesianos .....	80
8.4 Redes neuronales artificiales (Neural network) .....	82
8.5 Software de apoyo a decisiones (“decision-support software”).....	83
8.6 Estudio de variantes intrónicas.....	83
9. Reclutamiento de controles sanos .....	86
10. Análisis estadístico .....	86
<b>IV. Resultados .....</b>	<b>89</b>
1. Descripción clínica de las pacientes .....	91
2. Rendimiento genético del estudio de <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> .....	94
3. Rendimiento genético de <i>RAD51C</i> y <i>RAD51D</i> .....	97
3.1 Selección de las familias .....	97
3.2 Características de los pacientes seleccionados .....	99
3.3 Variantes detectadas en <i>RAD51C</i> .....	101
3.3.1 Variantes patogénicas en <i>RAD51C</i> .....	105

3.3.2	Variantes de significado clínico desconocido (UVs) en <i>RAD51C</i> .....	107
3.3.3	Variantes codificantes no patogénicas en <i>RAD51C</i> .....	109
3.3.4	Variantes no codificantes y no patogénicas en <i>RAD51C</i> .....	110
3.4	Variantes detectadas en <i>RAD51D</i> .....	112
3.4.1	Variantes patogénicas en <i>RAD51D</i> .....	116
3.4.2	Variantes de significado clínico desconocido en <i>RAD51D</i> .....	118
3.4.3	Variantes no patogénicas en <i>RAD51D</i> .....	120
3.5	Grandes Reordenamientos génicos.....	121
4.	Estudios de correlación genotipo-fenotipo.....	122
4.1	Cáncer de mama .....	127
4.1.1	Historia familiar .....	127
4.1.2	Cáncer de mama bilateral.....	128
4.1.3	Cáncer de mama en varón.....	128
4.1.4	Características histológicas e inmunohistoquímicas .....	130
4.2	Cáncer de ovario.....	134
4.2.1	Historia Familiar.....	134
4.2.1	Cáncer de mama y ovario .....	136
4.2.2	Características histológicas.....	136
4.3	Tipos de cáncer de los antecedentes familiares de los casos índice.....	137
<b>V.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>139</b>
1.	Rendimiento diagnóstico del test BRCA.....	141
1.1	Rendimiento diagnóstico del test genético según criterios clínicos. ....	144
2.	Prevalencia mutacional de <i>RAD51C</i> y <i>RAD51D</i> .....	146
2.1	Prevalencia mutacional de <i>RAD51C</i> .....	147
2.1.1	Análisis mutacional por subgrupos.....	148
2.2	Prevalencia mutacional de <i>RAD51D</i> .....	152
2.2.1	Prevalencia mutacional por subgrupos .....	152

3. Variantes génicas detectadas.....	156
3.1 Variantes patogénicas.....	158
3.2 Variantes de significado clínico desconocido (UVs).....	159
3.3 Variantes no patogénicas.....	161
3.4 Grandes reordenamientos génicos.....	162
3.5 Resumen de variantes detectadas en población española .....	163
4. Estudios de correlación genotipo-fenotipo.....	167
5. Aplicabilidad de los resultados a la práctica clínica .....	170
<b>VI. Conclusiones .....</b>	<b>173</b>
<b>VII. Anexos.....</b>	<b>177</b>
<b>VIII. Bibliografía .....</b>	<b>193</b>

## Abreviaturas

aa	Aminoácido
AD	Dominio <i>ATPasa</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AF	Anemia de Fanconi
<i>Aling-GVGD</i>	<i>Aling-Grantham Variation Grantham Derivation</i>
ALT	<i>Telomere length maintenance</i> , mantenimiento de la longitud de los telomeros
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
bCM	Cáncer de mama bilateral
bCMO	Cáncer de mama bilateral y ovario en el mismo individuo
BER	Escisión de bases
BIC	<i>Breast International Cáncer</i>
CM	Cáncer de mama
CMO	Cáncer de mama y ovario en el mismo individuo
CM/CO	Cáncer de mama y ovario en distintos individuos de la misma familia
<i>Cút</i>	<i>Cáncer de útero</i>
CMOH	Cáncer de mama y ovario hereditario
CO	Cáncer de ovario
<i>CDK</i>	Quinasa dependiente de ciclina
DBD	Dominio de unión a ácido desoxirribonucleico
DCIS	Carcinoma ductal in situ

DDR	<i>DNA damage response</i> , respuesta al daño del ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DSB	<i>Double strand DNA breaks</i> , rotura de la doble hebra de ácido desoxirribonucleico
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico bicatenario
<i>ESE</i>	<i>Exonic splicing enhacer</i>
<i>FISH</i>	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
GWAS	<i>Genome-wide association scans</i> , estudios pangénómicos de asociación
<i>GMS</i>	<i>Grantham matrix score</i>
<i>HapMap</i>	<i>Haplotype</i>
HER	Receptores Her2/neu
<i>HGMD</i>	<i>Human Genetic Mutation Database</i>
<i>HGSV</i>	<i>Human Genome Variation Society</i>
HJ	<i>Holliday junctions</i>
HSF	<i>Human Splice Finder</i>
<i>LOVD</i>	<i>Leiden Open Variation Database</i>
MAF	Frecuencia alélica mínima
<i>MES</i>	<i>MaxEntScan</i>
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	Dominio N-Terminal
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i> , unión de extremos no homólogos
nsSNP	<i>Nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms</i>
OB	Dominios globulares
OCCR	<i>Ovarian cancer cluster región</i> , región del grupo de cáncer de ovario
OR	<i>Odds ratio</i>

PARP-1	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
pb	Pares de bases
<i>Polyphen-2</i>	<i>Polymorphism Phenotyping v2</i>
RE	Receptores estrogénicos
RH	Recombinación homóloga
RPA	Proteína de replicación A
RR	Riesgo relativo
SDSA	<i>Synthesis Dependent Strand Annealing</i> , vía de síntesis dependiente de hibridación de la hebra
SEOM	Sociedad Española de Oncología Medica
<i>SIFT</i>	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico monocatenario
SSB	<i>single strand DNA breaks</i> , rotura en la monohebra de ácido desoxirribonucleico.
<i>SSF</i>	<i>Splice Site Finder</i>
TE	Tampón estándar
UTR	<i>Untranslated región</i> , región no traducida del gen
UV	<i>Unclassified variant</i> , variante de significado clínico desconocido
vCM	Cáncer de mama en varón

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Modelo poligénico de la susceptibilidad al cáncer de mama.	7
<b>Figura 2:</b> Genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario hereditario.	9
<b>Figura 3.</b> Esquema de los dominios funcionales de <i>BRCA1</i> y sus proteínas de unión.	12
<b>Figura 4.</b> Esquema de los dominios funcionales de <i>BRCA2</i> y sus proteínas de unión.	13
<b>Figura 5:</b> Vías de reparación de las DSBs del ADN.	15
<b>Figura 6.</b> Detección de DSBs y procesos desencadenados.	17
<b>Figura 7:</b> Etapas del proceso de recombinación homóloga.	18
<b>Figura 8:</b> Formación del filamento de nucleoproteína RAD51.	19
<b>Figura 9.</b> Interacción de la ruta FA/BRCA.	23
<b>Figura 10.</b> Interacciones entre las proteínas de la recombinación homóloga (RH) y sus dominios.	25
<b>Figura 11:</b> Interacción entre varios monómeros de RAD51.	27
<b>Figura 12:</b> Esquema de los complejos BCDX2 (A) y CX3 (B y C).	27
<b>Figura 13:</b> Dominios de los parálogos de RAD51.	28
<b>Figura 14:</b> Alineamiento de las secuencias de las proteínas RAD51.	30
<b>Figura 15:</b> Interacción entre BRCA2-RAD51.	32
<b>Figura 16:</b> Esquema de las funciones de RAD51C	34
<b>Figura 17:</b> Esquema de proteína RAD51D	37
<b>Figura 18:</b> Esquema de la interacción entre el complejo RAD51D-XRCC2 y el ssDNA	37
<b>Figura 19:</b> Mecanismo de interacción entre la ruta de reparación mediada por enzima Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) y la RH.	43
<b>Figura 20. A.</b> Maxwell 16 System. <b>B.</b> Guía de utilización del Maxwell 16. <b>C</b> Esquema detalle de la extracción de ADN.	63

<b>Figura 21:</b> A. Curva de absorbancia de una muestra de ADN. B. <i>Nanodrop 1000</i> (Termo) .	63
<b>Figura 22:</b> Reacción enzimática para la purificación del producto de PCR.	67
<b>Figura 23:</b> Proceso descriptivo de MLPA ( <i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i> )	70
<b>Figura 24.</b> Simbología empleada en la configuración de los árboles genealógicos.	73
<b>Figura 25:</b> Algoritmo usado para la interpretación de las variantes detectadas en este estudio. Modificado	77
<b>Figura 26.</b> Gráfica de los grados de conservación de Align-GVGD en función de las variables GD y GV.	79
<b>Figura 27:</b> Secuencias consenso críticas presentes en el sitio de empalme 5', el punto de ramificación y el sitio de empalme 3'.	84
<b>Figura 28:</b> Distribución según el tipo de cáncer de los casos índice.	91
<b>Figura 29:</b> Tasas de casos <i>BRCA+</i> de nuestro estudio según criterios clínicos.	96
<b>Figura 30:</b> Esquema de la distribución de los casos con sospecha de SCMOH.	97
<b>Figura 31:</b> Estructura del <i>cDNA</i> de <i>RAD51C</i> .	101
<b>Figura 32:</b> Árbol familiar de la variante c.404C>T de <i>RAD51C</i> .	105
<b>Figura 33:</b> Árbol familiar de la variante c.307T>G de <i>RAD51C</i> .	108
<b>Figura 34:</b> Estructura del <i>cDNA</i> de <i>RAD51D</i>	112
<b>Figura 35:</b> Árbol familiar de la variante c.694C>T de <i>RAD51D</i> .	117
<b>Figura 36:</b> Análisis de los resultados MLPA. Perfil de picos en una plantilla Excel®.	123
<b>Figura 37:</b> Diagrama de barras que representa la frecuencia de los tipos de cáncer de los casos índice en función del resultado del estudio genético.	125

<b>Figura 38:</b> Diagrama de barras que representa la frecuencia de los tipos de cáncer de los casos índice portadores de variantes patogénicas en función del gen <i>BRCA1</i> o <i>BRCA2</i>	128
<b>Figura 39:</b> Comparación de las clasificación de las familias con los criterios utilizados por la unidad de consejo genético basados en los criterios de la SEOM de 2014 (AR, MR, SR) y los nuevos criterios propuesto por la SEOM en 2016 (Sí tiene criterios de riesgo o No los tiene).	145
<b>Figura 40:</b> Tasas de casos <i>BRCA+</i> de este estudio según los nuevos criterios clínicos de riesgo incrementado de la SEOM.	146
<b>Figura 41:</b> Diagrama de barras que expresa el rendimiento diagnóstico en función de los criterios de inclusión de alto riesgo.	147
<b>Figura 42:</b> Diagrama de barras que expresa el rendimiento diagnóstico en función de los criterios de inclusión de moderado riesgo.	147
<b>Figura 43:</b> Rendimiento diagnóstico en función de los criterios de riesgo incrementado propuestos por la SEOM a principios de 2015.	148
<b>Figura 44:</b> Alineamiento de proteínas parálogas de RAD51.	159
<b>Figura 45:</b> Diferentes grados de expresión de RAD51C en fibroblastos	160

## Lista de tablas

<b>Tabla 1:</b> Resumen de genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario hereditario.	10
<b>Tabla 2.</b> Propuesta de clasificación de las variantes y su correlación con la recomendación clínica. Modificada de Lindor y col., 2013.	50
<b>Tabla 3.</b> Criterios de selección de pacientes para el test genético basados en las recomendaciones de la SEOM.	60
<b>Tabla 4:</b> Criterios de selección para el análisis de <i>RAD51C</i> .	61
<b>Tabla 5:</b> Criterios de selección para el análisis de <i>RAD51D</i> .	61
<b>Tabla 6:</b> Cebadores del gen <i>RAD51C</i> . Tª a: Temperatura de anillamiento recomendada. Secuencia de referencia de <i>NCBI</i> NM_058216.1	64
<b>Tabla 7:</b> Cebadores del gen <i>RAD51D</i> . Tª a: Temperatura de anillamiento recomendada. Secuencia de referencia de <i>NCBI</i> NG_031858.1.	65
<b>Tabla 8.</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa <i>RAD51C</i> .	65
<b>Tabla 9.</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa <i>RAD51D</i> .	65
<b>Tabla 10:</b> Programa de amplificación <i>RAD51C</i> y <i>RAD51D</i> . *Tª a: Temperatura de hibridación específica de cada par de cebadores.	66
<b>Tabla 11:</b> Reacción de secuenciación	68
<b>Tabla 12:</b> Programa de secuenciación	68
<b>Tabla 13:</b> Etapas de la técnica de MLPA.	71
<b>Tabla 14:</b> Significado de los resultados de GV, GD y los grados de conservación de <i>Align-GVGD</i> .	79
<b>Tabla 15:</b> Características de las herramientas bioinformáticas utilizadas en la predicción de patogenicidad de las nuevas variantes identificadas.	85
<b>Tabla 16:</b> Características clínicas de los cánceres de mama y de ovario incluidos en el estudio.	93
<b>Tabla 17:</b> Variantes génicas en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i> detectadas en la población de estudio	94
<b>Tabla 18:</b> Clasificación molecular de las variantes génicas detectadas en <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	95

<b>Tabla 19:</b> Clasificación de las familias en función de los criterios clínicos.	95
<b>Tabla 20:</b> Distribución de las familias y de los casos índices seleccionados para la ampliación del estudio genético.	98
<b>Tabla 21:</b> Características clínicas de los cánceres de mama y de ovario de los casos índice seleccionados para la ampliación del estudio genético.	100
<b>Tabla 22:</b> Variantes génicas detectadas en <i>RAD51C</i> .	102
<b>Tabla 23:</b> Frecuencias de las variantes de <i>RAD51C</i> en los casos analizados.	104
<b>Tabla 24:</b> Estudio genotipo-fenotipo de la variante c.404C>T de <i>RAD51C</i> .	106
<b>Tabla 25:</b> Frecuencia alélica de c.404G>A en población seleccionada (casos índice) y en controles sanos de la Región de Murcia.	107
<b>Tabla 26:</b> Estudio genotipo-fenotipo de la variante c.307T>G de <i>RAD51C</i> .	108
<b>Tabla 27:</b> Frecuencia alélica c.307C>T en población seleccionada (casos índice) y en controles sanos de la Región de Murcia.	109
<b>Tabla 28:</b> Variantes génicas detectadas en <i>RAD51D</i> .	113
<b>Tabla 29:</b> Frecuencias de las variantes de <i>RAD51C</i> en los casos analizados	115
<b>Tabla 30:</b> Estudio genotipo-fenotipo de la variante c.694C>T de <i>RAD51D</i>	118
<b>Tabla 31:</b> Frecuencia alélica de c.694C>T en población seleccionada (casos índice) y en controles sanos de la Región de Murcia.	118
<b>Tabla 32:</b> Frecuencia alélica de c.413A>G en población seleccionada (casos índice) y en controles sanos de la Región de Murcia	119
<b>Tabla 33:</b> Distribución de las familias y de los casos índices a los que se les ha realizado estudio de grandes reordenamiento génicos.	122
<b>Tabla 34:</b> Clasificación de los casos según el resultado del test genético.	124
<b>Tabla 35:</b> Casos según el test del estudio genético y el tipo de cáncer del caso índice.	127
<b>Tabla 36:</b> Características clínicas de los pacientes con cáncer de mama según los grupos <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRCAX</i> y el grupo de pacientes seleccionados para la ampliación de estudio genético.	131

<b>Tabla 37:</b> Características histológicas de los cánceres de mama según los grupos <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRCAX</i> y el grupo de pacientes seleccionados para la ampliación de estudio genético.	133
<b>Tabla 38:</b> Características inmunohistoquímicas de los cánceres de mama según los grupos <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRCAX</i> y el grupo de pacientes seleccionados para la ampliación de estudio genético.	135
<b>Tabla 39:</b> Características clínicas de los pacientes cáncer de ovario según los grupos <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRCAX</i> y los seleccionados para la ampliación del estudio genético.	137
<b>Tabla 40:</b> Características histológicas de los cánceres de ovario según los grupos <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>BRCAX</i> y los seleccionados para la ampliación del estudio genético	139
<b>Tabla 41:</b> Frecuencias de tipos de cánceres distintos al cáncer de mama observados en las familias de los casos índices pertenecientes, según el grupo de los casos <i>BRCA1/2</i> positivos, <i>BRCAX</i> y las familias seleccionadas.	140
<b>Tabla 42.</b> Criterios de selección de pacientes para el test genético recomendados por la SEOM a partir de la guía clínica de 2015	144
<b>Tabla 43:</b> Resumen de todos los estudios realizados sobre <i>RAD51C</i> .	153
<b>Tabla 44:</b> Resumen de los estudios publicados sobre <i>RAD51D</i> .	157
<b>Tabla 45:</b> Prevalencia de las variantes según su clasificación fisiopatológica.	158
<b>Tabla 46:</b> Variantes <i>missense</i> en los genes <i>RAD51C</i> y <i>RAD51D</i> clasificadas como variantes de significado clínico desconocido.	161
<b>Tabla 47:</b> fenotipo de las familias portadoras de la variante c.404C>T.	166
<b>Tabla 48:</b> fenotipo de la familia portadora de la variante c.307T>G.	167
<b>Tabla 49:</b> fenotipo de las familias portadoras de la variante c.404C>T.	168

# **I. Introducción**



## 1. Incidencia y factores de riesgo del cáncer de mama y de ovario

### 1.1 Incidencia

El cáncer de mama es la principal causa de mortalidad por cáncer en las mujeres en todo el mundo, con una estimación de 1,68 millones de nuevos casos y más de 521.000 muertes sólo en 2012(1). En los países de la Unión Europea la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama antes de los 75 años es del 8%(2). En España, la incidencia de cáncer de mama es una de las más bajas de Europa, se calcula que se diagnostican anualmente 22.000 casos de cáncer de mama, siendo la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres con un 30% del total de los tumores diagnosticados(3). Y, por lo que se refiere a la región de Murcia, cada año 560 mujeres son diagnosticadas de un cáncer de mama invasivo y cerca de 180 mueren por esta causa, con un 4% de los fallecimientos totales en mujeres (4). Se presentaron tasas de 84/100.000 mujeres, situándose en la media de las regiones españolas que disponen de información sobre incidencia basada en registros poblacionales de cáncer (5).

La implementación de programas de detección precoz, junto con los avances diagnósticos y terapéuticos, se han traducido en un incremento de la supervivencia, que se sitúa, según datos recientes de *European Cancer Registry-5 (EUROCARE-5)* por encima del 80% a los cinco años del diagnóstico en España (6). Por ello, la mortalidad ha perdido validez a la hora de estudiar la frecuencia de aparición de estos tumores, aunque sigue siendo el único indicador disponible para estudiar la variabilidad geográfica dentro y fuera de nuestro país. A nivel internacional, las grandes diferencias observadas hace medio siglo en la mortalidad por este tumor tienden a desaparecer, proporcionando un patrón mucho más homogéneo.

A pesar de que el cáncer de ovario no representa más allá del 20-25% de los tumores ginecológicos, ocasiona prácticamente la mitad de las muertes por cáncer genital, lo cual es debido al frecuente diagnóstico tardío (más del 50% en estadios FIGO III y IV). En EEUU, según la "*American Cancer Society*", la probabilidad de desarrollar un cáncer de ovario a lo largo de la vida se estima alrededor del 1,5%. En España, anualmente se diagnostican 3.000 casos y produce la muerte de 1.750 mujeres, siendo la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres españolas. La supervivencia del cáncer de ovario en España, se sitúa en torno al 43% a los 5 años tras el diagnóstico (7).

## 1.2 Factores de riesgo

La etiología del cáncer de mama es desconocida, y sólo un 30% de los tumores de mama pueden ser atribuidos a factores de riesgo conocidos. La investigación sobre las causas del cáncer de mama ha progresado hasta el punto de que se puede describir con cierta certeza el perfil de las mujeres con alto riesgo de la enfermedad. También se está ganando comprensión de la biología subyacente, incluyendo las influencias hormonales y los cambios moleculares que contribuyen a su desarrollo. Estas diversas líneas de investigación científica están convergiendo, y sugieren que el cáncer de mama se produce como consecuencia de combinaciones de factores y eventos, tales como la herencia de la susceptibilidad genética, la exposición a agentes carcinógenos, los niveles de algunas hormonas endógenas, el propio sistema inmunológico y cambios en la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN) en las células de la mama que pueden ocurrir fortuitamente. La mayoría de los factores de riesgo de cáncer de mama reconocidos se refieren a uno o más de estos factores y a situaciones individuales. Se sabe que los factores ambientales y de estilo de vida deben contribuir al riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, la mayoría de las exposiciones, eventos ambientales y estilo de vida asociados con el riesgo de cáncer de mama no se establecen necesariamente como causas de la enfermedad, sino que sirven como marcadores estratificados del riesgo. La probabilidad de desarrollar cáncer de mama aumenta con la edad, y el riesgo acumulado a la edad de 70 años se cuantifica en 12% (8). El sexo femenino y los niveles hormonales son un factor importante, una alta exposición a estrógenos, ya sea por menarquia precoz, menopausia tardía o primer embarazo a una edad tardía, incrementan el riesgo (9) (10). Es interesante mencionar, que las mujeres nulíparas presentan un incremento de riesgo del 30% (11). El cáncer de mama es más frecuente en poblaciones occidentales y en subpoblaciones de mayor nivel socioeconómico dentro del país, lo que sugiere que existen factores de riesgo relacionados con el estilo de vida. En este apartado se relacionarían con un incremento de factores de riesgo como el consumo de grasa, de tabaco, de alcohol y la obesidad (12). Existen factores ambientales como la exposición a radiaciones, a campos electromagnéticos o a productos químicos.

La historia personal también ejerce una influencia sobre el riesgo. En mujeres jóvenes diagnosticadas de cáncer de mama, se ha demostrado un incremento en el riesgo de desarrollar un segundo cáncer de mama primario de 4,5 veces y de 3 veces de desarrollar

cualquier otro tipo de cáncer (12). En cuanto a la historia familiar, se estima que una mujer con un familiar de primer grado diagnosticado de cáncer de mama, tiene el doble de riesgo y este riesgo se incrementa a medida que aumenta el número de familiares afectados(13). Si bien, esta asociación podría surgir a causa del entorno compartido y estilo de vida, también puede ser debida a la susceptibilidad genética heredada.

## **2. Cáncer de mama y ovario hereditario**

Como se ha comentado, el cáncer es una enfermedad compleja y heterogénea y en la mayoría de los casos de etiología desconocida. Aunque se han descrito numerosos factores de riesgo, podemos afirmar que la historia familiar es uno de los más importantes. Se ha visto que aumenta el riesgo en individuos con un mayor número de familiares afectados con cáncer de mama y/o ovario (CM/CO) y la disminución de la edad a la que fueron diagnosticados. El riesgo de cáncer de mama (CM) se duplica en parientes de primer grado de mujeres con cáncer de mama, mientras que el de cáncer de ovario (CO) se triplica con parientes afectas de esta enfermedad comparadas con mujeres sin antecedentes familiares (14). De todos los casos, entre un 5 y un 10% presentan un componente hereditario que es atribuible a mutaciones heredadas de forma autosómica dominante en varios genes de susceptibilidad. Un 15% adicional de mujeres con cáncer de mama presenta algún antecedente familiar, aunque sin un patrón de herencia claro. Teniendo en cuenta la alta frecuencia de esta neoplasia, el cáncer de mama y ovario hereditario afecta a un gran número de nuestra población (15).

La agregación familiar de casos de cáncer de mama se conoce desde la antigüedad, pero la primera descripción científica la realizó el médico francés Paul Broca en el año 1866. Con el diagnóstico de cáncer de mama de su mujer, Broca identificó cinco generaciones afectadas. La evidencia del fallecimiento de 10 de 24 mujeres por cáncer de mama le hizo sugerir la presencia de algún factor hereditario de predisposición al cáncer en la familia (16).

La gran mayoría de los cánceres de mama son de tipo esporádico. Ciertas células de la mama acumulan aberraciones genéticas que desembocan en la aparición del tumor. Los tumores esporádicos parece que surgen debido a errores combinados de múltiples genes de baja penetrancia junto con la influencia de los factores ambientales y otros factores de riesgo (17,18).

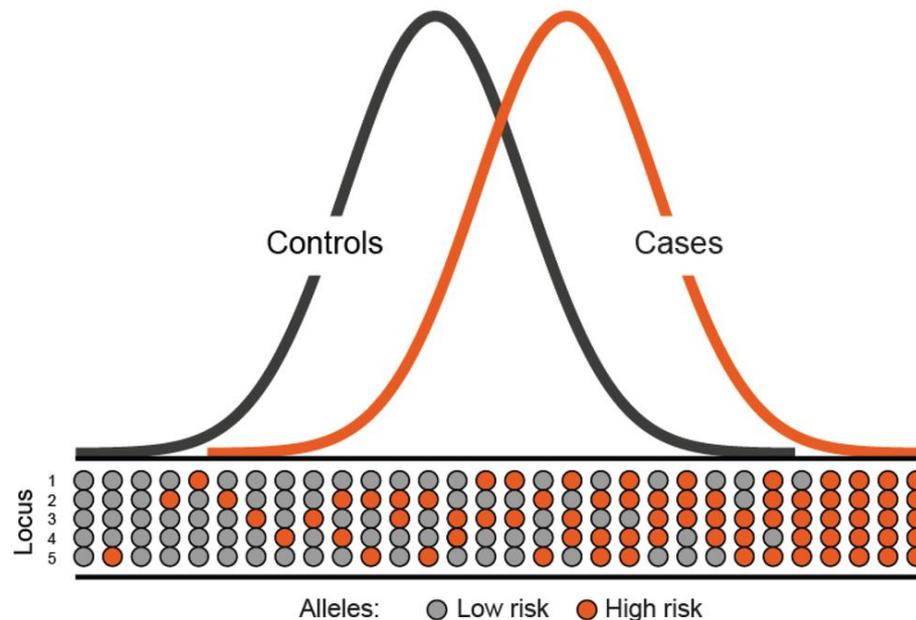
Dentro de los objetivos principales en la lucha contra el cáncer se encuentra la identificación de los genes implicados en el desarrollo tumoral. Las proteínas codificadas por estos genes normalmente regulan procesos tales como proliferación, diferenciación y muerte celular. También se relacionan con tumorigénesis las que intervienen en la reparación del ADN.

### 2.1 Genética del cáncer de mama y ovario hereditario.

Existen diferentes síndromes de predisposición hereditaria para CM/CO. El más frecuente es el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH). Tiene una incidencia estimada de 1/500 – 1/2500 y está relacionado con alteraciones germinales en los genes *BRCA1* (*Breast cancer 1*) y *BRCA2* (*Breast cancer 2*) (19). Otros síndromes de cancer hereditario muestran un incremento de riesgo para el CM en los que podemos incluir síndrome de Li-Fraumeni (SLF) y el síndrome de Cowden (SC), los cuales están relacionados con mutaciones en los genes *TP53* (*tumor protein 53*) y *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*), respectivamente (20,21). Similar a *BRCA1* y *BRCA2*, *TP53* y *PTEN*, codifican proteínas que participan en procesos relacionados con la reparación del ADN y la regulación del ciclo celular, son por tanto, genes supresores de tumores. El cáncer gástrico difuso hereditario (CGDH) es otro síndrome hereditario que está asociado al desarrollo de cáncer de mama lobulillar. Este síndrome es fruto de mutaciones en el gen *CDH1* (cadherin1, tipo 1, E-cadherina epitelial), que codifica una proteína supresora de tumores (22).

Actualmente, en más de dos tercios de las familias de alto riesgo estudiadas no se detecta ninguna mutación en los genes de susceptibilidad al CM/CO identificados hasta el momento, aceptando que este porcentaje varía según la población analizada, los criterios utilizados para seleccionar a los pacientes y las técnicas de análisis genético utilizadas. Este hecho ha llevado a la propuesta de un modelo poligénico que explicaría la mayoría del exceso de riesgo familiar observado por la combinación de variantes de riesgo que se acumularían en estas familias y serían responsables de la susceptibilidad al CM (23–25). Un riesgo elevado se puede adquirir por herencia de una única variante con una alta penetrancia, de unas pocas variantes de moderada penetrancia o de un conjunto amplio de variantes con penetrancia baja. De esta manera, a medida que disminuye la penetrancia de cada variante se requeriría un mayor número de variantes de riesgo presentes en un mismo individuo para lograr el mismo nivel de riesgo (**Figura 1**). Por lo

tanto, variantes de alta penetrancia estarán presentes en familias que se ajustan de una manera óptima a un patrón de herencia mendeliana de un único factor, mientras que, según disminuye la penetrancia de las variantes, los patrones de herencia se alejarán de la herencia mendeliana.



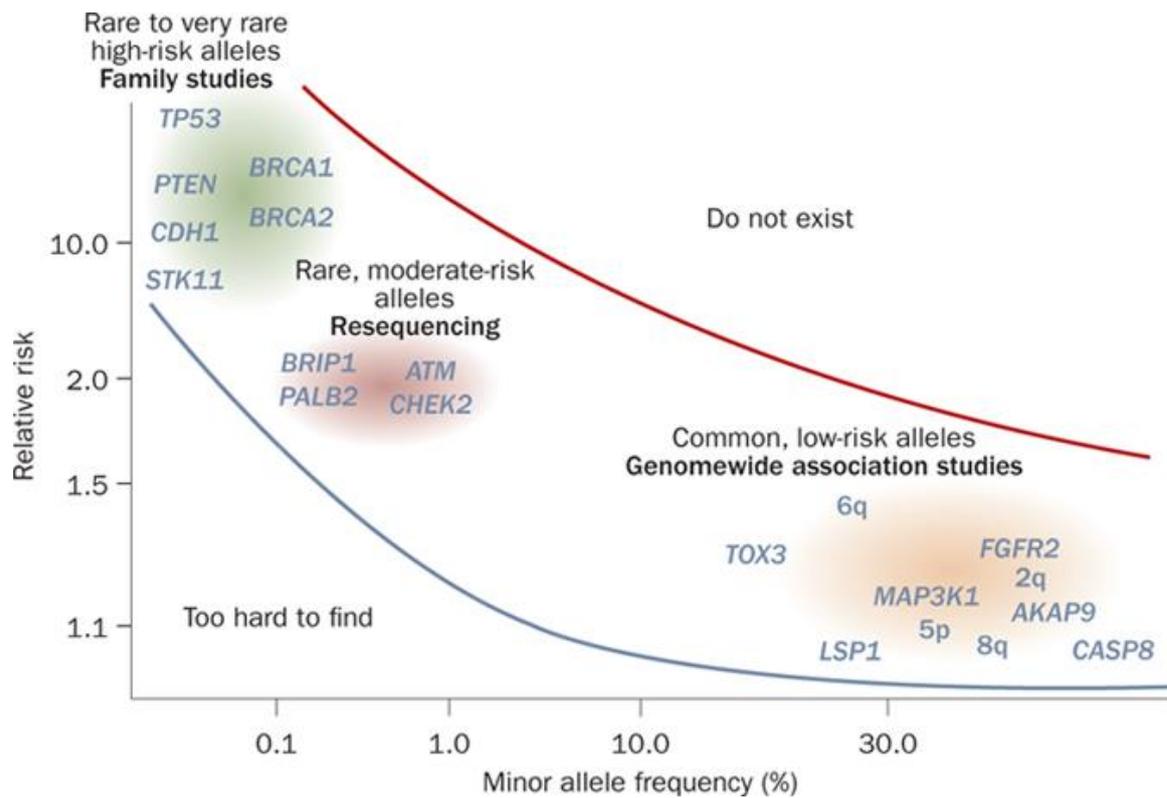
**Figura 1:** Modelo poligénico de la susceptibilidad al cáncer de mama. La distribución de los alelos de riesgo en ambos casos y controles sigue una distribución normal. Sin embargo, los casos tienen un cambio hacia un mayor número de alelos de alto riesgo. Tomado de Whiffin y col. 2014 (26).

Por tanto, la predisposición al CM/CO posee una alta heterogeneidad genética. Hasta la fecha, se han clasificado estos genes de susceptibilidad en base al aumento de riesgo que suponen a los portadores y a la prevalencia que tienen en la población (**Figura 2 y Tabla 1**):

- a) **Genes de alta penetrancia:** están asociados con un riesgo relativo (RR) de CM mayor que 5. Dentro de este grupo, solo alrededor del 25% de los pacientes con cáncer pueden atribuir a mutaciones en la línea germinal en dos genes de alta susceptibilidad para CM: *BRCA1* (27) y *BRCA2* (28). Las mutaciones en los genes de *BRCA1* y *BRCA2* confieren un riesgo acumulado promedio del 65 o 45% para CM, respectivamente y del 39 o 11% para el cáncer de ovario en edad de 70 años respectivamente (29). Además, en este grupo destacaríamos mutaciones en otros genes, que predisponen a síndromes hereditarios de susceptibilidad al cáncer que incluyen en sus características un incremento de susceptibilidad al CM. Entre ellos

incluiríamos *TP53* en el síndrome de Li-Fraumeni, *PTEN* en síndrome de Cowden, *STK11* (*Serine/Threonine kinase 11*) en síndrome de Peutz-Jeghers o *CDH1* en síndrome de cáncer gástrico hereditario. Se estima que causa alrededor del 5% de los CM/CO hereditarios (22,30–32).

- b) **Genes de moderada penetrancia:** Confieren un RR de cáncer de entre 1.5 y 5. Han sido descritos genes implicados en la anemia de Fanconi (FA) en aproximadamente el 5% de los CM hereditarios, dada su segregación incompleta en familiares afectados y su “odds ratio” (OR) menor de 3; Dentro de este grupo, encontramos genes como *BRIP1* (*BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1*) , *PALB2* (*partner and localizer of BRCA2*) , *RAD51C* (*RAD51 paralog C*) y *XRCC2* (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2*) (33–36). Además, presentan penetrancia similar otros genes no involucrados en la AF, como *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*) , *CHEK2* (*checkpoint kinase 29*) , *NBS1* (*Nijmegen breakage syndrome 1 protein*), *RAD50* (*RAD50 double strand break repair protein*), *RAD51D* (*RAD51 paralog D*) y *RAD51B* (*RAD51 paralog B*) (37–41).
- c) **Genes de baja penetrancia:** Se presentan como RR en torno al 1.5. Se han identificado mayoritariamente mediante estudios patogénicos de asociación (*GWAS: genome-wide association scans*) de cientos de miles de *single nucleotide polymorphism* (SNP) en extensas series de miles de casos de CM y controles. Recientes se han identificado 41 genes de baja susceptibilidad que podrían explicar alrededor del 14% del riesgo de CM/CO hereditario (42).



**Figura 2:** Genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario hereditario. En la zona verde destacan los genes de alto riesgo con muy baja frecuencia en la población general. En la zona roja se encuentran los genes de moderado riesgo. Y en el extremo inferior, en la zona naranja, estarían los genes de baja penetrancia que combinados entre sí darían explicación al exceso de riesgo familiar, constituyendo el modelo poligénico. Modificada de Foulkes y col. 2008 (43).

La epigenética también puede ser un componente a tener en cuenta en familias sin evidencia de mutaciones germinales. Se ha observado la disminución de expresión de genes de susceptibilidad en cánceres esporádicos, lo que puede asociarse a una alteración epigenética o a una hipermetilación de *BRCA1/2* (44). La pérdida de función de *BRCA1* debida a una hipermetilación somática explica alrededor del 10% de los CM esporádicos. En un subgrupo de cáncer de mama esporádico se demostró la hipermetilación de *BRCA2*.

	Baja frecuencia y alto riesgo	Baja frecuencia y moderado riesgo	Elevada frecuencia y bajo riesgo
<b>Genes</b>	<i>BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, STK11, CDH1</i>	<i>ATM, CHEK2, PALB2, RAD51C, RAD51D, BRIP1, ¿NSB1, RAD50, MRE11?</i>	<i>CASP8, FGFR2, 8q24, 21q21...(&gt;20 loci)</i>
<b>Frecuencia Poblacional</b>	Rara (< 0.1%)	Rara (< 0.1%)	Común (>10%)
<b>Riesgo Relativo</b>	>10	2-4	<1.25 en heterocigosis <1.65 en homocigosis
<b>Riesgo atribuible poblacional</b>	Pequeño	Pequeño	Elevado
<b>Estrategia de identificación</b>	Análisis de ligamiento y clonación posicional	Estudio de genes candidatos	Estudio casos-controles Estudios pangenómicos
<b>Porcentaje total del CMOH explicado</b>	20-25%	2-5%	14%

Tabla 1: Resumen de genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario hereditario.

### 3. Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH)

Se trata del síndrome de predisposición hereditaria al cáncer más frecuente. Se caracteriza por un patrón de herencia dominante, múltiples casos de cáncer de mama y/o ovario sincrónicos o metacrónicos. Los tumores aparecen a una edad más temprana que aquellos esporádicos, observándose a menudo casos de cáncer de mama premenopausicos (19). Para la identificación de familias con el SCMOH, grupos como el *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*(45), *UK Cancer Family Study Group (UKCFSG)*(46), *National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE)*(47) o la Sección de Cáncer Hereditario de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (48) han establecido una serie de criterios clínicos.

Criterios diagnósticos SCMOH según SEOM (debe cumplirse al menos uno de los criterios):

- Un caso de cáncer de mama menor o igual a 40 años.
- Diagnóstico de cáncer de mama y ovario en el mismo individuo.
- Dos o más casos de cáncer de mama, uno de los cuales en menor de 50 años o bilateral.
- Un caso de cáncer de mama a edad menor o igual a 50 años o bilateral y un caso de cáncer de ovario en familiares de primer o segundo grado.
- Tres casos de cáncer de mama y ovario (al menos un caso de ovario) en familiares de primer o segundo grado.
- Dos casos de cáncer de ovario en familiares de primer o segundo grado.
- Un caso de cáncer de mama en varón, y otro caso de cáncer de mama (varón o mujer) u ovario en un familiar de primer o segundo grado.

No existe una definición de este síndrome que haya sido aceptada de forma generalizada y distintas sociedades científicas utilizan criterios ligeramente diferentes. La edad temprana y el grado de agregación familiar se definen de manera diferente según cada guía y algunas guías incluyen otros tipos de cáncer como el pancreático o criterios anatómo-patológicos. En una proporción de familias con SCMOH la enfermedad sigue un patrón de herencia claramente mendeliano, suele ser el caso de familias grandes y multigeneracionales. Sin embargo se puede dar el caso en determinadas familias, en las que el número de individuos sea pequeño, que haya una elevada proporción de varones o tengan una estructura limitada dando lugar a una distorsión en la percepción del patrón de herencia mendeliana (49).

### **3.1 Principales genes de susceptibilidad al SCMOH: *BRCA1* y *BRCA2***

Por ahora, *BRCA1* y *BRCA2* son los genes de alta penetrancia asociados a una mayor proporción de casos de CM y CO hereditarios. Se identificaron en los años 90 mediante análisis de ligamiento y clonación posicional donde se identificó a *BRCA1* en familias con casos de CM y CO y *BRCA2* especialmente en familias con casos de CM masculino (27,28). La frecuencia poblacional de mutaciones se ha estimado en 1/400-1/800, aunque puede variar en las poblaciones debido a los diversos efectos fundadores (50). El riesgo de CM en portadoras es superior a 10 veces el de las mujeres de la población general. Aproximadamente un 3 a 5% de los casos de cáncer de mama (CM) y un 10% de los casos

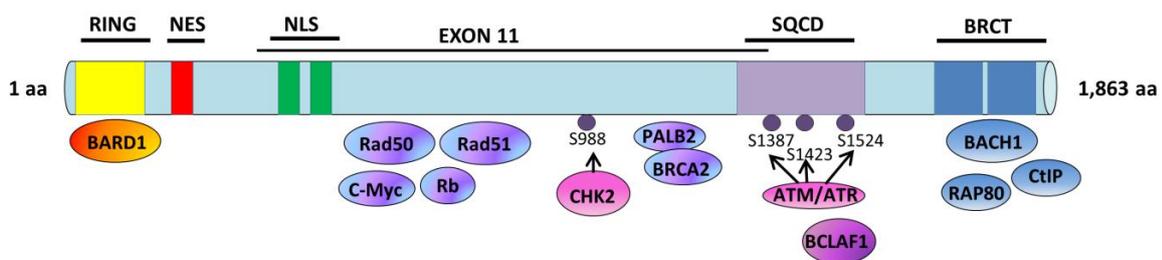
de cáncer de ovario (CO) se asocian a mutaciones germinales en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, responsables del síndrome del cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH)(51,52).

La expresión de *BRCA1* y *BRCA2* en condiciones normales está relacionada con el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales mamarias, especialmente durante la gestación y la lactancia. Aunque estos genes se expresan de forma ubicua, parece que su actividad repercute especialmente en las células de la mama (53,54).

Estos genes actúan en la reparación de ADN (en su forma germinal evitan la transformación neoplásica), y siguen un modelo de herencia autosómico dominante de alta penetrancia. Los portadores de mutaciones en alguno de estos genes tienen un riesgo alto de desarrollar cáncer de mama y/u ovario a lo largo de su vida. Por tanto, la detección de estas mutaciones permite la localización de individuos asintomáticos portadores que tienen un riesgo alto de desarrollar un cáncer en el transcurso de su vida.

### 3.1.1 Estructura de *BRCA1* y *BRCA2*

*BRCA1* (BReast CAncer gene 1) (NIM\*113705), se localiza en la región cromosómica 17q21, a lo largo de 100 kb (27). Contiene 22 exones codificantes que generan diversos transcritos pero la mayor atención se ha centrado en la proteína de mayor tamaño de 1863 aminoácidos (55) (Figura 3).

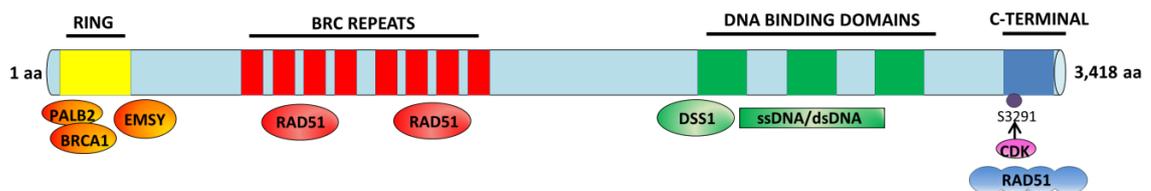


**Figura 3.** Esquema de los dominios funcionales de *BRCA1* y sus proteínas de unión. Tomado de Orr y col. (56).

La proteína *BRCA1* contiene en su región amino terminal el dominio *RING* responsable de la unión a la proteína *BARD1* (*BRCA1 associated RING domain protein 1*)(57,58). La región central es diana de la fosforilación mediada por la proteína *ATM* e interactúa con proteínas como *RB*, *CMYC*, *RAD50*, *RAD51* y *PALB2* (59). En el final de esta región, se localiza el dominio *coiled-coil* de *BRCA1* que interactúa con *PALB2*, fundamental en la conexión entre *BRCA1* y *BRCA2*. Este complejo está específicamente involucrado en la

reparación de roturas de la doble hebra de ADN (DSBs) mediante el proceso de recombinación homóloga (RH) (60,61). En el extremo C-terminal, se encuentra el dominio BRCT que se une a proteínas fosforiladas y está presente en muchas proteínas que responden a daños del ADN (58,62).

BRCA2 (Breast CAncer gene 2) (NIM\*600185), se localiza en la región cromosómica 13q12, a lo largo de 70 kb. Está compuesto por 27 exones, de los cuales 26 codifican una proteína de 3418 aminoácidos (28). (Figura 4)



**Figura 4.** Esquema de los dominios funcionales de *BRCA2* y sus proteínas de unión. Tomado de Orr y col (56).

En la estructura de la proteína BRCA2 debemos destacar en su extremo N-terminal el dominio *RING* de unión con PALB2 (63), las ocho repeticiones *BRC* de unión a RAD51 (64) y el dominio de unión a ADN (*DBD*) se une al ADN monocatenario (ssDNA) y al bicatenario (dsDNA) (65).

### 3.1.2 Funciones de las proteínas BRCA1 y BRCA2

Estas proteínas están involucradas en la respuesta al daño celular. La respuesta al daño en el ADN implica la activación de mecanismos de control del ciclo celular que evitan la progresión del ciclo mientras se activan las rutas de reparación del daño. Dentro de los distintos daños que puede sufrir el ADN, en concreto, BRCA1 y BRCA2 se encargan, principalmente, de la reparación de las roturas de doble cadena (DSBs) mediante el proceso de recombinación homóloga (RH). BRCA1 posee un papel central en la regulación de la recombinación homóloga pero está implicado en el control del ciclo celular y de otros procesos celulares, sin embargo, BRCA2 parece estar implicado principalmente y de una manera muy directa, en la recombinación homóloga. Directamente relacionada con la RH se encuentra la ruta de anemia de Fanconi. La ruta de anemia de Fanconi se activa en respuesta a daño al ADN que induce la formación de enlaces covalentes intercatenarios (ICL).

### 3.1.3 Frecuencia mutacional de *BRCA1* y *BRCA2*

En población general se estima una prevalencia de portadores de 0,11-0,32% para *BRCA1* y 0,12-0,69% para *BRCA2*, por lo que el análisis poblacional no tendría un aceptable rendimiento diagnóstico, siendo necesaria la selección de individuos y familias.

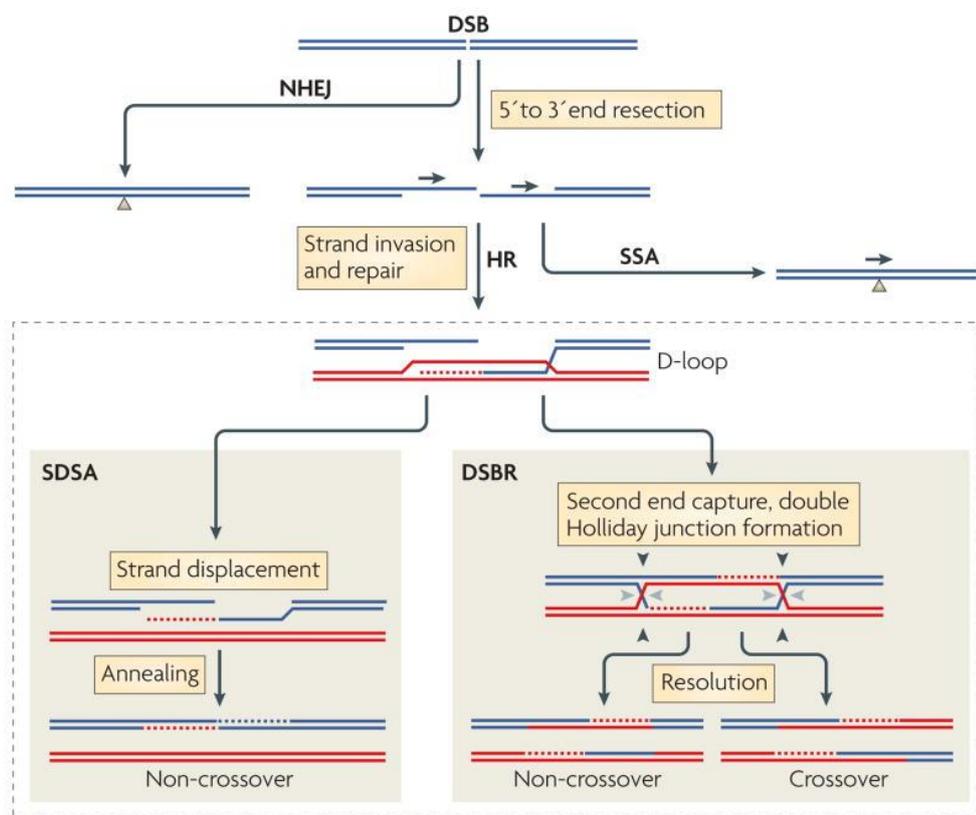
En España, se identifican mutaciones patogénicas en un 20-30% de las familias. Los porcentajes más altos corresponden a series de familias con 3 o más casos de CM y CO. La proporción disminuye en familias sólo con casos de CM (10-15%) o en mujeres jóvenes sin antecedentes (5%). La presencia de CO es un indicador de probabilidad de mutación heredada, mayormente en *BRCA1*, incluso en familias con pocas mujeres afectadas. Más de la mitad de familias con CM masculino presentan mutaciones en *BRCA2* (66–68). Un estudio español realizado a partir de 495 casos esporádicos de CM específicamente seleccionados por no cumplir criterios de alto riesgo para CMOH estimó una prevalencia mutacional de *BRCA1/2* de sólo el 1.05% (69). Globalmente todos estos resultados nos indican la importancia de la historia familiar a la hora de determinar una mutación en *BRCA1/2*. Sin embargo, se debe destacar que en casos de CO en familias anglosajonas no seleccionadas por su historia familiar, se detectaron hasta un 15% de mutaciones germinales (70).

Existen poblaciones concretas en las que la prevalencia de mutaciones es más alta como en la población Judía Askenazi. Esta prevalencia se explica normalmente por la presencia de mutaciones específicas que sufren un efecto “fundador” y provienen de un antecesor común.

## 4. La Recombinación homóloga (RH)

El genoma eucariota se encuentra bajo un estrés continuado, y uno de sus resultados es la generación constante de daño en el ADN (71). Una de las lesiones del ADN más tóxicas para una célula es la DSB (rotura en la doble hebra de ADN) (72). Esto es debido a que afecta a ambas hebras de la doble hélice, por lo tanto no hay cadena complementaria intacta disponible como molde para la reparación. Una sola DSB sin reparar puede dar lugar a la inestabilidad genética y la tumorigénesis (73). Las DSBs pueden surgir a partir de fuentes endógenas, como la replicación y las endonucleasas celulares, y también a partir de fuentes exógenas, como la radiación ionizante (RI) y muchos regímenes de

quimioterapia (74). En consecuencia, las células han desarrollado una serie de vías de reparación de las DSBs para tratar estas lesiones. Las dos principales vías de reparación son la recombinación homóloga (RH) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ) (**Figura 5**). RH utiliza secuencias de ADN homólogas como molde para la reparación, mientras que NHEJ liga los extremos del ADN expuestos a las DSBs sin el uso de una homología significativa. RH predomina en células en fase S, cuando una cromátida complementaria está disponible como molde para su reparación, y es un proceso de alta fidelidad (75). NHEJ se piensa que es activo durante todo el ciclo celular, y es más propenso a errores en comparación con RH.



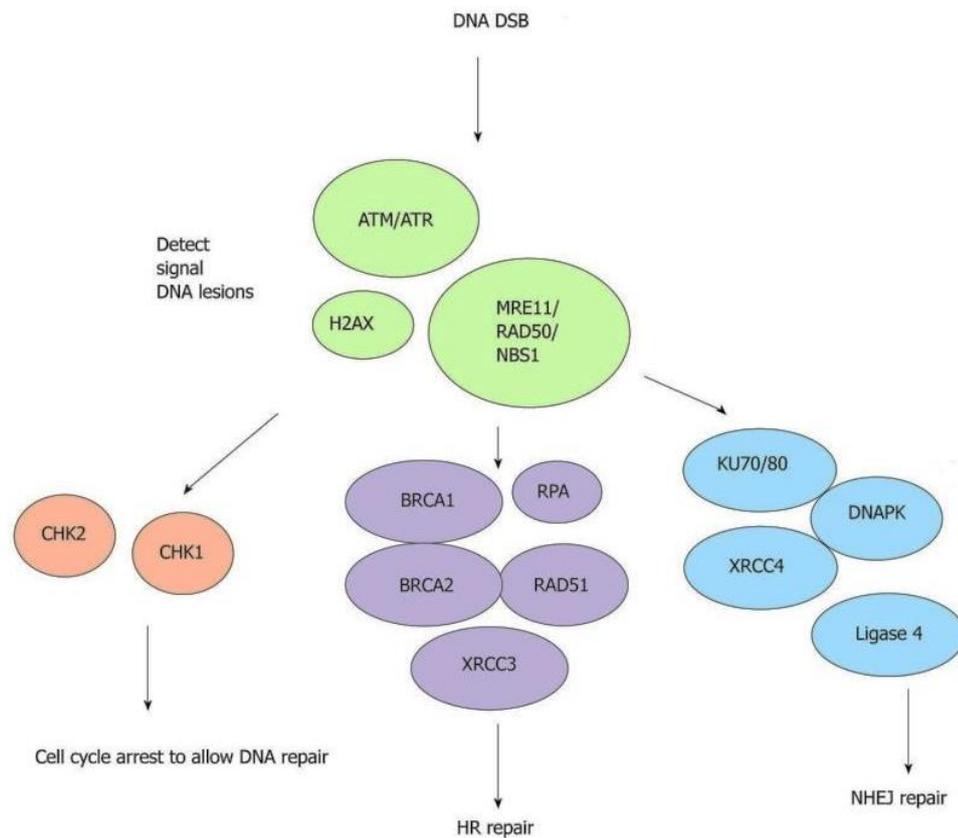
**Figura 5:** Vías de reparación de las DSBs del ADN. La RH se inicia con la resección de un extremo creando un extremo 3' de hebra sencilla que puede invadir otra hebra molde para iniciar la reparación. Las vías alternativas de RH (vía de síntesis dependiente de hibridación de hebra o SDSA y reparación de la DSD o DSBR) se genera a partir de la formación del bucle-D. NHEJ implica la unión de extremos no homólogos de ADN. El SSA ocurre cuando la resección del extremo se produce en secuencias repetidas. Tomado de Moynahan y col. 2010 (76).

Anormalidades en la vía de RH causan inestabilidad genómica y reordenamientos cromosómicos y han sido asociadas con enfermedades genéticas incluyendo Ataxia-telangiectasia, síndrome de Nijmegen break, Anemia de Fanconi o síndrome de Bloom. La inestabilidad genómica derivada de la alteración de RH también ha sido relacionada con el proceso de carcinogénesis (77).

El mecanismo de RH se define por la búsqueda de homología seguida por el apareamiento, el intercambio y la regeneración entre cadenas homólogas. A parte de su papel en la reparación de las DSBs, la RH también desempeña un papel importante durante la replicación, concretamente en la reparación de algunos errores que pudieran surgir cuando en la horquilla de replicación se encuentra algún daño que no ha sido reparado o en la diversidad genética y en la segregación cromosómica durante la meiosis (78). Merece la pena señalar que la HR está involucrada en el mantenimiento telomérico en aquellas células que no poseen telomerasas y elongan los telómeros por un mecanismo alternativo (ALT: *alternative lengthening of telomeres*) (79).

La reparación mediante RH implica una variedad de proteínas, que funcionan de manera coordinada y jerárquicamente para la detección y reparación de los DSBs. Las proteínas que detectan los daños en el ADN son denominadas “sensores” y desencadenan la activación de las proteínas “transductoras” que tiene es su mayoría actividad quinasa y amplifican la señales del daño mediante una cascada de reacciones. Finalmente se activan los “efectores” para ejecutar la reparación.

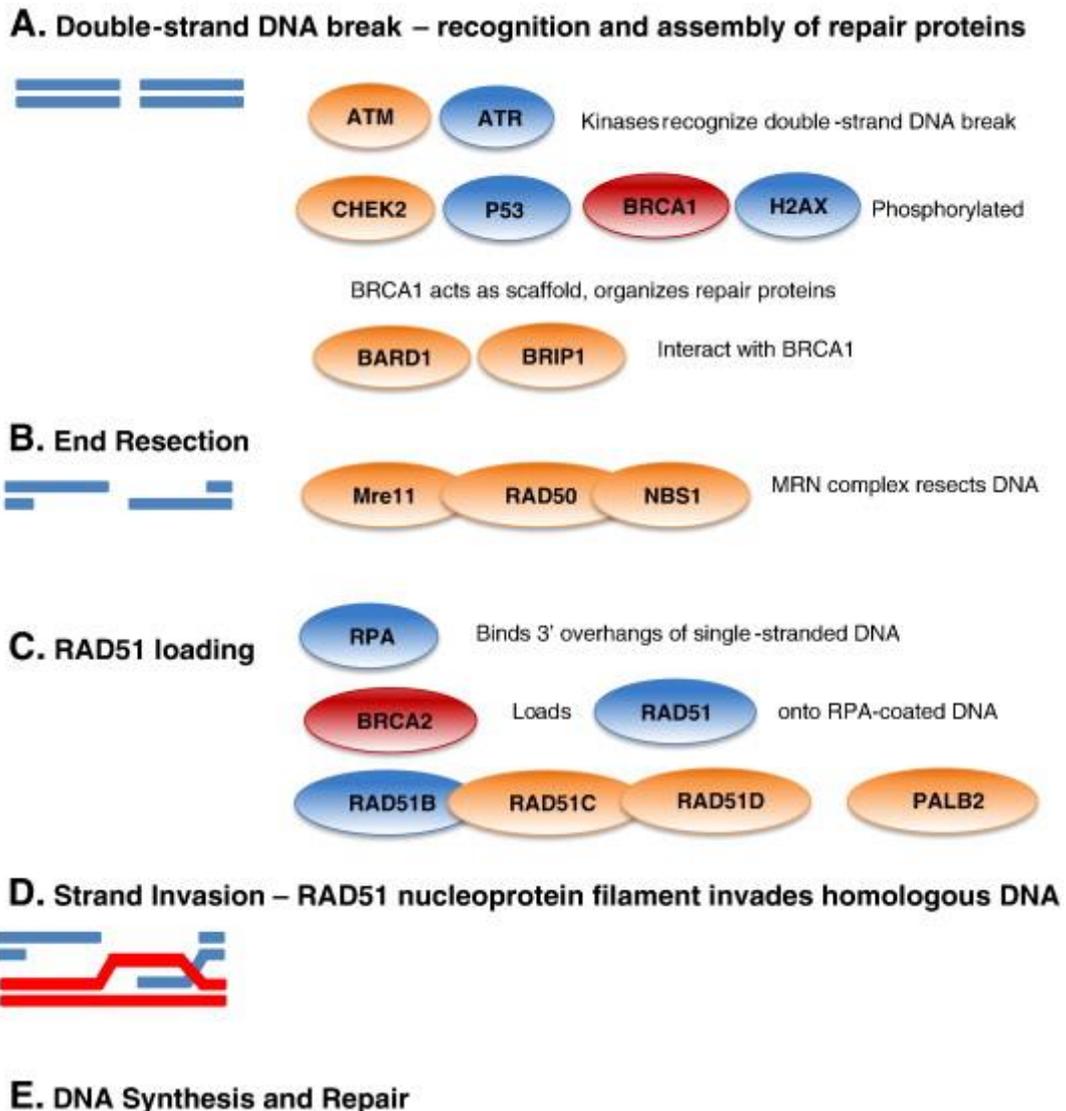
Todas estas proteínas forman una red compleja para la coordinación de distintos procesos en la reparación del ADN (**Figura 6**). Las principales quinasas de detección de lesiones de daño del ADN son ATM /ATR (*Ataxia Telangiectasia Mutated*)(*ATM related*) que inician una cascada de fosforilación. Otras dos quinasas, CHK1 y CHK2 (*checkpoint kinase 1 y 2*), activan los puestos de control y funcionan como transductores para transmitir y amplificar el daño del ADN. Se desencadenan diferentes procesos como la activación de la regulación transcripcional para inducir la expresión de genes específicos para facilitar la reparación del ADN eficiente, modificaciones de las histonas y cambios epigenéticos que afectan a la estructura de la cromatina para permitir el acceso a las lesiones del ADN. En resumen, la reparación RH implica una red compleja de proteínas, y el número de proteínas que se sabe están involucradas en esta red está en constante expansión.



**Figura 6.** Detección de DSBs y procesos desencadenados. Tomado de Peng y col., 2011 (80).

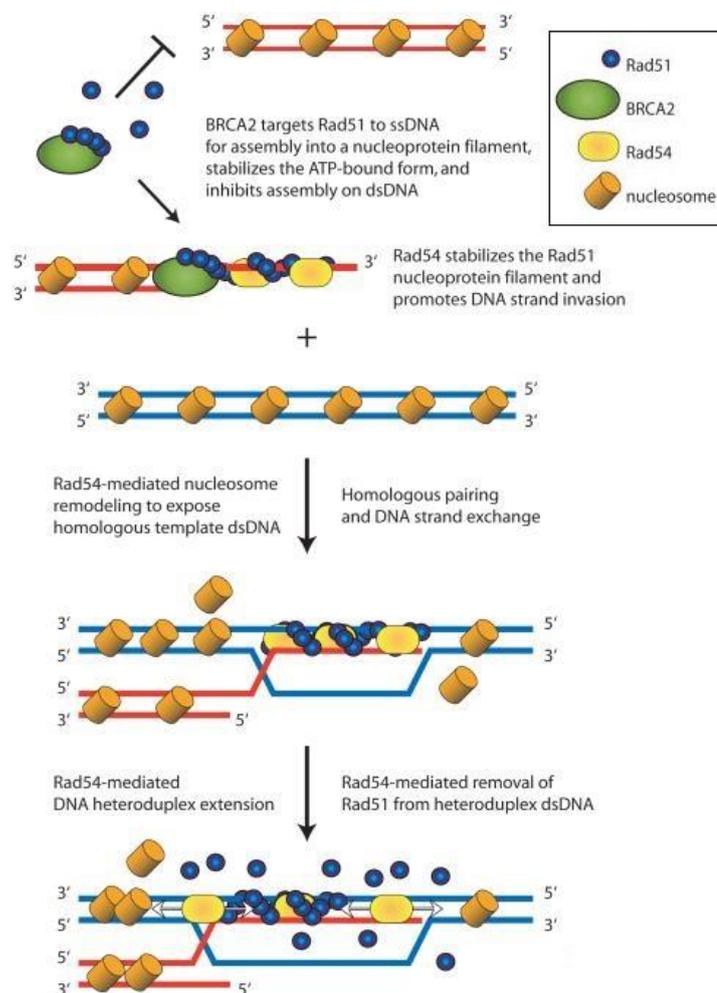
A continuación revisaremos con más detalle las etapas del proceso de RH (**Figura 7**) (81–83); tras la detección de DSBs, en la etapa inicial, se desencadena una cascada iniciada por las proteínas quinasas ATM y ATR que fosforilan sustratos requeridos para llevar a cabo el proceso como son las proteínas CHEK2, P53, BRCA1 y H2AX. BRCA1, con la colaboración de BARD1 y BRIP1, actúa de mediador para reclutar y organizar las proteínas en los sitios de reparación. El complejo MRN, formado por MRE11, RAD50 y NBS1, degrada los extremos del DSB gracias a su actividad exonucleasa 5´-3´y deja los extremos 3´en forma de ADN monocatenario (ssDNA). A continuación, la proteína de replicación A (RPA) y RAD52 se unen al extremo 3´de la hebra sencilla de ADN para proteger el ADN y prevenir la formación de estructuras secundarias. Es BRCA2, mediante la unión con PALB2, quien recluta a RAD51. Aunque es la proteína RAD51 quien lleva a cabo el paso bioquímico definitivo del mecanismo de RH, es BRCA2 quien permite la traslocación nuclear de RAD51 y favorece su unión al ssDNA para formar una estructura llamada nucleofilamento. Una vez formado el nucleofilamento proteico de monómeros de RAD51, se produce el intercambio de las hebras homólogas durante los cuales el ssDNA invade el ADN dúplex homólogo, desplazando la hebra idéntica del dúplex y la formación de un desplazamiento

bucle. Por último se inicia la síntesis de la nueva cadena de ADN por una polimerasa. La estructura es resuelta por enzimas helicasas y ligasas específicas. De esta manera la RH repara el ADN con fidelidad usando la cromátida hermana como un molde para la síntesis de la nueva cadena de ADN intacta.



**Figura 7:** Etapas del proceso de recombinación homóloga; **A.** Reconocimiento del daño en la doble hebra por parte de ATM y ATR, que fosforilan a proteínas como CHEK2, P53, BRCA1 y H2AX. BRCA1, asistido por BARD1 y BRIP1, actúa como un andamio para organizar el montaje de otras proteínas de reparación. Resección **B.** Resección del ADN por el complejo MRN, formado por MRE11, RAD50 y NBS1 **C.** RPA se une al extremo 3 'de ADN de cadena sencilla mientras BRCA2 es reclutado por PALB2 y atrae a RAD51B, RAD51C, RAD51D. **D.** El filamento de nucleoproteína RAD51 invade el ADN homólogo. **E.** Síntesis y reparación del ADN. La cadena de ADN homóloga proporciona una plantilla de alta fidelidad y la síntesis de ADN libre de errores y reparación (84).

A continuación se muestra específicamente la formación del filamento de nucleoproteína (Figura 8). Este filamento consiste en un arreglo helicoidal de monómeros de RAD51 alrededor de la cadena sencilla en el que también pueden estar incluidos algunos de sus parálogos (85,86). Mediante las repeticiones BRC de BRCA2 se dirigen los monómeros de RAD51 hacia la monohebra de ADN (ssDNA) evitando la unión de RAD51 a el ADN bicatenario (dsDNA). Se sabe que RAD54 interactúa con RAD51 enlazando y estabilizando el núcleofilamento. RAD54 también remodela el ADN para permitir el emparejamiento con el dsDNA homólogo y estimula el intercambio de ADN; Se piensa que incluso podría promover la extensión heterodúplex (migración de rama), así como el desmontaje del filamento RAD51-dsDNA después de la recombinación gracias a su actividad de translocación ATP-dependiente (87).



**Figura 8:** Formación del filamento de nucleoproteína RAD51. BRCA2: verde, RAD51: azul, RAD54: amarillo. Adaptación de Forget y col. 2010 (87).

Como se ha mencionado anteriormente, son muchas las proteínas que interaccionan y cooperan con BRCA1 y BRCA2 en la reparación del ADN y por tanto en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Es por eso, que se teoriza sobre si los genes codificantes de esas proteínas pueden ser una alternativa como candidatos en el aumento de susceptibilidad genética al CMOH. En un principio, se relacionaron varios genes con las susceptibilidad con el CM, tales como CHEK2, ATM o PALB2 (34,88,89). Pero actualmente, son muchos los estudios que relacionan genes como BRIP1, RAD51C o RAD51D con la susceptibilidad al CO principalmente (33,35,40).

Particularmente, tumores con un defecto en el sistema de RH que no sea en las proteínas BRCA pueden agruparse en tumores *BRCAness*. Estos tumores presentan un fenotipo específico con unas características similares a los tumores relacionados con alteraciones en BRCA, incluyendo la sensibilidad a los agentes alquilantes de ADN (ej. Platinos), histología principalmente de tipología serosa, intervalos libres de enfermedad y curvas de supervivencia similares. Incluso, los pacientes *BRCAness* tienen un incremento de riesgo similar a los portadores de mutaciones en BRCA.

#### **4.1 Genes de la RH relacionados con el SCMOH**

Dado el porcentaje de casos de SCMOH en los que la causa genética de susceptibilidad es desconocida, en los últimos 10 años se han hecho importantes esfuerzos tratando de identificar nuevos genes de susceptibilidad implicados en el síndrome. Para ello se han realizado estudios de asociación basados en genes candidatos. Estos estudios consisten en comparar la frecuencia de variantes génicas en series de cáncer de mama/ovario hereditario (>1.000 casos) con la frecuencia en individuos sanos (controles) en genes que por su función pueden estar relacionados potencialmente con la enfermedad. En el caso de CMOH se han analizado muchos de los genes que interaccionan directa o indirectamente con *BRCA1* y *BRCA2* (39). Aunque muchos de estos estudios han sugerido posibles asociaciones que más tarde no se han reproducido en series posteriores, han permitido la identificación de susceptibilidad al cáncer asociada a diversos genes como: *CHEK2*, *ATM*, o los genes implicados en la anemia de Fanconi como *BRIP1* y *PALB2* o *RAD51C* o *RAD51D*. El riesgo relativo que confieren estas variantes está entre 2 y 4, explican un porcentaje mínimo de las familias y en ocasiones su prevalencia es muy variable entre poblaciones.

Merece especial mención *RAD51C* porque existen evidencias de que podría tratarse de un gen de alto riesgo. Si esto es así, *RAD51C* sería el tercer gen identificado de alta/moderada penetrancia para cáncer de mama, tras 15 años de búsqueda desde el descubrimiento de *BRCA1* y *BRCA2*. En el estudio original, publicado en 2010, se describen mutaciones monoalélicas dominantes en el gen en 6 de 480 (1,3%) casos índice de familias alemanas afectadas con cáncer de mama y ovario (35). Los amplios estudios de segregación, pérdida de heterocigosidad y funcionalidad de las variantes encontradas, aportan fuertes evidencias de que estas se comportarían de forma muy similar a las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*. Es necesario replicar estos descubrimientos y es posible que existan diferencias entre poblaciones pero ya se han encontrado mutaciones en *RAD51C* en familias con cáncer de mama y ovario en algunas poblaciones como la española (90,91). Esto hace pensar que el análisis de *RAD51C* sí pueda ser transferido en poco tiempo a la práctica como parte de las pruebas genéticas recomendadas en los casos de cáncer de mama hereditario.

#### **4.1.1 ATM**

El gen *ATM* (Ataxia-telangiectasia mutated) [NIM\*607585], se localiza en el cromosoma 11q22-23, contiene 65 exones codificantes y codifica para una proteína de 3056 aminoácidos con actividad serina-treonina-quinasa. La proteína ATM es un quinasa que juega un papel fundamental en la reparación del ADN en el proceso de RH, y en la progresión del ciclo celular. ATM fosforila a *BRCA1* en respuesta a la radiación ionizante.

Mutaciones homocigóticas en el gen *ATM* causan el síndrome de Ataxia-Telangiectasia (AT), caracterizado por ataxia cerebral, inmunodeficiencias y aumento de riesgo para ciertos tumores, incluido el CM. La incidencia de AT es de 1/40.000 a 1/100.000 nacimientos, sin embargo, portadores heterocigotos son relativamente comunes con una frecuencia estimada de 0.5-1% en la población general (92). En un amplio estudio, realizado por Thompson y col., se ha estimado en portadores heterocigóticos de variantes en *ATM* un aumento de riesgo de un 2% para el CM, aumentando a un 5% en menores de 50 años (37).

#### 4.1.2 **CHEK2 (Cell Cycle Checkpoint Kinase 2)**

El gen *CHEK2* (CHEckpoint Kinasa 2) [MIM +604373] se localiza en 22q12.1 y consta de 14 exones. La proteína es una quinasa de control del punto G2 del ciclo celular y tiene una función importante en la reparación del ADN. Se activa a través de la fosforilación por ATM tras lesiones en el ADN y a su vez fosforila otras proteínas como BRCA1, p53 o CDC25C, relacionadas con el mantenimiento del genoma y el control de la entrada en mitosis o la apoptosis.

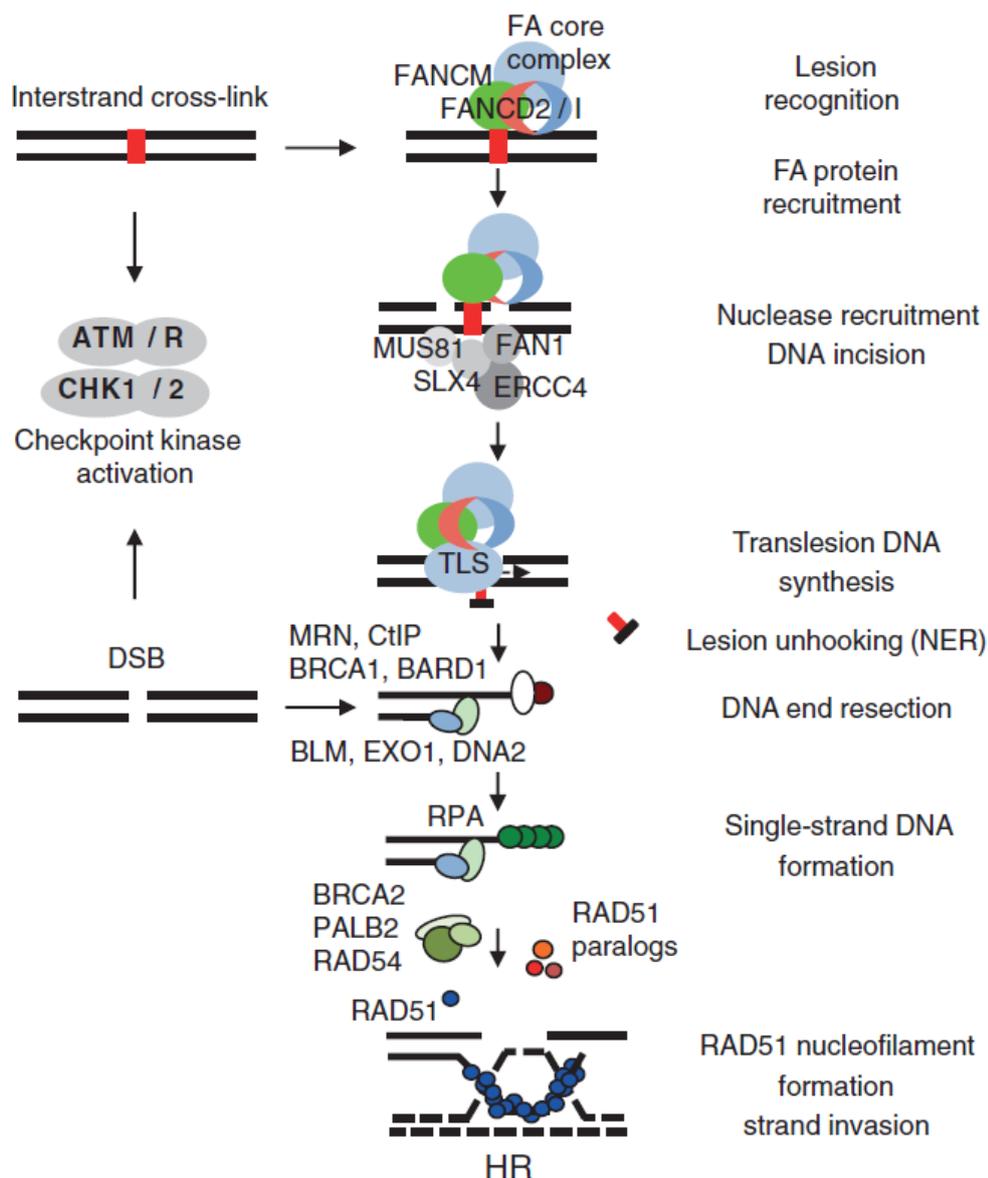
Mediante una combinación de análisis de ligamiento y selección del gen candidato, en el año 2002 se describió por primera vez la asociación de una variante en el gen *CHEK2* (1100delC) con un incremento moderado de riesgo en casos de cáncer de mama hereditario no asociados a mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (38).

Uno de los motivos que hace difícil la traducción de estos resultados a la clínica es que la variante 1100delC no segrega completamente con la enfermedad y no es suficiente para explicar el patrón de herencia familiar. Otra limitación ya comentada es la diferencia en prevalencia que esta variante presenta entre poblaciones. La variante es mucho más frecuente en países del norte de Europa (>1%), donde se han podido definir mucho mejor los riesgos asociados a la misma e incluso se ha llegado a recomendar la realización del test genético en los casos no asociados a mutaciones en *BRCA1/2* (88). Mientras, en países del sur de Europa, donde la prevalencia de la misma es prácticamente nula (<0,1%), no se recomienda el estudio (93). El papel de *CHEK2* en el cáncer de ovario también ha sido estudiado por varios grupos. Concretamente una variante missense de *CHEK2* (I157T) ha sido asociada a tumoraciones benignas y tumores de ovario de bajo grado pero no con cancer de ovario de alto grado (94).

#### 4.1.3 **Genes de la Anemia de Fanconi; *PALB2*, *BRIP1* y *RAD51C*.**

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad genética recesiva que se caracteriza por inestabilidad cromosómica, malformaciones congénitas, alta incidencia de neoplasias hematológicas y no hematológicas e hipersensibilidad a agentes que causan enlaces cruzados con ADN (*cross-linking agents*), como al mitomicina C (95). AF es genéticamente heterogénea, producida por mutaciones bi-alélicas en al menos 14 genes diferentes. La mayoría de estos genes codifican subunidades del complejo "FA core complex", cuya principal función es la monoubiquitinización de FANCD2 (*Fanconi anemia*

complementación grupo D2) y FANCI (Fanconi anemia complementación grupo I). Estas proteínas FA, y proteínas de la RH, entre otras BRCA1 y BRCA2, cooperan en la misma ruta de respuesta y reparación del daño en la doble hebra de ADN producido por entrecruzamiento (*internal cross-linking*) (ICLs) (96). En la **Figura 9** se esquematiza como interaccionan las proteínas codificadas por los distintos genes AF y su relación con *BRCA1*, *BRCA2* y otros genes de la RH.



**Figura 9.** Interacción de la ruta FA/BRCA. Cooperación entre las proteínas AF y proteínas de la RH en una ruta común para la reparación de los enlaces cruzados en la doble hebra de ADN. (Tomado de Konstantinopoulos y col., 2015)(97).

La conexión entre cáncer de mama hereditario y AF se confirmó cuando en 2002 se identificaron mutaciones bi-alélicas deletéreas en el gen *BRCA2* en tres pacientes con AF del subtipo D1, en los que no se había identificado previamente ninguna alteración genética (98). Una vez identificado que *BRCA2* era también *FANCD1*, y que las mutaciones en heterocigosis conferían riesgo para cáncer de mama, y cuando aparecían en ambos alelos originaban AF, todos los genes implicados en AF empezaron a ser analizados como posibles genes de susceptibilidad en cáncer de mama. A pesar de desconocer el modo preciso en que las proteínas FA actúan, el descubrimiento de *BRCA2* como uno de los genes FA, refuerza el papel de la ruta FA en el procesamiento de las dobles roturas mediante RH. Además de *BRCA2/FANCD1*, se han identificado mutaciones asociadas con un incremento de riesgo para cáncer de mama y/o ovario en los genes *BRIP1/FANCD1*, *PALB2/FANCD1* y *RAD51C/FANCD1* (33,99,100).

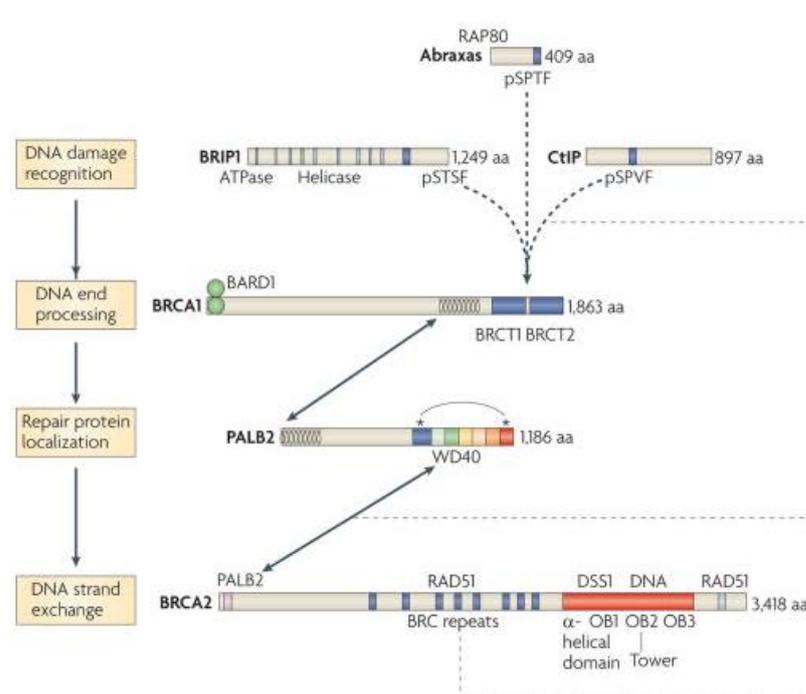
Una característica de las células AF es su hipersensibilidad a los agentes de entrecruzamiento (*cross-linking agents*) del ADN. Tres de los trece grupos de complementación de la AF son el resultado de mutaciones en *BRCA2*, *PALB2* y *BACH1*. Se ha propuesto que la reparación de los enlaces cruzados entre cadenas de ADN (ICLs) puede requerir la RH, y por tanto, el papel de *BRCA2* en la AF puede ser debido a su contribución a esta RH. Es tentador atribuir un papel de *BRCA1* en AF debido a la participación de múltiples proteínas que interactúan con *BRCA1* en la prevención de la enfermedad de AF, pero hasta el momento no existe ninguna evidencia convincente que explique tal función.

#### 4.1.3.1 PALB2

*PALB2* (*Partner and Localizer of BRCA2*) [NIM\*610355] ubicado en el cromosoma 16p12, contiene 13 exones y se traduce a una proteína que interacciona directamente tanto con *BRCA1* como con *BRCA2*, proporcionando un enlace físico entre las dos proteínas (61). El dominio *coiled-coil* N-terminal de *PALB2* interactúa con el dominio *coiled-coil* de *BRCA1*, y el extremo C-terminal de *PALB2* interactúa con el extremo N-terminal de *BRCA2* (61)(62)(63)(61)(60)(59)(58)(57) (101).

La interacción de *PALB2* con *BRCA2* ha demostrado ser esencial para proporcionar *RAD51* hacia la proteína de replicación A (RPA) unida a la ssDNA (63). Por otra parte, la interacción de *BRCA1-PALB2* es un requisito previo para el reclutamiento de *BRCA2* y

*RAD51* hacia el sitio dañado del ADN y por tanto para la RH (60,61). Toda esta evidencia apoya una jerarquía de reclutamiento a los sitios dañados de ADN: *BRCA1* no depende de ninguna de estas proteínas para la formación de focos nucleares, pero *PALB2* muestra cierta dependencia de *BRCA1*. En cambio, la formación de focos nucleares de *BRCA2* requiere de *PALB2*, mientras que la formación de focos de *RAD51* requiere de las tres proteínas (**Figura 10**).



**Figura 10.** Interacciones entre las proteínas de la recombinación homóloga (RH) y sus dominios. Tomado de Moynahan y col., 2010 (76).

Además, se ha demostrado que la fosforilación de *BRCA1* en S988 por *CHEK2* promueve la formación del complejo *BRCA1-BRCA2-PALB2*, lo que puede explicar por qué la mutación en este sitio elimina la RH (102). Actualmente, se desconoce si hay otros reguladores del complejo *BRCA1-PALB2-BRCA2*.

Dada su relación específica con *BRCA2*, se barajó la posibilidad de que las mutaciones en *PALB2* pudieran predisponer a un grupo similar de neoplasias. En concreto, mutaciones en *PALB2* se han relacionado con la predisposición al cáncer de mama en el varón y al cáncer de páncreas (34,103). Mediante la secuenciación de *PALB2* en 923 individuos con CM familiar sin mutación detectada en *BRCA1* ni en *BRCA2* y en un millar de controles, se identificaron mutaciones solamente en 10 individuos con antecedentes familiares (1,1%). Una de ellas se encontró entre las únicas 15 familias con CM masculino estudiadas (6,7%),

sugiriendo un mayor riesgo de este tipo de cáncer asociado a *PALB2*, de forma similar a la asociación con *BRCA2*. El análisis de cosegregación de las mutaciones con la enfermedad en controles y familias llevó a la estimación de un riesgo relativo de 2,3 asociado a *PALB2*, mayor para mujeres menores de 50 años (3,0) y menor (1,9) por encima de esta edad. La fracción de riesgo atribuible a *PALB2* en la población general se estimó en 0,23% (34).

Otro estudio de *PALB2* en 113 familias finlandesas con CM y CO identificó una mutación truncante en 3 de ellas. La frecuencia de dicha mutación en población finlandesa fue de 0,9% en casos de CM no seleccionados por su historia familiar y de 0,2% en controles, consistente con un aumento del riesgo para los portadores de 2 a 4 veces (104).

En población española la frecuencia mutacional es similar a otros estudios publicados. En una serie de 132 familias BRCAx con historia familiar de cáncer de páncreas se hallaron 2 variantes patogénicas, considerando una prevalencia mutacional de 1.5% (103).

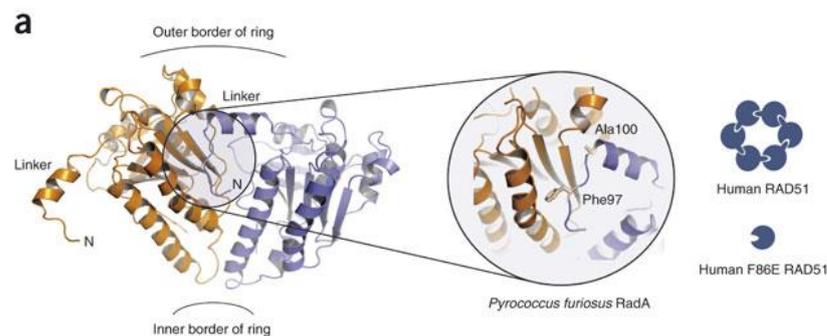
#### 4.1.3.2 BRIP1

*BRIP1* (*BRCA1-interacting protein 1*) [NIM \*605882], antes denominada *BACH1* (*BRCA1-associated C-terminal helicase 1*), es una ATPasa dependiente de ADN y una ADN helicasa que interacciona con los dominios BRCT de *BRCA1* y presenta funciones de reparación del ADN dependientes de *BRCA1* y de control del ciclo celular durante la transición de la fase G2 a M (105). Las mutaciones en la región BRCT de *BRCA1* alteran la asociación con *BRIP1* y conducen a una reparación ineficiente del ADN.

Se han identificado mutaciones en el gen de *BRIP1/FANCI* en mujeres jóvenes con CM, sugiriendo que una función anormal de *BRIP1* puede contribuir a la aparición del tumor. En un estudio de *BRIP1* en más de mil mujeres con CM y antecedentes familiares (sin mutación detectada en *BRCA1* ni en *BRCA2*) y en dos mil controles sanos se identificaron nueve mutaciones en mujeres afectas y dos entre los controles. Mediante el análisis de segregación en los familiares de ambos grupos, se estimó en 2,0 el riesgo relativo de CM asociado a dichas mutaciones (ascendía a 3,5 en portadoras de menos de 50 años). Según la frecuencia poblacional y el riesgo relativo, la fracción estimada de riesgo de CM de las mutaciones en *BRIP1* fue 0,2% (33).

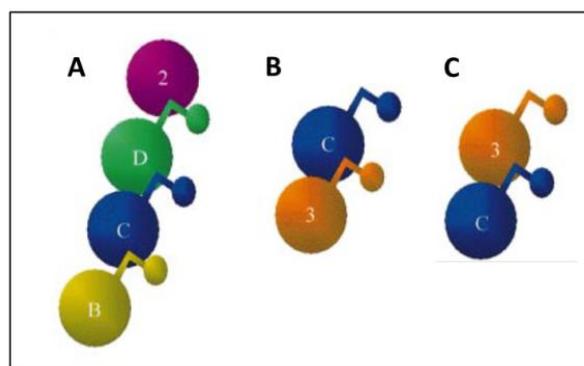
## 5. RAD51 y parálogos de RAD51

La proteína RAD51, homologa a RecA en *Escherichia coli*, es una recombinasa que tiene un papel central en la RH. Polimeriza alrededor de la ssDNA formando un nucleofilamento proteico cuya función es la búsqueda de homología y la invasión de la hebra homóloga de ADN. En la **figura 11** se observa la interacción entre el extremo N-terminal de un monómero de RAD51 con el extremo C-terminal de otro para polimerizar en forma de anillo o filamentos (106).



**Figura 11:** Interacción entre varios monómeros de RAD51. Tomado de Davies y Pellegrini, 2007 (106).

Los parálogos de RAD51 son una familia de proteínas que tiene un importante papel en el mantenimiento de la estabilidad genómica mediante la reparación del ADN. Se han identificado 5 parálogos RAD51 en vertebrados, que interaccionan unos con otros para constituir dos complejos, RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2 (BCDX2 complex) y RAD51C-XRCC3 (CX3 complex). **Figura 12.**

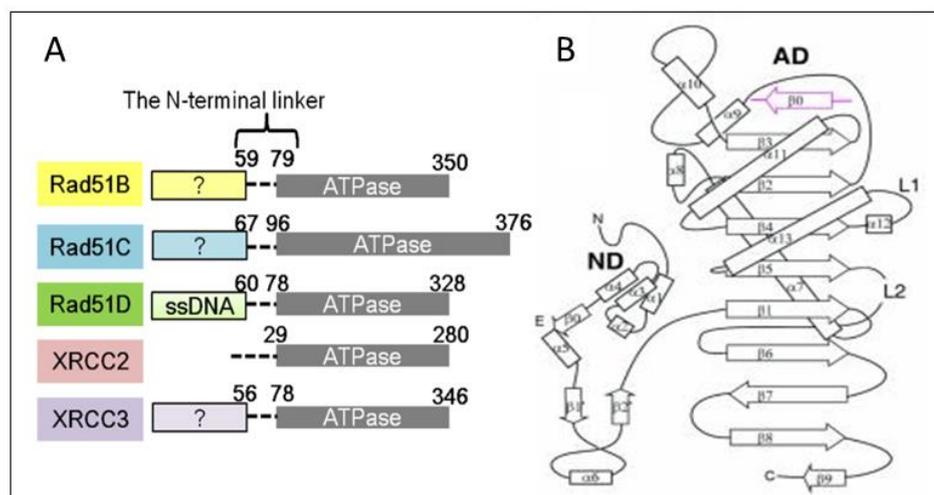


**Figura 12:** Esquema de los complejos BCDX2 (A) y CX3 (B y C). La esfera grande representa el dominio C-terminal y la esfera pequeña el dominio N-terminal de cada proteína (Excepto de XRCC2). La *Linker región* está representada como un codo que une las esferas. Modificado de Miller y col., 2004 (107).

Como se ha mencionado anteriormente, las principales enzimas involucradas en la RH son las recombinasas de la familia RAD51. Tienen actividad ATPasa dependiente de ADN y poseen habilidades de promover el apareamiento entre cadenas homólogas de ADN. La actividad recombinasa de RAD51 está bien definida en el mecanismo de RH, sin embargo, el mecanismo por el cual los parálogos de RAD51 intervienen en la RH no está del todo definido. Se postula, que el complejo BCDX2 actúa promoviendo el reclutamiento y la estabilización de RAD51 alrededor de las dsDNA y sin embargo, el complejo CX3 tendría un papel posterior a la actuación de RAD51 mediante su cooperación en la resolución de los entrecruzamiento *Holliday junctions* (HJ).

Las proteínas parálogas de la familia RAD51 tienen una organización molecular muy similar, conservada a través de la escala evolutiva. Comparten entre el 20-30% de la secuencia de aminoácidos entre sí, esta secuencia conservada se encuentran predominantemente en el dominio de ATPasa (107). Homólogos de este dominio han sido encontrados en la  $F_0F_1$ -ATP sintasa (proteína encargada de la síntesis de ATP) y en diversas helicasas, lo que sugiere que divergen de un antecesor común (108).

Estudios de modelización de homología de proteínas han predicho que los parálogos de RAD51, con el XRCC2 como excepción, mantienen una estructura cuaternaria organizada en dos dominios: dominio N-terminal (ND) y Dominio ATPasa (AD)(109). **Figura 13.**



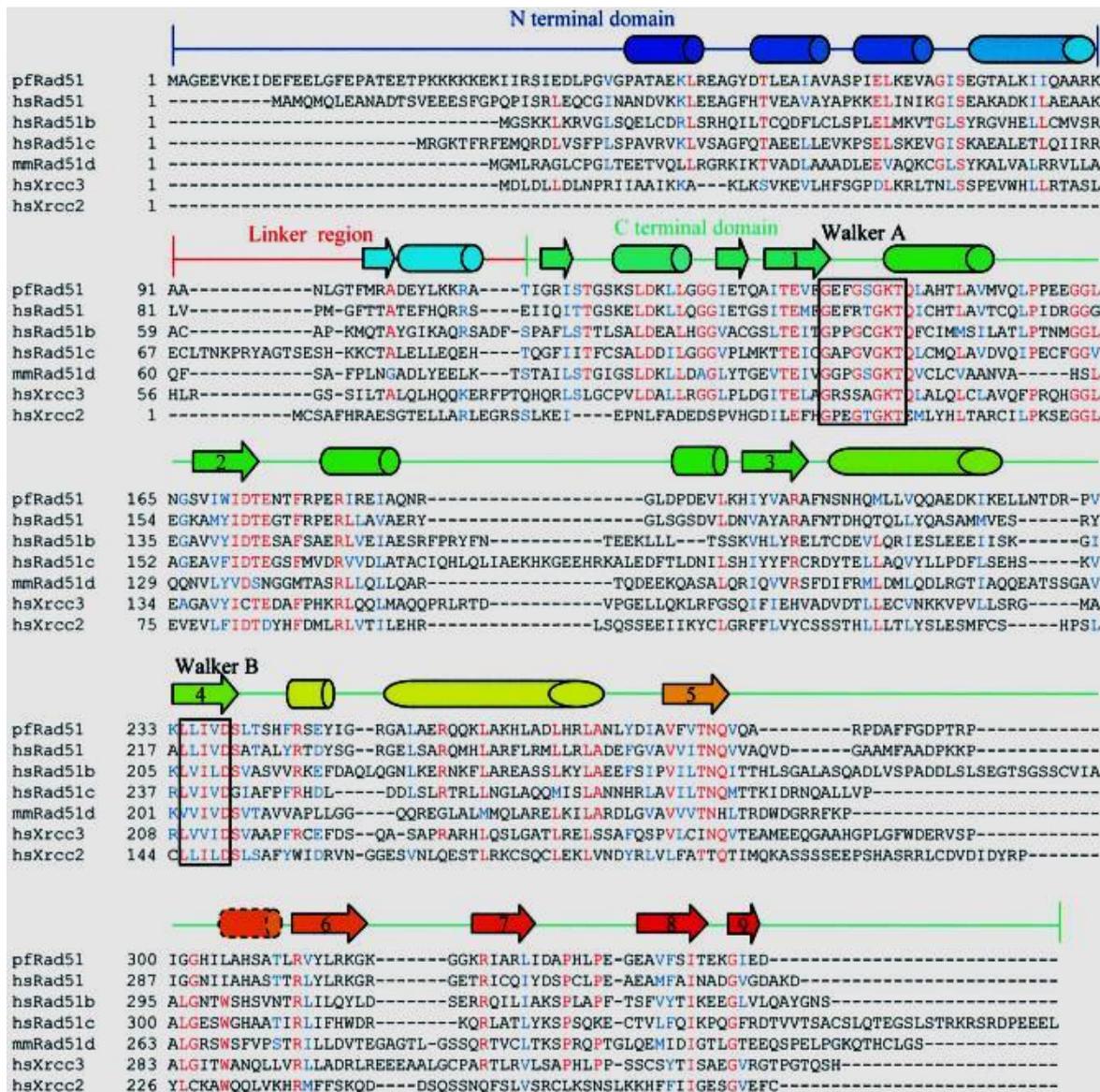
**Figura 13:** Dominios de los parálogos de RAD51. A: Alineamiento de proteínas de la familia recombinasas en función de sus dominios. B: Estructura de una recombinasa en la que se muestra el dominio N-terminal (ND) y el dominios ATPasa (AD) conectados por la *linker región*. Modificado de Shin y col. 2003 (109).

El dominio N-terminal de las proteínas RAD51 está formado por cuatro hélices  $\alpha$ , formando las dos últimas,  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ , el *motivo HhH*. Este motivo es una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos, presente tanto en eucariotas como en procariontes, cuya función es la unión a secuencias no específicas de ADN. Al final de este dominio, hay una secuencia de aminoácidos denominada *linker region*. Esta zona forma un ángulo cercano a los  $90^\circ$  y sirve de conexión entre ambos dominios.

El dominio ATPasa está constituido por múltiples laminas- $\beta$ , dispuestas de manera paralela ( $\beta_3, \beta_2, \beta_4, \beta_5, \beta_1, \beta_6$ ) y antiparalela ( $\beta_7, \beta_8, \beta_9$ ) rodeadas por hélices- $\alpha$  y conectadas por *loops*. Dentro de este dominio se han identificado los siguientes motivos funcionales (109):

- Los motivos *Walker A* y *Walker B*, que son sitios de unión a ATP y ADN, respectivamente. El motivo *Walker A* tiene una estructura conformada por un dominio de hélice- $\alpha$ -loop-hebra- $\beta$  y el motivo *Walker B* es una lámina- $\beta$ .
- Los denominados *Loop-1* y *Loop-2* son motivos de unión a ADN.
- Motivo  *$\beta$ -Zip* que junto a motivo *loop-1* forman una región de polimerización.

A continuación podemos ver en la **Figura 14** el alineamiento de las secuencias de aas de varios de los parálogos de RAD51 humanos y su alta homología entre ellos y sus homólogos en otras especies como RAD51 en *P. furiosus* y RAD51D en ratón. La estructura secundaria de la proteína *PfRAD51* se representa sobre los aas con cilindros para las  $\alpha$ -hélice y flechas para las lámina- $\beta$ . Los motivos *Walker A* y *Walker B* están enmarcados en un rectángulo.



**Figura 14:** Alineamiento de las secuencias de las proteínas RAD51. *P. furiosus* (pf), humano (hs), ratón (mm). La estructura secundaria; Cilindro:  $\alpha$ -hélice, flechas: lámina- $\beta$ . Rectángulo: Motivos Walker A y Walker B. Tomado de Miller y col., 2004 (107).

**5.1 Interacción RAD51-BRCA2**

La interacción entre BRCA2 y la recombinasa RAD51 es fundamental para la reparación del ADN mediante RH. El modelo de esta interacción se basa en dos dominios altamente conservados de la proteína BRCA2 (Figura 4, página 13). El dominio DSS1 de unión a ADN (DBD) localizado en el extremo C-terminal de BRCA2 comprende cuatro dominios globulares dispuestos de una manera lineal (OB) y un quinto dominio (TD) que sobresale a partir de OB2 extendiéndose como una “tower” para unirse al dsDNA.

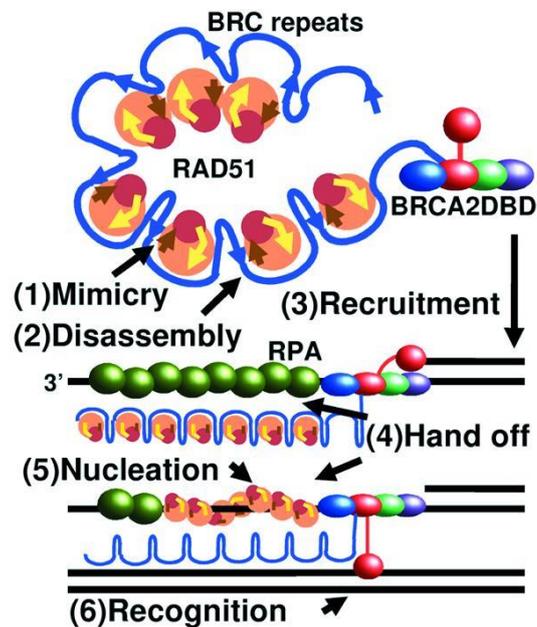
Otra zona altamente conservada de BRCA2, son las repeticiones BRC. Se tratan de 8 repeticiones compuestas aproximadamente por 30 aas y que son las responsables de la unión a RAD51. La región amino-terminal de *BRC4* adopta una estructura en horquilla que imita el motivo de oligomerización de *RAD51*, ocupando bolsillos hidrófobos que normalmente estarían ocupados por un monómero de *RAD51* adyacente en un filamento (110). Este mimetismo proporciona una explicación estructural basada en cómo las repeticiones *BRC* interfieren con la RH cuando ésta se sobreexpresa en células (111), aunque es de suponer que también promueva la función de *RAD51* en su contexto habitual. La región C-terminal *BRC4* forma una  $\alpha$ -hélice y contribuye a la unión con *RAD51* mediante la ocupación de un bolsillo hidrofóbico distinto (112). Por tanto, podemos decir que la complejidad en la unión existe incluso dentro de una sola repetición *BRC*.

Existen distintas teorías sobre esta interacción. En un principio se cataloga a BRCA2 como el mediador para el reclutamiento de RAD51 desde el citoplasma al núcleo y hasta el dsDNA. Sin embargo, solo una fracción de RAD51 celular está ligada a BRCA2, así que no se descarta la idea de que otras proteínas celulares desempeñen una función en el reclutamiento de RAD51 (113). Si bien es cierto, en cultivos celulares con la expresión de BRCA2 troncada, la formación de focos nucleares de RAD51 se ve disminuida. Cuando las células presentan unos niveles de BRCA2 normales, aparece la formación de los nucleofilamentos de RAD51 (114).

Otro punto importante sobre la promoción de los nucleofilamentos de RAD51 por parte de BRCA2, es que en ausencia de BRCA2, la formación de estos nucleofilamentos se ve inhibida por la proteína de replicación A (RPA), la cual está unida fuertemente a la ssDNA. Las repeticiones BRC, además de facilitar el reclutamiento de RAD51 hacia el ssDNA, aceleran el desplazamiento de la proteína RPA (28), bloquean la nucleación RAD51 en el dsDNA y facilita la formación de filamentos de RAD51 en el ssDNA (115).

Al estudiar la estructura cristalina formada en la unión de BRCA2-RAD51C, se ve como los "loops" L1 y L2, quedan fuera de la estructura, quedando libres para la interacción con otras moléculas, en concreto para la unión ssDNA.

En la **Figura 15** se propone un modelo de interacción entre BRCA2 y RAD51C. Una sola molécula de BRCA2 puede unirse a múltiples moléculas de RAD51C usando las repeticiones BRC. Gracias al dominio DBD, BRCA2 se ve implicado en el desplazamiento de RPA y se une al ssDNA mediante los dominios globulares OB y atrae a RAD51C hacia ssDNA (109).



**Figura 15:** Interacción entre BRCA2-RAD51C. Tomada de Shin y col., 2003 (109).

## 5.2 RAD51C

Dentro de los parálogos de RAD51 podríamos destacar a RAD51C/FANCO bien por su papel en el mantenimiento de la integridad genómica o bien por su relación en AF y en el CMOH.

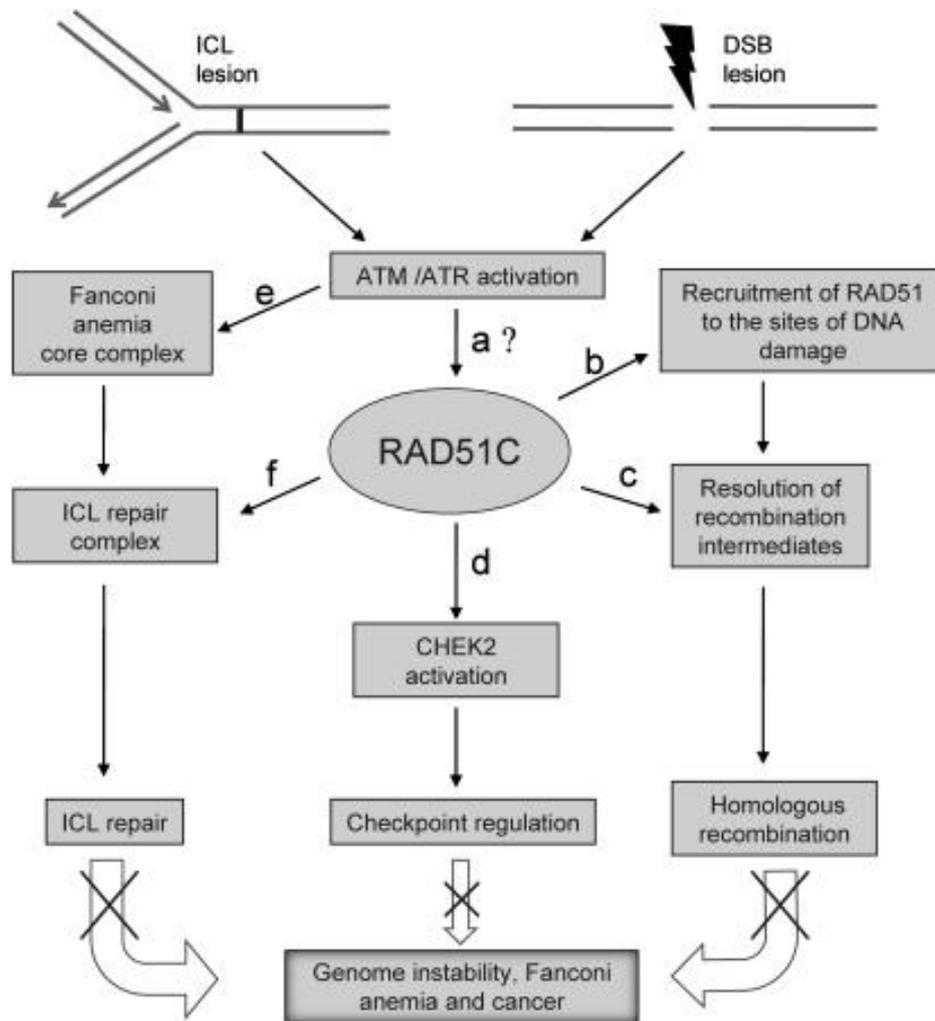
RAD51C forma parte de los dos complejos de parálogos, tanto el complejo BCDX2 (RAD51B/RAD51C/RAD51D/XRCC2) como de CX3 (RAD51C/XRCC3). Aunque los mecanismos no están del todo claros, se le han atribuido numerosas funciones celulares (**Figura 16**).

Badie y col. desarrollaron un modelo mediante cultivos celulares en los que la acumulación de RAD51C en los sitios de DSB no se ve afectada por la pérdida de función de BRCA2, pero que sí es dependiente de ATM, por lo que le atribuyen a RAD51C un papel inicial en la reparación de DSB y lo cataloga como una proteína de señalización del daño en el ADN (**Figura 16a**). Además, este estudio muestra que RAD51C es requerido para la fosforilación de CHEK2 por ATM, función que comparte con su parálogo XRCC3. Ya que

defectos en la activación de CHEK2 causa la progresión celular de fase M a G2 a pesar de detectarse daños en el material genético, esta teoría convierte a RAD51C en una proteína reguladora del ciclo celular (**Figura 16d**) (116).

Varios estudios le atribuyen a RAD51C diferentes funciones durante el proceso de RH. La depleción de RAD51C no afecta al reclutamiento de BRCA1 o BRCA2 hacia los DSBs sugiriendo un papel de este parólogo posterior al reclutamiento de BRCA1/2. Por el contrario, la formación de focos nucleares de RAD51 y la formación de nucleofilamento proteico sufre un descenso con el fallo del complejo CX3 y más moderado con la depleción del complejo BCDX2. A pesar de no conocerse el mecanismo al detalle, se postula a RAD51C y a otros parálogos como promotores de la formación del nucleofilamento proteico de RAD51 (**Figura 16b**) (117,118). Otros datos sostienen una función de RAD51C en un estadio tardío de la RH, donde RAD51C actuaría después de la invasión de la hebra mediada por RAD51, por lo tanto estaría implicado en la resolución de los intermediarios HJ (**Figura 16c**) (119). Pero para la resolución se requieren actividad helicasa y nucleasa, la ausencia de este tipo de motivos en RAD51C sugiere que su papel en la resolución de los intermediarios HJ puede ser indirecto.

Existen estudios que demuestran la participación de RAD51C en la ruta de reparación de ICLs mediada por las proteínas FA aunque los detalles del proceso no están del todo claros. Es probable que RAD51C interaccione con la proteína XRCC3 y que jueguen un papel en la detección de los ICLs (**Figura 16f**). Sin embargo, la participación de RAD51C en el complejo FA no se ha demostrado ya que se ha visto que la monoubiquitinización de FANCD2 no se ve afectada en células con mutaciones en RAD51C (100).



**Figura 16:** Esquema de las funciones de RAD51C. a) Señalizador de DSB mediada por ATM/ATR; b) Promotor de la formación de nucleofilamentos de RAD51; c) Resolución de los intermediarios HJ en la RH; d) Regulador del ciclo celular mediante la activación de CHEK2; e) Activación del complejo FA en respuesta a ICL mediante ATR quinasa; f) Detección de ICLs. Defectos de las funciones de RAD51C en la RH y en el control del ciclo celular puede causar inestabilidad genómica, Anemia de Fanconi y cáncer. Tomado de Somyajit y col., 2010 (120).

### 5.2.1 *RAD51C* como gen de susceptibilidad al cáncer

El gen *RAD51C* (MIM\* 602774) fue identificado inicialmente en una familia con fenotipo de Anemia de Fanconi en la que se detectó una variante *missense* en homocigosis (100). Además, mutaciones bialélicas en otros genes de RH (*BRCA2*, *PALB2* y *BRIP1*) se han descrito en este tipo de síndrome. Más adelante, la evidencia de que la familia RAD51 son genes supresores de tumores se hizo realidad a partir de estudios de *RAD51C* y *RAD51D*.

El primer estudio realizado en familias con CMOH fue publicado por Meindil y col. en 2010. Se analizó *RAD51C* en 1.100 casos índice de familias alemanas con CM/CO sin mutaciones detectadas en *BRCA1* ni en *BRCA2* y se identificaron seis mutaciones monoalélicas que conferían un aumento de riesgo para CM y CO. Todas las mutaciones se identificaron exclusivamente en el grupo de 480 familias con CM y CO (1.3%). En las seis familias portadoras la media de edad al diagnóstico de CM fue de 53 (33-78) y la de CO de 60 (50-81). El patrón de segregación de las seis familias es completo ya que todos los familiares de primer grado afectados fueron portadores (35). Los amplios estudios de segregación, pérdida de heterocigosidad y funcionalidad de las variantes encontradas, aportan evidencias para pensar que estas familias se comportarían de forma muy similar a las portadoras de mutación *BRCA1/2*. Desde entonces se han realizado múltiples estudios sobre distintas poblaciones obteniendo resultados dispares. En algunas de ellas se encuentran mutaciones en *RAD51C* y en otras no, probablemente estas diferencias estén relacionadas con variaciones poblacionales, con distintos criterios de selección o con el pequeño tamaño muestral.

En un estudio realizado sobre 1132 casos de CMOH y 272 casos de CO no seleccionados por historia familiar se encontraron 12 mutaciones patogénicas y se cuantificó el riesgo de CO con un OR de 5.88, lo que se traduce en un 9% de riesgo acumulado de cáncer de ovario a los 80 años. No se detectó un incremento significativo en el riesgo de cáncer de mama (90).

En población española se estima que la frecuencia de mutaciones en *RAD51C* dentro de los casos de CMOH es del 1.3% (91). Los autores de este estudio, Osorio y col. sugieren que la prevalencia ha sido hasta el momento subestimada dado que al menos el 50% de las mutaciones en *RAD51C* son de tipo *missense*, por lo que se precisan estudios funcionales para aclarar su patogenicidad.

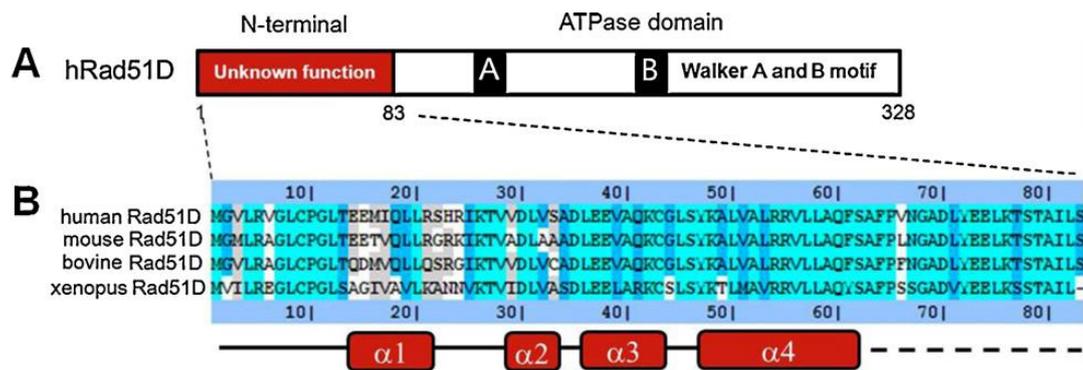
Mutaciones monoalélicas en *Rad51B*, *XRCC2* y *XRCC3* se han observado en familias con CM, aunque su implicación en la susceptibilidad no está del todo clara. (HILBERS 2011, PARK 2012, Golmar 2013). La presencia de una traslocación cromosómica en *RAD51B* ha sido descrita en algunos tumores benignos (Ingraham 1999, Schoenmakers 1999), incluyendo una traslocación germinal en una familia con múltiples casos de timoma (Nicodemme 2005).

### 5.3 RAD51D

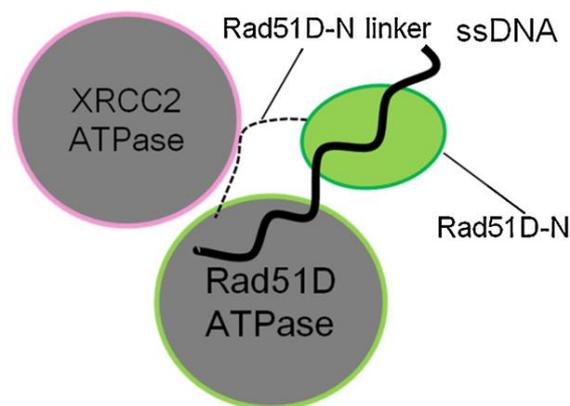
La identificación de mutaciones de *RAD51C* en familias con CMOH dio paso al estudio de otros parálogos de *RAD51*. El papel que juega RAD51D en la RH no está del todo claro. Forma complejo con RAD51B, RAD51C y XRCC2 (BCDX2 complex). La actividad de este complejo todavía no está bien definida *in vivo*, pero se une predominantemente a la intersección de los cuatro brazos de la Holliday unión (figura 6). RAD51D puede formar un subcomplejo con XRCC2 que posee una actividad ATPasa sustancialmente estimulada en presencia de ADN de cadena sencilla (ssDNA). Se cree que el complejo RAD51D-XRCC2 se une a una helicasa para interrumpir la estructura generada por la invasión de la hebra de ADN monocatenaria (ssDNA) hacia su cromátida homóloga (Holliday unión) (121).

RAD51D juega un papel importante en la protección de los telómeros. Se sabe que la enzima telomerasa es la principal vía de elongación de los telómeros, sin embargo, la RH puede ser un mecanismo alternativo del mantenimiento de la longitud de los telómeros (*telomere length maintenance*) (ALT) y supervivencia celular. En un modelo celular con depleción de RAD51D en células con ausencia o inactivación de telomerasa se vio reducción de los telómeros y un aumento en la incidencia de fusiones teloméricas (122).

La proteína RAD51D humana está compuesta por 328 aas. Como todos los parálogos de RAD51 tiene dos dominios en su estructura cuaternaria, dominio N-terminal (1-83 aá) y dominio ATPasa (84-328) (**Figura 17**). La interacción de RAD51D con su parálogo XRCC2 es a través del extremo N-terminal. Esta región de RAD51D está altamente conservada entre especies, pero tiene una baja homología con los extremos N-terminal de otros parálogos RAD51, lo que sugiere una función específica para esta región. En concreto, se le atribuye propiedades de unión específica a ssDNA (**Figura 18**) (123).



**Figura 17:** Esquema de proteína RAD51D; A): Esquema de los dos dominios de RAD51D. B): Alineamiento de secuencias de RAD51D de humano, ratón, vaca y rana xenopus. Subrayado en azul: aas conservados en las cuatro especies. Barras rojas:  $\alpha$ -hélice como estructura secundaria. Línea negra continua: regiones de unión entre las hélices (*loops*). Tomada de Kim y col., 2011 (123).



**Figura 18:** Esquema de la interacción entre el complejo RAD51D-XRCC2 y el ssDNA. La hebra de DNA es incorporada al complejo mediante el dominio N-terminal de RAD51D. Tomada de kim y col., 2011 (123).

### 5.3.1 *RAD51D* como gen de susceptibilidad al cáncer

La posible implicación de RAD51C en las familias con CMOH, llevó a la realización de estudios en otros parálogos de RAD51. El primer trabajo publicado sobre el gen *RAD51D* (MIM\* 614291) por Loveday y col. (40) en 2011 identificó 8 mutaciones en 911 familias británicas con fenotipo de CM/CO (0,88%) y una en 1.060 controles sanos (0,09%). La asociación de este gen es principalmente con la susceptibilidad al CO, ya que 4 de las mutaciones se encontraron en 235 familias con dos o más casos de CO (1,7%) y 3 mutaciones en 59 familias con 3 o más casos de CO (5,09%). Sin embargo, no se

encontraron mutaciones en los 737 individuos con historia de cancer de mama exclusivamente. Los autores estimaron un riesgo relativo para el CO de 6,3 y 1,32 para el CM.

En población Española se ha realizado un estudio sobre 842 familias donde se encontraron 3 mutaciones en 4 familias. Todas ellas fueron detectadas en las 491 familias con fenotipo de CM/CO (0,82%), aunque no encuentran relación con el número de casos de CO en la familia.

Otros estudios no han detectado mutaciones en las familias estudiadas.

## **6. Importancia del diagnóstico genético**

### **6.1 El proceso del asesoramiento genético**

La capacidad de poder distinguir pacientes portadores de una mutación en un gen de susceptibilidad al cáncer, permite a los clínicos desarrollar un apropiado asesoramiento y educación, vigilancia, y prevención. Puede proporcionar una estrategia adecuada de la gestión clínica a utilizar, con el objetivo de aumentar la supervivencia en mujeres de alto riesgo y disminuir los costes y complicaciones innecesarias en mujeres de bajo riesgo.

La *Sociedad Nacional Americana de Asesores Genéticos* (NSGC) define el consejo genético (124) como “el proceso de asesoramiento que permite a los individuos entender y adaptarse a las implicaciones médicas, psicológicas y familiares de los aspectos genéticos de una enfermedad”.

Este proceso integra los siguientes elementos:

- a) Interpretación de la historia médica y familiar para establecer el riesgo de aparición de la enfermedad genética y/o su recurrencia.
- b) Educación acerca de aspectos hereditarios, estudios genéticos, manejo clínico prevención e investigación de la enfermedad genética.
- c) Asesoramiento para facilitar la toma de decisiones informadas y la adaptación al riesgo de desarrollar la enfermedad genética.

Este proceso de asesoramiento genético en cáncer lo podemos dividir en varias etapas:

1. Sospecha clínica de un síndrome de cáncer hereditario: elaboración del árbol genealógico detallado incluyendo al menos tres generaciones consecutivas; motivos por los que el paciente acude a la visita y evaluación de las razones que tiene para solicitar las pruebas; valoración de la percepción del riesgo de cáncer; educación sanitaria sobre prevención primaria; adopción de hábitos de vida saludables y promoción de la salud.

2. Valoración de la indicación del estudio genético: determinar si existe la sospecha clínica de un síndrome determinado del cual se conocen los genes asociados y cuyo resultado puede interpretarse a nivel clínico.

3. Información sobre las implicaciones médicas personales y familiares de la identificación de una susceptibilidad genética.

4. Asesoramiento sobre los beneficios y limitaciones de cada tipo de estudio genético: implicaciones sobre la toma de decisiones médica de detección precoz, prevención y tratamiento, así como las limitaciones relacionadas con la sensibilidad limitada de algunas técnicas diagnósticas o la posibilidad de identificar variantes de significado clínico desconocido.

5. Realización del estudio genético, previo consentimiento informado en los casos en que se considere indicado.

6. Interpretación e información del resultado del estudio genético cuando se haya realizado.

7. Plan de seguimiento médico en función del resultado del estudio genético o de la historia personal y familiar si no se consideró oportuno realizar el test.

## **6.2 Estudio genético**

Podemos definir al test genético de predisposición al cáncer como el análisis que nos informa si un individuo ha heredado una alteración genética que aumente el riesgo para ciertos tipos de cánceres. Los resultados del test genético tienen repercusiones tanto en el individuo como en sus familiares.

Según la *American Society of Clinical Oncology (ASCO)*, el estudio genético sólo debería ofrecerse cuando (125):

1. El individuo tenga altas probabilidades de ser portador de mutación.
2. Se pueda garantizar con fiabilidad la interpretación del resultado.

3. Los resultados puedan ayudar al diagnóstico y manejo médico del paciente o sus familiares con riesgo hereditario al cáncer.

4. Las pruebas genéticas se realicen en el marco de asesoramiento genético.

Previo a realizar cualquier estudio genético, los individuos en riesgo deben estar informados de las opciones para la prevención, diagnóstico precoz y tratamiento. Se recomienda iniciar el estudio genético en una familia a partir de la persona que tenga más posibilidades de ser portadora de la mutación (caso índice o probando). Si se identifica la mutación en el caso índice, podrá ampliarse el estudio a otros familiares a riesgo de ser portadores.

Los resultados del test genético se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1. **Test informativo:**

Aquellos resultados que nos permiten asesorar con la mayor certeza posible a la persona que se ha realizado dicho test. Dentro de este grupo podemos distinguir dos opciones:

a) **Verdadero positivo:** Es aquella situación en la que la primera persona estudiada de la familia se identifica una mutación en alguno de los genes estudiados, el resultado es informativo y se interpreta como la existencia de predisposición a padecer un tipo determinado de cáncer hereditario. En estos casos, la persona portadora de la variante puede informar a otros familiares interesados en clarificar su riesgo. En el caso en el que la mutación se localice en un gen con herencia autosómica dominante, los familiares de primer grado tienen un 50% de probabilidades de tener esa misma mutación. El resultado de un estudio en una persona sana perteneciente a una familia con mutación conocida también se clasificaría como verdadero positivo. Para ayudar a manejar este tipo de riesgo se pueden incluir una serie de recomendaciones como un aumento de las pruebas de *screening*, protocolos de quimioprevención o cirugía profiláctica.

b) **Verdadero negativo:** Es aquella situación en la que existe una mutación identificada en la familia, y la persona que se ha sometido al test no ha heredado esa mutación. Se asume que el riesgo a algunos tipos de cáncer para la persona con un resultado negativo verdadero no es mayor que en la población general. A este tipo de personas se les suele sugerir seguir utilizando las mismas recomendaciones de cribado de cáncer que se dan a la población general.

## 2. Test no informativo:

- c) **Negativo no informativo:** No se ha encontrado mutación conocida en la familia. No está claro con este tipo de resultado si el cáncer familiar se debe a otro tipo de mutación genética, a otros factores que todavía no se comprenden o a una mutación en un gen no estudiado. Este resultado es más informativo para una persona con ciertos tipos de cáncer de lo que es para las personas que no tienen antecedentes personales de cáncer. A este tipo de personas se les suelen dar recomendaciones en base a su historia personal y familiar de cáncer.
- d) **Variante de significado clínico desconocido (UV, del inglés *unknown variant*):** Se ha encontrado una alteración en alguno de los genes de susceptibilidad, pero no está claro lo que significa este resultado para el riesgo de cáncer. Este tipo de resultado podrá ser reclasificado en un futuro si se obtienen más conocimientos sobre este tipo de variante. Pueden pedirse la sangre y/o muestras de tumores de otros familiares para poder avanzar en el estudio de esta variante y el riesgo de cáncer. A las personas con una variante de significado clínico desconocido se dan recomendaciones según los antecedentes personales y familiares de cáncer.

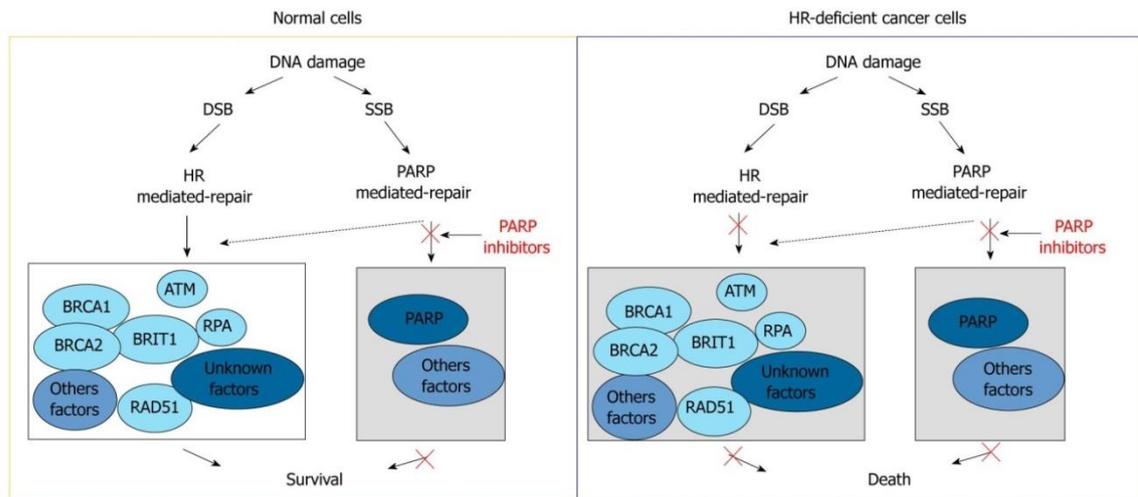
### 6.3 La genética como estrategia de tratamiento

Las mujeres portadoras de mutación en los genes *BRCA1* o *BRCA2* (*BRCA1/2*) tienen más riesgo de desarrollar cáncer de mama y ovario (56%-84%) (14). Los cánceres asociados a mutación en *BRCA1* son mayoritariamente triples negativos, es decir RE, RP, y rHER2/neu negativos, entre en un 25-50% de los tumores triple negativo se detecta una mutación en *BRCA1*; mientras que los cánceres esporádicos y los asociados a mutación en *BRCA2* son con más frecuencia positivos para los receptores hormonales. Estas diferencias tienen implicaciones a la hora de escoger el tratamiento sistémico más adecuado para cada paciente, así, en líneas generales, una portadora de *BRCA1* no recibirá tratamiento hormonal y sí tratamiento con quimioterapia.

Como hemos comentado anteriormente, muchos de los genes relacionados con la susceptibilidad genética al CM y CO están involucrados en la reparación de la doble cadena de ADN, tanto los genes FA (*PALB2*, *BRIP1*, *FANCI*), como otros genes de la RH como *BRCA1*, *BRCA2*, los parálogos de *RAD51* (*RAD51C*, *RAD51D*), o los genes envueltos en la señalización del DSB (*ATM* o *CHEK2*). Los agentes quimioterápicos análogos de los platinos, como el Cisplatino o el Carboplatino inducen entrecruzamientos ente las purinas del ADN,

es decir, ICLs y DSB, lo que produce una toxicidad celular y requiere mecanismos de reparación como RH. Múltiples estudios sugieren que, efectivamente, células con defectos en la RH serían más sensibles a la acción de estos agentes. En varios estudios con diferentes esquemas terapéuticos sobre casos con CM *BRCA1* mutados, se observa una mayor respuesta al cisplatino (126) y un mayor intervalo libre de progresión (127). Igualmente, la respuesta de los casos con CO a las líneas terapéuticas con cisplatino estuvieron influenciadas por las mutaciones en *BRCA1/2* y otros genes de la RH (128).

El hecho de que los defectos en la reparación del ADN concedieran a la célula una vulnerabilidad específica fue explotado hacia el concepto de letalidad sintética; mutación e inhibición de dos mecanismos celulares para producir la muerte celular. Esta interacción letal fue descrita en células *BRCA1* o *BRCA2* mutadas a las que se les inducía una pérdida de la enzima *Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1)*(129). PARP-1 participa en la ruta de reparación de roturas de cadena sencilla en el ADN mediante escisión de bases (BER). La inhibición de PARP-1 lleva a la acumulación de daños en la monohebra de ADN (SSB), que son convertidos en sDSB en la replicación. Estos sDSB no pueden ser reparados mediante RH en células deficientes de *BRCA1/2*, con el resultado de una citotoxicidad (**Figura 19**). Este hallazgo supuso un punto de partida para el desarrollo de fármacos inhibidores de la PARP-1. Recientemente se ha publicado datos pre-eliminarios del ensayo clínico fase II con el inhibidor de PARP-1, Olaparib®. Estos datos muestran un intervalo libre de enfermedad significativamente mayor en pacientes con *BRCA1/2* mutado tratadas con Olaparib® frente a placebo, 11,2 meses frente a 4,3 meses, respectivamente. En pacientes con *BRCA* no mutado también hubo diferencias significativa entre el grupo tratado con Olaparib® frente al grupo tratado con placebo, aunque en este caso la diferencia fue menor, 7,4 meses frente a 5,5 meses (130).



**Figura 19:** Mecanismo de interacción entre la ruta de reparación mediada por enzima Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) y la RH. DSB: Daños en la doble hebra de ADN; SSB: daño en una sola hebra de ADN; HR: Recombinación Homóloga; RPA: Proteína A de la replicación; BRCA: Breast cancer susceptibility protein; PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase. Tomado de Peng y col., 2011 (80).

## 7. Clasificación de las variantes genéticas

A continuación se revisarán las evidencias científicas que se pueden utilizar con el objetivo de clasificar variantes genéticas encontradas. De especial relevancia es la calidad de la información que cada una de las estrategias puede aportar y la cuantificación estadística de esa información. De manera general, las evidencias se pueden clasificar en directas e indirectas. Las directas son aquellas que miden una asociación entre la variante y la enfermedad. Las indirectas, por su parte, se basan en el efecto observado o predicho de la variante sobre aspectos del gen en cuestión, que se asumen como determinantes de la patogénesis (Goldgar et al., 2008)(131).

### 7.1 Tipos de variantes según el efecto fisiológico

- Variantes patogénicas (o mutaciones patogénicas): Variantes que resultan una función anormal de gen y en un fenotipo alterado (alta susceptibilidad al cáncer de mama).
- Variantes de significado clínico desconocido : Variantes en la secuencia normal de una gen cuyo significado biológico en cuanto a la patogenicidad o a benignidad no es conocido.

- Variantes no patogénicas: Variantes que no tienen efectos adversos sobre la función del gen y no originan un fenotipo alterado. Dentro de éstas, estarían los polimorfismos genéticos (en concepto estricto, variantes con al menos una frecuencia del 1% en la población general).

## 7.2 Herramientas de valoración clínica de variantes génicas

### 7.2.1 Bases de datos

Diferentes grupos de trabajo han organizado bases de datos para incluir resultados de los análisis de los diferentes laboratorios acerca de las variantes encontradas y su correcta clasificación. Entre ellas, podemos nombrar:

- a) **NCBI (Clin var)** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>): base de datos publica dentro del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI: *National Center for Biotechnology Information*) que contiene información sobre variaciones génicas y su significado clínico.
- b) **HGMD** (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>): Amplia base de datos privada sobre mutaciones de enfermedades hereditarias humanas en la investigación genética y genómica.
- c) **Ensembl Genome Browser** (<http://www.ensembl.org/index.html>): se trata de un proyecto de investigación bioinformática de distintos genomas eucariotas seleccionados y es de libre acceso. Funciona como una colaboración entre el *Wellcome Trust Sanger Institute* y el Instituto Europeo de Bioinformática, una división del Laboratorio Europeo de Biología Molecular. La principal ventaja que presenta esta web son sus tutoriales, bien explicados y muy prácticos, van paso a paso comentando cada una de las herramientas que ofrece.
- d) **LOVD** (<http://www.lovd.nl/3.0/home>): Se trata de una base de datos pública desarrollada por *Leiden University Medical Center* en Holanda, diseñada para recopilar información de todo tipo de variantes de una gran cantidad de genes. Por lo que se refiere a *BRCA1* y *BRCA2* (<http://brca.iarc.fr/LOVD/home.php>), clasifica las variantes según la clasificación de IARC (*International Agency for Research on Cancer*).
- e) **BIC** ([www.research.nhgri.nih.gov/bic/](http://www.research.nhgri.nih.gov/bic/)): base de datos pública sobre variantes en *BRCA1* y *BRCA2* más extensa, completa y utilizada como referente a nivel mundial.

- f) **UMD** (<http://www.umd.be/BRCA1/> y <http://www.umd.be/BRCA2/>): Base de datos pública a través del esfuerzo de 16 laboratorios de diagnóstico franceses para proporcionar información actualizada sobre variantes en *BRCA1* y *BRCA2*.

Existen casos en que la información recogida en las bases de datos no es concluyente, bien porque la variante no ha sido descrita con anterioridad o bien porque no hay evidencias suficientes para su clasificación y por tanto, sus efectos son desconocidos sobre la función del producto génico o el riesgo de enfermedad. En estos casos la variante en cuestión es clasificada como variantes de significado clínico desconocido (UVs). En estos casos se emplean múltiples herramientas que van más allá de la bases de datos para poder interpretar una UV. De forma individual, estos métodos no son ni fiables al 100%, ni infalibles cuando se combinan, y pueden dar lugar a diferentes interpretaciones para muchas UVs.

### **7.2.2 Análisis de segregación en la familia**

Se trata de un método que se centra en si la UV cosegrega (se hereda conjuntamente) con el fenotipo (enfermedad) de una manera constante en función de lo esperado para las mutaciones patogénicas en el gen de interés. Debido a que los familiares de primer grado tienen un 50% de posibilidades de compartir cualquier cambio específico de ADN, este análisis requiere de un gran número de personas portadoras de una UV para construir una relación de causalidad. Para algunas enfermedades, el análisis de segregación puede ser muy poderoso. Sin embargo, debido a la alta frecuencia de casos de cáncer de mama esporádicos, la información derivada de análisis de segregación para la interpretación UV puede ser no concluyente. Aunque puede ser de gran valor para las familias seleccionadas, la cosegregación requiere un análisis estadístico en virtud de un modelo específico de la enfermedad de herencia (132,133). Además, sería un análisis más potente combinar el análisis de segregación de varias familias, si la misma UV se observa en varias familias.

### **7.2.3 Estudio de caso-control**

Se basa en la comparación de la frecuencia de la variante de interés en una serie de casos y de controles. Metodológicamente es un método robusto que ofrece como resultado la medida estadística de riesgo relativo (O.R.). Aunque es un método muy útil en el análisis de variantes frecuentes (>1%), la mayoría de las UVs son individualmente infrecuentes ( $\approx 0,1\%$ ) y el tamaño muestral requerido es tan grande que generalmente se

hace inasumible. En la práctica, el estudio caso-control es un método rápido para descartar posibles variantes no patogénicas. Tras genotipar la variante de interés en un grupo de controles (n= 100-200), si su frecuencia es 1% o superior es muy improbable que se trate de una variante patogénica de penetrancia elevada. Además, se puede obtener información sobre frecuencias génicas encontradas en los grandes proyectos sobre el genoma humano, como por ejemplo el proyecto *1000Genomas* donde se han analizado 2.504 genomas humanos de toda la población mundial y donde podemos encontrar frecuencias de poblaciones específicas (134). *Hap Map* es otro proyecto que ha analizado variaciones genéticas comunes o *SNPs* (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) y del cual podemos obtener frecuencias poblacionales mediante la base de datos *SNPs* de *NCBI*.

#### **7.2.4 Historia personal y familiar**

Se basa en el hecho de que las variantes patogénicas tienden a aparecer de manera más frecuente en familias con una mayor incidencia de los casos de cáncer relacionados con el síndrome. El análisis de una variante de significado clínico desconocido en familias con distintos grados de historia familiar permite analizar su distribución y compararla con la distribución de las variantes patogénicas de la misma población. La ventaja de esta aproximación es que únicamente requiere el análisis del genotipo de un individuo por familia. La desventaja es que requiere información detallada de todas las familias analizadas en una población y no solo de aquellas portadoras de UVs (135). Dentro de la información de utilidad que se puede obtener de las familias se puede incluir tanto datos que se recogen habitualmente en el consejo genético (edades de diagnóstico y tipos de cáncer), así como datos anatomopatológicos (ER, PR, HER2, etc) que no se recogen habitualmente (131).

#### **7.2.5 Co-ocurrencia en *trans***

Diversos estudios relacionan que portar una mutación patogénica de *BRCA1* en ambos cromosomas provocaría la letalidad embionaria (aunque, recientemente, se ha publicado el primer caso con mutaciones bialélicas en *BRCA1* (136) y la herencia bialélica de *BRCA2* con la anemia de Fanconi. Estas observaciones, han proporcionado una forma de reclasificar específicamente las UVs en *BRCA1* y *BRCA2* como cambios no patógenos, si por casualidad la UV se ha visto en el mismo paciente que lleva una mutación patogénica

definida en el mismo gen. Sin embargo, no basta una mutación patogénica más una UV para realizar esta interpretación, ya que también hay que demostrar que la mutación y la UV se producen en diferentes alelos (que se encuentran en *trans*), en lugar de que ambos estén dentro del mismo alelo (*cis*). Si están en *cis*, entonces el paciente todavía tiene una copia normal del gen *BRCA* y la UV todavía no se puede valorar. La determinación de *trans* vs. *cis* se puede demostrar de una forma más directa mediante la realización de análisis de *BRCA* en los familiares (137).

### **7.2.6 Conservación evolutiva entre las especies**

Existen una serie de programas informáticos (métodos *in silico*) que permiten analizar si determinados dominios funcionales, aminoácidos individuales o pares de bases, incluso nucleótidos en una secuencia de genes se conservan a través de la evolución (análisis filogenético). Áreas de un gen que han adquirido sustanciales cambios en la secuencia de ADN en la evolución de los seres humanos se cree que son menos esenciales o no son críticos en la función de ese gen. Si la UV se encuentra en una parte muy conservada del gen, la lógica indicaría que una variación de cualquier tipo puede ser perjudicial; además, cuanto más grave sea el cambio, más probable será que sea nocivo. Por otro lado, si la UV se encuentra en una región no conservada, tal vez esta UV no sea clínicamente relevante. Se han llevado a cabo comparaciones entre estos diferentes programas informáticos para determinar si dan lugar a conclusiones similares (138,139), subrayando una vez más que ningún método es actualmente adecuado para reinterpretar las UVs.

### **7.2.7 Estudios funcionales**

Se han desarrollado ensayos funcionales mediante modelos animales que permiten el estudio de la expresión de una determinada mutación pudiendo aportar evidencias sobre su patogenicidad, especialmente cuando los animales reproducen el fenotipo observado en los humanos. Sin embargo estos ensayos son limitados por el coste y las dificultades en la obtención de dichos modelos. No existe un *gold standard* por el cual comparar estos resultados, ya que las mutaciones patogénicas no afectan a todos estos criterios de valoración funcionales de la misma manera, por lo que se puede recurrir a múltiples ensayos para identificar una pérdida específica de funcionalidad. De todos modos, es necesaria una validación para estar seguro que la variante encontrada en el laboratorio en

realidad se correlaciona con otros métodos que distinguen las variantes patogénicas de las neutrales.

### 7.2.8 Estudios *in silico*

Existen métodos informáticos que permiten predecir si un cambio de aminoácido afecta a la función de la proteína. Estos algoritmos (métodos *in silico*) son herramientas útiles en la valoración del efecto funcional de variantes nuevas, en ausencia de estudios funcionales con modelos animales o celulares. Hay diversos algoritmos de predicción disponibles en la red como: *Polyphen*, *SIFT*, *Pmut*, *Mutation Taster*, *Align GVGD*. Para hacer una predicción, estos programas pueden servirse, además de la información sobre la función de la proteína, de los siguientes datos:

- La conservación evolutiva entre distintas especies.
- Región del gen y de la proteína a la que afecta a la mutación. Las mutaciones que afectan a las regiones codificantes (exones) son probablemente más patogénicas que aquellas que afectan a las regiones no codificantes (intrones). Aunque las mutaciones intrónicas que afectan a regiones implicadas en procesos de *splicing*, serán, *a priori*, más patogénicas que aquellas que están en el resto del intrón.
- Tipo de cambio de aminoácido. Si las propiedades químicas de uno y otro son muy diferentes podría afectar a la estructura de la proteína o a su función si reside en el sitio activo de la misma.

En cualquier caso, siempre se tratará de una aproximación, dan una idea general, pero nunca pueden sustituir a los ensayos funcionales, epidemiológicos y de segregación. La caracterización final debe hacerse siempre mediante análisis más exhaustivos.

Por otro lado también existen algoritmos que predicen si la mutación podría afectar a la maduración del ARN mensajero (*MaxEntScan*, *NNsplice*, *Splice Site Finder*). Existen aplicaciones de software de apoyo a las decisiones como *Alamut*, desarrollada por *Interactive Biosoftware*, para el diagnóstico de mutaciones en la genética molecular en medicina. Es una aplicación que integra la información genética proveniente de diferentes fuentes para describir variantes utilizando la nomenclatura HGVS (*Human Genome Variation Society*) y ayuda a interpretar su condición patógena.

Para variantes en genes de alta penetrancia, los avances en los métodos de cálculo en los últimos 10 años se han alejado de la simple clasificación binaria de UVs como patógenas o no patógenas, ofreciendo en cambio una probabilidad numérica de patogenicidad. En el año 2000, el grupo de trabajo *BIC* estableció planes para desarrollar un sistema que pueda combinar varios tipos independientes de análisis mediante la combinación de las razones de verosimilitud (*likelihood ratio*, LR) para predecir la patogenicidad de UVs. Un LR compara la probabilidad de los datos observados bajo una hipótesis de patogenicidad (comparando los datos de UVs a los casos con mutaciones) frente a una hipótesis de que las UVs sean no patogénica. Las LRs de todas las fuentes disponibles se multiplicaron para obtener una "LR integrado" (131,140). Con el uso de un modelo bayesiano para aquellas UVs que son cambios *missense* (que son la mayoría), se puede determinar una probabilidad *a priori* de la patogenicidad para cada variante mediante la evaluación de las características biofísicas de aminoácidos y la conservación evolutiva de múltiples alineamientos de secuencias de proteínas mediante métodos bioinformáticos *in silico* como el *Align-GVGD* (141). Las demás líneas de evidencia independientes, como las descritas anteriormente (por ejemplo, la segregación en la se pueden expresar matemáticamente como LR), se pueden integrar con una *probabilidad a priori* para generar una *probabilidad a posteriori* de patogenicidad para cada variante.

Sobre la base del valor numérico de la *probabilidad a posteriori*, el grupo IARC presentó una traducción clínica en el que se proporciona un sistema de clasificación de cinco niveles para cada variante (142). Los autores han propuesto cómo éstos niveles predictores de patogenicidad pueden ser utilizados para aconsejar a los pacientes sobre la vigilancia del cáncer y cuándo es razonable utilizar una variante como marcador para las pruebas de predicción en los familiares en situación de riesgo. Basados en estos niveles de predicción, se utiliza el sistema de clasificación mostrado en la **Tabla 2** para la traducción clínica de las variantes detectadas en genes donde el sistema IARC todavía no está definido.

Clase de variante	Definición	Probabilidad de patogenicidad	Pruebas clínicas	Recomendaciones de vigilancia
<b>VP</b>	Definitivamente patogénica	>0,99	Pruebas de riesgo en familiares para la variante	Vigilancia completa de alto riesgo
<b>VPP</b>	Probablemente patogénica	0,95-0,99	Pruebas de riesgo en familiares para la variante	Vigilancia completa de alto riesgo
<b>UV</b>	Desconocida	0,05-0,949	No utilizar como pruebas de predicción en los familiares en riesgo	Asesoramiento en base a los antecedentes familiares y a otros factores de riesgo
<b>VPNP</b>	Probablemente no patogénica	0,001-0,049	No utilizar como pruebas de predicción en los familiares en riesgo	Asesoramiento como mutación no detectada
<b>VNP</b>	No patogénica	<0,001	No utilizar como pruebas de predicción en los familiares en riesgo	Asesoramiento como mutación no detectada

**Tabla 2.** Propuesta de clasificación de las variantes y su correlación con la recomendación clínica. Modificada de Lindor y col., 2013 (143).

## **II. Hipótesis**



## 1. Justificación del estudio e hipótesis

Actualmente, el cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada en las mujeres. A pesar de que se conocen múltiples factores de riesgo, la historia familiar es el factor de riesgo más importante para el cáncer de mama y ovario, además de la edad y el sexo femenino. Como hemos revisado en esta introducción, la genética del cáncer de mama hereditario es muy heterogénea.

La identificación de los genes *BRCA1* y *BRCA2* supuso un gran avance en el manejo de las familias con cáncer de mama hereditario, ya que ofreció la posibilidad de realizar un test genético mediante el que identificar y descartar los individuos de riesgo en las familias, recibir asesoramiento genético y tomar las medidas preventivas y de seguimiento adecuadas. Cuando se identificaron los dos genes hace más de 15 años, se pensó que las mutaciones germinales en los mismos podrían explicar hasta el 80% de los casos de cáncer de mama hereditario (144,145). Sin embargo, pocos años después se confirmó que este porcentaje no era tan alto y, sobretodo, que podría ser variable según la población analizada y los criterios utilizados para seleccionar los pacientes (146). Actualmente se considera que, en general, estos dos genes no explican más de un 20% de los casos de cáncer de mama y ovario familiar.

Dado el alto porcentaje de casos de CMOH en los que la causa genética de la susceptibilidad es desconocida y gracias a la evolución tecnológica, estamos siendo testigos de una intensa búsqueda de genes de susceptibilidad con el objetivo de seguir mejorando la prevención primaria y secundaria de las neoplasias relacionadas con este síndrome. Consecuentemente, nuevos genes han emergido como genes de susceptibilidad al cáncer de mama y al cáncer de ovario, incluyendo mutaciones en genes de alta penetrancia como *TP53* o *PTEN* entre otros, y mutaciones en genes de moderada penetrancia como *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D*, así como otros genes de la recombinación homóloga. Entre todos estos genes de predisposición se explicaría al menos entre un 30-40% del exceso de riesgo observado.

Se han realizado algunos estudios en población española sobre el análisis mutacional de *BRCA1/2*, y otros genes como *RAD51C* y *RAD51D* en familias con CMOH y, como en otras poblaciones, han mostrado prevalencias heterogéneas según la zona geográfica. Es por ello que, a pesar de las evidencias que hay sobre estos genes y su implicación en el

síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, es importante determinar que prevalencia mutacional se puede encontrar en el grupo de población sobre el que se trabaja con el fin de realizar un diagnóstico genético dirigido y mejorar la asistencia clínica a individuos y familiares afectos de CMOH.

## 1. Objetivos

Objetivo general:

Evaluar el rendimiento diagnóstico del estudio genético realizado en pacientes de la Región de Murcia con criterios de cáncer de mama y ovario hereditario.

Objetivos específicos:

1. Describir fenotípicamente los casos índice y familias de la Región de Murcia a las que se les ha realizado el estudio genético durante los años 2006 y 2015.
2. Estudiar el rendimiento diagnóstico del test genético *BRCA1* y *BRCA2*.
3. Conocer la prevalencia mutacional de *RAD51C* y *RAD51D* y describir las variantes encontradas en estos genes.
4. Realizar estudios de correlación genotipo-fenotipo: asociación entre las características clínicas y las variantes génicas detectadas en *RAD51C* y *RAD51D*.



# **III. Material y métodos**



## 1. Pacientes en estudio

Desde abril de 2007 hasta diciembre de 2014, se recogieron muestras de sangre periférica a los casos índice pertenecientes a 645 familias que cumplieran criterios de inclusión para el síndrome cáncer de mama y ovario hereditario.

### 1.1 Selección y clasificación de los pacientes

La selección de las familias se realizó según los datos de su historia personal y familiar de cáncer en la consulta de consejo genético del servicio de oncología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia y desde marzo de 2013, además, en la consulta de Consejo Genético de la Unidad de Hematología y Oncología Médica del Hospital Universitario Morales Meseguer. Los criterios utilizados para realizar el estudio de los genes *BRCA1* y *BRCA2* a un individuo con determinada agregación familiar de cáncer están basados en los criterios de selección recomendados por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (**Tabla 3**).

Sin embargo, hubo casos índice a los que se les realizó el test genético a pesar de no cumplir estrictamente alguno de los criterios de selección anteriormente indicados, a éstos se les clasificó como pacientes sin riesgo.

Todos los pacientes fueron debidamente informados de la naturaleza y objetivo del estudio y todos firmaron el consentimiento informado (**Anexo I**) previo a la extracción de una muestra de sangre para la realización del estudio genético.

A las familias que cumplieran los criterios de selección se ofreció el estudio genético en primer lugar al caso índice que, en todos los casos posibles, había sido diagnosticado de cáncer, y en caso de varios individuos afectados en la misma familia se escogió la paciente diagnosticada de cáncer de ovario, la diagnosticada a edad más precoz, la diagnosticada de cáncer de mama bilateral o el varón diagnosticado de cáncer de mama. Como excepción, se consideró la realización del estudio genético en individuos sanos si todos los familiares afectados habían fallecido, no se podía contactar con ellos o rehusaban hacerse el estudio genético, y siempre que el resultado de dicho estudio pudiera condicionar la decisión de manejo clínico de la persona como, por ejemplo, la realización de cirugía profiláctica.

<b>Criterios de alto riesgo</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cáncer de mama diagnosticado antes de los 40 años.</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cáncer de mama bilateral diagnosticado antes de los 40 años (aunque sea en una mama).</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cáncer de mama y ovario en una misma paciente.</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cáncer de mama en el varón, menor de 65 años.</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Dos casos ente familiares de primer o segundo grado con:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Dos casos de cáncer de ovario.</b></li> <li>- <b>Un caso de cáncer de mama y otro de cáncer de ovario.</b></li> <li>- <b>Un caso de cáncer de mama en el varón y otro de cáncer de mama u ovario.</b></li> <li>- <b>Un caso de cáncer de mama bilateral y otro de cáncer de mama (uno al menos de 50 años, aunque sea uno de los bilaterales).</b></li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Tres o más familiares de primer grado con cáncer de mama o de ovario.</b></li> </ul>
<b>Criterios de riesgo moderado</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cáncer de mama entre los 41 y los 50 años.</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Dos familiares de primer grado con cáncer de mama entre los 51 y 59 años.</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Un caso de cáncer de mama bilateral mayor de 40 años.</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Un caso de cáncer de mama en varón mayor o igual a 65 años.</b></li> </ul>

**Tabla 3.** Criterios de selección de pacientes para el test genético basados en las recomendaciones de la SEOM.

Una vez realizado el estudio de secuenciación y grandes reordenamientos en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, y según las evidencias mostradas hasta el momento, se seleccionaron para ampliar el estudio genético al gen *RAD51C* aquellas familias con cáncer de mama y/o ovario y aquellas en las que había algún caso de cáncer de mama bilateral (35,91). Sin embargo, para el análisis de *RAD51D* solo se seleccionaron aquellas familias con fenotipo de cáncer de mama y ovario, ya que todos los estudios realizados previamente sobre familias con fenotipo de cáncer de mama exclusivamente no han detectado ninguna variante patogénica(40,147). **Tabla 4 y 5.**

Estudio de <i>RAD51C</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumplir criterios de inclusión para el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No presentar ninguna variante patogénica ni ningún gran reordenamiento en los <i>BRCA1</i> o <i>BRCA2</i>.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presentar el caso índice o algún familiar cáncer de mama bilateral.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presentar el caso índice o algún familiar un caso de cáncer de ovario.</li> </ul>

**Tabla 4:** Criterios de selección para el análisis de *RAD51C*.

Estudio de <i>RAD51D</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumplir criterios de inclusión para el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No presentar ninguna variante patogénica ni ningún gran reordenamiento en los <i>BRCA1</i>, <i>BRCA2</i> o <i>RAD51C</i>.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presentar el caso índice o algún familiar un caso de cáncer de ovario.</li> </ul>

**Tabla 5:** Criterios de selección para el análisis de *RAD51D*.

## 1.2 Características clínicas e inmunohistoquímicas de los pacientes

A los pacientes clasificados como portadores *BRCA1*, portadores *BRCA2* o *BRCAX*, tras la consulta de las historias clínicas, se valoró la siguiente información:

### 1.2.1 Información detallada de la historia oncológica del cáncer de mama y/u ovario del caso índice:

- Evaluación del riesgo según criterios clínicos
- Tipo de cáncer
- Edad del diagnóstico
- Histología del cáncer de mama y/u ovario
- Estadificación: de T (tamaño o extensión del tumor primario), N (grado de diseminación a los ganglios linfáticos) y estadio del tumor en cáncer de mama según *American Joint Committee on Cancer* (148) y el estadio del tumor en cáncer de ovario según *FIGO Staging System* (149).
- Inmunohistoquímica de los cánceres de mama: receptores estrogénicos, receptores Her-2/neu (HER) y clasificación molecular. En el caso de los receptores Her-2/neu se consultó el método de *herceptest* y si éste daba un resultado ambiguo (2+) se confirmó mediante análisis con *fluorescence in-situ hybridation* (FISH). Por lo que se refiere a la

clasificación molecular, sobre la base de los perfiles de inmunohistoquímica, los cánceres de mama fueron clasificados de acuerdo con los siguientes subtipos moleculares: *luminal A* (RE+ y/o RP+, HER-), *luminal B* (RE+ y/o RP+, HER+), *HER2 positivo* (RE- y RP-, HER+) y *triple negativo* (RE-, RP-, HER2 -) (150).

En los casos de cánceres de mama bilaterales se registraron los datos clínico-patológicos tanto del primer tumor como del cáncer contralateral. Algunos datos no pudieron ser recopilados por ausencia de la información en la fuente consultada.

### 1.2.2 Información del tipo de cáncer de la historia familiar en los familiares

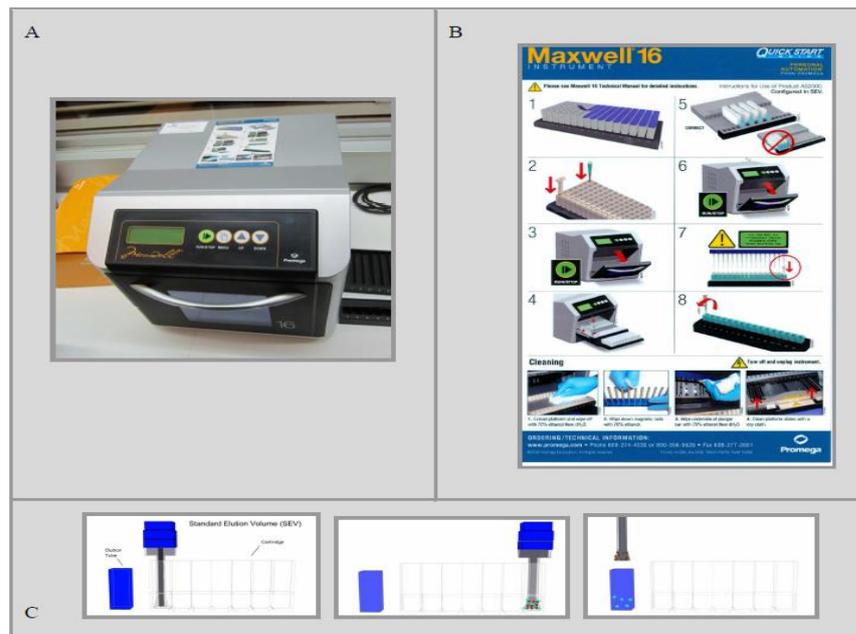
En el caso de estar afectados los familiares del caso índice en estudio, se registraron el tipo de cáncer y la edad de diagnóstico.

Para recoger toda esta información se revisó la historia clínica informatizada del paciente mediante el programa SELENE®, haciendo uso de la plataforma AGORA® para obtener información no registrada en el Hospital Clínico Virgen de la Arrixaca. Para obtener información de las primeras familias incluidas en el estudio fue necesaria la revisión de las Historias Clínicas almacenadas en el archivo del hospital. Para la información referente al fenotipo familiar fue necesaria una entrevista personal llevada a cabo en las consultas de consejo genético del servicio de Oncología.

## 2. Extracción de ADN

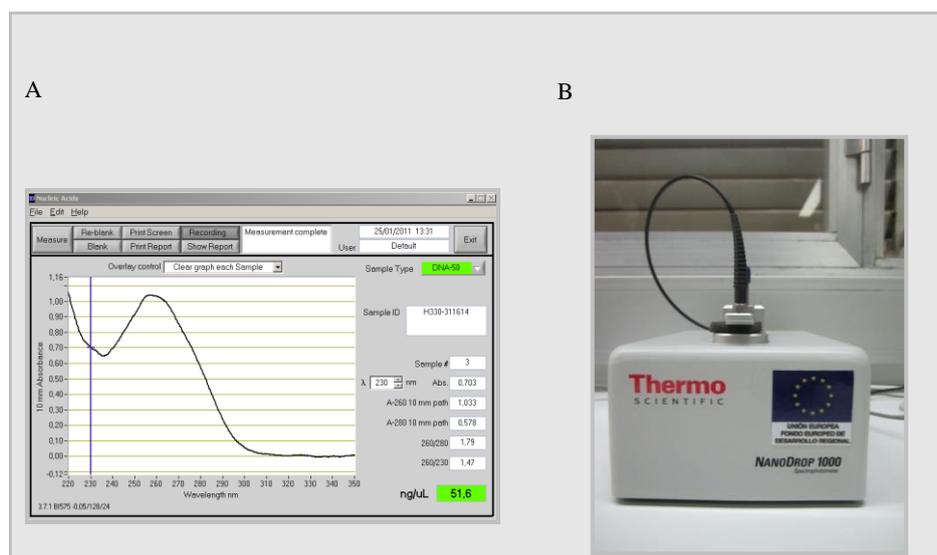
Se extrajo el ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico de todos los casos índices y sus familiares mediante el sistema automático de Promega (*Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit*) (**Figura 20**) a partir de 400µL de sangre periférica, extraída en tubo con anticoagulante EDTA.

La técnica se basa en la actuación de unas partículas paramagnéticas que funcionan como una fase sólida móvil que optimiza la captación, lavado y elución de la muestra. El equipo transporta estas partículas paramagnéticas a través de los reactivos de purificación de los cartuchos y se mezclan durante el proceso de purificación.



**Figura 20.** A. Maxwell 16 System. B. Guía de utilización del Maxwell 16. C Esquema detalle de la extracción de ADN.

Se midió la concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría utilizando el equipo de *Thermo Scientific*, *Nanodrop 1000* (**Figura 21**). Para valorar la concentración, se determinó a una absorbancia (A) de 260 nm, a la que absorben los ácidos nucleicos. Se determinó la relación A260/A280 nm con la finalidad de obtener la calidad del ADN extraído, considerándose un ratio entre 1,5-1,8 como aceptable.



**Figura 21:** A. Curva de absorbancia de una muestra de ADN. B. *Nanodrop 1000* (Termo).

Las muestras de ADN se almacenaron a una temperatura de -20°C incluyéndose en la genoteca del Laboratorio de Diagnóstico Genético.

### 3. Amplificación y purificación de ADN genómico

#### 3.1 Amplificación de los exones

Utilizamos como secuencia de referencia del gen *RAD51C* la isoforma a, la más larga (NM\_058216.1, MIM \*602724). Del gen *RAD51D* utilizamos también la secuencia de la isoforma más larga (NG\_031858.1, MIM\*602954).

Se amplificaron cada uno de los exones y regiones flanqueantes de los genes mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los cebadores o *primers* utilizados para la amplificación y secuenciación de *RAD51C* y *RAD51D*, las temperaturas de anillamiento o *annealing* ( $T^{\circ}a$ ) y el tamaño de los amplicones vienen detalladas en las **Tablas 6 y 7**, respectivamente.

Exón	$T^{\circ}a$	Cebador	Tamaño del amplicón (pb)
1	58 $^{\circ}$	F 5'-T AGCAGAATCTAACGGAGACT-3' R 5'-ACAAGACTGCGCAAAGCTG-3'	294
2	58 $^{\circ}$	F 5'- TCCACTCCTAGCATCACTGTT -3' R 5'- CCCACCCTTAAAAGGAGAAC -3'	399
3	60 $^{\circ}$	F 5'-TCATGATTTGGTTGTTTGTTCATC-3' R 5'- GGTCTCAGATGGGCACAAAT-3'	274
4	60 $^{\circ}$	F 5'- TGCCAATACATCCAAACAGG-3' R 5'- CAGGCAAACGCTATTTTGAC-3'	249
5	60 $^{\circ}$	F 5'- TCTTGAGAGAGAGAGCATT-3' R 5'-CAGGCAAACGCTATTTTGAC-3'	299
6	62 $^{\circ}$	F 5'- TGGGGTTTCACAATCTTGG-3' R 5'- GTCTGCTTTCATGAAGCGTATAGT-3'	251
7	60 $^{\circ}$	F 5'- TCTTGAGAGAGAGAGCATT-3' R 5'- GTCTGCTTTCATGAAGCGTATAGT-3'	243
8	62 $^{\circ}$	F 5'- ACGGGTAATTTGAAGGGTGT-3' R 5'- AGCATCAAAAGCTGTCCTCA-3'	362
9	62 $^{\circ}$	F 5'- GCCTGGCCCTAGAATAAAGT-3' R 5'- GGTATTTTCCCATTCACCTCA3-3'	341

**Tabla 6:** Cebadores del gen *RAD51C*.  $T^{\circ}a$ : Temperatura de hibridación recomendada. Secuencia de referencia de *NCBI* NM\_058216.1.

Exón	Tª a	Cebador	Tamaño del amplicón (pb)
1	58º	F 5'-TGTCCTCTCTAGGAAGGGGTA-3' R 5'-AGGTATGCCAGGGCAGTG-3'	275
2.1	58º	F 5'- AGGCCCCAGTCCTCTCTG-3' R 5'- AGACAAGCCACATTCTGAGC-3'	103
2.2	58º	F 5'-TGGTGGACCTGGTTTCTGC-3' R 5'- AGACTCAGTTTGAATGTG-3'	103
3	58º	F 5'- TTTGTTGCTGAGCAGTCTGG-3' R 5'- CCTCTGCCTCTCTCCTTCT-3'	195
4	58º	F 5'- TTTTCCCCTGTCTTCCTCCT-3' R 5'-ACCACCCTCACCCCTAAATC-3'	185
5	58º	F 5'- CCATCTGGACCCTCTCTGAA-3' R 5'- GGGGTTTTCTGTGCAGAA-3'	237
6	58º	F 5'- CCCCTACTCCCTTTATCC-3' R 5'- AGTAGGACACCTGCCACAG-3'	223
7	58º	F 5'- GCTGACAGGTTTATGAGTGC-3' R 5'- GCCAGAGACCAGACTCCAGA-3'	203
8	58º	F 5'- CCTCCCTCTCTGCTTCTCCT-3' R 5'- TTTGGGGTTCAGAAGCTGAC-3'	188
9	58º	F 5'- AGCATTATGGATCTGTAAGTCTGTT-3' R 5'-CCTCCAGGGCCCAAGATTA-3'	245
10	58º	F 5'- GAGGCTGAAACCTTGCAACT-3' R 5'-CAGGCGTTACTGGGAAGAAA-3'	231

**Tabla 7:** Cebadores del gen RAD51D. Tª a: Temperatura de anillamiento recomendada. Secuencia de referencia de NCBI NG\_031858.1.

Las reacciones de amplificación se realizaron para cada uno de los genes según la **Tabla 8 y 9**.

PCR	V (µL)	[Final]
H <sub>2</sub> O	10,875	-
Buffer (5x)	5	1x
DNTP's (2mM)	2,5	0,2mM
Cl <sub>2</sub> Mg (25Mm)	2	2mM
Cebardor F + R (10Mm)	1+1	0,4µM
Taq (0,5 U/µL)	0,125	0,625U
DNA (20ng/µL)	2,5	50ng
<b>Vol. total</b>	<b>25</b>	

**Tabla 8.** Reacción en Cadena de la Polimerasa RAD51C.

PCR	V (µL)	[Final]
H <sub>2</sub> O	8.4	-
Buffer (5x)	5	1x
DNTP's (2mM)	2,5	0,2mM
Cl <sub>2</sub> Mg (25Mm)	1.5	1.5mM
DMSO (99.9%)	2.5	10%
Cebardor F + R (10Mm)	1+1	0,4µM
Taq (0,5 U/µL)	0,125	0,625U
DNA (20ng/µL)	2,5	50ng
<b>Vol. total</b>	<b>25</b>	

**Tabla 9.** Reacción en Cadena de la Polimerasa RAD51D.

Se utilizaron los modelos de termociclador: 2720 *Thermal Cycler* de *Applied Biosystems*, *GeneAmp PCR System 9700* y modelo *Veriti* de la misma casa. El kit enzimático escogido para las amplificaciones es el kit de *Promega Go Taq Hot Start polymerase*. La enzima de *Promega* necesita un tiempo de activación menor que otras de las que están disponibles en el mercado, además reduce la formación de productos inespecíficos y la formación de dímeros de cebadores. En el caso de la PCR de amplificación de *RAD51D*, se introduce dimetilsulfóxido (DSMO) como agente reductor de estructuras secundarias del ADN para un mejor rendimiento de la reacción.

La PCR se realizó en varias fases dentro del termociclador; en primer lugar se realizó una fase de reactivación de la polimerasa, seguida de una repetición de ciclos que constan de desnaturalización de hebra molde, anillamiento del cebador y tiempo de extensión; por último una fase de extensión final. Para agilizar el proceso, se agrupan todos cebadores en 3 temperaturas de hibridación (58°C, 60°C y 62°C) (**Tabla 10**).

Activación	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final	Conservación
94°C	94°C	T <sub>a</sub> *	72°C	72°C	4°C
2'	1'	45''	45''	7'	∞
		35 Ciclos			

**Tabla 10:** Programa de amplificación *RAD51C* y *RAD51D*. \*T<sub>a</sub>: Temperatura de hibridación específica de cada par de cebadores.

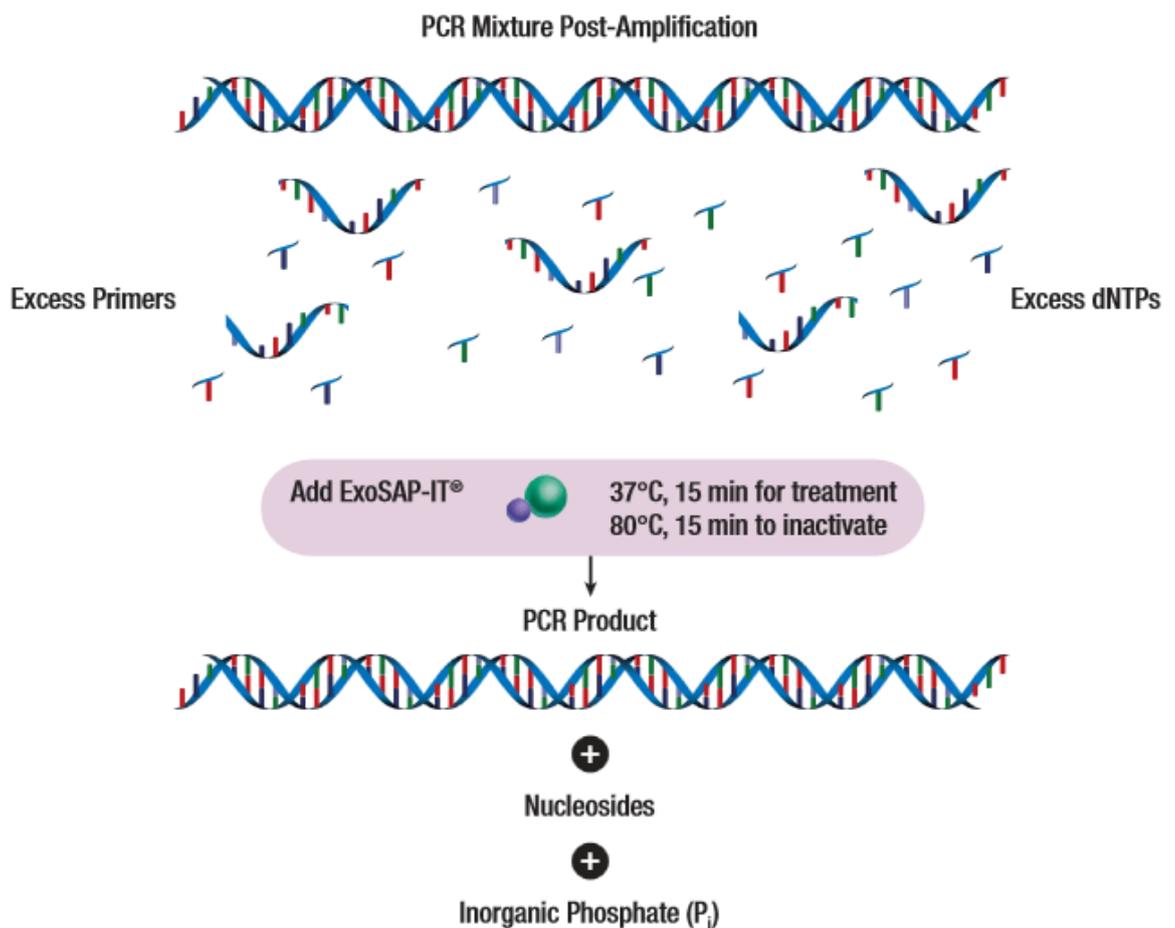
### 3.2 Verificación de la amplificación

Para verificar la correcta amplificación de los fragmentos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con tampón TBE 1X (Tris 89mM –ácido bórico 89 mM–EDTA (2mM) a pH 8,4. Bio-Rad (161-0770)) utilizando para el revelado *GelRed* (0,1 µL *GelRed*/1µL gel) (*GelRed Nucleic Acid Gel Satin*, 10000X in Water. Catalog number: 41003. Biotium), una solución de tinción fluorescente de ácido nucleico. Se carga aproximadamente 3µL de producto amplificado junto con 1 µL de tampón de carga (0,25% (W/V) azul de bromofenol, 0,25% (W/V) cianol xileno, 30% (V/V) de glicerol en agua). El tamaño de las muestras se comparó con un marcador de tamaño de peso molecular (*pGEM DNA Markers. Promega*) Se utilizaron para el revelado el trasiluminador *Alpha*

Innotech y la cámara PowerShot A640 AiAF de Canon y un nuevo sistema de revelado y captación de imágenes T:Genius de Syngene.

### 3.3 Purificación de los amplicones

A continuación se purificaron los amplicones mediante un método enzimático, con el kit *Exosap-It*. Este kit incluye dos enzimas, la exonucleasa I, que elimina las cadenas simples de ADN residuales que se puedan formar en la PCR o restos de cebadores y una fosfatasa alcalina que elimina los restos de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP). Se mezclaron 5  $\mu$ L del producto de reacción de PCR con 2  $\mu$ L de *Exosap-It*, se incubó 15' a 37  $^{\circ}$ C y seguidamente 15' a 80  $^{\circ}$ C en un termociclador para la inactivación de la enzima.



**Figura 22:** Reacción enzimática para la purificación del producto de PCR.

#### 4. Secuenciación automática directa

Se utilizó la secuenciación automática por electroforesis capilar como técnica de detección de alteraciones en la secuencia de los genes candidatos. Se realizó una nueva PCR con el amplicón purificado empleando el Kit *BigDye Terminador (BDt) v1.1* de *Applied Biosystems*, una adaptación de la reacción enzimática dideoxi de *Sanger (1977)*. Las secuencias se analizan por electroforesis capilar en el equipo ABI3130, un analizador de cuatro capilares (*Applied Biosystems*).

Para la reacción de secuenciación utilizamos los mismos cebadores que para la PCR pero a una concentración de 3,2  $\mu\text{M}$ . Se trabaja con un volumen final de 5  $\mu\text{L}$  (**Tabla 11**).

Reacción de secuenciación	Vol ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O	1,5
Buffer enhancer sequencing (10X)	1,5
Big Dye	0,5
Cebador F ó R (3,2 $\mu\text{M}$ )	0,5
Amplicón purificado	1
<b>Vol. Total</b>	<b>5</b>

**Tabla 11:** Reacción de secuenciación

El programa del termociclador que se utilizó para la reacción de secuenciación consta de desnaturalización, seguido de 25 ciclos de tres temperaturas, terminando a 4 °C indefinidamente (**Tabla 12**).

Desnaturalización	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Conservación
96°C	94°C	50°C	60°C	4°C
1'	10''	5''	4''	$\infty$
	<b>25 Ciclos</b>			

**Tabla 12:** Programa de secuenciación.

#### 4.1 Purificación de los productos de secuenciación

Tras la reacción de secuenciación se eliminaron los restos de dNTP's sobrantes y posibles impurezas. Este procedimiento se puede llevar a cabo mediante dos Kits diferentes pero ambos están basados en la descripción de *Sambrook y col.* (1989) de filtración de ADN en gel para separar fragmentos de más de 16 pares de bases (pb) de restos de dideoxinucleótidos marcados, dNTP's y otras sales o compuestos de bajo peso molecular (elimina hasta el 98% de sales presentes).

En primer lugar podemos utilizar las columnas *EdgeBio [Performa DTR (Dye Terminator Removal)]*. *Gel Filtration Cartridges*. El protocolo a seguir se detalla a continuación. Se centrifugan las columnas a 3000 rpm durante 2 minutos. Se retira el agua restante y colocamos la columna en un vial de 1,5 ml nuevo. Añadimos a los 5 µL de la reacción de secuenciación 10 µL de agua miliQ, el volumen final (15µL) lo depositamos en el centro de la columna. Volvemos a centrifugar a 3000 rpm durante 2 minutos. Al producto eluido se le añaden 10 µL de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*) que desnaturaliza la doble hebra del ADN, seguidamente se traspasan las muestras purificadas a una placa de 96 pocillos (*MicroAmp™. Optical 96-Well Reaction Plate. AppliedBiosystems*) adaptada para el secuenciador.

Cuando el número de muestras era elevado se utilizaron las placas de columnas de *Quiagen [DyeEx® (96 pocillos)]*. Se centrifugaron las placas a 1000 g durante 1 minuto, después se añadió 300 µL de agua desionizada a cada una de las columnas y se volvió a centrifugar a 1000 g durante 3 minutos. Al mismo tiempo se lleva el volumen de reacción de secuenciación hasta 15µL. Una vez descartado el filtrado de las columnas se aplica el volumen de reacción a cada uno de los 96 pocillos de la placa y se vuelve a centrifugar a 1000 g durante 3 minutos, en esta última centrifugación se utiliza una placa de 96 pocillos (*MicroAmp™. Optical 96-Well Reaction Plate. AppliedBiosystems*) adaptada para el secuenciador, para recoger el eluido con las muestras ya purificadas. Se añaden 10 µL de formamida *Hi-Di (Applied Biosystems)* a cada pocillo, con el objetivo de desnaturalizar la doble hebra del ADN.

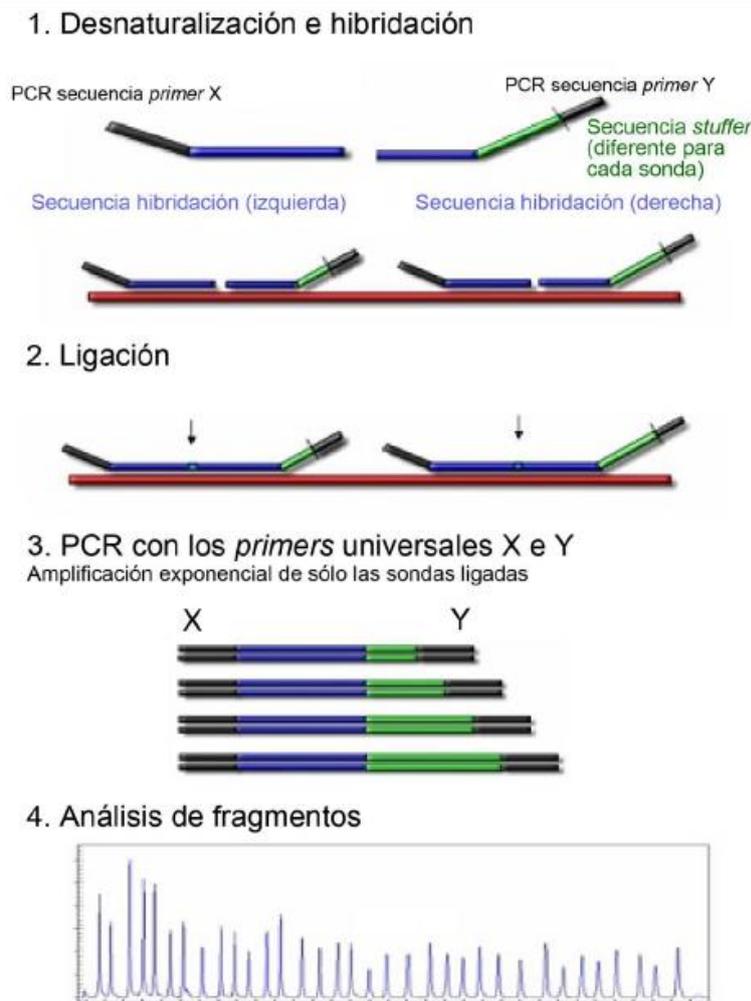
Las secuencias fueron analizadas por electroforesis capilar a través del equipo ABI3130, utilizando cuatro capilares de 50 cm y polímero POP7 (*Applied Biosystems*). Las

condiciones electroforéticas fueron las siguientes: tiempo de carrera 45 minutos, temperatura de 60°C y el tipo de análisis fue *Sequencing Analysis*.

Los análisis de las secuencias se realizaron con los soportes informáticos suministrados por la casa *Applied Biosystems: Foundation Data Collection v. 3.0, Sequencing Analysis v. 5.2 y Seqscape v. 2.5*.

## 5. Estudio de grandes reordenamientos

En la técnica *Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA)* para el estudio de estos reordenamientos usamos el kit *SALSA MLPA probemix P260-B1 PALB2-RAD50-RAD51C-RAD51D* de *MRC-Holland (Figura 23)*. Las sondas utilizadas en el kit para la detección de grandes reordenamientos génicos vienen indicadas en el **Anexo II**. Se optimizó la técnica en el termociclador *Eppendorf* que facilita opciones de programa que son necesarias en este caso.



**Figura 23:** Proceso descriptivo de MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*)

Para cada ensayo se incluyeron dos muestras como población control en las que no se había detectado ninguna mutación causal. El protocolo de la técnica de MLPA para la detección de grandes reordenamientos se compone de 5 pasos (**Tabla 18**).

<b>1. Desnaturalización de ADN e hibridación de sondas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desnaturalización de 5 µl de ADN (30 ng/µL) a 98°C.</li> <li>• Pausa a 25°C antes de abrir el termociclador</li> <li>• Adición de 1,5 µL de <i>SALSA probemix</i> y 1,5 µL de <i>MLPA buffer</i> a cada tubo. Mezcla.</li> <li>• Incubación a 95°C durante 1' seguida de 18 horas a 60°C (paso limitante debido a la evaporación del volumen de reacción, 8 µL).</li> </ul>
<b>2. Reacción de ligación</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bajada de temperatura hasta 54°C.</li> <li>• Añadir 32 µL de la mezcla de ligación (3 µL de <i>Ligase Buffer A</i>, 3 µL <i>Ligase buffer B</i> y 25 µL de agua miliQ. Se añade 1 µL de <i>Ligase-65</i> y se homogeneizó bien.</li> <li>• Incubación a 54°C durante 15' seguido de 5'a 98°C.</li> </ul>
<b>3. Reacción de PCR</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparación de <i>Master Mix polimerasa</i> (7,5 µL de agua miliQ, 2 µL de <i>SALSA PCR Mix</i> y de 0,5 de <i>SALSA Polymerase</i>)</li> <li>• Añadir 10 µL de la <i>Master Mix polimerasa</i> a cada muestra.</li> <li>• PCR de 35 ciclos de 30'' a 95°C, 30'' a 60°C y 60'' a 72°C. Finalmente se termina con una incubación de 20'a 72°C.</li> </ul>
<b>4. Separación de los productos de amplificación mediante electroforesis</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mezcla de 12 µL de Formamida <i>Hi-Di</i>, 1 µL de producto amplificado y 0,5 µL del marcador de tamaño utilizado, en nuestro caso <i>LIZ500</i></li> <li>• Desnaturalización a 86°C durante 3'.</li> <li>• Enfriamiento lo más rápido posible.</li> </ul>
<b>5. Electroforesis capilar en modo de análisis de fragmentos.</b>

**Tabla 13:** Etapas de la técnica de MLPA.

## 5.1 Análisis de fragmentos

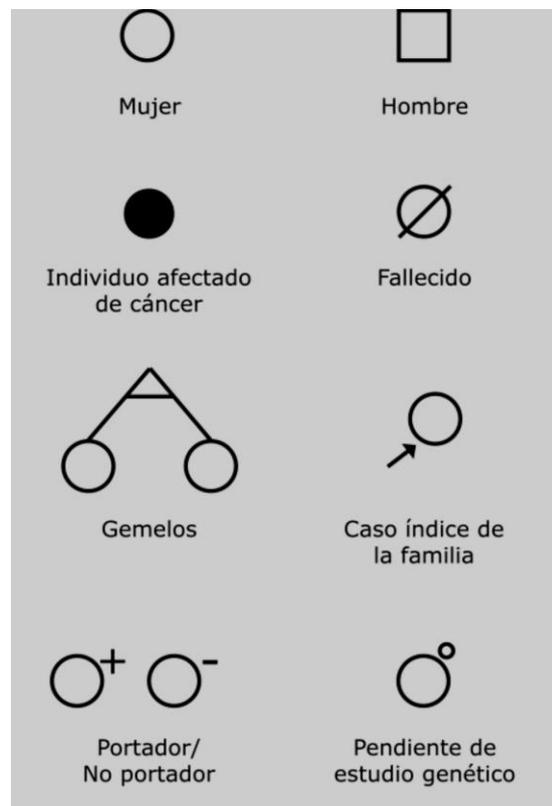
En este paso se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Electroforesis capilar con el analizador ABI3130 (*Applied Biosystems*).
- b) Análisis y visualización de los resultados con el software *GeneMapper v. 4.0* (*Applied Biosystems*). En la que deberemos tener en cuenta:
  - Fragmentos de control "DQ" (*DNA quantity*). Los cuales dan lugar a productos de amplificación de 64, 70, 76, 82 pb. Estos fragmentos sirven de control, ya que serán más evidentes si la cantidad de ADN de las muestras es muy baja. Estos fragmentos no requieren reacción de ligación para ser amplificados, por lo que son visibles incluso cuando falla la etapa de ligación.
  - Fragmentos de control "DD" (*DNA denaturation*) de 88, 92 y 96 pb. Fragmentos que consisten en dos sondas sintéticas, cuyo propósito es avisarnos de que el ADN no se ha desnaturalizado por completo. Los fragmentos de 88 pb y de 96 pb son específicos de secuencias que se localizan en islas CpG muy difíciles de desnaturalizar. Si los productos de amplificación de éstos son menos de un 40% de los fragmentos 92 y 127-454 pb, entonces la desnaturalización de ADN de las muestras puede haber sido incompleta y nuestros resultados poco fiables.
- c) Análisis de perfil de picos. Se abrieron como un archivo Excel y se eliminaron los picos sobrantes que no correspondían a ningún locus control ni a ningún exón. Mediante una plantilla de análisis se normalizaron las áreas relativas con respecto a las áreas de los controles sanos. A continuación, se comprobó la existencia de una posible amplificación o delección de un gen. Utilizamos los rangos de referencia indicados por la casa comercial (*MRC Holland*), considerando por debajo de 0,6 sospechoso de delección y por encima de 1,4 de duplicación, utilizando siempre dos controles sanos como referencia. Ambos se tendrían que confirmar posteriormente. Debemos tener en cuenta que quizás algunos SNPs interfieren en la hibridación de alguna sonda y pudiera generar un falso positivo.

## 6. Nomenclatura de las variantes y simbología de los árboles genealógicos

La nomenclatura de las distintas variantes localizadas sigue la normativa propuesta por la *Human Genome Variation Society (HGVS)* (<http://www.hgvs.org/>).

En la **Figura 24** se indican los símbolos utilizados en la elaboración de un árbol genealógico: los varones se representan como cuadrados y las hembras como círculos. Los individuos afectados de algún tipo de cáncer se indican rellenando los cuadrados o los círculos de color negro. La línea diagonal indica que el individuo está fallecido. Dos individuos unidos por una línea transversal en la parte superior indican que éstos son gemelos univitelinos. El caso índice se indica con una flecha, y éste no tiene necesariamente que estar afectado, sino que puede que simplemente consulte por la presencia de antecedentes familiares. El símbolo + indica que es portador de la variante patogénica, mientras que el símbolo – se refiere a no portador. Los pequeños círculos hacen referencia a que el paciente está pendiente del estudio genético.



**Figura 24.** Simbología empleada en la configuración de los árboles genealógicos.

## 7. Análisis de las variantes

Se realizó una búsqueda exhaustiva de todas las variantes encontradas, para lo cual se utilizaron las siguientes bases de datos, con el objetivo de comprobar si estas habían sido previamente descritas además de conocer su significado patogénico:

- *Human Gene Mutation Database (HGMD)* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Existe información sobre gran cantidad de enfermedades hereditarias. Nos permite conocer citas bibliográficas de cada variante, analiza las propiedades biofísicas de los aminoácidos sustituidos, realiza análisis de conservación (PSI-BLAST) y calcula predicciones de algunos estudios *in silico* (SIFT y MutPred).
- *Leiden Open Variation Database (LOVD)* (<http://www.lovd.nl/3.0/home/>). Se trata de una base de datos pública desarrollada por *Leiden University Medical Center* en Holanda. Tiene información sobre una gran cantidad de genes e importante información sobre citas bibliográficas, además está diseñada para recopilar datos sobre los individuos en los cuales ha sido hallada la variante.
- *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Plataforma pública estadounidense referente mundial en información biomédica y genómica. La cantidad de recursos que el NCBI pone en línea a disposición del público son realmente amplios, tanto en número como en los ámbitos de conocimiento que cubren. Tiene gran cantidad de bases de datos según la información y características de la búsqueda. Utilizamos la base de datos *dbSNP* (repositorio central tanto para sustituciones como pequeñas eliminaciones e inserciones de bases de nucleótidos únicos) para obtener información sobre el posible efecto fisiopatológico de la variante y de su frecuencia en población europea (a través de la información *de Haplotype Map; HapMap*). *dbSNP* También almacena variaciones raras y comunes con sus genotipos y frecuencias alélicas, e incluye tanto variantes clínicamente significativas en humanos como polimorfismos benignos. Actualmente cuenta con 53 millones de *RefSNP clústers* (o códigos rs, que son los códigos únicos de identificación de las variaciones una vez procesadas tras su envío). Originalmente fue creada para dar soporte al descubrimiento de polimorfismos

a gran escala, como el del proyecto *HapMap*, pero enseguida fue considerado como repositorio mundial también para otros tipos de variaciones.

- *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>). Otra muestra de los enormes esfuerzos públicos por proveer de recursos genómicos a la comunidad científica es el del proyecto *Ensembl* que, aunque con enfoque particular en el genoma humano, contiene información de otros genomas cordados de muchos organismos modelos como el ratón, la rata o el pez cebra. El proyecto comenzó en 1999 con el fin último de anotar automáticamente el genoma, integrar dicha anotación con otros datos biológicos disponibles, y publicar toda esta información en línea y de manera gratuita, algo que viene haciendo desde el 2000. Actualmente, en su versión *Ensembl Release 68*, disponen de información de 70 especies distintas. La cara más visible del proyecto es su visor genómico y su repositorio de recursos genómicos integrados, cuya densidad varía en función de la especie, siendo las de mayor completitud la de humano, ratón, rata y pez cebra, precisamente los genomas más consultados. Todas las especies disponen de anotaciones genéticas basadas en evidencias, así como de recursos de genómica comparativa, incluyendo alineamientos y relaciones de homología, ortología y paralogía. Todas estas anotaciones se integran con una enorme cantidad de fuentes externas de referencia, lo que convierte a *Ensembl* como un recurso integrador único.

Tras la búsqueda exhaustiva en todas estas bases de datos, clasificamos las variantes de la siguiente manera (ver algoritmo en **Figura 25**):

- **Variantes patogénicas (VP)**: serían aquellas variantes con información contrastada de su patogenicidad en las distintas bases de datos.
- **Variantes probablemente patogénicas (VPP)**: Aquellas de nueva descripción que causan un codón de parada prematuro y truncamiento de la proteína o aquellas que presentan una clara cosegregación con la enfermedad y/o están ausentes en controles sanos o en una extensa cohorte de pacientes (frecuencia en la población <1%). Las nuevas variantes encontradas son frecuentemente

clasificadas como UVs debido a la falta de información sobre la frecuencia de la variante en la población en la población general.

- **Variantes de efecto clínico desconocido (UVs):** Aquellas variantes en las que se desconoce todavía su clasificación por falta de estudios que lo corroboren y, además, que no cumplan los criterios de probabilidad de no patogenicidad propuestos.
- **Variantes probablemente no patogénicas (VPNP):** Aquellas variantes que han sido descritas previamente, presentan una frecuencia en la población  $<1\%$  y que se consideran neutras desde el punto de vista de los métodos de predicción de patogenicidad.
- **Variantes no patogénicas o polimorfismo (VNP):** Son aquellas es las que la frecuencia en al población general es  $>1\%$  y no presentan ninguna sospecha de patogenicidad.

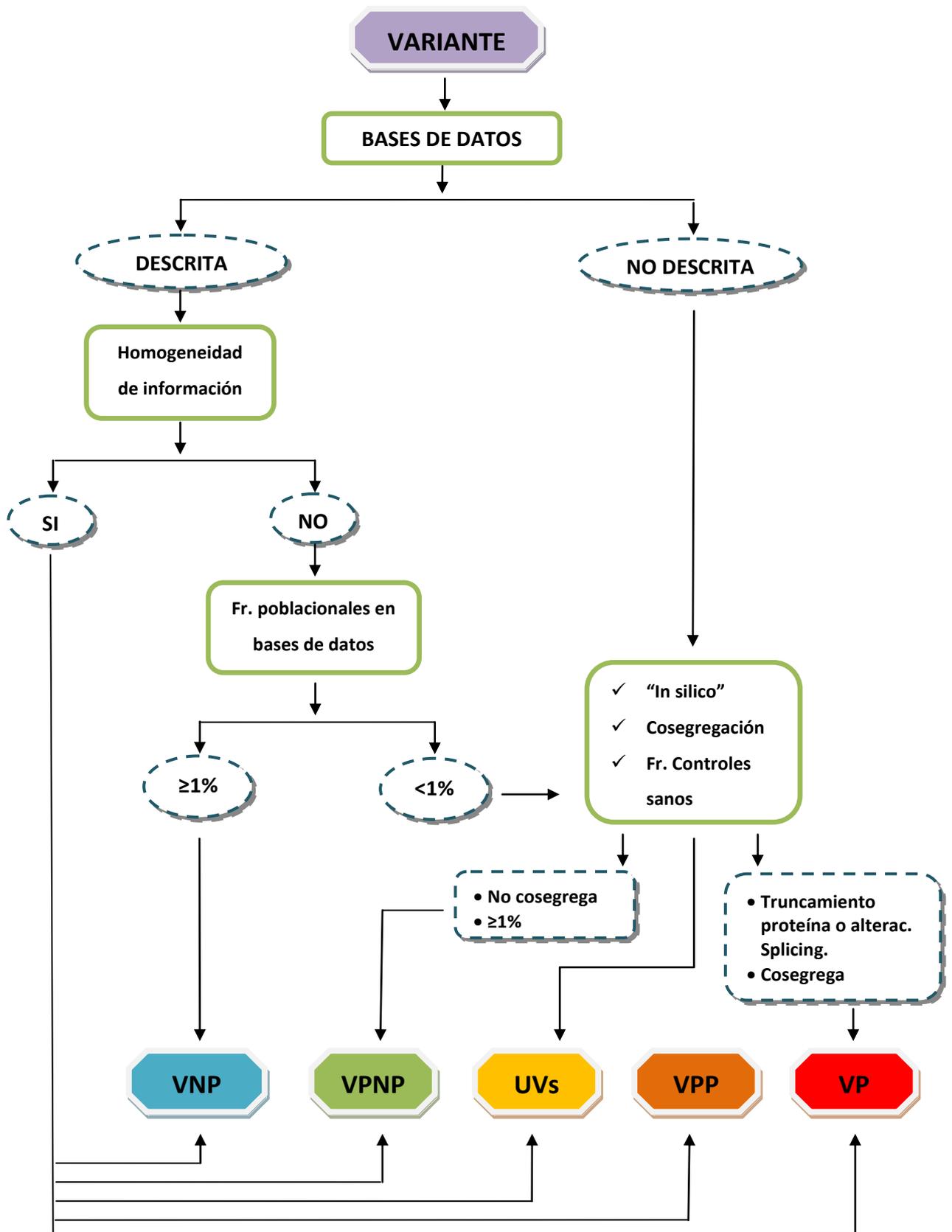


Figura 25: Algoritmo usado para la interpretación de las variantes detectadas en este estudio. Modificado de LMM: *Laboratory for Molecular Medicine* y LSDBs: *Locus Specific Databases*, bases de datos.

## 8. Análisis bioinformático: métodos *in silico*

Hoy en día, existen varias herramientas bioinformáticas, métodos *in silico*, disponibles que pueden predecir las consecuencias de las variantes genéticas en la estructura y función de las proteínas. Estos métodos *in silico* estudian varias características como son los cambios en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos sustituidos, el grado de conservación evolutiva, el entorno de la secuencia de un aminoácido afectado o la alteración en las propiedades estructurales de la proteína.

A continuación presentamos algunas de estas herramientas *in silico* según el algoritmo bioinformático utilizado.

### 8.1 Propiedades de los aminoácidos sustituidos

#### Grantham matrix score (GMS)

La GMS se trata de una medida compuesta por el grado de sustitución de aminoácidos, teniendo en cuenta la composición de la cadena lateral, la polaridad, y el volumen molecular de los dos aminoácidos (151). Los tres parámetros se combinan en una fórmula que da el mejor ajuste con las frecuencias relativas con las que los aminoácidos pueden sustituirse mutuamente en diversas proteínas de diferentes especies. Cuanto mayor es la puntuación, mayor es la “distancia” biofísica entre los dos aminoácidos.

Los valores en la matriz *Grantham* varían sustancialmente, los cambios de aa fueron catalogados como conservados, moderadamente conservados, moderadamente disímiles y fuertemente disímiles, en función de los *scores* de *Grantham* (1974); 0-50, 51-100, 101-150 o >100 respectivamente.

### 8.2 Métodos de análisis de conservación

#### Align-Grantham Variation Grantham Deviation (Align-GVGD)

*Align-GVGD* (<http://agvgd.iarc.fr/>) es un algoritmo que combina las características biofísicas de los aminoácidos y el alineamiento de secuencias múltiples [*multiple sequence alignment* (MSA)] de proteínas para predecir dónde se clasifican las sustituciones *missense* de genes de interés en un espectro que va desde C0 (no conservado), C25, C35, C45, C55 ó C65 (muy conservado). *Align-GVGD* es una extensión de la desviación de *Grantham*

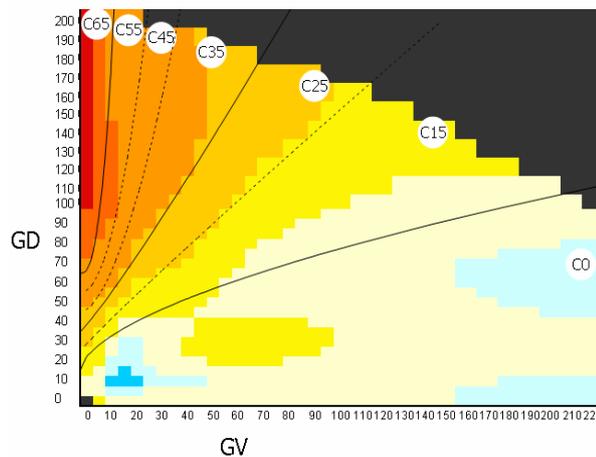
original hacia múltiples alineamientos de secuencias y verdaderas comparaciones múltiples simultáneas.

Calcula dos variables que, en conjunto, se relacionan con la severidad de la sustitución *missense*: *Grantham Variation (GV)* y *Grantham Deviation (GD)*. GV es una medida cuantitativa que mide el grado de variación bioquímica entre los aminoácidos que se encuentran en una posición dada en el MSA y GD es una medida cuantitativa de la distancia bioquímica entre la variante *missense* que estudiamos y el aa *Wildtype* en un determinado residuo. El grado de conservación de las variantes se hará tras el cálculo de estas variables.

En la **Tabla 14** y **Figura 26** se representan el significado de los diferentes resultados de GV, GD y las clases de conservación posibles de las variantes tras el cálculo de estas variables.

GV		GD		Grados de conservación
>100	Posiciones que no tienen limitación funcional	0	Variantes en la fama de especies que varían en esa posición proteica	C0
60-65	Límite superior de una variante conservada	60-65	Límite superior de una sustitución <i>missense</i> conservada	C25
0	El residuo es invariante en el alineamiento	>100	Sustitución radical del aminoácido	C35
				C45
				C55
				C65

**Tabla 14:** Significado de los resultados de GV, GD y los grados de conservación de *Align-GVGD*.



**Figura 26.** Gráfica de los grados de conservación de *Align-GVGD* en función de las variables GD y GV.

### Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)

El algoritmo *SIFT* (<http://sift.jcvi.org/>) es una herramienta que clasifica las sustituciones de aminoácidos en una proteína dada y predice si estos cambios provocarán un efecto fenotípico en la misma. *SIFT* se basa en la premisa de que los aminoácidos importantes de una proteína están conservados en la evolución, por lo que cambios en los mismos deben afectar a la funcionalidad de la proteína. Con una secuencia proteica dada, *SIFT* escoge proteínas relacionadas y obtiene un alineamiento múltiple de estas con la proteína a analizar, y basándose en los aminoácidos presentes en cada posición del alineamiento realiza una predicción de las sustituciones que afectarán a la función de la proteína. Las sustituciones en una posición conservada en el alineamiento serán consideradas como “no tolerables” para la mayoría de los cambios, mientras que las posiciones que no están conservadas en el alineamiento tolerarán mejor los cambios de aminoácido (152).

Se introduce la secuencia a analizar en formato FASTA y el programa primero busca secuencias similares a la introducida por nosotros, después escoge secuencias estrechamente relacionadas que puedan tener una función similar a la nuestra, y luego obtiene el alineamiento de las secuencias escogidas. Por último, calcula las probabilidades normalizadas para todas las posibles sustituciones del alineamiento. Las sustituciones con una puntuación menor de 0,05 serán clasificadas como deletéreas, y las de puntuación mayor o igual a 0,05 serán tolerables o neutrales.

### **8.3 Métodos bayesianos**

#### Polymorphism Phenotyping v2 (Polyphen-2)

La herramienta *Polyphen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) predice el impacto que puede causar una sustitución de un aminoácido en la estructura y/o función de una proteína humana mediante consideraciones comparativas.

Dada una sustitución de un aminoácido en una proteína, *PolyPhen-2* extrae varias características relacionadas con la secuencia y la estructura de donde se ha producido la sustitución e introduce estos datos en un clasificador probabilístico para obtener el grado de perjuicio que supone. Esta predicción se basa en reglas empíricas que se aplican a la secuencia, a la información filogenética y estructural que caracterizan la sustitución.

*PolyPhen-2* predice el significado funcional de la variación mediante un clasificador *Naïve Bayes*. Para ello hace uso de dos pares de conjuntos de datos con los que trabaja el clasificador. Por una parte, usa el conjunto de datos *HumDiv*, que está formado por los alelos dañinos causantes de enfermedades mendelianas que se encuentran en la base de datos *UniProtKB*, junto con las diferencias entre las proteínas humanas y sus homólogos mamíferos más cercanos. Por otra, está el conjunto *HumVar*, formado por las mutaciones causantes de enfermedades humanas que se encuentran en la base de datos *UniProtKB* y el conjunto *nsSNPs* (nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms), sin enfermedades dañinas asociadas. El clasificador *Naïve Bayes* obtiene la probabilidad de que una mutación sea dañina dando una tasa o estimación de falsos positivos (posibilidad de que una mutación sea clasificada como perjudicial cuando en realidad no lo es) y verdaderos positivos (una mutación es clasificada como perjudicial y lo es).

*Polyphen-2* clasifica a las variantes en una de estas tres categorías: benigna, posiblemente dañina y probablemente dañina, basándose en la probabilidad de patogenicidad dada por el clasificador de Bayes. La variante es considerada benigna cuando la probabilidad de patogenicidad es  $<0,15$ . Las variantes serán consideradas posiblemente dañinas cuando la probabilidad de patogenicidad este entre  $0,15$  y  $0,85$ . Por último serán considerada como probablemente dañina cuando la probabilidad de patogenicidad sea  $>0,85$ . Además el programa da una estimación de falsos positivos y falsos negativos.

#### Mutation Taster

*Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org/>), a diferencia de los algoritmos anteriores, además de analizar las variantes missense, es capaz de analizar las variantes sinónimas, no codificantes y pequeñas inserciones no superiores a 12 bases. En función de estos tipos de variantes se utilizan tres diferentes modelos de predicción: *Without\_aae*, está diseñado para las variantes sinónimas y no codificantes que no conducen a sustitución de aminoácidos pero podrían tener un efecto en el patrón de empalme de la transcripción; *Simple\_aae*, es para variantes *missense*; y *Complex\_aae*, para las variantes con efecto más complejo como *framshifts* o proteínas truncadas (153).

Utiliza un clasificador *Naïve Bayes* para predecir el potencial patológico de una alteración, el cual ha sido preparado con datos de variantes recopilados de diferentes

fuentes. El conjunto de datos que contiene las variantes neutrales es una selección de SNPs e inserciones de *dbSNP*. La selección de SNPs se basa en las frecuencias de la población en *Haplotype Map (HapMap)*, lo cual significa que la variante ha de encontrarse en al menos un 10% de la población. Este procedimiento de filtrado asegura que las variantes raras que podrían potencialmente causar enfermedades son excluidas. Los datos de variantes asociadas a enfermedad se han obtenido a partir de *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*, *Human Gene Mutation Database (HGMD)* y de la literatura.

Las características que han sido incluidas por el clasificador son: la conservación filogenética del lugar afectado, cambios en el sitio de *splicing*, *perdida* en las características de la proteína, cambios en el RNAm así como en el tamaño de la proteína.

Se introdujo en el programa informático la secuencia en formato FASTA, y a continuación, el cambio a estudiar, *Mutation Taster* clasifica a la variante como polimorfismo o como patogénica, basándose en la probabilidad de patogenicidad. Si la probabilidad está por debajo de 0,05 es clasificada como polimorfismo, si por el contrario está por encima se clasifica como patogénica. Además da un valor (p) que refleja la seguridad de la predicción.

#### **8.4 Redes neuronales artificiales (Neural network)**

Las redes neuronales artificiales NN (*neural network*), se han popularizado en medicina debido a su flexibilidad y dinamismo. Su estructura consta de varias capas y deben someterse a capacitación antes de ser funcionales (154).

##### *pMut*

*pMut* (<http://mmb2.pcb.ub.es:8080/Pmut/>) permite la predicción del carácter patológico de mutaciones *missense* basándose en las características de la secuencia y en un *software* de una o dos NN, que emplean bases de datos internas, predicción de estructura secundaria y conservación de la secuencia. Proporciona una respuesta afirmativa o negativa y un índice de credibilidad (155). El programa también permite el rápido escaneo de mutaciones puntuales a lo largo de toda la secuencia (análisis mutacionales *hotspots*), lo cual ayuda a detectar las regiones donde se espera que las mutaciones tengan un gran impacto patológico.

Se introdujo la secuencia proteica a estudiar en formato FASTA y se incluye la localización y el cambio aminoacídico que se produce. Predice un valor mayor de 0,5 como patológico, variando la fiabilidad entre 0 (fiabilidad baja) y 9 (altamente fiable).

## 8.5 Software de apoyo a decisiones (“decision-support software”)

### Alamut (versión 2.3)

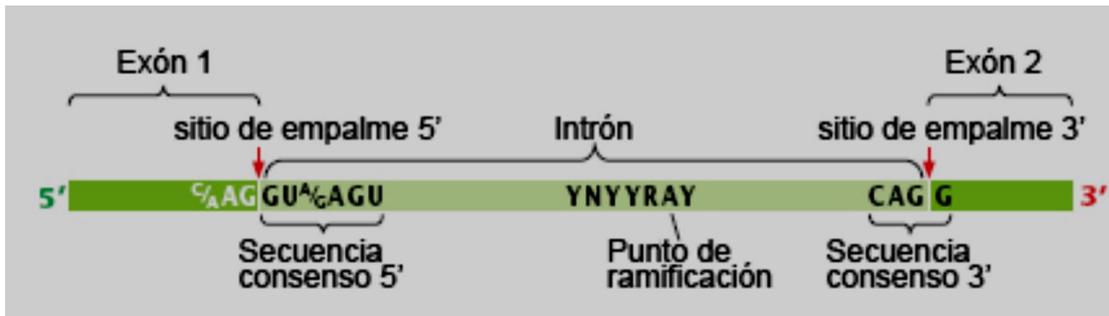
*Alamut* es una aplicación de software de apoyo a las decisiones desarrollada por Interactive Biosoftware, para el diagnóstico de mutaciones en la genética molecular en medicina. Es una aplicación que integra la información genética proveniente de diferentes fuentes para describir variantes utilizando la nomenclatura HGVS y ayuda a interpretar su condición patógena. *Alamut* obtiene su información genómica de *Ensembl* y la integra con datos de otras fuentes como *UniProt*, *dbSNP* y *PubMed*. Integra herramientas bioinformáticas tanto para variantes *missense* (*Align GVGD*, *SIFT*, *MutationTaster* y *PolyPhen-2*) como en predicciones del *splicing* en las distintas variantes, utilizando cinco algoritmos distintos: *SpliceSiteFinder (SSF)*, *MaxEntScan (MES)*, *NNSPLICE*, *GeneSplicer* y *Human Splicing Finder (HSF)*.

## 8.6 Estudio de variantes intrónicas

El procesamiento correcto de los intrones es un requisito imprescindible para la síntesis de una proteína. Variables genéticas que producen defectos en el *splicing* se han demostrado como causa de múltiples enfermedades hereditarias (156). El *splicing* es un proceso complejo en el que intervienen por una parte un complejo riboproteico conocido como *spliceosoma* y por otra parte multitud de señales presentes en la secuencia de ARNm.

Dentro de las señales presentes en el ARN, el sitio 5´(o donador), el sitio 3´(o aceptor) y el sitio de ramificación (*branch point*) definen los límites del exón y el intrón y están implicados directamente en la interacción con el *spliceosoma* y en las reacciones de procesamiento del ARNm.

La precisión de la escisión del intrón y la unión de los exones durante el empalme del preARNm se determina por el reconocimiento de secuencias de consenso bien conocidos, es decir, los sitios donadores 5´y los aceptores 3´, además del punto de ramificación (*branch point*) (**Figura 27**).



**Figura 27:** Secuencias consenso críticas presentes en el sitio de empalme 5', el punto de ramificación y el sitio de empalme 3'. En la secuencia consenso que rodea el punto de ramificación (YNYYRAY), Y es cualquier pirimidina, R es cualquier purina, A es adenina, y N es cualquier base.

Los programas utilizados para identificación de sitios donadores y aceptores de *splicing* y proteínas intervinientes (*Splice site Finder*, *MaxEntScan*, *Splice Site Prediction By Neuronal Network*), usan los conocimientos actuales en cuanto a la composición de secuencias en los sitios de empalme. Pero ejecutan diferentes algoritmos que permiten la identificación de secuencias, que por homología y grado de conservación con otras especies, pueden funcionar como donadores y aceptores de *splicing*, generando una matriz de puntuación en cada caso. Finalmente asignan un valor determinado a la probabilidad de que la posición estudiada esté en un sitio aceptor o donador, ayudando a predecir el efecto patogénico que puede tener la nueva mutación.

#### *Splice site Finder (SSF)*

*Splice site Finder (SSF)* (<http://www.umd.be/searchSpliceSite.html>) está basado en la utilización de una puntuación y un esquema de clasificación basado en tablas de peso de nucleótidos (*nucleotide weight tables*) (157).

#### *MaxEntScan (MES)*

*MaxEntScan* (MES) ([http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq.html](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)) se basa en el principio de máxima entropía y fue desarrollado por el Instituto Tecnológico de Massachusetts y descrito en (158). Utiliza grandes conjuntos de datos de los sitios de empalme humanos y tiene en cuenta las dependencias adyacentes y no adyacentes. Estos modelos de sitio de empalme asignan un log odd ratio (MAXENT score) a secuencias de 9

pb (sitio de empalme 5") o de 23 pb (sitio de empalme 3"). Cuanto más alta sea la puntuación, mayor es la probabilidad de que la secuencia sea un sitio de empalme verdadero(158) [235].

Splice Site Prediction By Neuronal Network (NNSsplice)

*Splice Site Prediction By Neuronal Network (NNSsplice)* ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)). Utiliza un método basado en redes neuronales que identifica patrones de secuencia, a la vez que realiza pruebas con un conjunto de señales de empalme reales. Cuanto mayor sea el conjunto de señales de empalme real utilizado, las predicciones obtenidas serán mejores(159).

Programas	Tipo de variantes analizadas	Método	website
<b>Align-GVGD</b>	<i>missense</i>	GV,GD	<a href="http://agvgd.iarc.fr/">http://agvgd.iarc.fr/</a>
<b>Pmut</b>	<i>missense</i>	Redes neuronales	<a href="http://mmb2.pcb.ub.es:8080/Pmut/">http://mmb2.pcb.ub.es:8080/Pmut/</a>
<b>SIFT</b>	<i>missense y nonsense</i>	Conservación de proteínas homólogas	<a href="http://sift.icvi.org/">http://sift.icvi.org/</a>
<b>Polyphen</b>	<i>missense</i>	Bayesianos	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/</a>
<b>Mutation Taster</b>	<i>missense, nonsense, silentes, deleciones (con ydesplazamiento del marco de lectura) e intrónicas</i>	Bayesianos	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a> .
<b>SSF</b>	Intrónicas y silentes	Tablas de peso de nucleótidos	<a href="http://www.umd.be/searchSpliceSite.html">http://www.umd.be/searchSpliceSite.html</a>
<b>MES</b>	Intrónicas y silentes	Principio de máxima entropía	<a href="http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html">http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html</a> .
<b>NNSsplice</b>	Intrónicas y silentes	Redes neuronales	<a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a> .

**Tabla 15:** Características de las herramientas bioinformáticas utilizadas en la predicción de patogenicidad de las nuevas variantes identificadas.

## 9. Reclutamiento de controles sanos

Con el fin de estudiar la frecuencia genotípica de variantes no descritas con anterioridad o de significado clínico desconocido en la población general, se reclutó un grupo de 150 pacientes sin antecedentes personales ni familiares de cáncer de mama y/o ovario de la Región de Murcia. Los pacientes reclutados fueron mujeres embarazadas que acudieron al área de extracciones del Hospital Clínico Virgen de la Arrixaca para la realización del *screening* de diabetes gestacional. Todos los pacientes incluidos como controles sanos fueron informados del objetivo del estudio y firmaron un consentimiento informado (**Anexo III**).

Se recogió una muestra de sangre periférica en un tubo de EDTA, posteriormente se realizó la extracción del material genético mediante el sistema automático de Promega (*Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit*) (**Figura 20**, página 63). Las muestras de ADN se almacenaron a una temperatura de -20°C incluyéndose en la genoteca del Laboratorio de Diagnóstico Genético.

El estudio de las variantes de interés se realizó por la adaptación del método Sanger, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación automática por electroforesis.

## 10. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas con una distribución normal se describieron mediante la media y la desviación típica. Mientras que las variables cuantitativas que no siguieron una distribución normal se describieron mediante media y rango. Las variables cualitativas se presentaron en forma de tabla incluyendo las frecuencias relativas y absolutas.

La condiciones de aplicación de los análisis estadísticos se verificaron previamente a los mismos. La normalidad se constató mediante el test kolmogorov-Smirnoff y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene. En caso de incumplimiento de alguna de las condiciones se procedió al análisis mediante pruebas no paramétricas.

La homogeneidad de la población con respecto a variables demográficas, antecedentes médicos y otros parámetros clínicos se analizó basalmente. Para las variables cuantitativas se desarrollaron comparaciones de pruebas no paramétricas de U-Mann-Whitney entre los

grupos de estudio. En el caso de variables cualitativas se compararon mediante el test exacto de Fisher o test de chi-cuadrado de Person, según el rendimiento del número de casos.

En todos los estudios, las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de  $p$  asociado a la prueba estadística de contraste era menor de 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *SPSS v20.0*.

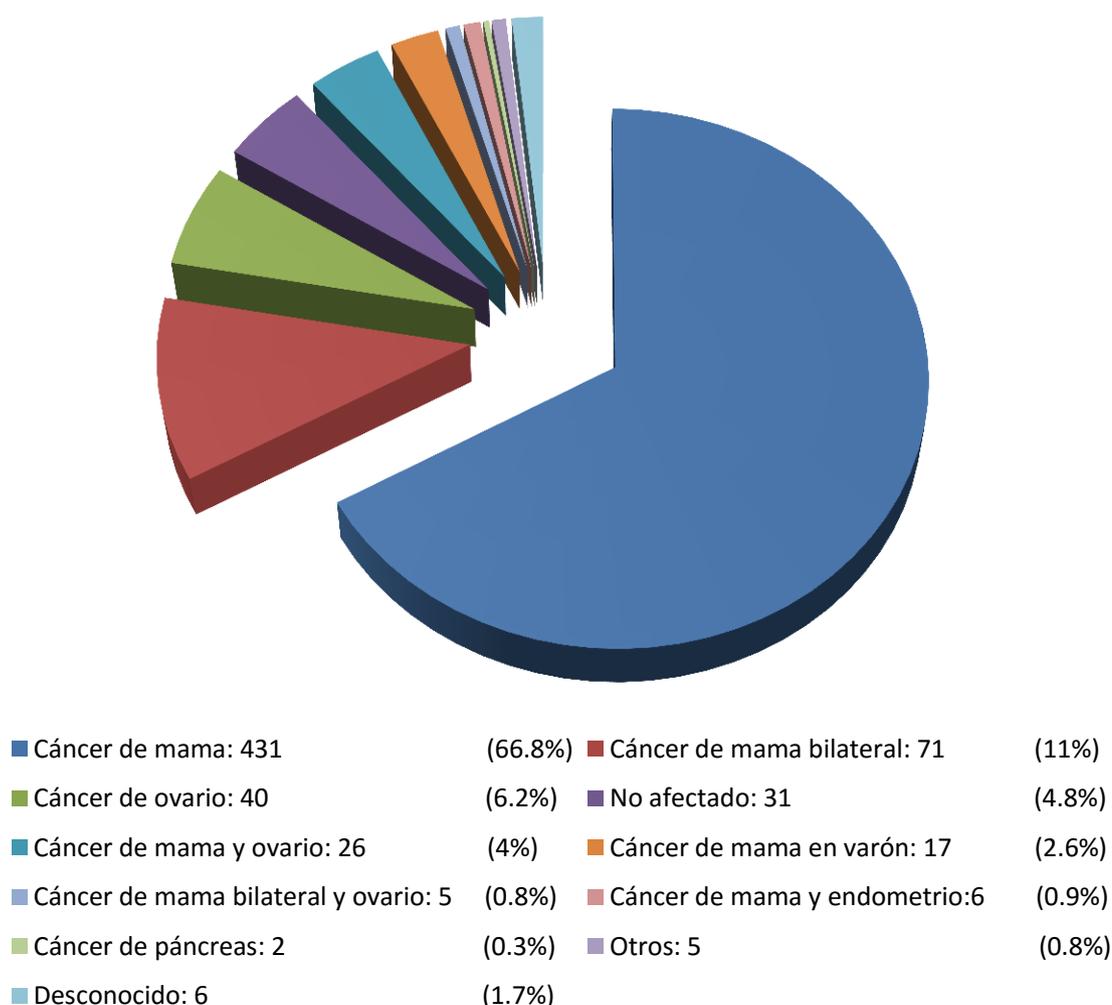


## **IV. Resultados**



## 1. Descripción clínica de las pacientes

Un total de 645 familias fueron remitidas desde la unidad de consejo genético para el estudio molecular de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. En relación al tipo de cáncer diagnosticado, más del 75% de los casos índice seleccionados estuvieron representados por cáncer de mama, presentando un mayor porcentaje el CM unilateral respecto al CM bilateral, con cifras del 66,8% y 11% respectivamente. Con respecto al cáncer de ovario se obtuvo una frecuencia del 6,2%, dándose coafectación con cáncer de mama en el 4% de los casos. También fueron registrados en menor proporción casos de cáncer de mama en el varón, cáncer de mama y endometrio, cáncer de páncreas y cáncer de mama bilateral y ovario (Figura 28).



**Figura 28:** Distribución de los casos índice según el tipo de cáncer.

En la **Tabla 16** se describen las características clínicas de los tumores de mama así como de los tumores de ovario de los casos índices incluidos. La edad media de diagnóstico en los tumores de mama fue siete años menor que la de los tumores de ovario,  $43,45 \pm 11,09$  años frente a  $50,64 \pm 13,99$ .

Los tumores de mama se presentan en su mayoría de forma unilateral, alcanzando el 86,3% de los casos, y solo un 13,6% lo hace de forma bilateral. Las neoplasias de ovario aparecen en coafectación con tumores de mama en un 29,5% de los casos.

En relación al subtipo histológico, los tumores de mama son predominantemente de subtipo ductal, incluyendo en este grupo el 87,7% de las neoplasias. En un número mucho menor, los subtipos histológicos lobulillares son el 6,2% de los casos y los medulares el 4%. Otras histologías como filoides, coloides, papilar, mucinosa o secretora, son menos frecuentes, representando entre todas ellas el 2,1% de los casos. Los tumores de ovario presentan una histología más heterogénea, aunque también existe un grupo con cierto predominio, el subtipo seroso representa el 47,2% de los casos. Con histología mucinosa se incluyen el 25% de los tumores y endometroide el 13,8%. Las histologías menos frecuentes en estos tumores son las células claras, con el 8,3%, los tumores transicionales y mullerianos que representan el 2,7% cada uno.

Los tumores de mama presentan al diagnóstico estadios poco avanzados, siendo el más frecuente el II-A con un 30,2% de los casos. Los tumores de ovario se diagnostican mayoritariamente en estadios de la escala FIGO avanzados, detectándose en estadio III-C el 34,2% de los casos y en estadio IV el 13,2% de los casos.

Cáncer de mama		Cáncer de ovario	
Año de diagnóstico (%)		Año de diagnóstico (%)	
Media	43,45 ±11,09 años	Media	50,64 ±13,99
<40 años	252 (46)	<50	38 (53,5)
>40 años	295 (54)	>50	33 (46,4)
Tipo Cáncer de mama (%)		Co-afectación	
CM unilaterales	480 (86,3)	Cáncer de ovario	40 (70,5)
CM bilaterales	76 (13,6)	Cáncer de mama y ovario	31 (29,5)
Subtipo histológico (%)		Subtipo histológico (%)	
Ductal	412 (87,7)	Seroso	17 (47,2)
Medular	19 (4)	Mucinoso	9 (25)
Lobulillar	29 (6,2)	Endometroide	5 (13,8)
Filoides	1 (0,2)	Células claras	3 (8,3)
Coloides	2 (0,4)	Transicional	1 (2,7)
Papilar	4 (0,9)	Mulleriano	1 (2,7)
Mucinoso	2 (0,4)		
Secretor	1 (0,2)		
Estadío (%)		Estadío FIGO (%)	
0	11 (4,6)	I-A	6 (15,8)
I	60 (24,9)	I-B	1 (2,6)
II-A	73 (30,3)	I-C	5 (13,2)
II-B	45 (18,6)	II-A	1 (2,6)
III-A	31 (12,8)	II-B	1 (2,6)
III-B	19 (7,8)	II-C	2 (5,3)
IV	2 (0,8)	III-A	2 (5,3)
		III-B	2 (5,3)
		III-C	13 (34,2)
		IV	5 (13,2)

**Tabla 16:** Características clínicas de los cánceres de mama y de ovario incluidos en el estudio. Estadío FIGO: sistema de estadiaje clínico. Algunos datos de cada parámetro no están disponibles.

## 2. Rendimiento genético del estudio de *BRCA1* y *BRCA2*

Tras el estudio de secuenciación y de grandes reordenamientos en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, se detectaron 213 variantes distintas: 48 patogénicas, 1 variante probablemente patogénica, 60 variantes de significado clínico desconocido, 24 probablemente no patogénicas y 80 no patogénicas (**Tabla 17**). El 40,8% de variantes fueron detectadas en *BRCA1* y el 59,2% en *BRCA2*, aunque esta diferencia no es apreciable en el número de variantes patogénicas, 24 y 25, respectivamente. En el **Anexo IV** se pueden ver las tablas de las variantes patogénicas y de significado clínico desconocido detectadas en el estudio en ambos genes. En un total de 106 (16,4%) familias se detectó alguna variante patogénica (Familias *BRCA+*), de las cuales 60 familias fueron portadoras de mutaciones en el gen *BRCA1* (56,6%) y 46 en el gen *BRCA2* (43,4%). El número de familias en las que se detectó alguna variante de significado clínico desconocido fue de 70, situando la tasa de UVs en un 10,85% (70/645).

	Variantes Patogénicas y probablemente no patogénicas (%)	Variantes de significado clínico desconocido (%)	Variantes probablemente no patogénicas y no patogénicas (%)	Total (%)
<b><i>BRCA1</i></b>	24 (11,3)	19 (8,9)	44 (20,6)	87 (40,8)
	25 (11,7)			
<b><i>BRCA2</i></b>	MP: 24 RG: 1	41 (19,3)	60 (28,2)	126 (59,2)
<b>Total</b>	49 (23)	60 (28,2)	104 (48,8)	213 (100)

**Tabla 17:** Variantes génicas en *BRCA1* y *BRCA2* detectadas en la población de estudio. MP: Mutaciones puntuales; RG: Reordenamientos génicos.

Entre las variantes patogénicas de *BRCA1* se encuentran doce variantes que cambian el marco de lectura por inserciones o pérdidas (*frameshift*), cinco variantes que alteran el procesamiento de ARN (*splicing*), cinco que codifican para un codón de parada o un cambio sin sentido (*nonsense*) y dos que provocan un cambio de nucleótido que es considerado patogénico (*missense*). Las variantes patogénicas de *BRCA2* se distribuyen de la siguiente manera: quince cambios de lectura, tres variantes que alteran el proceso de *splicing*, cinco que codifican un codón de parada, una *missense* y un gran reordenamiento génico. En total, el 55% de las variantes patogénicas de estos dos genes fueron de tipo *frameshift*, el 20,5% fueron de *nonsense*, el 16,3% de *splicing*, el 6,1% *missense* y el 2% grandes reordenamiento génicos (**Tabla 18**).

Tipo de variante	<i>BRCA1</i> (%)	<i>BRCA2</i> (%)	TOTAL
<i>Frameshifts</i>	12 (50)	15 (60)	27 (55,1)
<i>Nonsense</i>	5 (20,8)	5 (20)	10 (0,4)
<i>missense</i>	2 (8,3)	1 (4)	3 (6,1)
<i>splicing</i>	5 (20,8)	3 (12)	8 (16,3)
<b>LGR</b>		1 (4)	1 (2)
<b>Total</b>	24 (100)	25 (100)	49 (100)

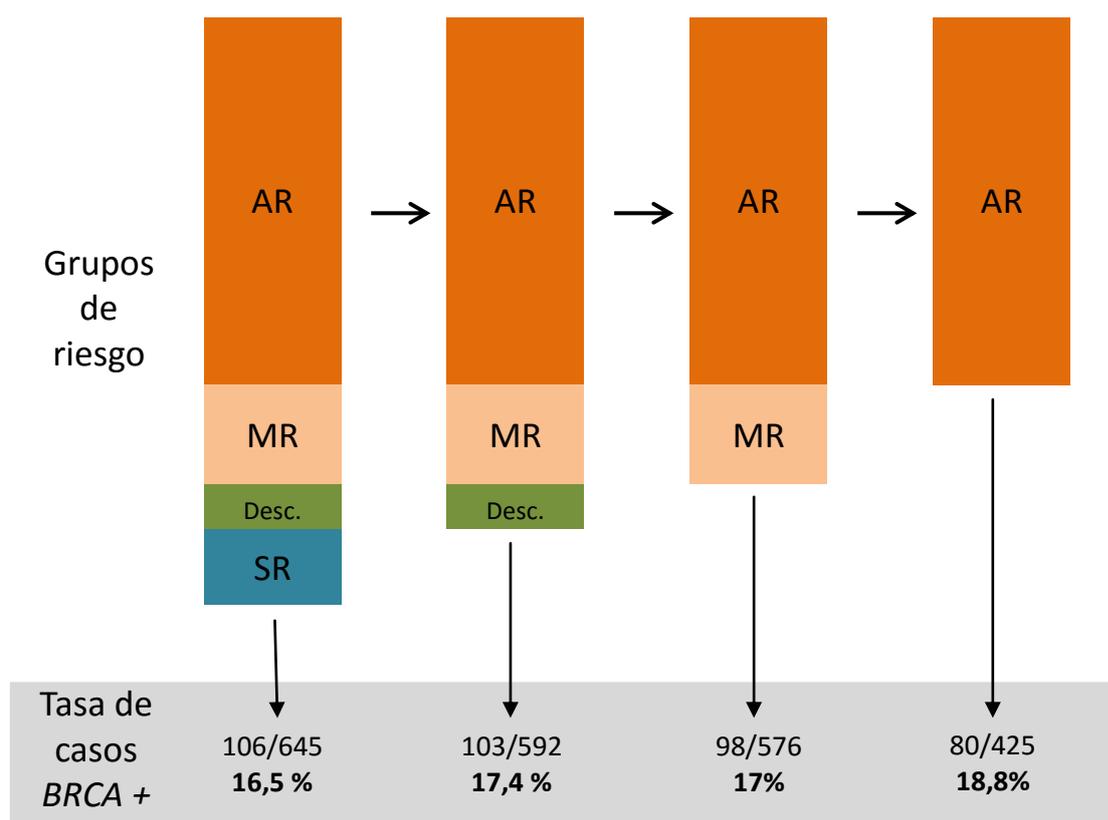
**Tabla 18:** Clasificación molecular de las variantes génicas detectadas en *BRCA1* y *BRCA2*.

Para el estudio de rendimiento del test genético en las familias analizadas, se realizó una clasificación de las familias según los criterios de selección utilizados por la unidad de consejo genético en cáncer hereditario. Como se muestra en la **Tabla 19**, 425 (65,9%) familias fueron clasificadas como de alto riesgo, 151 (23,4%) de moderado riesgo, 53 (8,2%) no cumplían ningún criterio de selección estipulado en ese momento y 16 (2,4%) no pudieron clasificarse por falta de información.

Criterios de selección	Familias <i>BRCA+</i>	Familias <i>BRCA-</i>	TOTAL (%)
<b>AR</b>	80 (75,5)	345 (64)	425 (65,9)
<b>MR</b>	18 (17)	133 (24,7)	151 (23,4)
<b>SR</b>	3 (2,8)	50 (9,3)	53 (8,2)
<b>Desconocido</b>	5 (4,7)	11 (2)	16 (2,5)
<b>Total</b>	106 (100)	539 (100)	<b>645 (100)</b>

**Tabla 19:** Clasificación de las familias en función de los criterios clínicos. *BRCA+*: Familias con mutación en *BRCA1/2*; *BRCA-*: Familias en las que no se han detectado variantes patogénicas en *BRCA1/2*; AR: Alto riesgo; MR: Moderado riesgo; Desc. Riesgo desconocido; SR: Sin riesgo.

La tasa de detección de variantes patogénicas de *BRCA* en las familias estudiadas fue de un 16,4% (106/645). Siguiendo la clasificación realizada anteriormente con los criterios de selección empleados por la unidad de consejo genético en cáncer hereditario, la tasa de detección aumentaría ligeramente hasta un 17,4% si se descartasen las 53 familias (8,2%) que no cumplen ningún criterio de alto o moderado riesgo. Esta tasa también se ve afectada por los 16 casos (2,5%) que no se han podido clasificar en base a estos criterios, situando el rendimiento diagnóstico del test genético en un 17% (98/576) si no se tuvieran en cuenta estos casos. Un dato a tener en cuenta es que el rendimiento del test en las familias que cumplen criterios de alto riesgo se sitúa en un 18,8%. En la **Figura 29** se puede ver gráficamente estos datos. Es importante tener en cuenta que a pesar de que el rendimiento diagnóstico de *BRCA1* y *BRCA2* es mayor, de esta manera 8 casos positivos no habrían sido detectados.

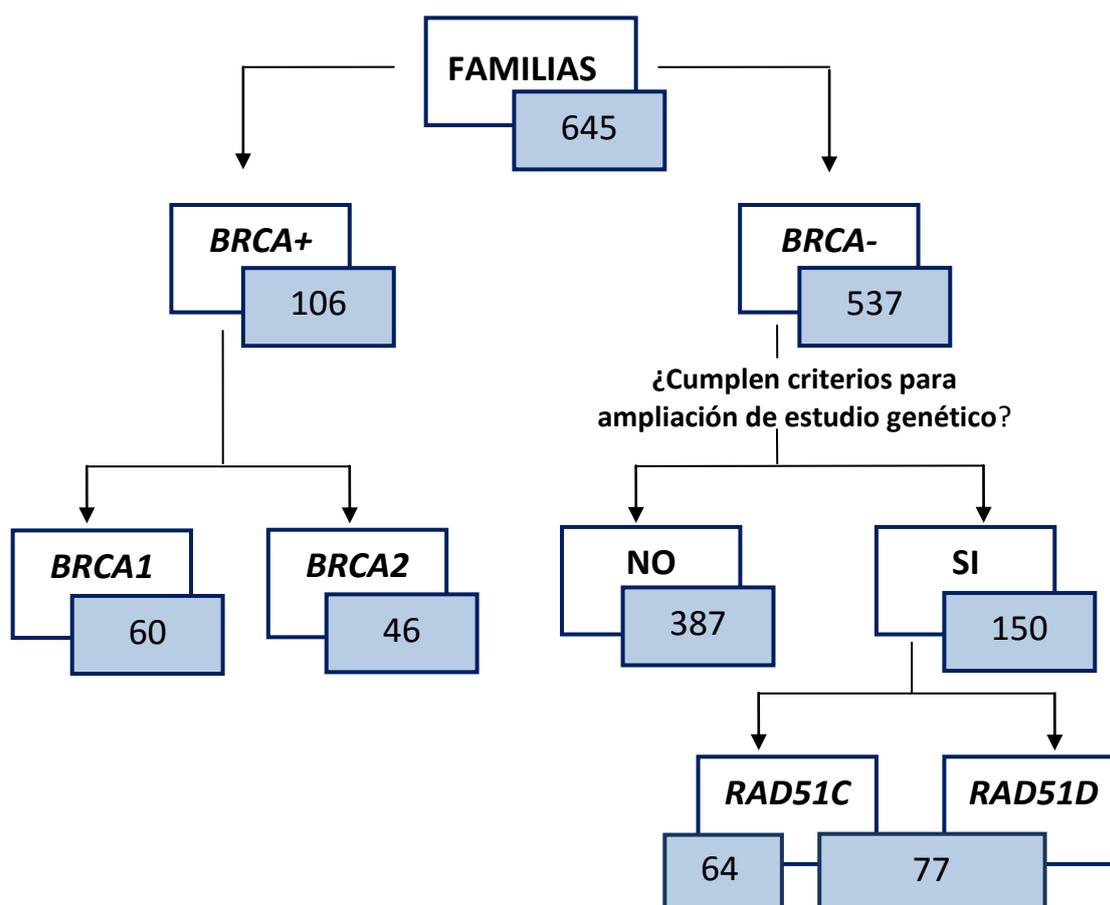


**Figura 29:** Tasas de casos *BRCA*+ de este estudio según criterios clínicos. AR: Alto riesgo; MR: Moderado riesgo; Desc. Riesgo desconocido; SR: Sin riesgo.

### 3. Rendimiento genético de *RAD51C* y *RAD51D*

#### 3.1 Selección de las familias

Para comenzar el estudio de los genes *RAD51C* y *RAD51D* se seleccionaron de entre las 537 familias en las que no se detectó ninguna variante patogénica en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, aquellas que cumplían criterios de ampliación de estudio genético. Se seleccionaron 150 familias, 64 con fenotipo de cáncer de mama bilateral (bCM), 17 con fenotipo exclusivamente de cáncer de ovario (CO) y 69 con fenotipo de cáncer de mama y ovario (CM/CO). Este último fenotipo hace referencia tanto a familias con casos de mama y ovario en la misma mujer y a familias con casos de mama y ovario en distintos individuos. A las familias con fenotipo de CO y CM/CO se les realizó el análisis de *RAD51C* y *RAD51D*. A las familias con fenotipo de bCM se les estudió únicamente el gen *RAD51C*. En 9 de las familias seleccionadas no se pudo completar el estudio (Figura 30).



**Figura 30:** Esquema de la distribución de los casos con sospecha de SCMOH. *BRCA+*: Familias portadoras de una variante patogénica en *BRCA1* o *BRCA2*. *BRCA-*: Familias en las que no se detectó ninguna variante patogénica en *BRCA1/2*. *RAD51C*: Familias con algún caso de mama bilateral y mama y ovario. *RAD51D*: Familias con casos de cáncer de ovario.

En la parte superior de la **Tabla 20** se puede ver la distribución de familias sobre las que se amplió el estudio genético. El análisis de *RAD51C* se realizó a 141 familias (58 con fenotipo de bCM, 16 con CO y 67 con CM/CO), para 9 familias de las seleccionadas (seis con fenotipo bCM, una con CO y dos con CM/CO) no hubo material genético disponible en el laboratorio. Incluso, en 6 familias con fenotipo de CM/CO a las que se les realizó el análisis de *RAD51C* no se pudo realizar el estudio de *RAD51D* porque la muestra fue insuficiente. Finalmente, el estudio de *RAD51D* se realizó en 77 familias (16 con CO y 61 con CM/CO).

Con respecto a la distribución de los casos índice de las familias seleccionadas se observa que el cáncer de mama sigue siendo la neoplasia mayoritaria con el 34% de los casos con CM, el 32% con bCM. Debido al proceso de selección, el número de casos con cáncer de ovario asciende hasta algo más del 20%. El porcentaje de casos con coafectación de mama y ovario se sitúa en un 8%.

Fenotipo de la familia	Total Seleccionados	RAD51C	RAD51D
	N=150 (%)	N= 141 (%)	N=77 (%)
Nº de familias con bCM	64 (42.6)	58 (41.1)	0
Nº de familias con CO	17 (11.4)	16 (11.3)	16 (20.8)
Nº de familias con CM/CO	69 (46)	67 (47.5)	61 (79.8)
Fenotipo del caso índice			
Nº de CI con CM	51 (34)	49 (34,7)	32 (41,6)
Nº de CI con bCM	48 (32)	44 (31,3)	0
Nº de CI con CO	31 (20,6)	30 (21,3)	30 (39)
Nº de CI con CMO	12 (8)	11 (7,8)	10 (12,9)
Nº de CI con CMO (bilateral)	1 (0,7)	1 (0,7)	1 (1,3)
Nº de CI con CM y C. Endometrio	1 (0,7)	1 (0,7)	0
Nº de CI con C. Endometrio	1 (0,7)	1 (0,7)	1 (1,3)
Nº de CI con C. Páncreas	1 (0,7)	0	0
Nº de CI no afectados	4 (2,6)	4 (2,8)	3 (3,9)

**Tabla 20:** Distribución de las familias y de los casos índices seleccionados para la ampliación del estudio genético. bCM: cáncer de mama bilateral; CO: cáncer de ovario; CM/CO: cáncer de mama y ovario en la familia; CI: casos índice; CM: cáncer de mama; CMO: cáncer de mama y ovario en el mismo individuo.

### 3.2 Características de los pacientes seleccionados

En la **Tabla 21** se describen las características clínicas de los cánceres de mama y cánceres de ovario de las familias seleccionadas. Destaca el aumento de edad media de los cánceres de mama y la bajada de la edad de los cánceres de ovario respecto a las medias obtenidas en el total de familias del estudio. En los pacientes seleccionados la diferencia de edades de diagnóstico no supera los dos años, con una media de edad de diagnóstico de  $46.55 \pm 11.48$  años en el cáncer de mama y de  $48.36 \pm 15.53$  en el cáncer de ovario.

Otra característica de este grupo de pacientes que se ve afectada por el proceso de selección previo es el porcentaje de casos índice afectados de cáncer de mama bilateralmente, que asciende hasta un 46%. Los casos de coafectación de mama y ovario son el 29,5% de los tumores de ovario.

Respecto al subtipo histológico, los tumores de mama son mayoritariamente de subtipo ductal, incluyendo en este grupo el 84,7% de las neoplasias. En un número mucho menor, los subtipos histológicos lobulillares son el 11,8% de los casos y los medulares el 3,5%. Los tumores de ovario presentan una histología más heterogénea, destacando la serosa y la mucinosa con un 32% y 36%.

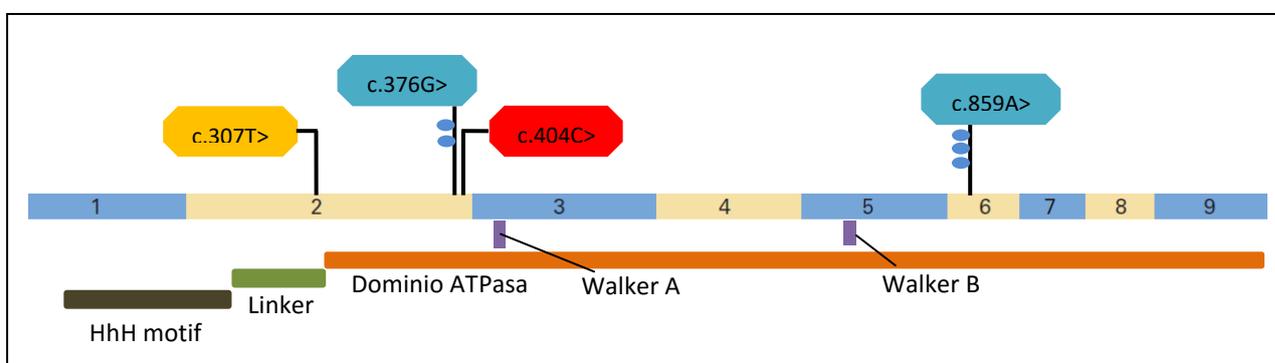
Los tumores de mama se presentan en estadios poco avanzados, siendo los más frecuentes el I y el II-A con un 26,2% de los tumores en ambos estadios. Los tumores de ovario se diagnostican mayoritariamente en estadios de la escala FIGO avanzados, detectándose en estadio III-C el 32,1% de los casos y en estadio IV el 14,3% de los casos.

Cáncer de mama		Cáncer de ovario	
Año de diagnóstico (%)		Año de diagnóstico (%)	
Media	46.55 ±11.48 años	Media	48.36 ±15.53 años
<40 años	32 (28)	<50	27 (61)
>40 años	81 (72)	>50	17 (39)
Tipo cáncer de mama (%)		Co-afectación	
CM unilaterales	61 (54)	Cáncer de ovario	31 (70,5)
CM bilaterales	52 (46)	Cáncer de mama y ovario	13 (29,5)
Subtipo histológico (%)		Subtipo histológico (%)	
Ductal	72 (84,7)	Seroso	8 (32)
Lobulillar	10 (11,8)	Mucinoso	9 (36)
Medular	3 (3,5)	Endometroide	4 (16)
		Células claras	3 (12)
		Mulleriano	1 (4)
Estadio (%)		Estadio FIGO (%)	
0	5 (11,9)	I-A	6 (21.4)
I	11 (26,2)	I-B	1 (3.6)
II-A	11 (26,2)	I-C	3 (10.7)
II-B	4 (9,5)	II-B	1 (3.6)
III-A	6 (14,3)	II-C	2 (7.1)
III-B	5 (11,9)	III-A	2 (7.1)
		III-C	9 (32.1)
		IV	4 (14.3)

**Tabla 21:** Características clínicas de los cánceres de mama y de ovario de los casos índice seleccionados para la ampliación del estudio genético. Estadio FIGO: sistema de estadiaje clínico. Algunos datos de cada parámetro no están disponibles.

### 3.3 Variantes detectadas en *RAD51C*

Se identificaron 7 variantes génicas en *RAD51C*, cuatro en regiones exónicas (representadas en la **Figura 31**) y 3 en regiones intrónicas. En función de la implicación clínica, estas siete variantes se clasifican como; una variante patogénica, una variante de significado clínico desconocido y 5 variantes no patogénicas. En total, el rendimiento diagnóstico de *RAD51C* en las familias estudiadas fue del 0.7% (1/141). Teniendo en cuenta el fenotipo de las familias, la variante patogénica se detectó en una familia de las 67 clasificadas como CM/CO, el rendimiento diagnóstico del test genético de *RAD51C* en estas familias sería del 1.5%.



**Figura 31:** Estructura del *cDNA* de *RAD51C*. En la parte superior las variantes detectadas; Azul: variante no patogénica; Amarillo: variante de significado clínico desconocido; Rojo: patogénica. Círculos azules: cada familia en la que se ha visto esa variante. En la parte inferior los dominios a los que codifica esa parte del gen; Gris: motivo de unión al ADN (*HhH motif*). Verde: región *linker*. Naranja: Dominio *ATPasa*. Morado: *Motivo Walker A y B*.

Todas las variantes no patogénicas se encuentran descritas en la base de datos de *dbSNP* del *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Las variantes exónicas *c.376G>A* y *c.859A>G* se detectó en dos y tres casos índice, respectivamente. La variante intrónica *c.-26C>T* se identificó 32 veces, dos de ellas en homocigosis. La variante *c.572-17G>T* solo se ha detectado en un caso y la variante *c.904+34T>G* fue la más frecuente, detectándose en 64 casos, 21 de ellos en homocigosis.

La variante *c.404G>A* se encuentra descrita en la bases de datos *HGMD* como causante de enfermedad. Se identificó exclusivamente en una de las familias y previamente solo había sido descrita en una familia española por Osorio y colaboradores (91).

La variante c.307T>G no se encuentra descrita en ninguna de las bases de datos consultadas (*HGMD*, *LOVD* y *ClinVar*) ni en la bibliografía. Se detectó en una familia con fenotipo de cáncer de mama bilateral y se clasificó como variante de significado clínico desconocido.

Exón	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Descrita previamente	Fenotipo familiar	MAF (n=141)	MAF en CIBERER	SIFT	Mutation taster	Clase
<b>Variante patogénicas</b>									
2	c.404C>T	p.Cys135Tyr	CM125259	CM/CO	0.0035	-	Deletérea	Causante enfermedad	VP
<b>Variantes de significado clínico desconocido</b>									
2	c.307T>G	p.Phe103Val	NO	bCM	0.0035	-	Tolerada	Causante enfermedad	UVs
<b>Variantes no patogénicas</b>									
<b>• Codificantes</b>									
2	c.376G>A	p.Ala126Thr	rs61758784	-	0.007	0.004	Tolerada	-	VNP
6	c.859 A>G	p.Thr287Ala	rs28363317	-	0.010	0.014	Tolerada	Causante de enfermedad	VNP
<b>• No codificantes</b>									
5'UTR	c.-26C>T	-	rs12946397	-	0.12	0.115	-	-	VNP
IVS3	c.572-17G>T	-	rs193023469	-	0.0035	0.004	-	-	VNP
IVS6	c.904+34T>C	-	rs28363318	-	0.372	0.289	-	-	VNP

**Tabla 22:** Variantes génicas detectadas en *RAD51C*. bCM: Cáncer de mama bilateral; CM/CO: Cáncer de mama y ovario. VP: Variante patogénica. UVs: Variante de significado clínico desconocido. VNP: Variante no patogénica.

En la **Tabla 22** se describen las características de las variantes, posición, cambio a nivel del ADN codificante y a nivel de la proteína. El MAF de cada variante en las familias estudiadas frente al MAF en la aplicación *CIBERER Spanish Variant Server*. En las columnas de *SIFT* y *Mutation taster* se muestran los resultados de estos programas *in silico*. Finalmente, la columna de clase muestra como se ha clasificado la variante en función de su implicación clínica.

---

Las frecuencias de las variantes obtenidas tanto en las familias de este estudio (columna MAF n=141) como en el estudio *CIBERER* son muy similares en las variantes no patogénicas. Sin embargo, la variante patogénica y la variante de significado clínico desconocido no se encuentran descritas en el estudio *CIBERER*.

Los programas *in silico* mostraron discrepancias a la hora de estimar el efecto de la variante UV, sin embargo coincidieron con el efecto de la variante clasificada como patogénica.

En la **Tabla 23** se muestra la frecuencia genotípica y alélica obtenida tras el análisis de *RAD51C* en los 141 casos. Las variantes intrónicas, c.-26C>T y c.904+34T>C, se detectaron en un alto número de casos, 33 y 84 respectivamente. De los 33 casos índice en los que se ha visto la variante c.-26C>T, dos de ellos son portadores en homocigosis. Los casos homocigotos para la variante c.904+34T>C son 21 de los 84. A diferencia de estas variantes intrónicas, la variante c.572-17G>T se ha visto en un solo caso. Las variantes exónicas son menos frecuentes, siendo la que presenta más alta tasa de detección la variante c.859A>G con 3 familias portadoras.

En la segunda parte de la tabla se muestra la frecuencia alélica de cada variante haciendo referencia al número de veces que se ha visto ese alelo en función del fenotipo familiar. Tanto la variante patogénica como la de significado clínico desconocido presentaron frecuencias alélicas bajas, ya que se observó el alelo minoritario de cada una de estas variantes en una sola ocasión (1/282).

Variantes	Genotipo				Frecuencia Alélica (%)							
	bCM N=58	CM/CO N=67	CO N=16	TOTAL N=141	CM N=116		CM/CO N=134		CO N=32		TOTAL N=282	
					A (%)	B (%)	A (%)	B (%)	A (%)	B (%)	A (%)	B (%)
<b>Variantes patogénicas</b>												
c.404G>A	0	1	0	1	116 (100)	0	133 (99,3)	1 (0,7)	32 (100)	0	281 (99,6)	1 (0,4)
<b>Variantes de significado clínico desconocido</b>												
c.307T>G	1	0	0	1	115 (99,1)	1 (0,9)	134 (100)	0	32 (100)	0	281 (99,6)	1 (0,4)
<b>Variantes no patogénicas</b>												
<b>• Codificantes</b>												
c.376G>A	1	1	0	2	115 (99,1)	1 (0,9)	133 (99,3)	1 (0,7)	32 (100)	0	280 (99,3)	2 (0,7)
c.859A>G	1	1	1	3	115 (99,1)	1 (0,9)	133 (99,3)	1 (0,7)	31 (96,9)	1 (3,1)	279 (98,9)	3 (1,06)
<b>• No codificantes</b>												
c.-26C>T	11	15 (2)	7	33 (2)	105 (90,5)	11 (9,5)	117 (87,3)	17 (12,7)	25 (78,1)	7 (21,9)	247 (87,6)	35 (12,4)
c.572-17G>T	1	0	0	1	115 (99,1)	1 (0,9)	134 (100)	0	32 (100)	0	281 (99,6)	1 (0,4)
c.904+34T>C	32 (7)	40 (13)	12 (1)	84 (21)	77 (66,1)	39 (33,9)	81 (60,4)	53 (39,6)	19 (59,4)	13 (40,6)	177 (62,7)	105 (37,3)

**Tabla 23:** Frecuencias de las variantes de *RAD51C* en los casos analizados. Frecuencia genotípica en función del fenotipo familiar (entre paréntesis los casos en homocigosis). Frecuencia alélica: número de veces que se vio ese alelo. Entre paréntesis se expresa el porcentaje de n/N, donde n es el número de veces que se observó ese alelo y N es el total de alelos estudiados para ese *locus*. bCM: Familia con cáncer de mama bilateral; CM/CO: Familia con cáncer de mama y ovario. CO: Familia con cáncer de ovario exclusivamente. A: Alelo de mayor frecuencia. B: Alelo de menor frecuencia.

### 3.3.1 Variantes patogénicas en *RAD51C*

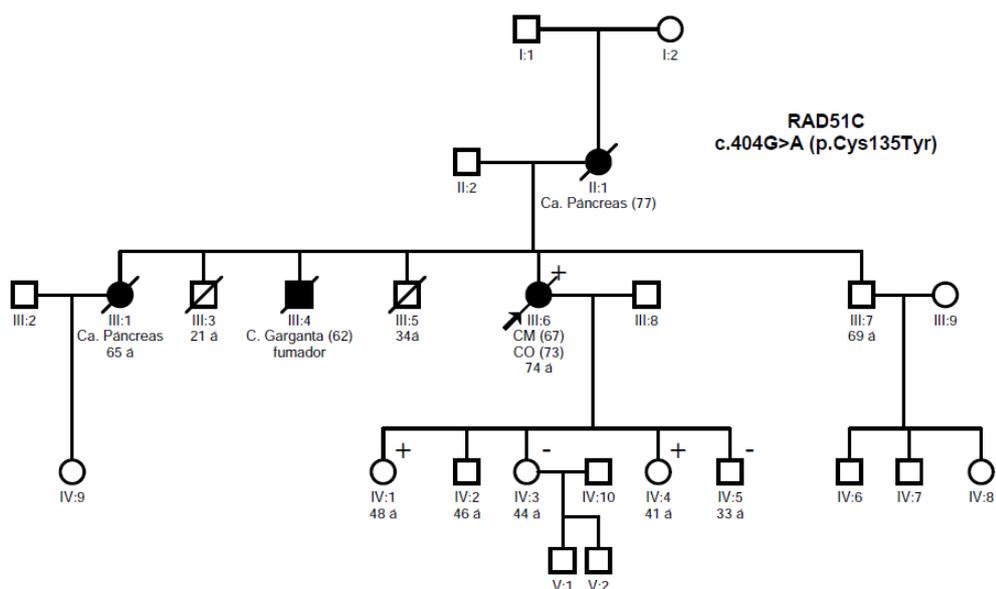
#### ➤ c.404 C>T (p.Cys135Tyr)

Este cambio de la última base en el exón 2 es una variante *missense* que produce un cambio en la síntesis de proteína. El aminoácido 135 cambia de cisteína a tirosina (C135Y). A demás de este cambio de aaa nivel proteico, el nucleótido afectado forma parte de un sitio 5' (o donador) de *splicing* que está implicado directamente en el procesamiento del ARNm (*splicing*). Este cambio da lugar a un transcrito alterado que a su vez origina una proteína anómala y no funcional.

Esta variante está descrita en la base de datos *HGMD* como causante de enfermedad y ha sido descrita exclusivamente en una familia española, Osorio y col (91).

#### a) Descripción de la familia

El caso índice de esta familia (F232) es una mujer diagnosticada a los 67 años de cáncer de mama medular triple negativo (RE-, RP-, RA-, HER-) y diagnosticada a los 73 años de cáncer de ovario bilateral de histología serosa y estadio IC de la escala FIGO (**Figura 32**). Su madre (II:1) y su hermana (III:1) tuvieron un cáncer de páncreas a los 77 y 65 respectivamente. Tiene dos hijas sanas portadoras de la variante (IV:1 y IV:4).



**Figura 32:** Árbol familiar de la variante c.404C>T de *RAD51C*.

**b) Estudios *in silico***

- *Mutación Taster*: Causante de enfermedad por la alteración en la funcionalidad de la proteína e incluso se prevé que forme un transcrito aberrante al producir una alteración en el sitio donador de “*splicing*”.
- *SIFT*: Deletérea
- Programas de predicción de *splicing*: Predicen la pérdida del sitio donador de *splicing* con una probabilidad media de -70,7%.
  - *MaxEnt*: -100%
  - *NNSPLICE*: -98,9%
  - *HSF*: -13,3%

**c) Estudios genotipo-fenotipo**

El caso índice de esta familia fue diagnosticada de cáncer de mama y ovario. No se dieron otros casos de cáncer de mama, ni de ovario en la familia. Sí se observaron casos de cáncer de páncreas en dos mujeres, aunque no se pudo estudiar el genotipo. Dos hijas del caso índice fueron portadoras de la variante. En la **Tabla 24** se expresa el nº de casos en función de los portadores y del diagnóstico.

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad de diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad de diagnóstico	Casos cáncer mama y Ovario (%)
3	1 (33,3)	67	0 (33,3)	1 (33,3)	73	1 (33,3)

**Tabla 24:** Estudio genotipo-fenotipo de la variante c.404C>T de *RAD51C*.

**d) Frecuencia en población de control**

La variante c.404G>A fue vista en heterocigosis en solo una familia de las 141 en las que se estudió el gen *RAD51C*. La variante no se ha encontrado en ningún control sano utilizado en el estudio, por tanto, la frecuencia en los 150 controles sin antecedentes personales o familiares de cáncer de mama y/o ovario fue de 0%. (**Tabla 25**).

Variante	Frecuencia Alélica (%)					
	CASOS N=282			CONTROLES SANOS N=300		
	A (%)	B (%)	MAF	A (%)	B (%)	MAF
c.404G>A	281 (99,6)	1 (0,4)	0.003	300 (100)	0	0

**Tabla 25:** Frecuencia alélica de c.404G>A en población seleccionada (casos índice) y en controles sanos de la Región de Murcia. N: número de alelos estudiados. A: Alelo mayoritario. B: Alelo minoritario. MAF: Frecuencia alélica menor.

### 3.3.2 Variantes de significado clínico desconocido (UVs) en *RAD51C*

#### ➤ c.307T>G (p.Phe103Val)

Este cambio de base en el exón 2 fue una variante de tipo *missense* que produce un cambio en la proteína en el aminoácido 103 de fenilalanina a Valina (F103V). Este aa forma parte del dominio *ATPasa* de la proteína, dominio altamente conservado en la escala evolutiva.

Este cambio no está descrito en ninguna de las bases de datos consultas (*HGMD*, *LOVD* y *ClinVar*).

#### a) Descripción de la familia

En la **Figura 33** se representa el árbol familiar en la que se detectó la variante c.307T>G en la familia F598:. El caso índice de la familia (III:4) presentó un cáncer de mama bilateral diagnosticado a los 57 años. En la mama derecha se le diagnosticó un carcinoma ductal infiltrante GRADO III (pT1cpN0M0; Triple negativo, Ki67 >60%) y en la mama izquierda un carcinoma ductal infiltrante grado II (pT2N0M0; Triple negativo, ki 80%). Se hermana fue diagnosticada de cáncer de mama a los 67 años, una sobrina de un cáncer de mama a los 36, una tía materna fallecida con cáncer de mama a los 42 años y una tía paterna fallecida con cáncer de mama a los 48. La hermana (III:6) y la sobrina (IV:3) fueron portadoras de la variante.

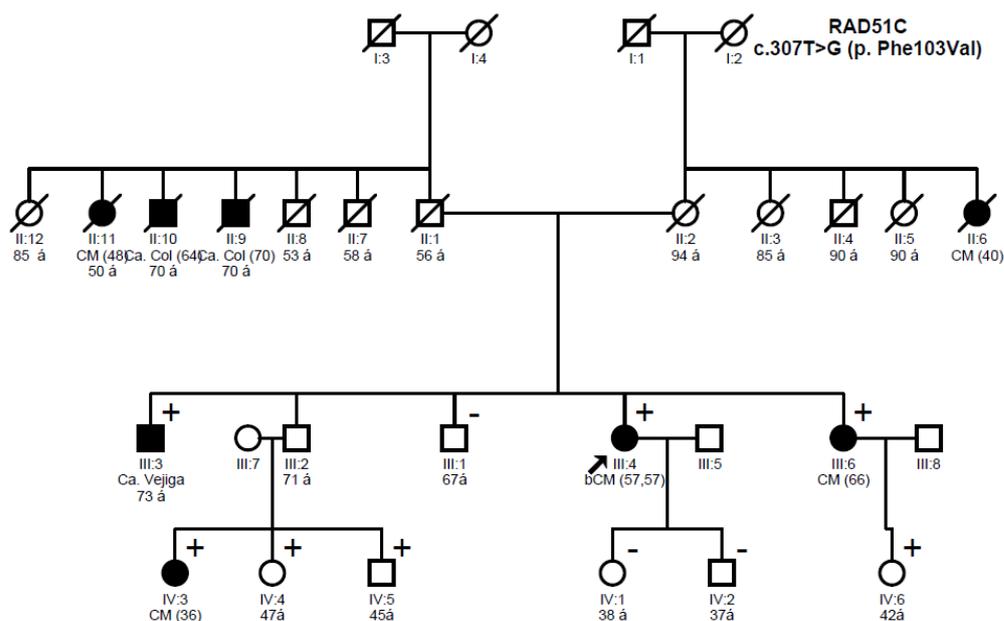


Figura 33: Árbol familiar de la variante c.307T>G de *RAD51C*.

#### b) Estudios *in silico*

- *Mutación Taster*: Causante de enfermedad por la alteración en la funcionalidad de la proteína.
- *SIFT*: Tolerada.
- *PolyPhen-2*: Probablemente patogénica con un score de 0,993 (0-1).
- *A-GVGD*: Clase C45.

#### c) Estudios genotipo-fenotipo

En la familia hubieron 3 afectados de cáncer de mama, uno de ellos de cáncer de mama bilateral y todos ellos fueron portadores de la variante de estudio con una edad media de diagnóstico de 53 años. Un varón con diagnóstico de cáncer de vejiga fue portador de la variante. Otros 3 familiares fueron portadores de la variante, 2 de ellos mujeres, y no están afectados (Tabla 26).

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad de diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad de diagnóstico	Casos cáncer mama y Ovario (%)
7	3 (43)	53	1 (33,3)	0	-	0

Tabla 26: Estudio genotipo-fenotipo de la variante c.307T>G de *RAD51C*.

#### d) Frecuencia en población de control

La variante c.307C>T fue detectada en heterocigosis en una sola familia de las 141 en las que se analizó el gen *RAD51C*. También se fue identificada en heterocigosis en un control sano, obteniéndose una frecuencia alélica en controles sanos de un 0,3% (**Tabla 27**).

Variantes	Frecuencia Alélica (%)					
	CASOS N=282			CONTROLES SANOS N=300		
	A (%)	B (%)	MAF	A (%)	B (%)	MAF
c.307T>G	280 (99,6)	1 (0,4)	0.003	299 (99,6)	1 (0,3)	0,003

**Tabla 27:** Frecuencia alélica de c.307C>T en población seleccionada (casos índice) y en controles sanos de la Región de Murcia. N: número de alelos estudiados. A: Alelo mayoritario. B: Alelo minoritario. MAF: Frecuencia alélica menor.

#### 3.3.3 Variantes codificantes no patogénicas en *RAD51C*

##### ➤ c.376G>A (p.Ala126Thr)

Este cambio de base en el exón 2 produce un cambio de aa en la posición 126 de la proteína de alanina a treonina. A pesar de estar en un dominio importante de la proteína (dominio ATPasa), parece que este cambio no afecta a la función de la proteína. Está descrito en las bases de datos *LOVD* y *HGMD* como una variante no patogénica. En la base de datos *dbSNP* aparece con rs61758784 y está catalogada como variante no patogénica.

Esta variante fue observada por primera vez en 2011 y clasificada como UV (160). Posteriormente fue observada en población francesa y Europea y ya se catalogó como polimorfismo. En 2014, un estudio realizado sobre población española, también la clasificó como polimorfismo con una frecuencia menor alélica (MAF) de 0,006. La aplicación *CIBERER* obtuvo un MAF de 0,004. En este estudio se detectó esta variante en dos familias, obteniendo como resultado una MAF similar al resto de la población española (MAF=0,007).

### ➤ **c.859 A>G (p.Thr287Ala)**

Este cambio de base en el exón 6 produce un cambio en la síntesis de proteína. El aminoácido 287 cambia de Treonina a Alanina (T287A). Esta variante está descrita en la base de datos *HGMD* como variante de significado clínico desconocido, en la base de datos *LOVD* la describe como probablemente no patogénica y en la base de datos *dbSNP* (rs28363317) la describe como una variante no patogénica.

En la bibliografía consultada también se encuentran discrepancias. El grupo de Meindl y col. analizó esta y otras variantes tipo *missense* o cambio de sentido mediante inmunofluorescencia, comparando la formación de focos de proteína *RAD51C* en células no modificadas y en células con variantes inducidas en *RAD51C*. La variante T287A mostraba una disminución de la supervivencia celular, pero una formación normal de focos de *RAD51C*. Además de estos ensayos funcionales, el análisis de la frecuencia poblacional mostró una alta presencia de la variante en la población, tanto en casos, 15 de los 1.100 casos seleccionados, como en controles 35 de los 2.912 (35). En otro trabajo publicado por Lu Wenping y col. en 2011 se identificó esta variante en 6 pacientes en una cohorte de 192 familias estudiadas. A pesar de la predicción de pérdida de funcionalidad por parte de programas bioinformáticos como *PolyPhen*, se hace referencia al ensayo funcional de Meindl y col y a su estudio casos-control, concluyendo que esta variante no aumenta el riesgo a cáncer de mama (161).

En cuanto a población española, existen datos del proyecto *1000Genomas* donde se detectó el alelo "G" en un 3% de la población Ibérica, en la aplicación *CIBERER* calcula una frecuencia menor alélica de un 0,014. En este estudio se encontró esta variante en 3 familias situándonos en un MAF de 0,01.

#### **3.3.4 Variantes no codificantes y no patogénicas en *RAD51C***

### ➤ **c.- 26 C>T**

Esta variante se encuentra en el extremo 5'UTR, la región previa al exón 1 de *RAD51C*. Se encuentra descrita en las bases de datos *dbSNP* (rs12946397), *LOVD* y en la *ClinVar* como no patogénica. Según los programas *in silico* no tiene efecto sobre el *splicing*.

Es una variante frecuente en población española, en el proyecto *1000Genomas* se vio el alelo "T" con una frecuencia de un 13%. En la plataforma *CIBERER* se obtuvo un MAF de 0,115. En este estudio se vio esta variante en 32 casos índice, en dos de ellos en homocigosis con un MAF de 0,12.

➤ **c.572-17G>T**

Esta variante se encuentra en el intrón 2 de *RAD51C*. Se encuentra descrita en la base de datos *dbSNP* (rs193023469), en la *LOVD* y *ClinVar* como variante no patogénica. Según los programas *in silico* no tiene efecto sobre el *splicing*.

En el proyecto *1000Genomas* se ha visto el alelo "T" con una frecuencia de un 1%. En la plataforma *CIBERER* se muestra un MAF de 0,004. En este estudio se identificó esta variante en un solo caso índice, obteniendo una frecuencia alélica de 0,0035.

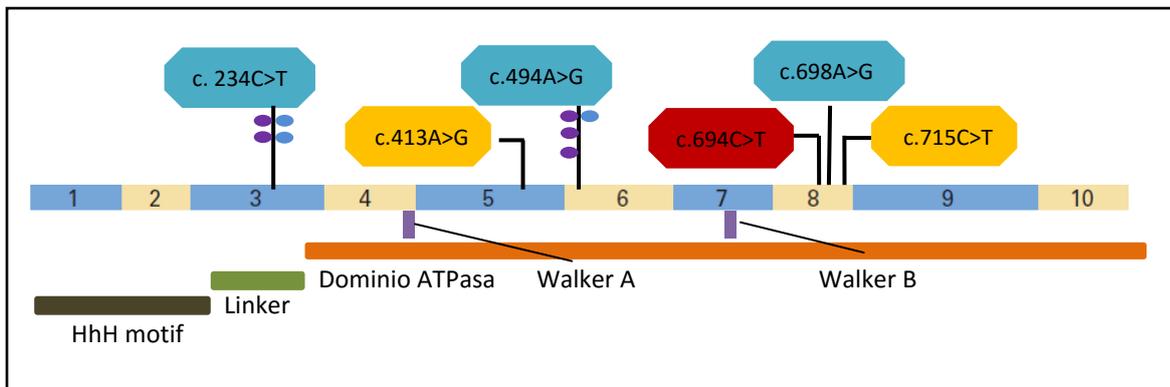
➤ **IVS6+34T>C**

Esta variante génica se localiza en la región intrónica tras el exón 6 de *RAD51C*. Está descrita en la base de datos *dbSNP* (rs28363318) como variante no patogénica. Según los programas *in silico* no tiene efecto sobre el *splicing*.

En el proyecto *1000Genomas* se ha visto el alelo "C" con una frecuencia de un 39%. En la plataforma *CIBERER* muestran un MAF de 0,289. En este estudio se detectó esta variante en 64 casos índice, 21 de ellos en homocigosis, obteniéndose una frecuencia alélica de 0,372.

### 3.4 Variantes detectadas en *RAD51D*

Se identificaron 6 variantes génicas en *RAD51D*, todas ellas en regiones exónicas (representadas en la **Figura 34**). En función de la implicación clínica, estas siete variantes se clasifican como; una variante patogénica, dos variantes de significado clínico desconocido y 3 variantes no patogénicas. En total, el rendimiento diagnóstico de *RAD51D* en las familias estudiadas ha sido del 1,3% (1/77). Teniendo en cuenta el fenotipo, la variante patogénica se detectó en una familia de las 16 clasificadas como CO, el rendimiento diagnóstico del test genético de *RAD51D* en estas familias fue de un 6,2%.



**Figura 34:** Estructura del *cDNA* de *RAD51D*. En la parte superior las variantes detectadas; Azul: variante no patogénica; Amarillo: variante de significado clínico desconocido; Rojo: patogénica. Círculos azules: cada familia en la que se observó esa variante. Círculo morado: cada 5 familias en las que se detectó esa variante, un círculo morado. En la parte inferior los dominios a los que codifica esa parte del gen; Gris: motivo de unión al ADN (*HhH motif*). Verde: región *linker*. Naranja: Dominio *ATPasa*. Morado: *Motivo Walker A y B*.

Todas las variantes se encuentran descritas en la base de datos de *dbSNP* del *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Dentro de las variantes polimórficas, la variante c.234C>T se identificó en 12 casos índice, la c.494A>G en 16 casos, dos de ellos en homocigosis y por último la c.698A>G solo se detectó en un caso.

La variante c.694C>T está descrita en la bases de datos *HGMD* como causante de enfermedad. Se identificó en una sola familia y todos los portadores de la variante fueron a su vez portadores de una variante no sinónima en el mismo exón, la c.715C>T. Lo que sugiere que estas dos variantes estén probablemente posicionadas en *cis* y que estemos ante un efecto fundador.

La variante c.413A>G está descrita en bases de datos consultadas (*HGMD*, *LOVD* y *ClinVar*) como variante de significado clínico desconocido. En este estudio se detectó en una familia y clasificada como UV.

Exón	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Descrita previamente	Fenotipo familiar	MAF (n=154)	Fec CIBERER	SIFT	Mutation taster	Clase
<b>Variantes patogénicas</b>									
8	c.694C>T	p.Arg232X	rs587780104	CO	0.006	-	-	-	VP
<b>Varaintes de significado clínico desconocido</b>									
5	c.413A>G	p.Asn138Ser	rs201676898	CO	0.006	-	Tolerada	Neutral	UVs
8	c.715C>T	p.Arg239Trp	rs770250516	CO	0.006	-	Patogenica	Neutral	UVs
<b>Variantes no patogénicas</b>									
<b>• No sinónimas</b>									
6	c.494G>A	p.Arg165Gln	rs4796033	-	0.129	0.114	Tolerada	Neutral	VNP
8	c.698A>G	p.Glu233Gly	rs28363284	-	0.006	0.016	Tolerada	Causante enfermedad	VNP
<b>• Sinónimas</b>									
3	c.234C>T	p.Ser78Ser	rs9901455	-	0.078	0.074	Tolerada	Neutral	VNP

**Tabla 28:** Variantes génicas detectadas en *RAD51D*. bCM: Cáncer de mama bilateral; CM/CO: Cáncer de mama y ovario. VP: Variante patogénica. UVs: Variante de significado clínico desconocido. VNP: Variante no patogénica.

En la **Tabla 28** se describen las características de las variantes, posición, cambio a nivel del ADN codificante y a nivel de la proteína. El MAF de cada variante en las familias estudiadas frente al MAF en la aplicación *CIBERER Spanish Variant Server*. En las columnas de *SIFT* y *Mutation taster* se muestran los resultados de estos programas *in silico*. Finalmente, la columna de clase muestra como se ha clasificado la variante en función de su implicación clínica.

En el caso de las variantes de *RAD51D*, las frecuencias obtenidas en este estudio fueron diferentes en algunos casos de las obtenidas en el estudio *CIBERER*. La variante c.694A>G fue identificada con una frecuencia algo menor que en la población estudiada en *CIBERER*.

Con la variante c.494G>A ocurrió lo contrario, fue más frecuente en las familias de este estudio. Como en el caso de *RAD51C*, las variantes patogénicas y de significado clínico desconocido no aparecieron en el estudio *CIBERER*.

Los estudios *in silico* estimaron el mismo efecto para la variante UV, c.413A>G. En los dos programas le predijeron un efecto no patogénico. Para otra variante UV, c.715C>T existieron discrepancias entre los programas.

En la **Tabla 29** se muestra la frecuencia genotípica obtenida tras el análisis de *RAD51D* en los 77 casos clasificados en función del fenotipo familiar (entre paréntesis los casos en homocigosis). Las variantes más frecuentes en el estudio fueron la c.494G>A, que fue observada en 18 individuos, dos de ellos homocigotos para esta variante. La segunda variante más frecuente fue la c.234C>T, que fue vista en 12 individuos, en ningún caso en homocigosis.

En la misma tabla se muestran las frecuencias alélicas de cada variante haciendo referencia al número de veces que se identificó ese alelo en todos los individuos estudiados. Tanto la variante patogénica, c.694C>T, como las variantes de significado clínico desconocido, c.413A>G y c.715C>T, fueron detectadas en una sola ocasión, mostrando frecuencias alélicas bajas, 0,6 (1/154).

Variantes	Genotipo			Frecuencia alélica (%)					
	CM/CO N=61	CO N=16	TOTAL N=77	CM/CO N=122		CO N=32		TOTAL N=154	
				A (%)	B (%)	A (%)	B (%)	A (%)	B (%)
<b>Varaintes patogénicas</b>									
c.694C>T	0	1	1	122 (100)	0	31 (96,8)	1 (3,1)	153 (99,4)	1 (0,6)
<b>Variantes de significado clínico desconocido</b>									
c.413A>G	1	0	1	121 (99,1)	1 (0,9)	32 (100)	0	153 (99,4)	1 (0,6)
c.715C>T	0	1	1	121(99,1)	1 (0,9)	32 (100)	0	153 (99,4)	1 (0,6)
<b>Varaintes no patogénicas</b>									
<b>• No sinónimas</b>									
c.494G>A	15 (2)	3	18 (2)	105 (86,1)	17 (13,9)	29 (90,6)	3 (9,4)	134 (87,1)	20 (12,9)
c.698A>G	1	0	1	121(99,1)	1 (0,9)	32 (100)	0	153 (99,4)	1 (0,6)
<b>• Sinónimas</b>									
c.234C>T	8	4	12	114 (93,4)	8 (6,6)	28 (87,5)	4 (12,5)	142 (92,2)	12 (7,8)

**Tabla 29:** Frecuencias de las variantes de *RAD51C* en los casos analizados. Frecuencia genotípica en función del fenotipo familiar (entre paréntesis los casos en homocigosis). Frecuencia alélica: número de veces que se ha visto el alelo. Entre paréntesis se expresa el porcentaje de n/N, donde n es el número de veces que se ha visto ese alelo y N es el total de alelos. bCM: Familia con cáncer de mama bilateral; CM/CO: Familia con cáncer de mama y ovario.CO: Familia con cáncer de ovario exclusivamente. A: alelo de mayor frecuencia. B: alelo de menor frecuencia

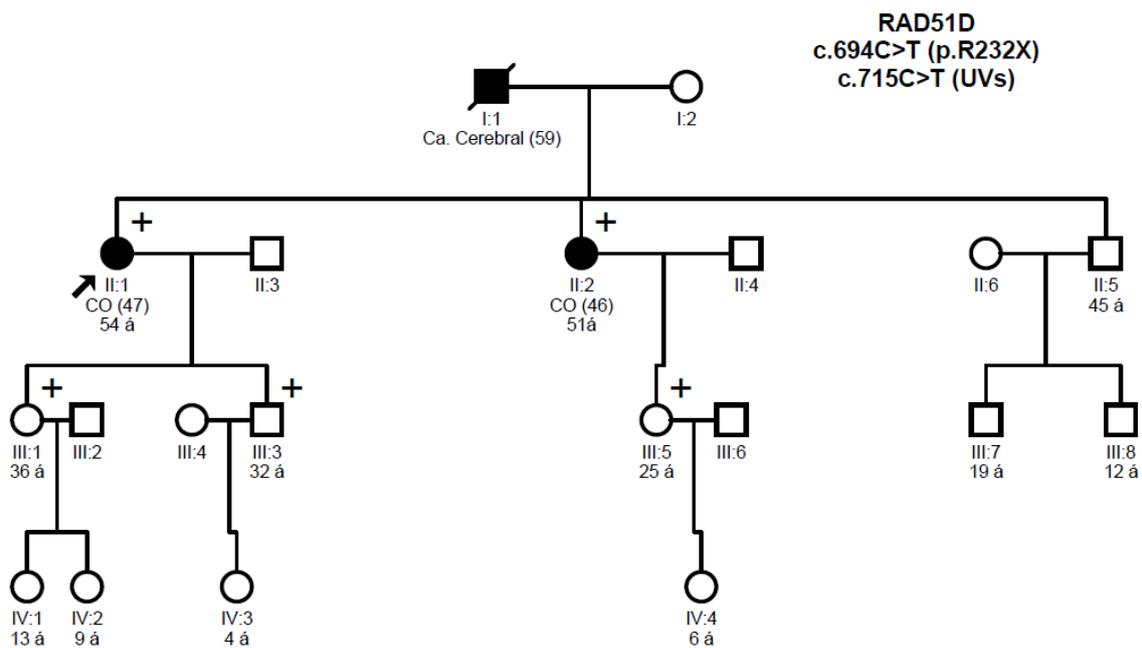
### 3.4.1 Variantes patogénicas en *RAD51D*

#### ➤ c.694C>T (p.Arg232X)

Se trata de una variante tipo *nonsense* en el exón 8 de *RAD51D* que provoca a nivel de la proteína un codón de parada prematura en el aminoácido 232 situado a mitad del dominio *ATPasa*, que genera una proteína truncada con la pérdida del 30% de la misma. Esta variante está descrita en la base de datos *HGMD* como patogénica.

#### a) Descripción de la familia

El caso índice (II:1) de la familia 137 fue una mujer diagnosticada a los 47 años de un cistadenocarcinoma mucinoso papilar en ambos ovarios estadio IB de la escala FIGO. Su hermana (II:2) fue diagnosticada a los 46 años de cáncer de ovario papilar seroso moderadamente diferenciado y también es portadora de la variante. Su padre (I:1) tuvo un cáncer cerebral a los 59 años (**Figura 35**).



**Figura 35:** Árbol familiar de la variante c.694C>T de *RAD51D*.

### b) Estudios *in silico*

- *Mutación Taster*: Causante de enfermedad por la alteración en la funcionalidad de la proteína.

### c) Estudios genotipo-fenotipo

En la familia existen 2 afectadas de cáncer de ovario, y las dos fueron portadoras de la variante de estudio con una edad de diagnóstico de 47 y 46 años, respectivamente. Otros 3 familiares son portadores de la variante, 2 de ellos mujeres de 36 y 25 años, que no están afectadas (Tabla 30).

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad de diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad de diagnóstico	Casos cáncer mama y Ovario (%)
5	0	-	0	2 (40)	46	0 (0)

**Tabla 30:** Estudio genotipo-fenotipo de la variante c.694C>T de *RAD51D*.

### d) Frecuencia en población de control

La variante c.694C>T fue detectada en heterocigosis en una familia de las 77 en las que se estudió el gen *RAD51D*. La variante no fue detectada en los 150 controles sanos analizados (Tabla 31).

Variante	Frecuencia Alélica (%)					
	CASOS N=154			CONTROLES SANOS N=300		
	A (%)	B (%)	MAF	A (%)	B (%)	MAF
c.694C>T	153 (99.4)	1 (0.6)	0.006	300 (100)	0	-

**Tabla 31:** Frecuencia alélica de c.694C>T en población seleccionada (casos índice) y en controles sanos de la Región de Murcia. N: Número de alelos estudiados. A: Alelo mayoritario. B: Alelo minoritario. MAF: Frecuencia alélica menor.

### 3.4.2 Variantes de significado clínico desconocido en *RAD51D*

#### ➤ c.413A>G (p.Asn138Ser)

Este cambio es una variante tipo *missense* en el exón 5 de *RAD51D* que provoca un cambio en la posición 138 de la proteína de arparagina a serina. Está descrita en la base de datos *dbSNP* (rs201676898) y clasificada como variante de significado clínico desconocido. No está descrita en las bases de datos *HGMD* y *LOVD*.

Esta variante no ha sido descrita anteriormente en población española y su frecuencia en otras poblaciones es muy baja, MAF en *1000Genomas* fue de 0,0002.

#### a) Estudio familiar

En el caso de esta familia, no se pudo recopilar apenas información. El caso índice y su madre fueron diagnosticadas de cáncer de ovario.

#### b) Estudio bioinformático

- *Mutación Taster*: Neutral
- *SIFT*: Tolerada
- *A-GVGD*: Clase C0.

#### c) Estudios genotipo-fenotipo

No se pudo realizar el estudio genotipo-fenotipo a la familia por no tener información del resto de los familiares.

#### d) Frecuencia en población de control

La variante c.413A>G fue detectada en heterocigosis en una familia de las 77 en las que se analizó el gen *RAD51D*. La variante fue encontrada en heterocigosis en un control sano, obteniéndose una frecuencia en los 150 controles sanos es del 0,3% (**Tabla 32**).

Variante	Frecuencia Alélica (%)					
	CASOS N=154			CONTROLES SANOS N=300		
	A (%)	B (%)	MAF	A (%)	B (%)	MAF
c.307T>G	153 (99,4)	1(0,6)	0,006	299 (99,6)	1 (0,3)	0,003

**Tabla 32:** Frecuencia alélica de c.413A>G en población seleccionada (casos índice) y en controles sanos de la Región de Murcia. N: Número de alelos estudiados. A: Alelo mayoritario. B: Alelo minoritario. MAF: Frecuencia alélica menor.

### ➤ c.715C>T (p.Arg239Trp)

La variante c.715C>T de tipo *missense* se localizada en el exón 8 de *RAD51D* provoca un cambio en la posición 239 de la proteína de arginina a triptófano. Ha sido descrita en las bases de datos *ClinVar* (RCV000166936.1), *dbSNP* (rs770250516) y en la *HGMD* como variante de significado clínico desconocido.

#### a) Descripción de la familia

Esta variante es fue identificada en una familia en la que ya se habia detectado una variante patogénica (F137, c.698C>T). Todos los portadores de la variante c.698C>T fueron portadores de la variante c.715C>T.

#### b) Estudio bioinformático

- *Mutación Taster*: Causante de enfermedad
- *SIFT*: Deletérea
- *PolyPhen-2*: Posiblemente patogénica.
- *A-GVGD*: C0

#### c) Estudio bibliográfico

Esta variante fue descrita por primera vez en 2012 por Wickramanayake y col. en una familia con la variante c.698C>T. El caso índice tuvo cáncer de ovario a los 43 y antecedentes familiares de cáncer de mama a edad postmenopáusica en madre y abuela materna y cáncer de ovario en tía paterna (162). Más tarde en 2014 en el trabajo publicado por Gutiérrez-Enríquez y col. se vio la variante c.715C>T junto a la variante patogénica c.698C>T en dos familias distintas(147). En todos los casos los portadores de la

variante patogénica, eran también portadores de la variante missense c.715C>T. El hecho de que las dos variantes se transmitan siempre juntas es debido a que están las dos en *cis* y por lo tanto no podemos conocer el efecto clínico de ellas por separado.

### 3.4.3 Variantes no patogénicas en *RAD51D*

#### ➤ c.234C>T (p.Ser78Ser)

La variante c.234C>T localizada en el exón 3 de *RAD51D* produce un cambio sinónimo de aminoácido. A pesar del cambio a nivel génico de la base citosina por timina, el aminoácido para el que codifica el codón resultante fue serina (S78S). Esta variante está descrita en las bases de datos *dbSNP* (rs9901455) y *ClinVar* (RCV000162563.1) como no patogénica.

La frecuencia observada en población Ibérica con el proyecto *1000Genomas* fue del 7% para el alelo "T". La frecuencia observada en el estudio *CIBERER* en población española (MAF=0,074) En la cohorte estudiada se observó esta variante en 12 familias, siempre en heterocigosis, situándose la frecuencia alélica similar a lo publicado, MAF=0,074.

#### ➤ c.494G>A (p.Arg165Gln)

Este cambio de base en el exón 6 de *RAD51D* produce un cambio en la síntesis de la proteína. El aminoácido 165 cambia de arginina a glutamina (R165Q). Esta variante ha sido descrita en las bases de datos *dbSNP* (rs4796033) y *ClinVar* (RCV000131069.2) como no patogénica.

La frecuencia observada en población Ibérica con el proyecto *1000Genomas* fue del 13% para el alelo "A". La frecuencia observada en el estudio *CIBERER* en población española fue de 0,114. En este estudio se observó esta variante en 16 familias, en dos de ellas en homocigosis, situándose el MAF en 0,129.

#### ➤ C.698A>C (p.Glu233Gly)

La variante c.698A>G localizada en el exón 8 provoca un cambio de aminoácido en la posición 233 de la proteína de glutámico a glicina (E233G). Esta variante ha sido descrita en *ClinVar* (RCV000203773.1) y en *dbSNP* (rs28363284) como variante no patogénica. En la base de datos *LOVD* aparece como variante de significado clínico desconocido.

La frecuencia observada en población Ibérica con el proyecto *1000Genomas* es de 1% para el alelo "C". La frecuencia observada en el estudio *CIBERER* en población española fue: MAF=0,016. Solo se observó esta variante en una familia por lo que la frecuencia alélica menor de la variante fue del 0,004.

### 3.5 Grandes Reordenamientos génicos

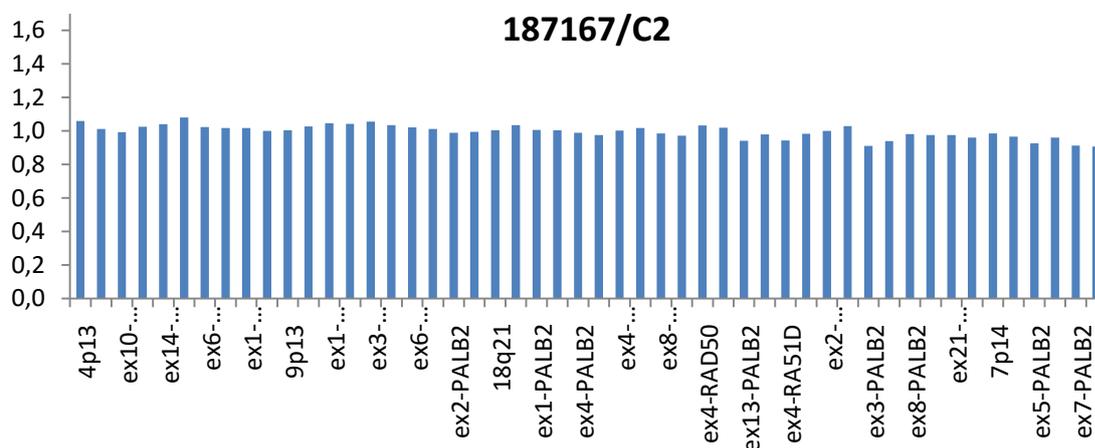
El estudio de grandes reordenamientos génicos (LGR) mediante la técnica de MLPA requiere un estado óptimo del material genético, dado que muchas de las muestras sobre las que se ha trabajado son muy antiguas, no fue posible realizar la determinación sobre todas las familias seleccionadas para el estudio genético de *RAD51C* y *RAD51D*. Dentro de las posibilidades que ofrecían las muestras, se seleccionaron preferentemente aquellas familias con fenotipo de CM/CO y CO. Se estudiaron 83 familias, 53 con fenotipo de CM/CO, 15 con CO y 15 con bCM. En la **Tabla 33** se muestra la distribución tanto de las familias como de los casos índice en función del tipo de cáncer que presentaban. La proporción de casos índice con cáncer de mama fue de un 33,7%, con cáncer de mama bilateral de un 16,9% y con cáncer de ovario de un 33,7%. Un 10% de los casos estudiados estaban afectados de mama y ovario.

<b>LGR de <i>RAD51C</i> y <i>RAD51D</i></b>	
<b>Fenotipo familiar</b>	<b>n=83 (%)</b>
Nº de familias con bCM	15 (18)
Nº de familias con CO	15 (18)
Nº de familias con CM/CO	53 (64)
<b>Fenotipo del caso índice</b>	
Nº de CI con CM	28 (33,7)
Nº de CI con bCM	14 (16,9)
Nº de CI con CO	28 (33,7)
Nº de CI con CMO	9 (10,8)
Nº de CI con CM y C. Endometrio	1 (1,2)
Nº de CI con C. Endometrio	1 (1,2)
Nº de CI no afectados	2 (2,4)

**Tabla 33:** Distribución de las familias y de los casos índices a los que se les ha realizado estudio de grandes reordenamiento génicos. LGR: Grandes Reordenamientos Génicos. CI: caso índice.

CM: cáncer de mama. CO: cáncer de ovario. CMO: cáncer de mama y ovario. bCM: cáncer de mama bilateral.

En ninguna de las muestras analizadas se obtienen grandes reordenamientos génicos, no se identificó ninguna amplificación ni deleción (**Figura 36**).



**Figura 36:** Análisis de los resultados MLPA. Perfil de picos en una plantilla Excel® mediante la normalización de las áreas relativas con respecto a las áreas de los controles sanos.

#### 4. Estudios de correlación genotipo-fenotipo

Se realizó una clasificación de los casos según el resultado del test genético (**Tabla 34**). De tal manera, que se obtuvieron 108/645 (16,7%) casos índice portadores de alguna variante patológica en *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C* o *RAD51D* y 537/645 (83,3%) casos en los que no se detectó ninguna variante patológica.

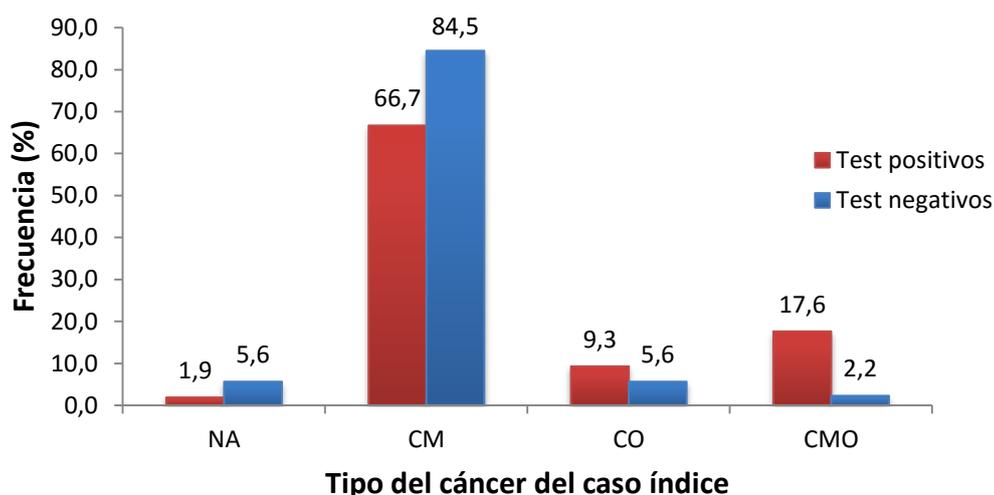
El diagnóstico de cáncer de mama represento el 43,5% de los casos portadores de mutación, frente al 71,5% que represento en el grupo de no portadoras. Sin embargo, cuando se trata de cáncer de mama bilateral o cáncer de mama en el varón, los porcentajes fueron mayores en el grupo de los portadores; 17,6% de tumores bilateral y 5,5% de tumores en el varón, frente a 9,7% y 2% en los no portadores.

La frecuencia de cáncer de ovario fue mayor en el grupo con resultados de test genético positivo, un 9,3% frente a un 5,6% en el grupo con test negativo. De igual manera, el porcentaje de casos con cáncer de mama y ovario o con cáncer de mama bilateral y ovario fue mayor en el grupo de los portadores; 9,3% casos con ovario y 13,9% casos con cáncer de mama y ovario, frente a 5,6% y 2% en los no portadores.

	Portadores n=108 (%)	No portadores n=537 (%)
Cáncer de mama	47 (43,5)	384 (71,5)
Cáncer bilateral de mama	19 (17,6)	52 (9,7)
Cáncer de mama en varón	6 (5,5)	11 (2)
Cáncer de ovario	10 (9,3)	30 (5,6)
Cáncer de mama y ovario	15 (13,9)	11 (2)
Cáncer de mama bilateral y ovario	4 (3,7)	1 (0,2)
Cáncer de mama y endometrio	0 (0)	6 (1,1)
Cáncer de páncreas	0 (0)	2 (0,4)
No afectado	2 (1,9)	29 (5,5)
Desconocido	5 (4,6)	11 (2)

**Tabla 34:** Clasificación de los casos según el resultado del test genético.

Agrupando los diagnósticos de forma más general, la afectación de la mama supone el 66,7% de los casos con test genético positivo, frente al 84,5% de los casos con test negativo. Los casos de cáncer de ovario tuvieron un mayor peso en el grupo de los pacientes con test genético positivo, un 9,3% frente a un 5,6% en el grupo de los negativos. La frecuencia de pacientes con cáncer de mama y ovario fue mayor en el grupo positivo, un 17,6% frente a 2,2% de los pacientes con test genético negativo. En todos los grupos se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) (Figura 37).



**Figura 37:** Diagrama de barras que representa la frecuencia de los tipos de cáncer de los casos índice en función del resultado del estudio genético. NA: Caso índice no afectado; CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario.

En la **Tabla 35** se muestra la distribución de casos en función del diagnóstico y el resultado genético.

De entre todos los casos con test genético negativo, se clasificaron como *BRCAX* aquellas familias que cumplían criterios de alto o moderado riesgo, siendo un total de 476 (88,6%). Las familias con test negativo que no cumplían ningún criterio de riesgo se clasificaron como casos sin riesgo, 50 (9,3%). Finalmente, 11 (2%) casos con test negativo no se clasificaron por falta de información en las fuentes consultadas.

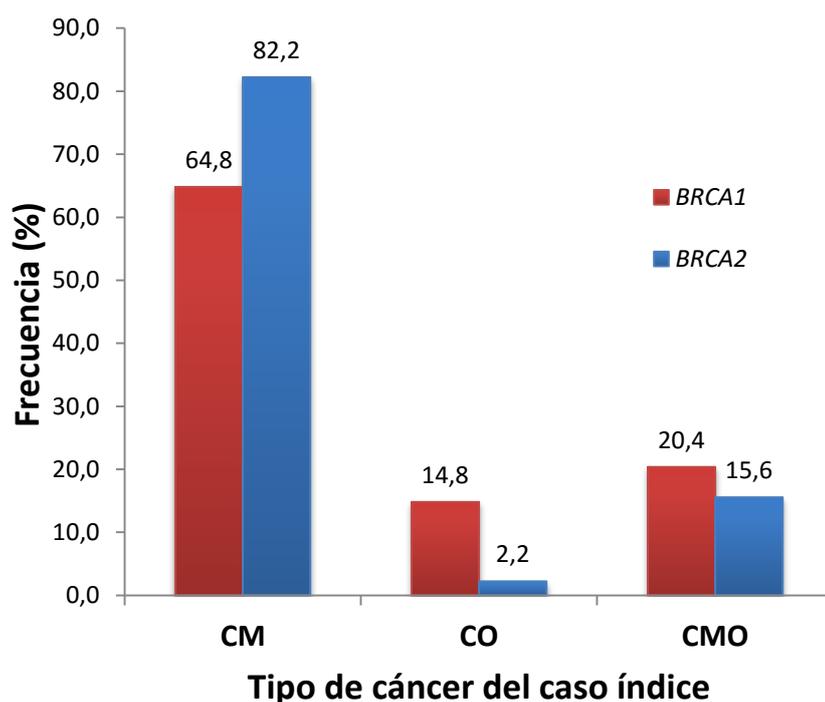
El número de casos de cáncer de mama fue de un 75,3% en el grupo *BRCAX*, de un 52,2% en el grupo *BRCA2* y de un 38,3% en el grupo *BRCA1*. Sin embargo, los casos con cáncer de mama bilateral fueron más frecuentes en el grupo de *BRCA1*, con un 20% de los positivos en *BRCA1* frente a un 15,2% en *BRCA2*. En el grupo *BRCAX* los casos de mama bilateral fueron el 10,7%. Los casos de cáncer de mama en el varón representaron un 13% de los diagnósticos en el grupo *BRCA2*, no encontrándose ningún caso *BRCA1* positivo y representando el 2,1% de los casos *BRCAX*.

Los casos índice diagnosticados de cáncer de ovario representaron el 13,3% de los casos *BRCA1* positivos, el 2,2% de los *BRCA2* y el 4,4% de los *BRCAX*. El único caso con mutación en *RAD51D* fue diagnosticado de cáncer de ovario. Los casos diagnosticados de cáncer de mama y ovario fueron el 16,7% del grupo *BRCA1*, el 8,7% del grupo *BRCA2*, el 100% de los positivos para *RAD51C* y el 2,3 de los *BRCAX*. Sin embargo, cuando se trata de pacientes diagnosticados de cáncer de ovario y cáncer de mama bilateral, fue mayor el porcentaje de en el grupo *BRCA2* positivo, con un 6,5% de los casos frente a un 1,7% en el grupo *BRCA1* positivo. Un solo paciente con este diagnóstico forma parte del grupo *BRCAX*, 0,2%. Los pacientes con diagnóstico de cáncer de mama y endometrio no presentaron variantes génicas patogénicas en los genes estudiados, siendo el 0,6% de los casos *BRCAX* y el 6% del grupo sin riesgo.

	Portadores (n=108)				No Portadores (n=537)		
	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>RAD51C</i>	<i>RAD51D</i>	<i>BRCAX</i>	Sin riesgo	Riesgo desconocido
	60 (100%)	46 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	476 (100%)	50 (100%)	11 (100%)
<b>Cáncer de mama</b>	23 (38,3)	24 (52,2)	0 (0)	0 (0)	358 (75,3)	24 (48)	2 (18,2)
<b>Cáncer bilateral de mama</b>	12 (20)	7 (15,2)	0 (0)	0 (0)	51 (10,7)	0 (0)	1 (9,1)
<b>Cáncer de mama en varón</b>	0 (0)	6 (13)	0 (0)	0 (0)	10 (2,1)	0 (0)	1 (9,1)
<b>Cáncer de ovario</b>	8 (13,3)	1 (2,2)	0 (0)	1(100)	21 (4,4)	9 (18)	0 (0)
<b>Cáncer de mama y ovario</b>	10 (16,7)	4 (8,7)	1 (100)	0 (0)	11 (2,3)	0 (0)	0 (0)
<b>Cáncer de mama bilateral y ovario</b>	1 (1,7)	3 (6,5)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)	0 (0)	0 (0)
<b>Cáncer de mama y endometrio</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (0,6)	3 (6)	0 (0)
<b>Cáncer de páncreas</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0,2)	1 (2)	0 (0)
<b>No afectado</b>	1 (1,7)	1 (2,2)	0 (0)	0 (0)	16 (3,4)	11 (22)	2 (18,2)
<b>Desconocido</b>	5 (8,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (0,8)	2 (4)	5 (45,4)

**Tabla 35:** Casos según el resultado del estudio genético y el tipo de cáncer del caso índice. *BRCAX*: Familias con criterios de alto o moderado riesgo con test genético negativo.

En la **Figura 38** se representó gráficamente la distribución de los casos índice en función del gen *BRCA* afectado. En el caso de los diagnósticos de cáncer de mama y cáncer de mama y ovario las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, en el cáncer de ovario si hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,003$ ), con un 14,8% de los casos *BRCA1* positivos frente a un 2,2% de los casos con mutación en el gen *BRCA2*.



**Figura 38:** Diagrama de barras que representa la frecuencia de los tipos de cáncer de los casos índice portadores de variantes patogénicas en función del gen *BRCA1* o *BRCA2*.

A continuación se describen detalladamente las características de los cánceres de mama, ovario y la historia oncológica de los familiares en función de los grupos *BRCA1*, *BRCA2* y *BRCA1/2*. Un cuarto grupo corresponde a las 150 familias seleccionadas por su fenotipo para la ampliación del estudio genético de *RAD51C* y *RAD51D* (grupo Seleccionados). En primer lugar se recogieron los datos clínicos referentes a los casos índice con cáncer de mama (**Tabla 36**), completando la información con las características histológicas en la **Tabla 37** e inmunohistoquímicas en la **Tabla 38**. Posteriormente se agruparon los datos clínicos de los casos con cáncer de ovario en la **Tabla 39** y las características histológicas en la **tabla 40**.

## 4.1 Cáncer de mama

Se analizaron las características clínicas de 525 pacientes con cáncer de mama (**Tabla 36**). De todos ellos, 46 fueron portadores de alguna variante patogénica en *BRCA1* y 44 en *BRCA2*. Dentro del grupo de los *BRCAX*, 435 casos índice fueron diagnosticados de cáncer de mama. Entre los casos seleccionados para la ampliación del estudio genético 113 fueron diagnosticados de cáncer de mama.

La media de edad de diagnóstico en el grupo de *BRCA1* fue de 40,6 ( $\pm 11,6$ ) años, 45,7 ( $\pm 12,5$ ) años para *BRCA2* y de 42,4 ( $\pm 10,2$ ) para *BRCAX*, encontrando diferencias significativas entre los cánceres de mama *BRCA+* y los *BRCAX*.

Los cánceres de mama con edades de diagnóstico menores pertenecen al grupo *BRCA1*, con un 15,5% de ellos diagnosticados antes de los 30 y un 46,6% entre los 30 y los 40 años. El grupo con tumores de mama diagnosticados a edades más avanzadas fue el de pacientes Seleccionados con un 30,6% de tumores diagnosticados después de los 50 años.

### 4.1.1 Historia familiar

En cuanto a la historia familiar, la mayoría de los casos con cáncer de mama presentaron antecedentes familiares de cáncer de mama, en concreto, un 86% en el grupo *BRCA1*, un 81% en el grupo *BRCA2*, un 91,7% en el *BRCAX* y un 68,5% en el grupo de los pacientes Seleccionados. Se observaron diferencias significativas entre el grupo de *BRCA+* y el grupo *BRCAX* ( $p=0,024$ ). Entre el grupo *BRCA+* y el grupo de Seleccionados estas diferencias se acentuaron debido al proceso de selección. ( $p=0,01$ ). (**Tabla 36**).

La historia familiar de cáncer de ovario estuvo presente en un 38,1% de mujeres con tumores de mama portadoras de mutaciones en *BRCA1*, en un 26,2% de los casos *BRCA2*, en un 13,6% de los *BRCAX* y en un 33,3% de los Seleccionados. Se encontró una fuerte asociación en el grupo *BRCA+* y los casos de cáncer de mama con antecedentes familiares de cáncer de ovario, con diferencias estadísticamente significativas con el grupo *BRCAX*. El riesgo estimado de ser portador de una variante patogénica en los genes *BRCA* para los casos de CM con historia familiar de CO, es de 3,98 (IC95%:2,29-6,91).

#### 4.1.2 Cáncer de mama bilateral

En el grupo *BRCA1*, el 32,6% de las neoplasias de mama tuvieron afectación bilateral, siendo menor este porcentaje en el grupo *BRCA2* con el 22,7% de los CM, en el grupo *BRCAx* los cánceres de mama bilaterales fueron el 12,2%. En el grupo de Seleccionados el porcentaje fue del 46%. Se encontraron diferencias significativas ente los grupos genéticos *BRCA+* y el grupo *BRCAx* ( $p < 0,001$ ). Estimándose un riesgo tres veces mayor de tener un diagnóstico de cáncer de mama bilateral en el grupo *BRCA+* (IC95%: 1,12-3,65).

A la hora de analizar las características de los tumores contralaterales se observó en el grupo *BRCA1* que el 80% de ellos fueron de tipo metacrónico presentando la edad de aparición del tumor contralateral más baja de todos los grupos, 48 años de media. El grupo *BRCA2* tuvo un 70% de los tumores bilaterales metacrónicos, con una edad media de diagnóstico del cáncer contralateral de 53,3 años. Los años de intervalo de aparición del cáncer contralateral fueron similares entre los grupos por los que no se encontraron diferencias significativas (**Tabla 36**).

#### 4.1.3 Cáncer de mama en varón

Seis de los casos de cáncer de mama en el varón fueron portadores de variantes patogénicas, concretamente en el gen *BRCA2*, siendo el 13,6% de los tumores de mama en este grupo. En el grupo *BRCA1* no hubo ningún caso índice diagnosticado con esta patología y en el grupo *BRCAx* se incluyeron 10 casos, el 2,3% de los tumores de mama en este grupo. Se obtuvieron diferencias significativas ente los grupos, estimando que un varón con cáncer de mama tiene 3,04 (IC95%: 1,07-8,58) veces más riesgo de ser portador de una variante en *BRCA*.

Variable	Categoría	N(%) / Media				Seleccionados N=113	P1	P2	P3	RR2	RR3
		BRCA1 N=46	BRCA2 N=44	BRCAX N=435							
Media de edad de diagnóstico (DS)		40,6 (11,6)	45,7 (12,5)	42,4 (10,2)	46,5 (11,5)	0,969	<b>0,012</b>	0,338			
Grupos de edad de diagnóstico	<30	7 (15,5)	3 (6,9)	26 (6,1)	3 (2,7)						
	30-40	21 (46,6)	13 (30,2)	182 (42,2)	33 (29,7)						
	41-50	8 (17,7)	16 (37,3)	149 (34,3)	41 (37)						
	>50	9 (20,2)	11 (25,6)	75 (17,4)	34 (30,6)						
Historia familiar de CM	Sí	37 (86)	34 (81)	397 (91,7)	76 (68,5)	0,527	<b>0,024</b>	<b>0,01</b>	<b>0,46</b> <b>(0,24-0,91)</b>	<b>2,28</b> <b>(1,25-4,16)</b>	
	No	6 (14)	8 (19)	36 (8,3)	35 (31,5)						
Historia familiar de CO	Sí	16 (38,1)	11 (26,2)	59 (13,6)	37 (33,3)	0,243	<b>&lt;0,001</b>	0,121	<b>3,98</b> <b>(2,29-6,91)</b>		
	No	26 (61,9)	31 (73,8)	374 (86,4)	74 (66,7)						
bCM	Sí	15 (32,6)	10 (22,7)	53 (12,2)	52 (46)	0,426	<b>&lt;0,001</b>	0,125	<b>2,99</b> <b>(1,74-5,14)</b>		
	No	31 (67,4)	34 (77,3)	382 (87,8)	61 (54)						
Tipo CC	Sincrónico	3 (20)	3 (30)	22 (42,3)	22 (43,1)	0,566	0,118	0,104			
	Metacrónico	12 (80)	7 (70)	30 (57,7)	29 (56,9)						
Edad media de Dx CC (DS)		48 (8,4)	53,3 (14,5)	53,29 (9,1)	53,28 (8,88)	0,133	0,356	0,276			
Años intervalo de CC (DS)		6,3 (5,6)	6,1 (5,6)	5,41 (6,7)	5,41 (6,7)	0,926	0,511	0,5			
vCM	Sí	0 (0)	6 (13,6)	10 (2,3)	0 (0)	<b>0,01</b>	<b>0,028</b>	<b>0,003</b>	<b>3,04</b> <b>(1,07-8,58)</b>	<b>1,06</b> <b>(1,01-1,11)</b>	
	No	46 (100)	38 (86,4)	423 (97,7)	113 (100)						

**Tabla 36:** Características clínicas de los pacientes con cáncer de mama según los grupos *BRCA1*, *BRCA2*, *BRCAX* y el grupo de pacientes seleccionados para la ampliación de estudio genético. CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; bCM: Cáncer de mama bilateral; CC: Cáncer contralateral; vCM; Cáncer de mama en el varón. P1: Grupo *BRCA1* versus grupo *BRCA2*; P2: Grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*; P3: Grupo *BRCA1/BRCA2* versus Seleccionados; RR2: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*. RR3: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1/BRCA2* versus Seleccionados. DS: Desviación estándar.

\*Se estimaron los riesgos relativos entre las variables categóricas que fueron significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4 Características histológicas e inmunohistoquímicas

Para el estudio de las características histológicas e inmunohistoquímicas de los tumores de mama, se consideraron los cánceres contralaterales de las mujeres con cáncer de mama bilateral como entidades independientes. Se contemplaron datos de 603 neoplasias de mama ya que, además de los 525 pacientes con cáncer de mama, se incluyeron 78 cánceres contralaterales de los 78 pacientes con cáncer de mama bilateral (71 mujeres con cáncer de mama bilateral, 5 con cáncer de mama bilateral y cáncer de ovario, una con cáncer de mama bilateral y cáncer de endometrio y un varón con cáncer de mama bilateral).

En la **tabla 37** se reflejan las características histopatológicas mostrando un alto porcentaje de carcinomas de tipo ductal en todos los grupos de estudio sin encontrarse diferencias estadísticamente significativa. Los carcinomas medulares fueron un 14,3% en el grupo *BRCA1* y los carcinomas lobulillares un 9,8% en el grupo *BRCA2*. Las histologías más dispares se localizaron exclusivamente en el grupo de los *BRCAX*, con un caso de carcinoma filoides, un carcinoma tipo coloide y un carcinoma papilar.

En cuanto al tamaño del tumor primario, el 48,4% de todos los tumores se clasificaron como pT0-pT1, el 42,3% como pT2 y el 9,3% como pT3-pT4. No hubo diferencias significativas entre los distintos grupos. El 47% de todos los tumores no presentó afectación de los ganglios linfáticos, el 36,7% presentó una afectación de ganglios pN1 y el 16,3% la presentó en un estadio pN2-pN3. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos. El estadio clínico que presentó el 28,8% de las neoplasias estuvo comprendido entre la clase 0 y I. El 31,2% presentó estadio II y el 40% estuvo entre el estadio III-IV.

Variable	Categoría					P1	P2	P3	RR2 *
	Todos CM N (%)	BRCA1 N (%)	BRCA2 N (%)	BRCAX N (%)	Seleccio- nados N (%)				
<b>Histología</b>						0,007	0,676	0,214	
<b>Carcinoma ductal</b>	394 (87,3)	36 (85,7)	37 (90,2)	321 (87,3)	73 (83,9)				
<b>Carcinoma medular</b>	19 (4,3)	6 (14,3)	0 (0)	13 (3,5)	3 (3,5)				
<b>Carcinoma lobulillar</b>	31 (6,9)	0 (0)	4 (9,8)	27 (7,3)	10 (11,5)				
<b>Carcinoma mucinoso</b>	4 (0,8)	0 (0)	0 (0)	4 (1,1)	0 (0)				
<b>Otros</b>	3 (0,7)	0 (0)	0 (0)	3 (0,8)	1 (1,1)				
<b>Tumor primario (pT)</b>						0,131	0,768	0,778	
<b>pT0-T1</b>	119 (48,4)	16 (51,6)	13 (50)	90 (47,6)	23 (57,5)				
<b>pT2</b>	104 (42,3)	11 (35,5)	13 (50)	80 (42,3)	14 (35)				
<b>pT3-T4</b>	23 (9,3)	4 (12,9)	0 (0)	19 (10,1)	3 (7,5)				
<b>Ganglios linfáticos regionales (pN)</b>						0,769	0,595	0,958	
<b>pN0</b>	118 (47)	17 (53,1)	11 (44)	90 (46,4)	21 (51,2)				
<b>pN1</b>	92 (36,7)	9 (28,1)	9 (36)	74 (38,1)	13 (31,7)				
<b>pN2-N3</b>	41 (16,3)	6 (18,8)	5 (20)	30 (15,5)	7 (17,1)				
<b>Estadio Clínico</b>						0,869	0,649	0,335	
<b>0-I</b>	69 (28,8)	8 (25,8)	6 (26,1)	55 (29,5)	16 (41)				
<b>II</b>	75 (31,2)	12 (38,7)	7 (30,4)	56 (29,9)	11 (28,2)				
<b>III-IV</b>	96 (40)	11 (35,5)	10 (43,5)	76 (40,6)	12 (30,8)				

**Tabla 37:** Características histológicas de los cánceres de mama según los grupos *BRCA1*, *BRCA2*, *BRCAX* y el grupo de pacientes seleccionados para la ampliación de estudio genético. P1: Grupo *BRCA1* versus grupo *BRCA2*; P2: Grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*; P3: Grupo *BRCA1/BRCA2* versus Seleccionados; RR2: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*. RR3: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1/BRCA2* versus Seleccionados.

\*Se estimaron los riesgos relativos entre las variables categóricas que fueron significativas ( $p < 0,05$ )

Los datos de los receptores inmuistoquímicos (**Tabla 38**) mostraron una fuerte asociación ente los RE negativos y *BRCA1* ( $p<0,001$ ). El 66,6% de los tumores *BRCA1* positivos no expresaron receptores estrogénicos frente al 19,5% de los *BRCA2* o al 22,2% de los *BRCAX*.

El 80% de todos los tumores no expresaron receptores HER2. En el grupo *BRCA1*, el 8,1% de los tumores si expresaron HER2, en el grupo *BRCA2* lo expresaron el 13,3%, en el grupo *BRCAX* lo expresaron 22,1% y en los Seleccionados el 23,1%. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,034$ ) en la expresión de HER2 entre las neoplasias BRCA+ y las *BRCAX*.

Estas diferencias en la expresión de receptores se traducen en diferencias significativas entre los grupos genotípicos en cuanto al subtipo molecular se refiere. La alta proporción de RE negativos, explica que sea poco común el subtipo molecular *Luminal A* en el grupo de *BRCA1*, con tan solo el 22,6% de las neoplasias frente al 70% y 62,4% de *BRCA2* y *BRCAX* respectivamente. Existe una fuerte asociación entre en los cánceres triples negativos y las mutaciones en *BRCA1* ( $p<0.001$ ), con un riesgo relativo de 14,73 (IC95%: 4,37-49,67). Incluso, se observó esta asociación ente *BRCA+* y *BRCAX* ( $p<0.001$ ). Estimándose que una mujer con cáncer de mama triple negativo tiene 4,29 veces (IC95%: 2,46-7,47) más riesgo de ser portadora de una mutación en BRCA (**Tabla 38**).

Los subtipos Luminal B y HER2 fueron poco frecuentes, con un 14,6% y un 6,6% de los tumores, respectivamente. Siendo el grupo con mayor tasa de luminal B el *BRCAX* con un 16,3% de los casos. El grupo con mayor tasa de tumores de subtipo HER2 fue el *BRCA2* con un 6,6% de los casos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Variable	Categoría					P1	P2	P3	RR1*	RR2*
	Todos CM N (%)	BRCA1 N (%)	BRCA2 N (%)	BRCAX N (%)	Seleccionados N (%)					
<b>RE</b>						<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,009</b>	<b>0,12 (0,44- 0,33)</b>	<b>0,37 (0,22- 0,61)</b>
<b>Negativos</b>	116 (26,2)	28 (66,6)	8 (19,5)	80 (22,2)	20 (24,1)					
<b>Positivos</b>	327 (73,8)	14 (33,3)	33 (80,5)	280 (77,8)	63 (75,9)					
<b>HER2</b>						0,487	<b>0,034</b>	0,052		<b>0,42 (0,18- 0,95)</b>
<b>Negativos</b>	292 (80)	34 (91,9)	26 (86,7)	232 (77,9)	50 (76,9)					
<b>Positivos</b>	73 (20)	3 (8,1)	4 (13,3)	66 (22,1)	15 (23,1)					
<b>Luminal A</b>						<b>&lt;0,001</b>	<b>0,02</b>	<b>0,036</b>	<b>0,1 (0,03- 0,31)</b>	<b>0,43 (0,25- 0,74)</b>
<b>Sí</b>	212 (58,6)	7 (22,6)	21 (70)	184 (62,4)	39 (60)					
<b>No</b>	150 (41,4)	24 (77,4)	9 (30)	111 (37,6)	26 (40)					
<b>Luminal B</b>						0,477	0,073	0,096		
<b>Sí</b>	53 (14,6)	2 (5,4)	3 (10)	48 (16,3)	11 (16,9)					
<b>No</b>	309 (85,4)	35 (94,6)	27 (90)	247 (83,7)	54 (83,1)					
<b>HER2+</b>						0,828	0,805	0,728		
<b>Sí</b>	24 (6,6)	2 (5,4)	2 (6,6)	20 (0,7)	3 (4,6)					
<b>No</b>	338 (93,4)	35 (94,5)	28 (93,4)	275 (99,3)	62 (95,4)					
<b>Triple Negativo</b>						<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>14,73 (4,37- 49,67)</b>	<b>4,29 (2,46- 7,47)</b>
<b>Sí</b>	73 (20,2)	26 (70,3)	4 (13,3)	43 (14,6)	12 (18,8)					
<b>No</b>	289 (79,8)	11 (29,7)	26 (86,7)	252 (85,4)	53 (81,2)					

**Tabla 38:** Características inmunohistoquímicas de los cánceres de mama según los grupos *BRCA1*, *BRCA2*, *BRCAX* y el grupo de pacientes seleccionados para la ampliación de estudio genético. P1: Grupo *BRCA1* versus grupo *BRCA2*; P2: Grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*; P3: Grupo *BRCA1/BRCA2* versus Seleccionados; RR1: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1* versus *BRCA2*; RR2: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*. RR3: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1/BRCA2* versus Seleccionados.

\*Se estimaron los riesgos relativos ente las variables categóricas que fueron significativas ( $p < 0,05$ )

## 4.2 Cáncer de ovario

Se realizó un estudio exhaustivo de 71 casos con cancer de ovario de los cuales solo 62 estaban clasificados en los grupos *BRCA1*, *BRCA2* o *BRCAX*. Esto es debido a que la selección para la ampliación de estudio genético de *RAD51C* o *RAD51D* no se realizó en función de los criterios de riesgo sino en función al fenotipo familiar, incluyendo en el estudio 9 casos índice con cáncer de ovario que no son incluidos en el grupo *BRCAX* por no cumplir criterios de alto o moderado riesgo.

La edad media de diagnóstico fue de 54,2 ( $\pm 11,3$ ) años para los pacientes del grupo *BRCA1*, de 53,9 ( $\pm 12,6$ ) para los pacientes del grupo *BRCA2* y 51 ( $\pm 14,6$ ) años para el grupo *BRCAX*. La edad media de los cáncer de ovario en el grupo de pacientes seleccionados fue la más baja con 48,4 ( $\pm 15,5$ ) años. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ninguno de los grupos (**Tabla 39**).

### 4.2.1 Historia Familiar

El porcentaje de casos con cáncer de ovario y antecedentes familiares de cáncer de mama en el grupo *BRCA1* fue de un 70,6%, en el grupo *BRCA2* de un 85,7%, en el grupo *BRCAX* de un 54,3% y en el grupo de Seleccionados de un 47,7%. Se vieron diferencias significativas ente los pacientes con cáncer de ovario *BRCA+* y los pacientes del grupo de seleccionados ( $p=0,04$ ), estimando un riesgo relativo de un 0,322 (IC95%: 0,107-0,971) (**Tabla 39**).

En los casos de cáncer de ovario con antecedentes familiares de la misma patología se observó una tendencia a pertenecer al grupo de *BRCA+*. El 94,1% de los casos de cáncer de ovario con mutaciones en *BRCA1* tuvieron antecedentes familiares de la misma patología. En el grupo *BRCA2* se obtuvo un 74,4% de los casos en esta situación y en el grupo *BRCAX* la misma proporción, un 74,4%. En el grupo de pacientes Seleccionados el 75% de los casos de cáncer de ovario tuvo historia familiar. Se observaron diferencias significativas entre entre el grupo de *BRCA1* y el grupo de *BRCA2* cuando se trata de casos con cáncer de ovario y familiares con cáncer de ovario ( $p=0,025$ ), estimando que un caso índice con cáncer de ovario y con historia familiar de cáncer de ovario tiene 4,2 veces (IC95%: 1,954-9,027) más riesgo de ser *BRCA1* que *BRCA2* (**Tabla 39**).

Variable	Categoría				P1	P2	P3	RR1	RR3
	BRCA1 N=18	BRCA2 N=9	BRCAX N=35	Seleccio nados N=44					
Media de edad de diagnóstico CO (DS)	54,2 (11,3)	53,9 (12,6)	51 (14,6)	48,4 (15,53)	0,807	0,179	0,168		
Historia familiar de CM	Sí	12 (70,6)	6 (85,7)	19 (54,3)	21 (47,7)	0,394	0,132	<b>0,04</b>	<b>0,322 (0,107-0,971)</b>
	No	5 (29,4)	1 (14,3)	16 (45,7)	23 (52,3)				
Historia familiar de CO	Sí	<b>16 (94,1)</b>	5 (74,4)	25 (74,4)	33 (75)	<b>0,025</b>	0,068	0,109	<b>4,2 (1,954-9,027)</b>
	No	<b>1 (5,9)</b>	2 (28,6)	10 (28,6)	11 (25)				
CMO	Sí	10 (55,6)	6 (85,7)	14 (40)	14 (31,8)	0,132	0,089	<b>0,014</b>	<b>0,280 (0,099-0,794)</b>
	No	8 (44,4)	1 (14,3)	21 (60)	30 (38,2)				
Años intervalos 2º cáncer		7,38 (10,3)	7,17 (6,05)	8,86 (7,6)	8,86 (7,6)	0,807	0,679	0,679	
Primero caso CO	Sí	3 (30)	4 (66,7)	7 (50)	7 (50)	0,119	0,705	0,705	
	No	7 (70)	2 (33,3)	7 (50)	7 (50)				

**Tabla 39:** Características clínicas de los pacientes cáncer de ovario según los grupos *BRCA1*, *BRCA2*, *BRCAX* y los seleccionados para la ampliación del estudio genético. CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario; P1: Grupo *BRCA1* versus grupo *BRCA2*; P2: Grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*; P3: Grupo *BRCA1/BRCA2* versus Seleccionados; RR2: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1/BRCA2* versus *BRCAX*. RR3: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1/BRCA2* versus Seleccionados; DS: Desviación estándar.

\*Se estimaron los riesgos relativos ente las variables categóricas que fueron significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1 Cáncer de mama y ovario

La prevalencia de coafectación de cáncer de mama y ovario fue mayor en el grupo de *BRCA2* con respecto al grupo *BRCA1* (85,7% en *BRCA2* frente al 55,6% de los casos de *BRCA1*). Teniendo en cuenta que el número de familias *BRCA1* fue mayor que las *BRCA2*, la frecuencia de casos positivos diagnosticados con cáncer de mama y ovario fue similar en ambos grupos, incluso un poco mayor en el grupo de *BRCA1* (15,6% en *BRCA2* frente a 20,4% en *BRCA1*) (**Tabla 39**).

Los años de intervalo entre ambas neoplasias fueron de una media de 7,38 en el grupo *BRCA1*, de 7,17 en el grupo *BRCA2* y de 8,86 en el grupo *BRCAX*. En el grupo *BRCA2* destacó que el 66,7% de los pacientes diagnosticados de las dos neoplasias tuvo primero el tumor de ovario. En el grupo *BRCA1* el 30% tuvo primero el cáncer de ovario y en el grupo *BRCAX* el 50%. No se encontraron diferencias significativas.

#### 4.2.2 Características histológicas

El 48,65% de todos los cánceres de ovario fueron de tipo seroso, el 24,4% de tipo mucinoso, el 13,5% endometroide, el 8% de células clara, el 2,7% mulleriano y el 2,7% transicional. En el grupo de *BRCA1* el porcentaje de carcinomas serosos aumentó hasta el 77,8% y en *BRCA2* hasta un 66,6% (**Tabla 40**). Se encontraron diferencias significativas entre el grupo *BRCA1* y el grupo de Seleccionados ( $p < 0,026$ ).

Los estadios de la escala FIGO se agruparon en dos subgrupos, el primero de ellos englobó los estadios I y II, y el segundo los estadios III y IV. El 61,1% de todas las neoplasias de ovario pertenecieron al segundo subgrupo, fueron tumores de alto grado. El 80% de los tumores *BRCA1* se clasificó entre los estadios III y IV, así como el 100% de los tumores *BRCA2* y el 53,5% de los tumores *BRCAX*. Las diferencias encontradas no fueron significativas estadísticamente.

Variable	Categoría				Seleccio nados N(%)	P1	P2	P3
	Todos CO N(%)	BRCA1 N(%)	BRCA2 N(%)	BRCAX N(%)				
<b>Histología</b>						0,206	0,051	<b>0,026</b>
<b>Seroso</b>	18 (48,6)	7 (77,8)	2 (66,6)	9 (36)	9 (36)			
<b>Mucinoso</b>	9 (24,4)	0 (0)	0 (0)	9 (36)	9 (36)			
<b>Endometroide</b>	5 (13,5)	0 (0)	1 (33,4)	4 (16)	4 (16)			
<b>Células claras</b>	3 (8,1)	0 (0)	0 (0)	3 (12)	3 (12)			
<b>Mulleriano</b>	1 (2,7)	1 (11,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
<b>Transicional</b>	1 (2,7)	1 (11,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
<b>Estadio (FIGO)</b>						0,408	0,115	0,083
<b>I-II</b>	14 (38,9)	1 (20)	0 (0)	10 (43,5)	13 (46,4)			
<b>III-IV</b>	22 (61,1)	4 (80)	3 (100)	13 (53,5)	15 (53,6)			

**Tabla 40:** Características histológicas de los cánceres de ovario según los *grupos BRCA1, BRCA2, BRCAX* y los seleccionados para la ampliación del estudio genético. CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; CMO: Cáncer de mama y ovario; P1: Grupo *BRCA1 versus grupo BRCA2*; P2: Grupo *BRCA1/BRCA2 versus BRCAX*; P3: Grupo *BRCA1/BRCA2 versus Seleccionados*; RR2: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1/BRCA2 versus BRCAX*. RR3: Riesgo Relativo Grupo *BRCA1/BRCA2 versus Seleccionados*.

#### 4.3 Tipos de cáncer de los antecedentes familiares de los casos índice

En la **Tabla 41** se analizaron los tipos de cáncer (distintos al cáncer de mama) observados en las familias de los casos índice según los grupos *BRCA+*, *BRCAX*, o los Seleccionados. Se observó una mayor frecuencia de casos de cáncer de ovario en familiares de los casos *BRCA1/2 positivos* (33,9% frente a 14,9%), aunque la mayor proporción de familiares con cáncer de ovario se sitúa en el grupo de los seleccionados para ampliación de estudio genético (48%). El 11,3% de los casos en *BRCA+* tuvo antecedentes de cáncer gástrico, frente al 4,2% en *BRCAX* y un 6,6% en los seleccionados.

Se encontraron antecedentes de cáncer de páncreas en el 8,2% de los casos en *BRCA+* frente al 7,5% en *BRCAX* y un 8,6% en los seleccionados.

El cáncer colorrectal estuvo muy presente en el grupo de los seleccionados para la ampliación del estudio (11,5% de los casos en *BRCA+* frente a 12,6% en *BRCAX* y un 17,3% en los seleccionados).

Otros tipos de cáncer familiares	Casos índice con historia familiar n=582 N (%)	Nº de casos índice <i>BRCA+</i> n=106 N (%)	Nº de casos índice <i>BRCAX</i> n=476 N (%)	Nº de casos índice SELECCIONADOS n=150 N (%)
Cáncer de ovario	107 (18,3)	36 (33,9) <i>BRCA1</i> : 24 <i>BRCA2</i> : 12	71 (14,9)	72 (48,0)
Cáncer de próstata	65 (11,2)	9 (8,5) <i>BRCA1</i> : 6 <i>BRCA2</i> : 3	56 (11,8)	16 (10,6)
Cáncer de páncreas	26 (4,5)	6 (5,6) <i>BRCA1</i> : 3 <i>BRCA2</i> : 3	20 (4,2)	10 (6,6)
Cáncer gástrico	48 (8,2)	12 (11,3) <i>BRCA1</i> : 7 <i>BRCA2</i> : 5	36 (7,5)	13 (8,6)
Cáncer de pulmón	73 (12,5)	11(10,4) <i>BRCA1</i> :3 <i>BRCA2</i> :8	62 (13)	18 (12)
Cáncer colorrectal	67 (11,5)	7 (6,6) <i>BRCA1</i> :5 <i>BRCA2</i> : 2	60 (12,6)	26 (17,3)
Cáncer hepático	12 (2,1)	3 (2,8) <i>BRCA1</i> :2 <i>BRCA2</i> :1	9 (1,9)	0 (0)
Cáncer de cabeza y cuello	38 (6,5)	7 (6,6) <i>BRCA1</i> :3 <i>BRCA2</i> :4	31 (6,5)	9 (6)
Cáncer cerebral	19 (3,3)	3 (2,8) <i>BRCA1</i> :1 <i>BRCA2</i> :2	16 (3,4)	5 (3,3)
Otros tipos cáncer	107 (18,4)	10 (9,4) <i>BRCA1</i> :4 <i>BRCA2</i> :6	97 (20,4)	32 (21,3)

**Tabla 41:** Frecuencias de tipos de cánceres distintos al cáncer de mama observados en las familias de los casos índices pertenecientes, según el grupo de los casos *BRCA1/2* positivos, *BRCAX* y las familias seleccionadas.

## **V. Discusión**



## 1. Rendimiento diagnóstico del test BRCA.

Entre un 5-10% de los casos de cáncer de mama se consideran de tipo hereditario y atribuibles a mutaciones heredadas en genes de susceptibilidad. Los dos principales genes conocidos de susceptibilidad y alta penetrancia en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH) son *BRCA1* y *BRCA2*, aunque solo explican alrededor de un 20-25% de este tipo de cánceres (145,163).

En relación a estos datos, la tasa de detección de variantes patogénicas en *BRCA* obtenida en este estudio fue de 16,5% (106/645). Sin embargo, esta tasa es menor en comparación con otros estudios poblacionales (164–166), situación que podría explicarse por los 53 pacientes (8,2%) que no cumplían los criterios de alto o moderado riesgo establecidos por el grupo de trabajo de consejo genético en cáncer de mama y ovario hereditario. El largo periodo en el que se empezó el estudio (prácticamente 8 años), y que ha implicado cambios en los criterios clínicos de selección, o bien, los criterios de clasificación empleados en este estudio (donde pueden haber intervenido otros factores no controlados), quizá haya influido en este hallazgo. Además se ha de añadir la limitación que ha supuesto no poder clasificar 16 casos (2,5%) por tener una información incompleta de los casos índice o de sus familiares. Si se considera la tasa de *BRCA+* seleccionando solo los pacientes que cumplen los criterios de moderado o alto riesgo, el rendimiento diagnóstico del test *BRCA* se situaría en un 17% (98/574). Estos resultados son más acordes con lo que existe en la bibliografía, aunque de esta manera 8 casos positivos no habrían sido detectados (**Figura 29**, página 94).

Recientemente, la SEOM ha publicado una nueva guía clínica sobre síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (167). En este trabajo, entre otras novedades, destacan las nuevas recomendaciones sobre criterios de selección para la realización de test genético a familias con riesgo incrementado de cáncer de mama y ovario hereditario (**Tabla 42**). En estas nuevas recomendaciones encontramos importantes variaciones como la desaparición de las distintas categorías de riesgo (moderado o alto) remplazadas por un único nivel de riesgo; la desaparición de la restricción a familiares de primer y segundo grado por alusiones a individuos de la misma rama familiar; o la incorporación de la histología e inmunohistoquímica de los tumores del caso índice como característica a

tener en cuenta (como los tumores de ovario epiteliales de alto grado o los tumores de mama triple negativo).

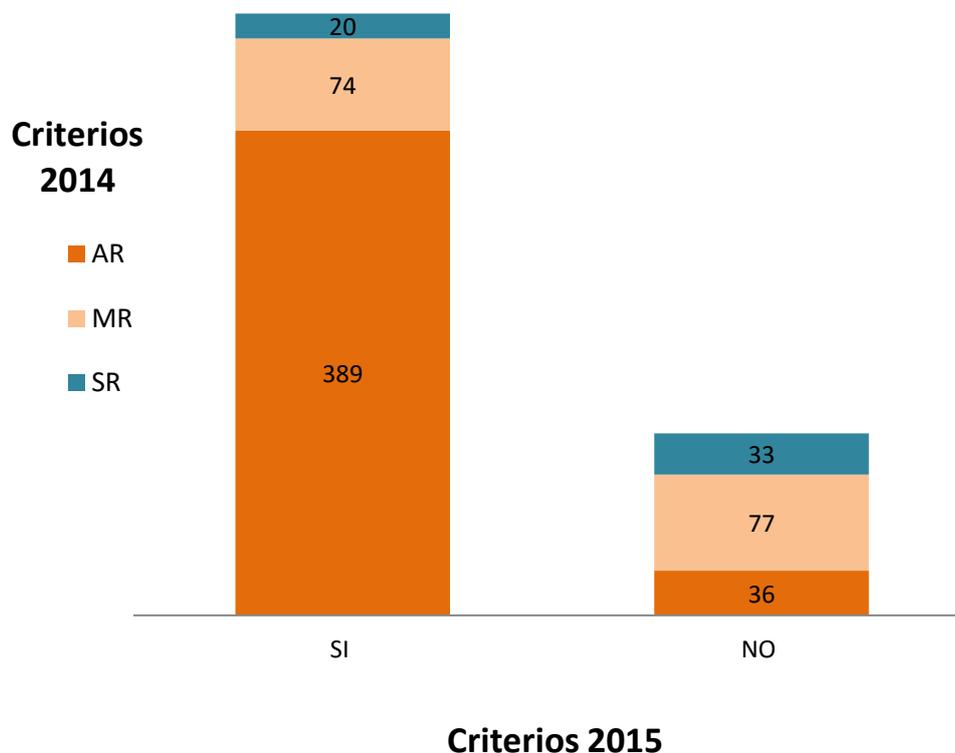
<b>Independientemente de la historia familiar</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Diagnóstico sincrónico o metacrónico de cáncer de mama y ovario mismo individuo.</b></li> <li>• <b>Un caso de cáncer de mama menor o igual a 35 años (o menor o igual a 40 años en caso de familia no informativa<sup>a</sup>).</b></li> <li>• <b>Un caso de cáncer de mama bilateral (primer diagnóstico menos o igual a 40 años).</b></li> <li>• <b>Caso de cáncer de mama triple negativo menor o igual a los 50 años.</b></li> <li>• <b>Un caso de cancer de ovario epitelial de alto grado no mucinoso (o tubo de Falopio o cáncer peritoneal primario)</b></li> </ul>
<b>Dos o más familiares<sup>b</sup> cumplen alguno de los siguientes criterios</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Un caso de cáncer de mama bilateral más un caso de cáncer de mama menor o igual a 50 años.</b></li> <li>• <b>Un cáncer de mama en el varón.</b></li> <li>• <b>Un caso de cáncer de mama y uno de cáncer de ovario.</b></li> <li>• <b>Dos casos de cáncer de mama diagnosticados antes de los 50 años.</b></li> <li>• <b>Tres o más familiares con cáncer de mama y/o ovario<sup>b</sup>.</b></li> </ul>
<b>Tres o más familiares con cáncer de mama y cáncer de ovario.</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Tres o más cáncer de mama y/o ovario.</b></li> </ul>

**Tabla 42.** Criterios de selección de pacientes para el test genético recomendados por la SEOM a partir de la guía clínica de 2015.

<sup>a</sup> familia no informativa es aquella con menos de dos mujeres que han vivido hasta la edad de 45 años o más por cada lado familiar.

<sup>b</sup> En la misma rama familiar.

En base a estos nuevos criterios se han reclasificado las familias del estudio obteniendo un 79.4% (512/645) de coincidencia entre criterios y un 20.6% (133/645) de discrepancias. En total, 474 familias cumplirían los nuevos criterios de selección para el estudio genético y 152 no (**Figura 39**).

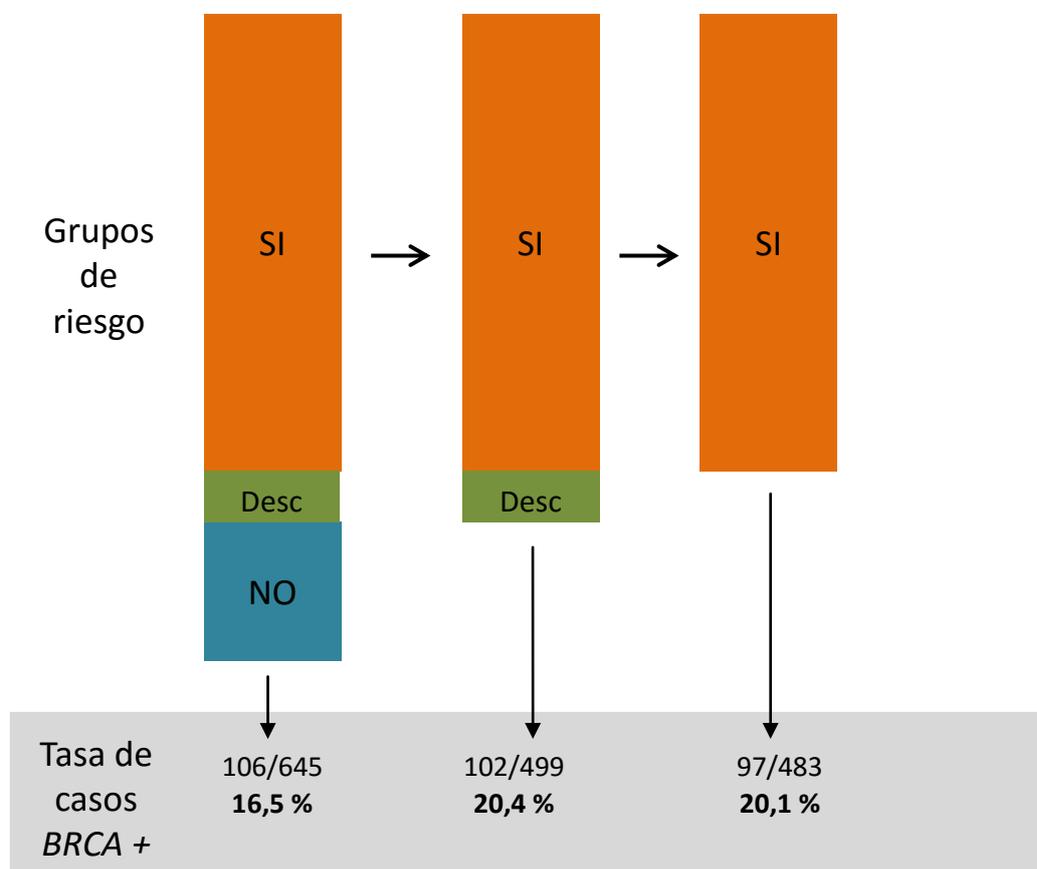


**Figura 39:** Comparación de las clasificación de las familias con los criterios utilizados por la unidad de consejo genético basados en los criterios de la SEOM de 2014 (AR, MR, SR) y los nuevos criterios propuesto por la SEOM en 2015 (Sí: Familias que sí cumplen criterios de riesgo o NO: Familias que no cumplen criterios de riesgo).

Llama la atención que 20 familias que no cumplían estrictamente los criterios de selección utilizados en el estudio sí cumplen las nuevas directices de la SEOM y pasarían a ser incluidas en el grupo de riesgo incrementado. En concreto, cuatro de estos casos son cáncer de mama tripe negativo y seis de ellos cáncer de ovario de alto grado. Los otros siete casos son familias con tres o más casos de cáncer en la familia pero no en familiares de primer o segundo grado. Entre estas 20 familias, 3 de ellas son BRCA+ y en estos casos todos los casos indice tenia un cáncer de ovario de alto grado.

De la misma manera, si se considera la tasa de BRCA+ seleccionando los pacientes en función de las nuevas recomendaciones, se obtiene un rendimiento diagnóstico del test BRCA del 20% (97/483), con la pérdida de detección de 9 familias portadoras de mutaciones en BRCA. Según los resultados observados, los nuevos criterios propuestos por

la SEOM son más sensibles que los empleados por la unidad de consejo genético. Son más estrictos a la hora de inclusión en el grupo de riesgo incrementado porque incluyen menos pacientes para la realización del estudio genético y mejoran la capacidad de selección de los pacientes ya que aumentan la tasa de detección en los pacientes seleccionados.



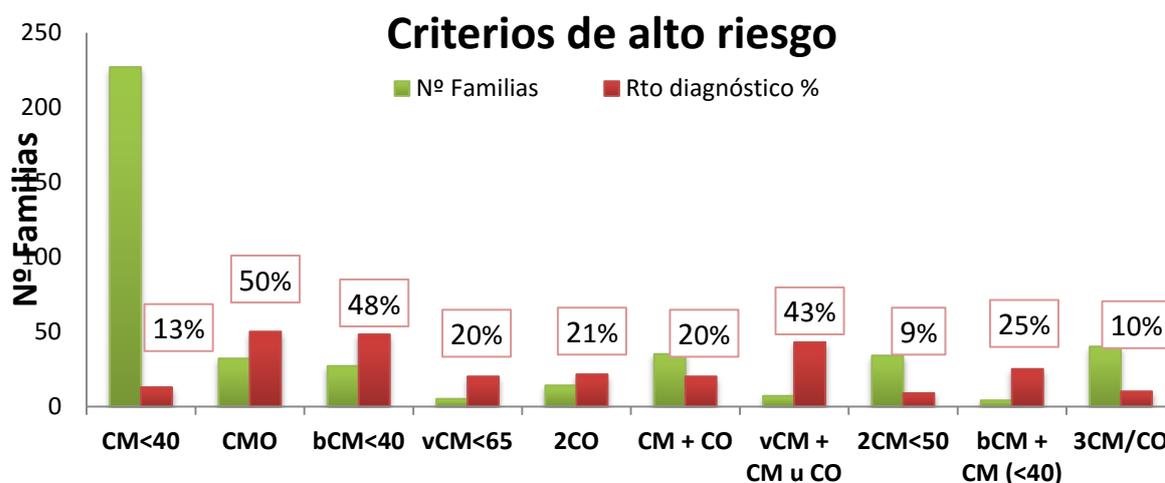
**Figura 40:** Tasas de casos *BRCA+* de este estudio según los nuevos criterios clínicos de riesgo incrementado de la SEOM. SI: Familias que sí cumplen los criterios; NO: Familias que no cumplen ninguno de los nuevos criterios propuestos por la SEOM; Desc. Riesgo desconocido.

### 1.1 Rendimiento diagnóstico del test genético según criterios clínicos.

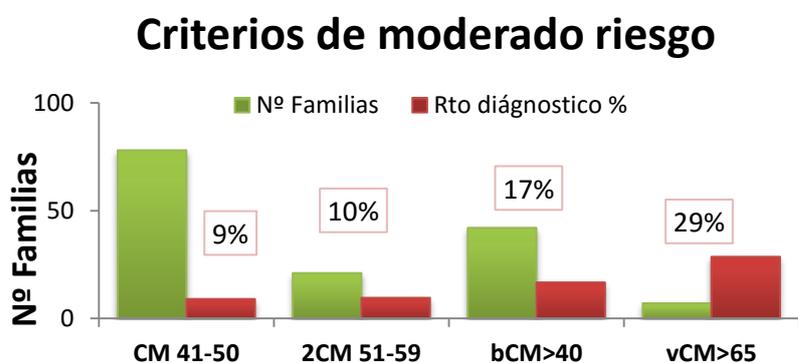
En este apartado se analizaron los criterios clínicos de manera independiente, con el objetivo de valorar el rendimiento del test genético *BRCA* en función de cada criterio en concreto.

En general, los criterios de alto riesgo utilizados en este estudio tuvieron un rendimiento diagnóstico mayor del 20%, siendo los criterios con mejores rendimientos el cáncer de mama y ovario en el mismo individuo (CMO) (con un 50% de positivos) y el cáncer de mama bilateral con al menos una de las neoplasias diagnosticada a edad menor de los 40 años (*bCM<40*) (con un 48% de positivos). En contraposición, los criterios que

tuvieron rendimientos más bajos fueron los casos de cáncer de mama a edad menor o igual de 40 (CM<40) (con un 13% de los positivos) o las familias en las que había dos casos de cáncer de mama menos o igual de los 50 años (2CM<50) (con un 9%)(Figura 41). Sin embargo, y como era de esperar, los criterios de moderado riesgo tuvieron peores rendimientos. En concreto, en los casos seleccionados con edades de diagnóstico de cáncer de mama entre los 41 y los 50 años (CM 41-50) se obtuvo un rendimiento del 9%. En las familias seleccionadas con dos casos de cáncer de mama ente los 51 y los 59 años (2CM 51-59), la tasa de positivos fue del 10% (Figura 42).

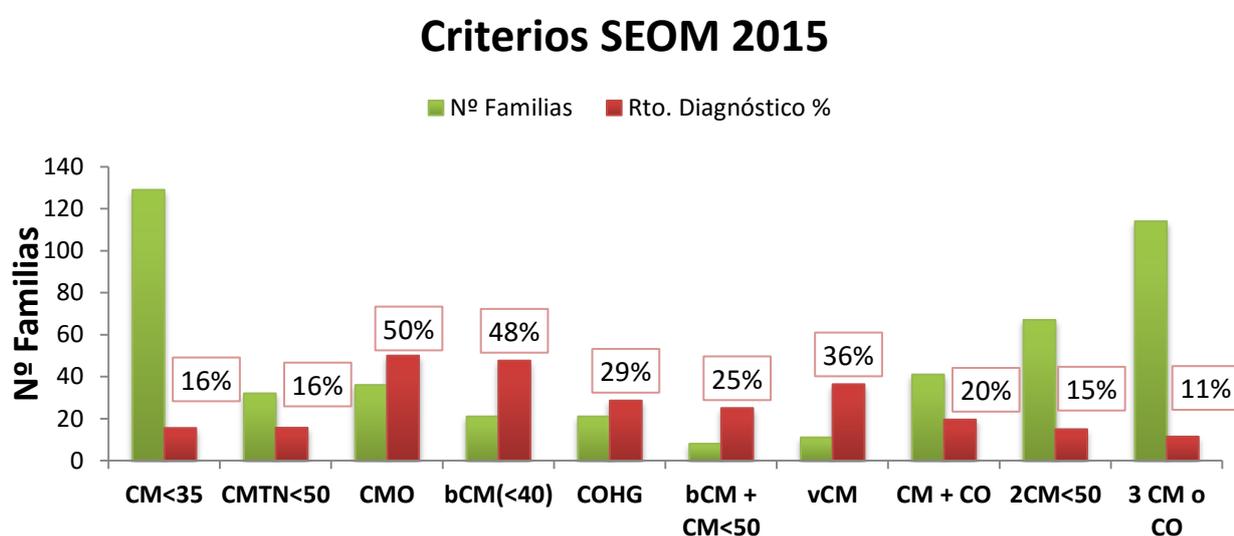


**Figura 41:** Diagrama de barras que expresa el rendimiento diagnóstico en función de los criterios de inclusión de alto riesgo. Barra verde: Nº de familias seleccionadas con ese criterio. Barra roja: Rendimiento del test BRCA en esas familias. CM: Cáncer de mama; CMO: Cáncer de mama y ovario; CO: Cáncer de ovario; bCM: Cáncer de mama bilateral. vCM: Cáncer de mama en el varón.



**Figura 42:** Diagrama de barras que expresa el rendimiento diagnóstico en función de los criterios de inclusión de moderado riesgo. Barra verde: Nº de familias seleccionadas con ese criterio. Barra roja: Rendimiento del test BRCA en esas familias. CM: Cáncer de mama; bCM: Cáncer de mama bilateral. vCM: Cáncer de mama en el varón.

En la **Figura 43** se representa el rendimiento de los nuevos criterios propuestos por la SEOM donde destacan los criterios basados en la histología o inmunohistoquímica del tumor. El criterio que selecciona los tumores diagnosticados a edades avanzadas con receptores hormonales negativos (CMTN<50) obtuvo una tasa de detección de un 16%. El cáncer de ovario de alto grado sin antecedentes familiares destacados (COHG) obtuvo un rendimiento diagnóstico de un 29%. De nuevo, los criterios con mejores rendimientos fueron el cáncer de mama y ovario en el mismo individuo (CMO) y el cáncer de mama bilateral a edades menores de 40 años (bCM<40). Con un 11%, el criterio con el rendimiento diagnóstico más bajo fue aquel en el que se incluían familias con tres o más casos de cáncer de mama y/o ovario en la misma rama familiar (3 CM o CO) (**Figura 43**).



**Figura 43:** Rendimiento diagnóstico en función de los criterios de riesgo incrementado propuestos por la SEOM a finales de 2015. CM: Cáncer de mama; CMO: Cáncer de mama y ovario; CO: Cáncer de ovario; bCM: Cáncer de mama bilateral. vCM: Cáncer de mama en el varón.

## 2. Prevalencia mutacional de *RAD51C* y *RAD51D*

Para la clasificación de las variantes detectadas en los genes *RAD51C* y *RAD51D* se aplicaron una serie de criterios bibliográficos, de cosegregación con la enfermedad y de frecuencia alélica (**Figura 25**. Capítulo de material y métodos, página 77).

En los 141 casos índice estudiados para *RAD51C* y en los 77 para *RAD51D*, se detectaron 13 variantes distintas: 2 patogénicas (15,4%), 3 UVs (23%) y 8 no patogénicas (61,6%). En

el 0,7% (1/141) de los casos estudiados se observó una variante patogénica en *RAD51C* y en *RAD51D* la prevalencia mutacional fue de 1,2% (1/77).

### 2.1 Prevalencia mutacional de *RAD51C*

Estudios similares a esta memoria obtuvieron resultados dispares, con un rango en la tasa de detección mutacional desde 0 a 2,9% (35,91,160,161,168–176). Estas diferencias de prevalencia pueden ser debidas a la baja frecuencia de mutaciones de estos genes o a las diferencias en los criterios de selección utilizados. Además, es importante tener en cuenta que existen características específicas de las poblaciones que afectan de forma considerable a las frecuencias poblacionales. Un ejemplo de estas características específicas es la presencia del efecto fundador de una variante en una población.

Sobre *RAD51C* se han realizado tres estudios en población española en familias con cáncer de mama y/o cáncer de ovario. En el primero de ellos, realizado en 2011 por Romero y col. (174) solo se detectó una variante patogénica en 492 (0,2%) familias estudiadas. Curiosamente, el portador de la variante (c.774delT) era sueco. Esa mutación fue descrita por Vuorela y col. (176) en un caso de cáncer de ovario en un estudio sobre población sueca y finlandesa. Ya en 2012, Osorio y col. (91), publicaron un trabajo sobre 785 familias españolas en las que se identificaron 17 variantes, 5 de ellas patogénicas. Lo característico de este estudio es que 4 de las variantes patogénicas fueron detectadas en las 300 familias en las que coexistía el cáncer de mama y de ovario, obteniendo un rendimiento genético de 1,3% (4/300) para familias con este fenotipo. Sin embargo, el hallazgo de mutaciones en familias exclusivamente con cáncer de mama fue mucho menor, una mutación en 438 familias (0,2%). En 2014, Blanco y col. (175), detectaron 3 mutaciones en una cohorte de 516 familias (0,6%), localizadas dos de ellas en dos familias que pertenecían a las 89 familias con cáncer de mama y ovario, obteniendo un rendimiento del test en este grupo de un 2,25%.

En el ámbito Internacional un total 12 estudios han descrito mutaciones en el gen *RAD51C* con una alta variabilidad entorno a la prevalencia mutacional obtenida, entre 0,1-2,9%. Sin embargo, otros 8 estudios publicados no encontraron mutaciones en su población de estudio. En la **Tabla 43** se muestra un resumen de todos los trabajos realizados hasta la fecha. Las prevalencias más altas se describen en un estudio sobre población francesa (2,6%)(177) y en un estudio en Reino Unido (2,9%) (178).

### 2.1.1 Análisis mutacional por subgrupos

Para una mejor evaluación del test genético de los parálogos de RAD51 es necesario estudiar el rendimiento diagnóstico en función del fenotipo familiar. En total, la tasa de mutaciones de *RAD51C* en este estudio fue de 0,7% (1/141). La variante patogénica se detectó en una familia clasificada como CM/CO. Si el análisis genético se hubiese dirigido a este grupo de familias, el rendimiento del test hubiese sido mayor, un 1,5% (1/67).

#### 2.1.1.1 *RAD51C* en familias con cáncer de mama y ovario

Desde el primer estudio publicado por Meindl y col. (35), en 2010, ya se evidenció una mayor asociación de mutaciones en *RAD51C* con familias en la que coexistía cáncer de mama y ovario (6 mutaciones detectadas en 480 familias con este fenotipo y ninguna en 620 familias con fenotipo exclusivamente de cáncer de mama). Loveday y col. (90), en un amplio estudio, recogieron 1.102 familias del Reino Unido con historia de cáncer de mama y /o ovario e identificaron 8 variantes patogénicas (0,7%). La prevalencia fue mayor en familias con múltiples casos de cáncer de ovario (1,3% en familias con dos o más casos de cáncer de ovario y un 3% en familias con 3 o más casos de cáncer de ovario). Pelttari y col. (168), realizó un análisis de 277 familias: 130 con historia exclusivamente de cáncer de mama (CM), 139 familias en las que coexistía el cáncer de mama y ovario (CM/CO) y 8 únicamente con casos de cáncer de ovario (CO). Entre estas familias identificó dos mutaciones recurrentes en 4 familias (c.93delG y c.837 + 1G>A). La deleción se determinó en una familia con 4 cánceres de mama y un familiar con mama y ovario (CM/CO) y en otra familia en la que únicamente había dos casos de cáncer de ovario (CO). La variante c.837+1G>A se detectó en una familia con cáncer de mama y ovario (CM/CO) y en una familia con ovario exclusivamente (CO). En total, se obtuvo un rendimiento de 1,4% en familias con fenotipo de mama y ovario (2/139) y de un 25% en familias con fenotipo de ovario (2/8). Debido a los resultados obtenidos, Pelttari continuó el estudio realizando un *screening* de estas dos variantes en la población finlandesa donde incluyó grupos de pacientes con cáncer de ovario sin historia familiar y un amplio grupo de controles sanos. En esta cohorte de pacientes, mutaciones en *RAD51C* fueron asociadas a un aumento de riesgo de cáncer de mama y ovario (OR= 13,59, IC95% 1,89-94,6) pero especialmente se relacionaron con un aumento de riesgo para cáncer de ovario en ausencia de cáncer de mama (OR=213,95 IC95% 25,6-1.769), incluso en cáncer de ovario sin historia familiar (OR=6,31 IC95% 1,15-34,6). Todas las variantes patogénicas que han sido identificadas en

este grupo de familias sumaban un total de 29, y teniendo en cuenta que se estudiaron 3.439, se obtuvo una prevalencia global de 0,8%.

### **2.1.1.2 *RAD51C* en familias con cáncer de ovario**

Los estudios realizados hasta el momento cuentan con un número menor de familias con fenotipo exclusivamente de cáncer de ovario. Loveday y col. (90) encuentran una mutación en 30 familias con cáncer de ovario exclusivamente. Estos autores, estiman el riesgo relativo de cáncer de ovario para portadores de mutaciones de *RAD51C* en un 5,88 (IC 95% 2,91-11,88). Coulet y col. (177) identificaron una mutación en una cohorte de 35 pacientes con cáncer de ovario, 8 de los cuales tenían al menos, un familiar con cáncer de ovario (2,9%). En el estudio realizado por Thompson y col. (175) sobre 1.338 familias se detectaron 3 mutaciones, una de ellas entre las 21 familias con fenotipo exclusivamente de cáncer de ovario (4,8%). Globalmente, se han estudiado 372 familias con este fenotipo detectándose 5 mutaciones en total, lo que significa una prevalencia de 1,3%. A pesar de estos altos rendimientos, en los estudios sobre población española, no se identificó ninguna variante patogénica en las 16 familias del presente estudio con dicho fenotipo, ni en las 17 estudiadas por Blanco y col. (Tabla 43).

### **2.1.1.3 *RAD51C* en cáncer de ovario sin historia familiar**

Cuatro grandes trabajos han estudiado la prevalencia de mutaciones en *RAD51C* sobre casos de cáncer de ovario sin antecedentes familiares de cáncer de mama y ovario. Loveday y col. (90) detectó 3 mutaciones en 272 casos de cáncer de ovario sin historia familiar, con una prevalencia del 1,1%. Thompson y col. (160) incluyó 267 cánceres de ovario sin historia familiar obteniendo una única mutación este todos ellos (0,4%). Cunningham y col. (178) identificó mutaciones de *RAD51C* en 26 casos de 899 cánceres de ovario sin antecedentes familiares, obteniendo una frecuencia mutacional del 2,9%. Sí bien es cierto, esta última cifra podría estar sobreestimada por los autores ya que se incluyen como mutaciones tres variantes tipo *missense*, A126T, T287A y Gly264Ser, las cuales están categorizadas en otros estudios como no patogénicas. Por último, un estudio realizado por Pennington y col. (179) obtuvo una frecuencia mutacional de un 1% sobre 311 cáncer de ovario sin antecedentes familiares. Entre todos los estudios publicados sobre este grupo de familias, se han detectado 37 mutaciones sobre 2439 casos estudiados, con una frecuencia mutacional del 1,5%. Si excluimos el estudio realizado por Cunningham y col., la

prevalencia de mutaciones de *RAD51C* en casos de ovario sin antecedentes familiares estaría sobre el 0,7%.

#### **2.1.1.4 *RAD51C* en familias con cáncer de mama**

A pesar de que la relación entre mutaciones de *RAD51C* y el cáncer de ovario está mucho más clara no se debe perder de vista su implicación en el cáncer de mama. En este estudio, una de las 58 familias con antecedentes de cáncer de mama exclusivamente fue portadora de una variante no descrita con anterioridad clasificada como variante de significado clínico desconocido, c.307T>C. Actualmente, solo existen tres estudios en los que se hayan detectado mutaciones en este tipo de familias y dos de ellos fueron realizados sobre población española. Osorio y col., identificó la variante *missense* c.428A>G (p.Gln143Arg) en 1 de las 438 familias con cáncer de mama exclusivamente (0.2%) (variante catalogada como patogénica mediante ensayos funcionales)(91). Blanco y col. detectó la mutación c.577C>T (p.Arg193Stop) en una de las 410 familias CM y Schnurbein y col. encontró un gran deleción del exón 5 al 9 en dos familias, una de ellas sin individuos afectados de cáncer de ovario (175,180). Recientemente, se ha publicado un trabajo realizado por Jonson y col. sobre población danesa. Sobre 1.228 individuos se detectaron 5 mutaciones en 6 familias (0,5%). En este trabajo, 4 de las familias no tenían ningún caso de cáncer de ovario familiar, incluso dos de ellas solo presentaron un caso de cáncer de mama a edad temprana (181). Hasta la fecha, solo se han detectado 8 variantes patogénicas sobre 4.044 familias estudiadas con fenotipo de cáncer de mama exclusivamente (0,19%).

ESTUDIO	PAÍS	PACIENTES ANALIZADOS						MUTACIONES					
		TOTAL	CM	CM/CO	CO	uCO	CONTROL	TOTAL (%)	CM (%)	CM/CO (%)	CO (%)	uCO (%)	CONTROL (%)
Meindl y col. (2010) (35)	Alemania	1100	620	480	0	0	0	6 (0,5)	0	<b>6 (1,25)</b>	0	0	0
Pelttari y col. (2011) (168)	Finlandia	2747	130+491 +884+686	139	8	409	2086	8 (0,3)	0+0+0+0	<b>2 (1,4)</b>	2 (25)	4 (1)	2 (0,1)
Vuorela y col. (2011) (176)	Finlandia	1936	112+993	35	0	232 + 332	871	2 (0,1)	0	<b>1 (2,8)</b>	0	1 (0,4)	0
Walsh y col.(2011)	EE.UU	360	0	0	0	281	0	2 (0,6)	N/S	N/S	N/S	0	0
loveday y col.(2011) (90)	UK	1404	0	1102	30	272	1156	12 (0,9)	0	8 (0,7)	<b>1 (3,3)</b>	3 (1,1)	1 (0,09)
Osorio y col.(2012) (91)	España	785	485	300	0	0	550	5 (0,6)	1 (0,2)	4 (1,3)	0	0 [0]	0 [0]
Romero y col. (2011) (174)	España	492	391	101	[0]	[0]	[0]	[1(0,2)]	[0]	[1 (1)]	[0]		
Thompson y col.(2012) (160)	Australia	1655	1053	314	21	267	427	3 (0,2)	0	1 (0,3)	<b>1 (4,8)</b>	1 (0,4)	0
Coulet y col. (2013) (177)	Francia	117	0	82	35	0	0	<b>3 (2,6)</b>	0	<b>2 (2,4)</b>	<b>1 (2,9)</b>	0	0
Schnurbein y col. (2013) (180)	Alemania	825	500	325	0	0	0	2 (0,3)	1 (0,2)	1 (0,3)	0	0	0
Penninghton(2013) (179)	EE.UU	311	0	0	0	311	0	2 (1,0)	0	0	0	2 (1,0)	0
Castera y col. (2014)	Francia	708	-	-	-	0	0	3 (0,4)	-	-	-	0	0
Cunningham y col. (2014) (178)	UK	899	0	0	0	899	0	<b>26 (2,9)</b>	0	0	0	<b>26 (2,9)</b>	0
blanco y col. (2014) (175)	España	516	410	89	17	0	0	3 (0,6)	1 (0,24)	<b>2 (2,2)</b>	0	0	0
Jonson y col.(2016) (181)	EE.UU	1228	-	-	-	0	0	6 (0,5)	4	2	0	0	0
<b>Presente estudio</b>	España	148	58	67	16	0	150	2 (1,35)	1 (1,7)	1 (1,49)	0	0	
Akbari y col.(2010) (171)	Francia	454	N/S	N/S	N/S	0	0	0	N/S	N/S	N/S	0	0
Zheng y col. (2010) (170)	EE.UU	92	0	92	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Clague y col.(2011) (173)	EE.UU	286	113	34	119	0	0	0	0	0	0	0	0
Wong y col.(2011) (182)	Australia	70	67	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
De leeneery col. (2012)	Bélgica	351	0	239	112	0	0	0	0	0	0	0	0
Kushnir y col. (2012)(183)	Judíos	206	190	2	14	0	200	0	0	0	0	0	0
Lu w y col. (2012) (161)	EE.UU	192	157	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>		16882	4044	3439	372	2439	5440	86 (0,5)	8 (0,19)	29 (0,8)	5 (1,3)	37 (1,5)	3 (0,05)

**Tabla 43:** Resumen de todos los estudios realizados sobre *RAD51C*. CM: Cáncer de mama; CM/CO: Cáncer de mama y ovario; CO; Cáncer de ovario; uCO:

Cáncer de ovario sin historia familiar previa. Ente paréntesis: Rendimiento del test *RAD51C*.

## 2.2 Prevalencia mutacional de RAD51D

En cuanto a *RAD51D*, se analizaron 77 familias entre las cuales se identificó una variante patogénica. Se obtuvo una prevalencia mutacional en *RAD51D* del 1,3% (1/77). Teniendo en cuenta el fenotipo de las familias y que la variante patogénica se detectó en una familia de las 16 clasificadas como CO, el rendimiento del test genético de *RAD51C* en este tipo familias hubiese sido del 6,2%.

Como sucede con *RAD51C*, la prevalencia mutacional de este gen varía en un rango de entre 0,8 y 2,1 (40,147,162,184–186). Las características específicas de las poblaciones estudiadas es un factor a tener en cuenta a la hora de realizar comparaciones entre estudios. En el caso de *RAD51D*, se detectó la presencia de efecto fundador de una variante en población finlandesa, describiendo la mayor prevalencia mutacional descrita hasta la fecha, un 2,1% (185) (**Tabla 44**).

En población española se realizó un solo estudio llevado a cabo por Gutiérrez-Enríquez y col. en 2014 (147). En él se analizaron 842 casos índices recogidos de 6 centros españoles, localizados entre Cataluña, Valladolid, Madrid y Galicia. 713 casos fueron seleccionados por su historia personal y familiar de CM/CO y 129 únicamente con antecedentes personales CM o CO a edad temprana. Se detectaron 3 mutaciones en 4 familias de las 491 con el fenotipo de mama y ovario, obteniendo una tasa mutacional de 0,82%.

### 2.2.1 Prevalencia mutacional por subgrupos

#### 2.2.1.1 RAD51D en familias con cáncer de mama

Las mutaciones en *RAD51D* han sido asociadas a un incremento de cancer de ovario hereditario, y aunque han sido observadas en un contexto de familias con cáncer de mama y ovario, la asociación con el cáncer de mama no está clara. Existen varios estudios sobre familias con fenotipo de cáncer de mama y en ninguno se ha detectado variantes patogénicas. En el estudio realizado en población española en 2014, Gutiérrez-Enríquez y col. (147) no encontraron ninguna variante patogénica en las 171 familias con fenotipo de cáncer de mama exclusivamente. En las 737 familias con este fenotipo seleccionadas por Loveday y col. (40), las 741 por Thomposn y col. (187) y las 226 por Wickramanyake y col.

(162) no se ha detectado ninguna variante patogénica. Según estos datos, en este estudio no se incluyó para el análisis de *RAD51D* ninguna familia con fenotipo exclusivamente de cáncer de mama.

### **2.2.1.2 *RAD51D* en familias con cáncer de mama y ovario**

Como ocurre con *RAD51C*, las familias con cáncer de mama y ovario son el grupo de riesgo donde mayor rendimiento diagnóstico del test de *RAD51D* se obtiene globalmente. Desde un principio, Loveday y col. (40) en 2011 detectaron 8 mutaciones en una cohorte de 1.648 familias. Las 8 mutaciones se detectaron en las 911 familias en las que coexistía el cáncer de mama y ovario (0,88%). Osher y col. (184) ya en 2012 realizó un screening sobre 175 familias con este fenotipo, detectando una variante patogénica (0,57%). Es el estudio de Pelttari y col. (185) donde se detecta una mayor prevalencia mutacional en estas familias, 2 familias con la misma mutación, c.576+1G>A, entre las 40 seleccionadas con este fenotipo (5%). Ante estos resultados, el mismo grupo realizó un genotipado de esta variante en 2.200 pacientes con cáncer de mama y en 553 con cáncer de ovario, identificando esta variante en 5 pacientes de 707 con historia de cáncer de ovario (0,7%) y en 2 pacientes de 2.105 con historia exclusivamente de cáncer de mama (0,09%). El haplotipo de 10 individuos de 4 de las familias con la mutación demostró que las familias tenían un ancestro común, por lo que la alta prevalencia detectada por Pelttari es debida a un efecto fundador en su población. En población Española, Guitérrez-Enríquez y col. (147) detectan 4 variantes patogénicas en una cohorte de 842 familias, y todas las variantes se detectan en el grupo de las 491 familias con cáncer de mama y/o ovario (0,81%). Globalmente, se han genotipado 1.981 familias con este fenotipo y se ha detectado en ellas un total de 15 variantes patogénicas, obteniendo una prevalencia mutacional del 0,75%. Sin embargo, en este estudio, no se ha encontrado ninguna variante patogénica de *RAD51D* en las 61 familias con cáncer de mama y ovario.

### **2.2.1.3 *RAD51D* en familias con cáncer de ovario**

Las familias con fenotipo exclusivamente de cáncer de ovario no están muy representadas en los estudios realizados sobre *RAD51D*. En total existen 381 de estas familias genotipadas. Es en el estudio de Song y col. (186) de 2015 donde se analizaron un mayor número de estas familias. Entre 294 familias se detectó una única mutación (0,34%). Thompson y col. y Guitérrez-Enríquez (147,187) incluyeron 16 y 51 familias con

este fenotipo respectivamente. En ninguno de los estudios se detectaron variantes patogénicas. Sin embargo, en el presente estudio, se ha detectado una variante patogénica en 16 de las familias estudiadas con este fenotipo, resultado un rendimiento del 6,25%. Este porcentaje se prevee sobreestimado debido a que el número de familias con este fenotipo no es muy alto. Se deben seguir analizando las familias de la Región con el fin de obtener una mayor evidencia sobre la prevalencia de *RAD51D*. Globalmente, se han descrito 2 mutaciones en un total de 517 familias (0,38%).

#### **2.2.1.4 *RAD51D* en cáncer de ovario sin historia familiar**

El primer trabajo que estudió la prevalencia mutacional de *RAD51D* en casos de cáncer de ovario no seleccionados por la historia familiar fue Wirckmanayake y col. (162) seleccionó 360 mujeres con cáncer de ovario, de trompas o peritoneal primario y 449 mujeres y 10 hombres de 226 familias con al menos 4 cánceres de mama y/o ovario. Detectó 3 mutaciones entre el grupo de las 360 mujeres aparentemente sin historia familiar. De entre las tres portadoras de variantes patogénicas, una de ellas tenía historia familiar. Ella tenía un cáncer de ovario de alto grado a la edad de 43, su madre y su abuela materna habían tenido cáncer de mama después de la menopausia y una tía paterna tenía un cáncer de ovario a edad temprana. Esta familia es portadora de la variante *nonsense* c.694C>T, variante detectada en una familia de este estudio. Thompson y col. (187) también seleccionaron 245 casos de cáncer de ovario sin historia familiar entre los cuales detectaron 2 variantes patogénicas (0,8%). En el estudio español, de Gutiérrez-Enríquez y col. (147), también hubo 129 casos sin historia familiar, pero en este caso no se detectó ninguna variante patogénica. El mayor estudio de casos sin historia familiar es el realizado por Song y col. en 2015. En él se incluyeron 3429 casos, 2307 sin historia familiar, entre los cuales se detectaron 11 variantes patogénicas de *RAD51D* (0,35%).

AUTOR	Pacientes analizados							Mutaciones					
	PAÍS	TOTAL	CM	CM/CO	CO	uCO	CONTROL	TOTAL (%)	CM (%)	CM/CO (%)	CO (%)	uCO (%)	CONTROL (%)
loveday y col. (2011)(40)	UK	1648	737	911	0	0	1060	8 (0,48)	0	8 (0,88)	-	-	1
Osher y col. (2012)(184)	Canadá y Bélgica	175	0	175	0	0	0	1 (0,57)	0	1 (0,57)	0	0	0
Wickramanyake y col. (2012) (162)	EE.UU	586	226	0	0	360	0	3 (0,51)	0	-	-	3 (0,83)	-
Pelttari y col. (2012) (185)	Finlandia	95	51	40	4	0	0	<b>2 (2,1)</b>	0	<b>2 (5)</b>	0	-	-
Thompson y col. (2013) (187)	UK, Australia	1060	741	303	16	245	466	2 (0,2)	0	0	0	2 (0,8)	1
Gutiérrez-Enríquez y col. (2014) (147)	España	842	171	491	51	129	0	4 (0,47)	0	4 (0,81)	0	0	0
Song y col. (2015) (186)	UK, EE.UU., Australia	3429	0	0	294	3135	2772	12 (0,35)	0	0	1 (0,34)	11 (0,35)	1 (0,036)
<b>Presente estudio</b>	España	77	0	61	16	0	150	1 (1,29)	-	0	<b>1 (6,25)</b>	-	
<b>Total</b>		7912	1926	1981	381	3869	4448	33 (0,42)	0	<b>15 (0,75)</b>	2 (0,52)	16 (0,41)	3(0,07)

**Tabla 44:** Resumen de los estudios publicados sobre *RAD51D*. CM: Cáncer de mama; CM/CO: Cáncer de mama y ovario; CO; Cáncer de ovario; uCO: Cáncer de ovario sin historia familiar previa.

### 3. Variantes génicas detectadas

En el análisis de los 141 casos índices a los que se les estudió el gen *RAD51C*, se detectaron 7 variantes génicas diferentes que fueron vistas en 127 ocasiones. En el 90% de los análisis realizados se detectó una variante génica (127/141) pero en el 98,4% (125/127) de veces se trata de variantes no patogénicas. En el análisis de *RAD51D* a los 77 casos índice, se detectaron 6 variantes génicas diferentes que fueron vistas en 34 ocasiones. En este gen, solo se detectan variantes en el 44% de las determinaciones, y aunque en gran parte de las veces se trata de variantes no patogénicas, las variantes de significado clínico desconocido toman más presencia alcanzando un 5,9% (2/34) (**Tabla 45**). Es importante tener en cuenta que el número de estudios publicados y el número de casos estudiados de *RAD51D* es menos de la mitad que los realizados sobre *RAD51C*, por lo que es normal que el significado de algunas variantes detectadas en *RAD51D* no esté del todo definido.

Clase variante	<i>RAD51C</i>		<i>RAD51D</i>	
	Prevalencia	Porcentaje	Prevalencia	Porcentaje
Patogénica (VP)	1/127	0,8%	1/34	2,9%
Probablemente patogénica (VPP)	0/127	0%	0/34	0%
Desconocida (UVs)	1/127	0,8%	2/34	5,9%
Probablemente no patogénica (VPN)	0/127	0%	0/34	0%
No patogénica (VNP)	125/127	98,4%	31/34	91,2%

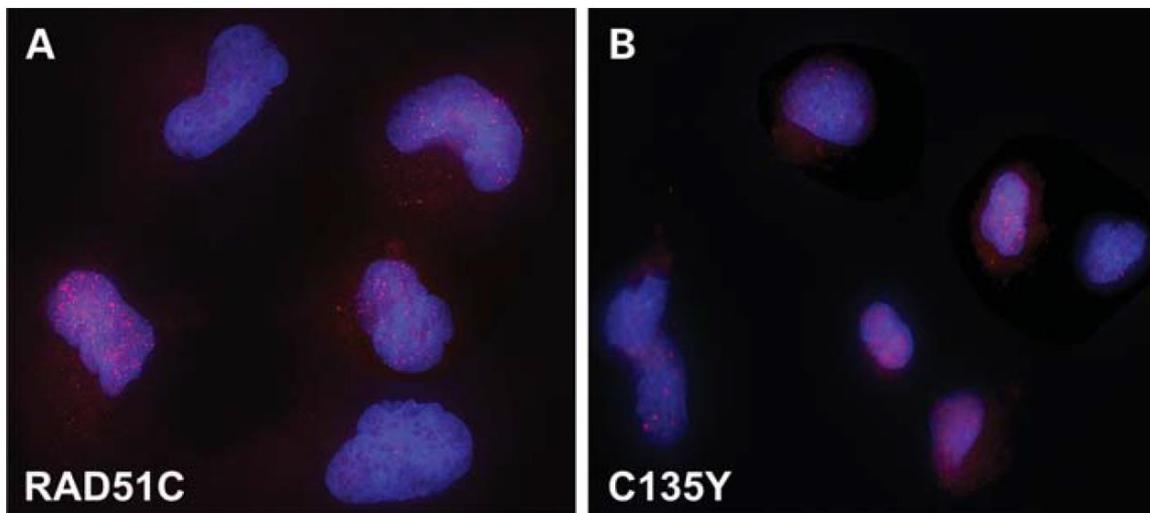
**Tabla 45:** Prevalencia de las variantes según su clasificación fisiopatológica.

Entre las 13 variantes detectadas entre *RAD51C* y *RAD51D*, 8 de ellas fueron de tipo *missense* (61,5%), 3 fueron intrónicas (23,1%), 1 *nonsense* (7,7%) y 1 sinónima (7,7%). Como ya apuntó el grupo de Osorio y col., la mayoría de las variantes detectadas en estos genes son de naturaleza *missense*, lo que complica su caracterización a nivel funcional ya que ante cambios puntuales de aminoácidos en la proteína es difícil predecir el efecto que el cambio supone y a veces hace que sea necesario la realización de ensayos funcionales para determinar el efecto a nivel celular (91). Ante este tipo de variantes, además de los programas *in silico*, se utiliza el grado de conservación de los aminoácidos afectados entre los parálogos de RAD51 (**Figura 44**).



### 3.1 Variantes patogénicas

Entre las ocho variantes *missense* encontradas, debemos destacar la variante Cys135Tyr en RAD51C. Esta variante es inferida en los programas *in silico* como potencialmente patogénica, incluso en el alineamiento de proteínas parálogas podemos ver como la cisteína en las posición 135 de RAD51C es un aminoácido con cierto grado de conservación entre RAD51 y los parálogos (4/6). Pero el efecto de esta variante génica en la proteína no solo es el cambio de aminoácido, sino que el cambio c.404 C>T afecta a la última base exón 2, base involucrada en el proceso de *splicing* como sitio aceptor (3'). Los tres programas *in silico* (*MaxEnt*, *NNSPLICE*, *HSF*) predicen una maduración alternativa del ARNm con una probabilidad muy alta. Los estudios a nivel de ARN no pudieron realizarse. Un importante estudio, realizado en familias españolas, caracteriza esta mutación mediante un ensayo funcional donde se evalúa el potencial de la célula para ejercer la reparación del ADN. El ensayo se basa en la comparación de la formación de focos o agrupaciones de proteína RAD51C en núcleos de fibroblastos, obteniendo como resultado una pérdida de expresión de RAD51C en la población celular con esta alteración génica. En la **Figura 45** se observan los distintos niveles de expresión proteica.



**Figura 45:** Diferentes grados de expresión de RAD51C en fibroblastos. (A) células *wild type* muestran más del 50% (3 de 5) núcleos con más de 10 focos por núcleo. (B) células parcialmente complementadas con RAD51C *missense* (C135Y), muestran menos del 50% (3 de 7) con un menor número de focos por núcleo.

### 3.2 Variantes de significado clínico desconocido (UVs)

Ante otras variantes *missense*, la clasificación a nivel funcional no esta tan definida. Podemos contar con las herramientas *in silico* capaces de predecir las consecuencias de los cambios en la proteína, pero no debemos considerarlas como definitivas para determinar si una variantes es probablemente patogénica o tiene poco significado clínico (131,188). A pesar de ello, hemos aplicado una serie de herramientas *in silico* que abarcan parámetros como las propiedades biofísicas de los aminoácidos sustituidos (*Grantham*), análisis de conservación (*Polyphen-2* y *MutationTaster*) o el efecto en el splicing (*SSF*, *MES* y *NNSPLICE*) (Tabla 46).

Variante UV	Estudios in silico con predicción patogénica	Localización en dominio funcional	Tipo cambio de aminoácido	Tipo de Familia	Controles sanos N=150 (%)
<b>RAD51C</b> c.307T>G	<i>MutationTaster</i> <i>Polyphen-2</i> <i>Align-GVGD</i>	ATP-asa	De aa. aromático, sin carga e hidrofóbico <b>(Phe)</b> a aa. ramificado, sin carga e hidrofóbico <b>(Val)</b>	bCM	0,6
<b>RAD51D</b> c.413A>G	<i>Polyphen-2</i>	ATP-asa	De aa. con carga negativa y polar <b>(Asn)</b> a aa. sin carga y polar <b>(Ser)</b>	CO	0,6
c.715C>T	<i>MutationTaster</i> <i>SIFT</i> <i>Polyphen-2</i>	ATP-asa	De aa. con carga positiva y polar <b>(Arg)</b> a aa. aromático, sin carga y apolar <b>(Trp)</b>	CO	0

**Tabla 46:** Variantes *missense* en los genes *RAD51C* y *RAD51D* clasificadas como variantes de significado clínico desconocido.

Además de las herramientas *in silico*, el estudio de estas variantes en población control es una herramienta utilizada para la clasificación de las UVs. Gracias al reclutamiento de 150 controles se pudieron estudiar las variantes de significado clínico desconocido en una

muestra de población de la Región de Murcia. El análisis mediante secuenciación mostró la presencia de c.307T>G y de c.413A>G en la población sana, con un caso por variante, resultaron tener una frecuencia de 0,6%. La variante c.715C>T no se detectó en ningún control sano. A pesar de que este método es útil cuando se trata de variantes frecuentes (>1%), en este caso las UVs se encuentran por debajo de ese 1% y sería necesario utilizar otras herramientas como estudios funcionales para poder determinar una estimación de riesgo de estas variantes.

Otra herramienta de interés ante estos casos es el análisis de cosegregación de las variantes con la enfermedad. Para la variante c.307T>G de *RAD51C* se han podido genotipar 10 miembros de la familia, donde 3 no son portadores de la variante y 7 si lo son. Entre todos los portadores, hay 4 casos afectados de cáncer (57%). Dos casos de cáncer de mama, un caso de cáncer de mama bilateral y un caso de cáncer de vejiga en un hombre. La media de edad de diagnóstico del cáncer de mama es de 53 años. Todos los portadores sanos, incluidas las dos mujeres, se encuentran por debajo de los 53 años (Figura X. Página X del capítulo de resultado). Por el momento, el análisis de la familia muestra cosegregación de la enfermedad con la variante. Es importante, realizar un especial seguimiento en las portadoras de la mutación que no están afectadas para poder esclarecer el papel de esta variante en el riesgo a padecer cáncer de mama.

Los estudios de cosegregación para la variante c.413A>G de *RAD51D* no se ha podido realizar por falta de datos sobre la familia. En el caso de la variante c.715C>T se trata de variante que se detecta en todos los casos conocidos junto a la variante *nonsense* c.694C>T, que codifica un codón de parada a mitad el dominio *ATPasa*. En el estudio de cosegregación de la familia portadora de estas dos variantes se han genotipado a 5 individuos, y todos ellos son portadores tanto de la variante c.715C>T como de la variante c.694C>T. De los 5 portadores, hay dos afectadas de cáncer de ovario a edades muy cercanas, 46 y 47 años. De los 3 portadores sanos tenemos dos mujeres con edades por debajo de la edad media de diagnóstico del cáncer de ovario en la familia (46 años) y un varón. El hecho de que estas variantes se detecten siempre juntas, nos muestran que estamos ante una co-ocurrencia en *cis* de una variante claramente patogénica (c.694C>T que codifica un codón de parada) con una variante que produce un cambio en la pauta de lectura. Ante esta situación el efecto clínico de la variante *missense* será siempre

desconocido ya que el riesgo estimado para los portadores dependerá de la variante *nonsense* y será independiente de si la variante desconocida es patogénica o neutral (131).

### 3.3 Variantes no patogénicas

Se detectaron un total de 8 variantes no patogénicas, 5 en el gen *RAD51C* y 3 en el gen *RAD51D*. Como ya hemos comentado antes, las variantes no patogénicas forman el grueso de las variantes detectadas en el análisis de *RAD51C* y *RAD51D*, siendo el 98,4% y el 91,2% respectivamente.

Dos de estas variantes son de tipo *missense* en el gen *RAD51C*. Una de ellas, la variante c.859A>G (p.Thr287Ala) da lugar a un cambio en un aminoácido bastante conservado entre los parálogos de RAD51 (5/6), aun así, los datos sobre frecuencias poblacionales hacen ver que es una variante frecuente en la población. Actualmente está catalogada como una variante no patogénica pero en la bibliografía consultada se encuentran discrepancias relativas a la clasificación. En este estudio se ha detectado esta variante en tres familias (MAF: 0,01), sin embargo, en otros estudios de población española el número de familias con esta variante es superior. En el estudio de Blanco y col. se detectó en 18 familias de 516, obteniendo una frecuencia de alélica de 1.7%. La frecuencia alélica del estudio *CIBERER* demuestra que el cambio c.859A>G está presente en más de un 1% en la población general (MAF: 0,014). La otra variante *missense* no patogénica de *RAD51C*, c.376G>A (p.Ala126Thr), es un cambio que afecta a un aminoácido incluido dentro del motivo *Walker A*. A pesar de estar en un motivo importante de la proteína, es una posición poco conservada entre los parálogos de RAD51.

Pero entre las variantes no patogénicas de *RAD51C*, el 60% son de tipo intrónico. Todas ellas se encuentran en zonas intrónicas profundas, lo cual explica que no formen parte de los sitios clásicos de procesamiento y no alteren el proceso de *splicing*. Es importante remarcar que dos de ellas se han encontrado en una frecuencia bastante alta de casos, lo que supone una frecuencia mayor del 1%.

En el caso del gen *RAD51D* nos encontramos 3 variantes no patogénicas pero que aparecen en un número menor de casos. Como en el caso anterior, dos de ellas son de tipo *missense* y una de tipo *sinónima*. La variante c.494G>A (p.Arg165Gln) afecta a un aminoácido muy poco conservado entre los parálogos. Es una variante con una frecuencia muy alta en la población. En nuestra población hemos observado esta variante en 16

familias, en dos de ellas en homocigosis, situándonos en un MAF de 0,129. En población europea se ha visto el alelo minoritario en un 13% de la población estudiada. La variante *missense* C.698A>C (p.Glu233Gly) afecta a un aminoácido no conservado entre los parálogos. Existe cierta discrepancia entre los primeros estudios sobre la susceptibilidad genética que esta variante puede conferir, aunque actualmente esta variante está claramente catalogada como no patogénica. En este estudio se ha detectado en una única familia, resultando un MAF de 0,006. Sin embargo, en otros estudios la frecuencia de esta variante es mayor. En el estudio de Gutiérrez-Enriquez y col. obtienen un MAF para esta variante de 0,016 y en la población general estudiada por *CIBERER* se observa un MAF de 0,016.

Por último, la variante sinónima en *RAD51D*, c.234 C>T (p.Ser78Ser), ha sido detectada en doce familias, obteniendo un MAF de 0,078. Tanto en otros estudios como en población general, la variante se observa en una frecuencia muy similar.

### 3.4 Grandes reordenamientos génicos

Estos grandes reordenamientos consisten principalmente en deleciones y amplificaciones de uno o varios exones. Normalmente, no se puede realizar su detección mediante secuenciación por electroforesis capilar, por lo que se utilizan métodos alternativos como la transferencia Southern, el MLPA, PCR cuantitativa o hibridación genómica comparada (189). Recientemente, algunas tecnologías de secuenciación masiva (*Illumina*) han demostrado tener la capacidad para detectar grandes reordenamientos (190–192), aunque las normas y directrices sobre el análisis de este tipo de variantes mediante plataformas de *next generation sequencing* todavía no se ha establecido en el ámbito asistencial (193). El método MLPA(194) es por el momento el método más utilizado para buscar grandes reordenamientos.

En toda la cohorte de familias de este estudio, se han detectado en 8 de ellas un total de un reordenamiento génico en *BRCA2*. Se trata de una deleción del exón dos en siete familias. En *BRCA1* no se detectó ningún reordenamiento. La prevalencia ha sido de un 1,24% (8/645) entre todos los casos de riesgo de SCMOH. Estos resultados contrastan con la frecuencia de grandes reordenamientos entre las mutaciones patogénicas en *BRCA1* en otras cohortes como la estadounidense (22%)(192), italiana (10,5%)(195) o española (8,2%)(196). Sin embargo la prevalencia encontrada en *BRCA2* (1,24%) estaría acorde con

la prevalencia en otros estudios españoles (1,5%)(197), o en Italia (2,4%)(195). La recurrencia de la deleción del exón 2 ha llevado a estudios de haplotipo para corroborar que estamos ante un efecto fundador y todas las familias comparten un ancestro común (datos no publicados).

A diferencia de la mayoría de estudios realizados a nivel nacional e internacional en los que no se realiza el estudio de grandes reordenamientos, nosotros no podíamos pasar por alto el hecho de tener en nuestra población un efecto fundador de este tipo de mutaciones. Mediante el método de MLPA, se estudiaron los grandes reordenamientos de los genes *RAD51C* y *RAD51D* sin encontrar ninguna duplicación ni deleción. Hasta el momento, solo se ha publicado un gran reordenamiento génico en *RAD51C*. Fue detectado por Schnurbein y col.(180) en un estudio realizado sobre 500 familias con fenotipo de cáncer de mama y 325 con fenotipo de cáncer de mama y ovario. Se trata una deleción de 36.637 pares de bases comprendidas desde el exón 5 al exón 9. Esta deleción se identificó en dos familias independientes una con fenotipo de cáncer de mama y otra con fenotipo de cáncer de mama y ovario. En la primera familia, el caso índice fue diagnosticado de cancer de mama bilateral a los 33 y 39 años. Su madre había sufrido un cancer de colon a las 44 años y su padre no era portador de la variante. En la publicación interpretan directamente que la mutación fue heredada de la madre a la que no se pudo realizar el estudio genético. En ningún otro miembro de la familia se ha detectado la mutación, por lo que no hay que descartar que sea una mutación *de novo*. En la segunda familia se identificó la variante en dos gemelas dicigóticas diagnosticadas de cáncer de mama y de cáncer de ovario a los 42 y 43 años respectivamente. Fenotípicamente, se debe resaltar que las tres tumores de mama de las dos portadoras fueron clasificados de carcinoma ductal infiltrante, de grado intermedio-alto y triple negativo.

### 3.5 Variantes detectadas en población española

Como se comentó anteriormente, existen tres estudios publicados hasta la fecha sobre *RAD51C* en población española, pero las familias estudiadas en uno de ellos (Romero y col.)(198) se incluyen dentro de la población de estudio de otro (Osorio y col.)(91), por lo tanto, para la realización de un resumen de las variantes génicas de *RAD51C* en población española se tuvo en cuenta solo el más amplio de estos dos estudios (Osorio y col). En total se analizaron 1.442 familias españolas, Osorio y col. describieron 785, Blanco y col.(175) estudiaron 516 de estas familias y este estudio 141. En la **Tabla 47** se exponen

todas las variantes detectadas en *RAD51C*, sumando un total de 23 variantes génicas. En función del significado clínico se obtuvieron 7 variante patogénicas (30,5%), 5 de significado clínico desconocido (21,7%) y 11 no patogénicas (47,8%). Referente al tipo molecular de la variante, se observó que el 47,9% (11/23) de las variantes son de tipo *missense*, el 34,8% son intrónicas, el 8,7% son *nonsense*, el 4,3% *frameshift* y el 4,3% sinónimas.

Hasta la fecha, hay un único estudio sobre *RAD51D* en población española publicado. Gutiérrez-Enríquez y col. (147) analizaron 842 familias a las que se sumaron las 77 estudiadas en este estudio. En total, se detectaron 17 variantes génicas (**Tabla 48**), de las que 3 se clasificaron como variantes patogénicas (17,6%), 8 como UV (47,1%) y 6 como no patogénicas (35,3%). En función del tipo molecular de las variantes, se obtuvo un 47% de variantes *missense*, un 23,5% fueron intrónicas, un 11,8% sinónimas, un 5,9% de *splicing*, y en la misma proporción las variante *nonsense* y *frameshift*.

Localización	Variante	Cambio proteína	Tipo de variante	Efecto	Fenotipo familiar	Familias	MAF N=2884	Referencia
5'UTR	C.-118G>A	-	intrónica	No patogénica	-	-	-	A
5'UTR	c.-26C>T	-	intrónica	No patogénica	-	161	0,0673	A, B, C
1	C.89C>A	P.Ala30Glu	<i>missense</i>	UV	CM	1	0,0003	A
1	c.106G>A	p.Glu36Lys	<i>missense</i>	UV	CM	1	0,0003	A
1	c.134A>G	p.Glu45Gly	<i>missense</i>	UV	CM	1	0,0003	A
IVS 1	c.146-67dupA	-	intrónica	No patogénica	CM/CO	1	0,0003	A
Ex 2	c.307T>G	p.Phe103Val	<i>missense</i>	UV	CM	1	0,0003	C
Ex 2	c.376G>A	p.Ala126Thr	<i>missense</i>	No patogénica	-	9	0,0038	A, B, C
<b>Ex 2</b>	<b>c.404G&gt;A</b>	<b>p.Cys135Tyr</b>	<b><i>missense</i></b>	<b>Patogénica</b>	<b>CM/CO</b>	<b>2</b>	<b>0,0007</b>	<b>A, C</b>
IVS 2	c.404+63_404+71dup9	-	intrónica	No patogénica	-	2	0,0007	B
IVS 2	c.405-58A>G	-	intrónica	UV	-	1	0,0003	B
<b>Ex 3</b>	<b>c.414G&gt;C</b>	<b>p.Leu138Phe</b>	<b><i>missense</i></b>	<b>Patogénica</b>	<b>CM/CO</b>	<b>1</b>	<b>0,0003</b>	<b>A</b>
<b>Ex 3</b>	<b>c.428A&gt;G</b>	<b>p.Gln143Arg</b>	<b><i>missense</i></b>	<b>Patogénica</b>	<b>CM</b>	<b>1</b>	<b>0,0003</b>	<b>A</b>
IVS 3	c.572-17G>T	-	intrónica	No patogénica	-	10	0,0035	A, B, C
<b>Ex 4</b>	<b>c.577C&gt;T</b>	<b>p.Arg193Stop</b>	<b><i>nonsense</i></b>	<b>Patogénica</b>	<b>CM</b>	<b>1</b>	<b>0,0003</b>	<b>B</b>
Ex 4	c.586T>C	p.Leu196Leu	sinónima	UV	CM	1	0,0003	A
<b>Ex 4</b>	<b>c.656T&gt;C</b>	<b>p.Leu219Ser</b>	<b><i>missense</i></b>	<b>Patogénica</b>	<b>CM/CO</b>	<b>2</b>	<b>0,0007</b>	<b>A, B</b>
IVS 4	c.705+79A>G	-	intrónica	No patogénica	-	1	0,0003	B
<b>Ex 5</b>	<b>c.709C&gt;T</b>	<b>p.Arg237Stop</b>	<b><i>nonsense</i></b>	<b>Patogénica</b>	<b>CM/CO</b>	<b>1</b>	<b>0,0003</b>	<b>B</b>
<b>Ex 5</b>	<b>c.774delT</b>	<b>p.Arg258fs</b>	<b><i>frameshift</i></b>	<b>Patogénica</b>	<b>CM/CO</b>	<b>1</b>	<b>0,0003</b>	<b>A</b>
Ex 6	c.859A>G	p.Thr287Ala	<i>missense</i>	No patogénica	CM/CO	33	0,0125	A, B, C
Ex 6	c.869T>C	p.Ile290Thr	<i>missense</i>	No patogénica	CM	1	0,0003	A
IVS 6	c.904+34T>G	-	intrónica	No patogénica	-	311	0,2451	A, B, C

**Tabla 47:** Resumen de las variantes de *RAD51C* descritas en población española. MAF: Frecuencia menor alélica; N: total de alelos estudiados; UV:

Variante de significado clínico desconocido; CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; CM/CO: Cáncer de mama y ovario. A: Detectada en el estudio de Osorio y col.(91) B: Detectada en el estudio de Blanco y col. (175) ; C: Detectada en este estudio.

Localización	Variante	Cambio proteína	Tipo variante	Efecto	Fenotipo familiar	Familias	MAF N=1838	Referencia
5'UTR	c.-60C>T	-	intrónica	UV	-	1	0,0005	D
<b>Ex 1</b>	<b>c.1A&gt;T</b>	<b>p.Met1</b>	<b>splicing</b>	<b>Patogénica</b>	<b>CM/CO</b>	<b>1</b>	<b>0,0005</b>	<b>D</b>
Ex 1	c.26G>C	p.Cys9Ser	<i>missense</i>	UV	-	1	0,0005	D
IVS 1	c.83-4T>C	-	intrónica	UV	-	1	0,0005	D
Ex 3	c.234C>T	p.Ser78Ser	sinónima	No patogénica	-	136	0,0740	C, D
Ex 5	c.355T>C	p.Cys119Arg	<i>missense</i>	UV	-	1	0,0005	D
Ex 5	c.413A>G	p.Asn138Ser	<i>missense</i>	UV	-	1	0,0005	C
IVS 5	c.480+75T>G	-	intrónica	No patogénica	-	5	0,0027	D
Ex 6	c.494G>A	p.Arg165Gln	<i>missense</i>	No patogénica	-	201	0,1104	C, D
<b>Ex 7</b>	<b>c.667+2_667+23del</b>	<b>p.Val193Alafs*4</b>	<b>frameshift</b>	<b>Patogénica</b>	<b>bCM</b>	<b>1</b>	<b>0,0005</b>	<b>D</b>
Ex 7	c.629C>T	p.Ala210Val	<i>missense</i>	UV	CM/CO	1	0,0005	D
<b>Ex 8</b>	<b>c.694C&gt;T</b>	<b>p.Arg232Stop</b>	<b>nonsense</b>	<b>Patogénica</b>	<b>CM/CO</b>	<b>3</b>	<b>0,0016</b>	<b>C, D</b>
Ex 8	c.695G>A	p.Arg232Gln	<i>missense</i>	No patogénica	-	5	0,0027	D
Ex 8	c.698A>g	p.Glu233Gly	<i>missense</i>	No patogénica	-	28	0,0152	C, D
Ex 8	c.715C>T	p.Arg239Trp	<i>missense</i>	UV	CM/CO	3	0,0016	C, D
Ex 9	c.879G>A	p.Ala293Ala	sinónima	No patogénica	-	1	0,0005	D
IVS 9	c.904-11T>A	-	intrónica	UV	-	1	0,0005	D

**Tabla 48:** Resumen de las variantes de *RAD51D* descritas en población española. MAF: Frecuencia menor alélica; N: total de alelos estudiados; UV: Variante de significado clínico desconocido; CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; CM/CO: Cáncer de mama y ovario; C: Detectada en este estudio. D: Detectada en el estudio de Gutiérrez-Enriquez y col. (147).

#### 4. Estudios de correlación genotipo-fenotipo

Para realizar un análisis fenotípico de los portadores de variantes patogénicas de *RAD51C* y *RAD51D* se compararon las familias positivas de este estudio con otras familias portadoras de las mismas variantes.

En el caso de la variante c.404C>T de *RAD51C* se estudiaron las dos familias en las que se detectó (**Tabla 49**). En el presente trabajo, la variante fue detectada en una mujer afectada de cáncer de mama medular triple negativo a los 67 y a los 73 de cáncer de ovario bilateral de histología serosa y estadio IC de la escala FIGO. (Figura 4. Pag: X). La otra familia en la que se detectó esta variante fue descrita por Osorio y col. (91) en un estudio realizado en población española. En esta segunda familia el caso índice estaba afectado de cáncer de mama a los 64 y cáncer de ovario a los 73.

Familia	Individuo	Tipo tumor	Edad diagnostico	Histología	Grado	Estadio	RE	PR	HER2
1	1	Mama	67	Medular			Neg	Neg	Neg
		Ovario bilateral	73	Seroso		IC			
2	1	Mama	64	Ductal	2		Pos	Pos	-
		Ovario bilateral	73	Seroso	3		Pos	Neg	Neg

**Tabla 49:** fenotipo de las familias portadoras de la variante c.404C>T.

Las dos mujeres portadoras de esta variante presentan edades muy similares en el diagnóstico, resultando una media de edad de aparición del cáncer de mama a los 65 años y del cáncer de ovario a los 73. Son edades muy por encima de las edades medias de diagnóstico en los portadores de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, que en este estudio han sido de 40,6 y 45,7 años en el cáncer de mama y de 54,2 y 53,9 en el cáncer de ovario.

La variante c.307T>G (p.Phe103Val) es una variante de significado clínico desconocido que solo se ha descrito en una familia de este estudio. En esta familia el caso índice está afectada de un cáncer de mama bilateral sincrónico a los 57 años. Otras dos portadoras de la variante en la familia están afectadas de cáncer de mama a los 67 y a los 36 años (**Tabla 50**).

Individuo	Tipo tumor	Edad diagnostico	Histología	Grado	Estadío	RE	PR	HER2
1	Mama	57	ductal	3	1	Neg	Neg	Neg
	bilateral	57	ductal	2	2	Neg	Neg	Neg
2	Mama	67						
3	mama	36						

**Tabla 50:** fenotipo de la familia portadora de la variante c.307T>G.

Es difícil estimar si las mutaciones en *RAD51C* confieren susceptibilidad a un fenotipo de tumor específico, ya que se disponen de pocos casos y los datos histopatológicos son limitados. Un estudio sobre características de los tumores asociados a mutaciones en *RAD51C* fue realizado por Gevensleben y col. (199) en 2014. En este estudio se analizan las características de 22 cáncer de mama y 10 cáncer de ovario de 30 mujeres, 11 portadoras de variantes de significado clínico desconocido y 19 portadoras de mutaciones. Los autores observan que los tumores de mama asociados a mutaciones en *RAD51C* son predominantemente receptores hormonales positivos y HER2 negativo, son de tipo invasivo pero no detectan ningún subtipo histológico predominante y diagnosticados en estadios tempranos. Solo dos tumores asociados a mutaciones eran negativos para todos los receptores. A diferencia de estos datos, en este estudio, tanto en el caso de la variante patogénica como en el caso de la UV, los tumores de mama fueron triple negativo y diagnosticados a edades avanzadas.

En cuanto a las características morfológicas de los CO, Gevensleben y col. (199) no encuentran diferencias significativas con los CO esporádicos pero describen que en general, los CO asociados a *RAD51C* están pobremente diferenciados (G3), son de histología serosa y se diagnostican en un estadio avanzado (estadio III-IV). Cunningham y col. (178) relacionan las mutaciones en *RAD51C* con carcinomas serosos de alto grado diagnosticados a edad temprana. Sin embargo, en el estudio realizado por Song y col. (186) sobre 3.429 pacientes con CO, las edades de diagnóstico en portadores son mayoritariamente avanzadas. Ningún portador de mutación en *RAD51C* fue diagnosticado antes de los 40 años, solo el 29% lo hizo a edades comprendidas entre los 40-49, el 36% lo hizo a edades entre los 50-59 y el 36% restante fue diagnosticado a edades por encima de los 60 años. En este mismo estudio, un 71% de los portadores tenían un cáncer de ovario de alto grado y el 29% no. En este caso, la variante de *RAD51C* c.404C>T se detectó en una

mujer con cáncer de ovario diagnosticado a edad avanzada de la paciente y en un estadio poco avanzado (IC). El diagnóstico precoz del cáncer de ovario en la paciente puede estar influenciado por que el hecho de haber sido diagnosticada previamente de un cáncer de mama triple negativo.

En el caso de *RAD51D* la variante c.694C>T (p.Arg232X) se ha detectado cuatro familias diferentes. En este estudio, el caso índice es una mujer diagnosticada a los 47 años de un cistoadenocarcinoma mucinoso papilar de alto en ambos ovarios estadio IB de la escala FIGO. Su hermana fue diagnosticada a los 46 años de cáncer de ovario papilar seroso moderadamente diferenciado y también es portadora de la variante. Otras dos familias españolas presentan esta variante. Una de ellas con caso índice de cáncer de ovario a los 44 años y otra con un caso de cáncer de ovario bilateral a los 42 años. La última familia con esta variante presenta un caso índice con cáncer de ovario a los 43 (**Tabla 51**).

Familia	Individuo	Tipo tumor	Edad diagnóstico	Histología	Grado	Estadío
1 <sup>a</sup>	1	Ovario bilateral	47	Mucinoso	4	IB
	2	Ovario	46	Seroso		
2 <sup>b</sup>	1	Ovario	44	Seroso	3	
3 <sup>b</sup>	1	Ovario bilateral	42			
4 <sup>c</sup>	1	Ovario	43	Carcinoma	3	4

**Tabla 51:** fenotipo de las familias portadoras de la variante c.404C>T.

<sup>a</sup>Familia de este estudio

<sup>b</sup>Familia del estudio de Gutiérrez-Enríquez (147).

<sup>c</sup>Familia del estudio de Wickramanayke (162).

Con esta variante la enfermedad se expresa de forma casi idéntica en todos los portadores. Muestra un fenotipo de cáncer de ovario a edad temprana, a unos 44 años de media. Esta edad está por debajo de la edad media de diagnóstico de cáncer de ovario en portadores de *BRCA1* o *BRCA2*, 54,2 y 53,9 años respectivamente. En el amplio estudio publicado en 2015 sobre 3.429 CO, no hubo ningún portador de mutación en *RAD51D* diagnosticado antes de los 40 años, solo el 8,3% lo hizo entre los 40-49, el 50% entre los 50-59 y el 42% fue diagnosticado a edades mayores de 60 años.

## 5. Aplicabilidad de los resultados a la práctica clínica

Actualmente, estamos inmersos en un rápido cambio en el campo de los estudios genéticos con fines clínicos. Gracias a los avances de la tecnología somos capaces de analizar simultáneamente una multitud de genes. Tanto en la última versión (2.2015) de la guía clínica en oncología *del National Comprehensive Cancer Network®* (NCCN), como en el último artículo publicado por la SEOM se recomienda, además del estudio de *BRCA1* y *BRCA2*, el análisis de otros genes predictores de riesgo para el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (45,167)

En un amplio estudio sobre 911 pacientes BRCA, la realización de un panel de 19 genes tuvo como resultado la identificación de 67 mutaciones, aumentando en un 7,4% el rendimiento del test genético BRCA. La mayoría de las mutaciones, concretamente el 72%, fueron identificadas en genes de la recombinación homóloga y moderado riesgo (*BRIP1*, *ATM*, *RAD51C*, *CHEK2*, *NBN*, *PANLB2*, *RAD50* y *MRE11*). El resto de mutaciones fueron identificadas en genes del Sd. De Lynch (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*) y otros genes de alta penetrancia como *PTEN* o *TP53* (200).

Genes como, *RAD51C* y *RAD51D*, se postulan como genes de susceptibilidad para cáncer de ovario de penetrancia moderada-alta, asociados a carcinomas epiteliales de ovario manifestados a edades no muy tempranas. Diferente a lo que ocurre con las mutaciones de BRCA, la asociación con el cáncer de mama no está del todo definida, aunque sí parecen estar influenciados los casos de cáncer de mama con historia familiar de cáncer de ovario(201).

En teoría, estos avances deben ofrecer un mejor entendimiento de los síndromes de cáncer hereditario y por lo tanto deben suponer una mejora sustancial en el proceso de asesoramiento genético. Pero la realidad es que muchos de los nuevos genes que se están relacionando con síndromes de cáncer hereditario son genes de moderada o baja penetrancia para los que todavía no está clara la estimación de riesgo que suponen para los portadores. Por el momento, no existe consenso en las guías clínicas de asesoramiento genético sobre las medidas adoptadas y por tanto su aplicabilidad a la práctica clínica no es fácilmente reproducible. Además, como en el caso de los genes de alta penetrancia, es posible que el riesgo asociado a genes de moderada penetrancia no sea debido

exclusivamente a estos genes, sino que puede estar influenciado por otras variantes génicas presentes en el individuo (modelo poligénico) o incluso por factores ambientales. En la guía de clínica de NCCN, ante genes que pueden potenciar el riesgo de cáncer ovario en los que las evidencias de intervención aún son insuficientes, se recomienda como estrategia reductora de riesgo la salpingo-ooforectomía bilateral (RRSO) aunque siempre teniendo en cuenta el fenotipo familiar. Por tanto, a la hora de realizar acciones preventivas en portadoras sigue siendo fundamental evaluar la historia familiar y otros factores clínicos.

Aunque el potencial efecto de la detección de una mutación en un gen de susceptibilidad es mayor para los familiares que para el paciente en sí mismo, existen nuevas oportunidades de tratamiento basadas en el genotipo de los paciente. Las pacientes afectadas de cáncer de ovario que son portadoras de mutaciones en BRCA tienen un mejor pronóstico y una mejor respuesta a los tratamientos con platinos. Además, las nuevas terapias en las que se combinan los platinos con el uso de los inhibidores de la PARP (IPARP), están basadas en el defecto en el mecanismo de reparación, siendo un nuevo aliciente para la detección de mutaciones en genes de la recombinación homóloga. Este concepto de letalidad sintética puede ayudar al aumento del tiempo libre de enfermedad en los pacientes afectados.



## **VI. Conclusiones**



### **Conclusión 1**

El 16,5% de la población de este estudio fue portadora de alguna variante patogénica en *BRCA1/2*. Con la aplicación de los nuevos criterios de selección desarrollados por la SEOM, la tasa de detección aumentó hasta el 20,1%. Los resultados obtenidos justifican la implementación de estos nuevos criterios al Programa de Consejo Genético en cáncer de mama y ovario hereditario.

### **Conclusión 2**

El criterio propuesto por la SEOM que selecciona los tumores de mama diagnosticados a edades avanzadas con receptores hormonales negativos (CMTN<50) obtuvo una tasa de detección de un 16% . El rendimiento del test genético de *BRCA* en los casos con cáncer de ovario de alto grado sin antecedentes familiares destacados (COHG) fue de un 29%. Estos rendimientos justifican su incorporación como criterios de selección en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.

### **Conclusión 3**

El 0,7% de los casos estudiados fueron portadores de alguna variante patogénica en *RAD51C*, teniendo en cuenta el fenotipo familiar, la prevalencia mutacional de *RAD51C* en familias con cáncer de mama y ovario fue de un 1,5% . Con respecto a *RAD51D*, el 1,2% de las familias estudiadas fueron portadoras de variantes patogénicas, siendo la prevalencia mutacional en familias con cáncer de ovario de un 6,25%. Los datos obtenidos en la población de estudio estuvieron en concordancia a lo descrito en la bibliografía.

### **Conclusión 4**

La variante c.404C>T de *RAD51C* se asoció a cáncer de mama y ovario en la misma paciente a edad avanzada. Sin embargo, la variante c.694C>T (p.Arg232X) de *RAD51D* se asoció a familias con fenotipo exclusivamente de cáncer de ovario diagnosticado a edades tempranas.

## **Conclusión 5**

Según los datos obtenidos se recomienda la inclusión de los genes *RAD51C* y *RAD51D* en el diseño de un panel de genes con el cual poder ampliar el estudio genético de *BRCA1/2* en las familias *BRCAX* que cumplan los criterios de selección elegidos.

## **VII. Anexos**



**Anexo I**

Espacio reservado para la etiqueta identificativa

## Consentimiento informado para la realización de pruebas genéticas de cáncer hereditario

UNIDAD DE CONSEJO GENÉTICO DE CÁNCER HEREDITARIO

SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA

### Introducción

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

El propósito de esta información no es preocuparle ni liberar de responsabilidad al médico. Simplemente representa un esfuerzo para que usted conozca mejor los hechos y pueda tomar la decisión libre y voluntaria, de autorizar o rechazar dicho procedimiento.

Debe saber usted que es una norma de obligado cumplimiento para el/la médico que le atiende, informarle y solicitar su autorización o rechazo siempre que la urgencia lo permita.

### ¿Para qué se hace?

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

### ¿Qué le vamos a hacer?

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

### ¿Qué beneficios se esperan obtener de este procedimiento?

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

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

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

### ¿Qué riesgos tiene?

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

Los resultados de esta prueba serán comunicados exclusivamente a usted y serán custodiados por el Hospital para evitar cuestiones relativas a una posible discriminación por parte de sistemas de seguro médico.

### Limitaciones

Esta prueba analiza sólo algunos genes asociados a un síndrome o síndromes específicos de cáncer hereditario. Las pruebas genéticas determinan el riesgo de cáncer sólo para aquellos tipos de cáncer asociados a los genes que se analizan.

### Resultados de la prueba e interpretación

Los resultados de su prueba deben evaluarse teniendo en cuenta los antecedentes clínicos personales y familiares, los resultados del examen físico y las pruebas de laboratorio y diagnósticas pertinentes. Los resultados posibles son:

- **Positivo:** se identificó una mutación asociada a un mayor riesgo de cáncer hereditario. Conocer esta información podría ayudarle a usted y a su médico a tomar decisiones sobre su atención médica, tales como pruebas de detección, cirugías para reducir el riesgo y estrategias de tratamiento con fármacos con finalidad preventiva.
- **Negativo:** no se identificó ninguna mutación.
  - Si usted es la primera persona de su familia en someterse a la prueba, corre al menos el mismo riesgo que la población general. Aún así, su riesgo de cáncer hereditario podría ser mayor al promedio debido a una predisposición genética no detectable mediante esta prueba, ya sea en el gen o genes analizados o en cualquier otro gen asociado con el cáncer hereditario.
  - Si obtiene un resultado negativo para una mutación que se sabe existe en su familia, se considera que usted tiene el mismo riesgo que la población general.
- **Incierto:** se detectó un cambio genético pero no se sabe si este cambio está asociado al riesgo de cáncer. Su riesgo de cáncer es al menos igual al de la población general. Además, su riesgo podría ser todavía más elevado que el promedio debido a este cambio o a una predisposición genética no detectable por esta prueba, ya sea en el gen o los genes analizados o en otro gen asociado al cáncer hereditario.

Los resultados de las pruebas genéticas tienen consecuencias para los parientes consanguíneos. Con el respaldo de esta Unidad de Consejo Genético, usted podría evaluar la posibilidad de compartir sus resultados con algunos de sus parientes consanguíneos que podrían también estar en riesgo. Si decide hacerlo debería evaluar la mejor forma de dar a conocer esta información, para lo cual también le ofrecemos nuestro apoyo profesional.

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

**¿Qué alternativas hay?**

La alternativa a la realización de estudios genéticos es la aproximación al riesgo basada en el estudio de los antecedentes personales y familiares, aunque los resultados son menos precisos que los proporcionados por estos estudios genéticos cuando están indicados.

**Puede usted ampliar la información todo lo que desee, así como consultar cuantas dudas tenga, y además puede revocar el consentimiento en el momento que usted lo considere oportuno.**

Yo \_\_\_\_\_ como paciente.

Yo \_\_\_\_\_ como representante legal del  
paciente \_\_\_\_\_

**AUTORIZO** a la Unidad de Consejo Genético del Cáncer Hereditario del Servicio de Oncología Médica a realizar el ESTUDIO GENÉTICO DE CÁNCER HEREDITARIO previamente descrito. He sido informado/a verbalmente y por escrito de su naturaleza, riesgos y posibles alternativas, y he recibido las aclaraciones a mis dudas por parte de mi médico.

El Paciente:

DNI:

El Representante Legal:

DNI:

El Médico:

Nº Colegiado:

Murcia, a        de        de



## Anexo II

**Table 1. SALSA MLPA P260-B1 PALB2-RAD50-RAD51C-RAD51D probemix**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position				
		Reference	RAD50	PALB2	RAD51D	RAD51C
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA					
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation					
100	X-fragment: Specific for the X chromosome					
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome					
130 *	Reference probe 19616-L26704	4p13				
136 *	<b>RAD51C</b> probe 20193-L27481				<b>Exon 2</b>	
142 *	<b>RAD51D</b> probe 20194-L27482				<b>Exon 10</b>	
148 *	<b>PALB2</b> probe 20195-L27483			<b>Exon 9</b>		
154 *	<b>RAD50</b> probe 20196-L27484		<b>Exon 14</b>			
160 *	Reference probe 09787-L10202	15q21				
166 *	<b>RAD51D</b> probe 20198-L27486				<b>Exon 6</b>	
172 †	<b>PALB2</b> probe 07501-L27938			<b>Exon 10</b>		
178 *	<b>RAD51D</b> probe 20199-L27487				<b>Exon 1</b>	
184 †	<b>RAD51C</b> probe 16393-L27657				<b>Exon 3</b>	
190	Reference probe 08067-L19457	9p13				
196 *	<b>RAD50</b> probe 20200-L27488		<b>Exon 25</b>			
202 †	<b>RAD51C</b> probe 16395-L27659				<b>Exon 1</b>	
208 *	<b>RAD50</b> probe 20201-L27489		<b>Exon 10</b>			
218 * †	<b>RAD51D</b> probe 20203-SP0939-L27491				<b>Exon 3</b>	
225 *	Reference probe 10902-L14355	9q34				
232 †	<b>RAD51C</b> probe 16398-L27871				<b>Exon 6</b>	
238 *	<b>RAD50</b> probe 20204-L27492		<b>Exon 23</b>			
245 *	<b>PALB2</b> probe 20205-L28341			<b>Exon 2</b>		
253	<b>RAD51C</b> probe 16399-L28036				<b>Exon 9</b>	
262 *	Reference probe 16433-L28037	18q21				
267 *	<b>RAD51D</b> probe 20206-L28038				<b>Exon 9</b>	
274 †	<b>PALB2</b> probe 16391-L27658			<b>Exon 1</b>		
281 *	<b>RAD51D</b> probe 20207-L28039				<b>Exon 7</b>	
288 *	<b>PALB2</b> probe 20208-L28040			<b>Exon 4</b>		
293 *	Reference probe 15724-L27656	12q12				
301	<b>RAD51C</b> probe 16400-L18815				<b>Exon 4</b>	
310	<b>PALB2</b> probe 07502-L22722			<b>Exon 11</b>		
318 * †	<b>RAD51D</b> probe 20209-SP0940-L27940				<b>Exon 8</b>	
328 †	<b>RAD51C</b> probe 16402-SP0363-L19302				<b>Exon 8</b>	
336	<b>RAD50</b> probe 08999-L19778		<b>Exon 4</b>			
344 *	Reference probe 12785-L27941	2q12				
350 †	<b>PALB2</b> probe 07504-L27660			<b>Exon 13</b>		
359 †	<b>RAD51C</b> probe 20139-L27378				<b>Exon 7</b>	
368 *	<b>RAD51D</b> probe 20210-L27498				<b>Exon 4</b>	
375 †	<b>PALB2</b> probe 07497-L19690			<b>Exon 6</b>		
388 *	<b>RAD51D</b> probe 20211-L27499				<b>Exon 2</b>	
395 *	Reference probe 11901-L27676	6p12				
406 *	<b>PALB2</b> probe 20212-L27500			<b>Exon 3</b>		
414 *	<b>RAD50</b> probe 20213-L27501		<b>Exon 2</b>			
423 *	<b>PALB2</b> probe 20214-L27943			<b>Exon 8</b>		
427 *	<b>RAD51C</b> probe 20215-L27503				<b>Exon 5</b>	
436 †	<b>RAD50</b> probe 09002-L27944		<b>Exon 21</b>			
445	<b>RAD50</b> probe 08998-L09098		<b>Exon 1</b>			
459 *	Reference probe 16581-L27675	7p14				
466 * †	<b>PALB2</b> probe 20216-SP0941-L27504			<b>Exon 12</b>		
477 *	<b>PALB2</b> probe 20217-L27505			<b>Exon 5</b>		
485 *	<b>RAD51D</b> probe 20218-L27945				<b>Exon 5</b>	
494 *	<b>PALB2</b> probe 20219-L27946			<b>Exon 7</b>		
500 *	Reference probe 19555-L27674	2p13				

**Tabla B1:** Todas las sondas del Kit *SALSA MLPA P260-B1 PALB2-RAD50-RAD51C-RAD51D probemix*.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	RAD51D Exon	Ligation site NM_002878.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	257-259 (ex 1)		
178	20199-L27487	<b>Exon 1</b>	139-140	TTCCTCCGGCA-GCCAGCGGCCT	0.6 kb
388	20211-L27499	<b>Exon 2</b>	396-395 reverse	AGCTCACCTTGT-AAGACAAGCCAC	0.7 kb
218 Ж	20203-SP0939-L27491	<b>Exon 3</b>	512-513 and 38 nt after exon 3	GTCCACTGGCAT-44nt spanning oligo-AGGATGGGGCCT	11.0 kb
368	20210-L27498	<b>Exon 4</b>	551-552	CTGGTCTCTATA-CTGGAGAAGTGA	0.3 kb
485	20218-L27945	<b>Exon 5</b>	5 nt before exon 5	AATGCCCCACC-CCCAGGTATGTC	0.7 kb
166	20198-L27486	<b>Exon 6</b>	788-789	ACATCTTCCAGA-TGCTGGATGTGC	2.9 kb
281	20207-L28039	<b>Exon 7</b>	840-841	TCAGGTGACTGG-TTCTTCAGGAAC	0.3 kb
318 Ж	20209-SP0940-L27940	<b>Exon 8</b>	938-939 and 973-974	TGGCCTTGATGA-35nt spanning oligo-GACCTTGGCATG	2.0 kb
267	20206-L28038	<b>Exon 9</b>	1060-1061	GGACGCTCCTGG-AGCTTTGTGCC	0.3 kb
142	20194-L27482	<b>Exon 10</b>	1228-1229	GCCACATTACAG-GGTGATCAGACA	
		<i>stop codon</i>	1241-1243 (ex 10)		

**Tabla B2:** Sondas de *RAD51D*.

Ж Sonda que consta de tres partes y tiene dos sitios de ligación.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	RAD51C Exon	Ligation site NM_058216.1	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>start codon</i>	43-45 (ex 1)		
202	16395-L27659	<b>Exon 1</b>	143-144	GGGGTTCAGAC-TGCTGAGGAAC	2.3 kb
136	20193-L27481	<b>Exon 2</b>	340-341	CCCAGGGCTTCA-TAATCACCTTCT	1.7 kb
184	16393-L27657	<b>Exon 3</b>	578-579	CTGCATTCAGCA-CCTTCAGCTTAT	6.5 kb
301	16400-L18815	<b>Exon 4</b>	705-706	GAGTACTGGCA-CAAGTTTATCTT	6.7 kb
427	20215-L27503	<b>Exon 5</b>	866-867	CCTTGCAAATAA-TCACAGATTAGC	11.0 kb
232	16398-L27871	<b>Exon 6</b>	133 nt after exon 6	ATCTTAGACTA-AGCACAGTACCG	3.2 kb
359	20139-L27378	<b>Exon 7</b>	995-996	CTTTCATTGGGA-CCGAAAGCAAAG	8.4 kb
328 Ж	16402-SP0363-L19302	<b>Exon 8</b>	1035-1036 and 1067-1068	AAGTCACCCAGC-32nt spanning oligo-AGTCAGTATTAT	1.7 kb
253	16399-L28036	<b>Exon 9</b>	1122-1123	TTGCAAACAGAA-GGTCCTTGAGC	
		<i>stop codon</i>	1171-1173 (ex 9)		

**Tabla B3:** Sondas de *RAD51C*.

Ж Sonda que consta de tres partes y tiene dos sitios de ligación.

**Anexo III****SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS****SECCIÓN DE HORMONAS-LAB  
DIAGNÓSTICO GENÉTICO****CONTROLES PARA ESTUDIO DE C. MAMA****CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO GENÉTICO**

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente entre las mujeres del mundo occidental. En España, se calcula que se diagnostican anualmente 22.000 casos de cáncer de mama, lo que supone el 30% del total de los tumores diagnosticados en mujeres. Entre un 5 y un 10% de todos los casos presentan un componente hereditario. Se han identificado dos genes principales de susceptibilidad (*BRCA1* y *BRCA2*). Sin embargo, publicaciones recientes recomiendan ampliar el estudio a variantes actualmente desconocidas, así como realizar investigaciones en otros genes que podrían estar relacionados.

Para ello, es necesario el reclutamiento de personas sanas, que no cumplan ninguno de los criterios clínicos de inclusión de cáncer de mama y ovario hereditario.

Es por ello, que solicitamos tu colaboración de forma voluntaria como control sano, agradeciendo de antemano tu participación desinteresada.

Dña:

.....

, con DNI ..... y ..... fecha de nacimiento.....

Declaro haber recibido completa información sobre los propósitos del estudio genético y estar de acuerdo con que se utilice el ADN obtenido a partir de una muestra de sangre periférica, así como su posterior almacenamiento.

Según lo establecido en la ley Orgánica 15/1999, de protección de datos de carácter personal, mis datos de carácter personal y sanitario quedarán registrados en un fichero propiedad del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, pudiendo ser utilizados y cedidos única y exclusivamente a los efectos de la actuación encargada, gozando de los derechos de acceso, rectificación y cancelación. Todos los datos que se derivan del proceso quedarán reflejados en la correspondiente historia clínica, que será custodiada en las instalaciones de la entidad para garantizar su correcta conservación y recuperación.

**Paciente (control sano)**

**Facultativo**

Fdo: \_\_\_\_\_

Fdo: \_\_\_\_\_

Murcia, a .... de ..... de .....



**Anexo IV**

Exón/Intrón	Mutación (cambio proteína)	M	Nº. casos (%)	Referencia
2	c.34C>T (p.Gln12*)	N	1 (1,67)	Adem y col. 2003 (202). BIC
2	c.68_69delAG (p.Leu22_Glu23LeuVals)	F	10 (16,67)	Díez y col. 2003 (66). BIC
2	c.70_73dup (p. Pro25LeufsX17)	F	2 (3,33)	Díez y col. 2003 (66). BIC
5	c.181T>G (p.Cys61Gly)	M	1 (1,67)	Freidman y col. 1994 (203). BIC
5	c.211A>G (p.Arg71Gly)	S	4 (6,67)	Díez y col. 2003 (66). BIC
I-5	c.212+1G>A	S	8 (13,33)	Díez y col 2003 (66). BIC
6	c.290_291delCA (p. Thr97fsX105)	F	1 (1,67)	Bergman y col. 2005 (204). BIC
11	c.835delC (p.His279Metfs)	F	3 (5)	BIC
11	c.953delA (p.His318Leufs*23)	F	1 (1,67)	No descrita
11	c.1612C>T (p.Gln358Ter)	N	1 (1,67)	Eerola (2005) y col. (205) BIC
11	c.1859delT (p..Ile620fsX625)	F	1 (1,67)	No descrita
11	c.1912_1912delG (p.Glu638AsnfsX650)	F	1 (1,67)	Díez y col 2003 (66). BIC
11	c.1918C>T (p.Gln640*)	N	4 (6,67)	Gabaldó y col. 2014 (206).
11	c.2285_2286delGA (p.R762fsX766)	F	1 (1,67)	No descrita
11	c.3205C>T (p.Gln1069X)	N	1 (1,67)	No descrita
11	c.3280A>T (p.Lys1094Ter)	N	1 (1,67)	No descrita
11	c.3331_3334delCAAG (p.Gln1111fsX1115)	F	2 (3,33)	Durocher y col. 1996 (207). BIC
11	c.3583delC (p. H1195fsX1209)	F	3 (5)	De Juan Jiménez y col. 2008 (69). HGMD
11	c.3770_3771delAG (pGlu1257fsX1265)	F	1 (1,67)	Takahashi y col. 1995 (208).
I-13	c.4357+1delG	S	1 (1,67)	Musolino et al. 2007 (209).
18	c.5095C>T (p.Arg1699Trp)	M	1 (1,67)	De Juan Jiménez y col. 2012 (207). BIC
18	c.5123C>A (p.Ala1708Glu)	S	8 (13,33)	Futreal PA y col. 1994 (210). BIC
20	c.5263_5264insC (p.Gln1756profsX 1829)	F	1 (1,67)	Simard y col. 1994 (211). BIC
20	c. 5277+1G>A	S	2 (3,33)	Díez y col. 2003 (66). BIC
<b>TOTAL</b>	24		60 (100)	

**Tabla X:** Variantes patogénicas *BRCA1*. M: Tipo de variante; F: *frameshift*; M: *missense*; N: *nonsense*; S: *splicing*.

Exón/Intrón	Mutación (cambio proteína)	M	No. casos (%)	Referencia
2	Del Ex 2	LGR	7 (15,22)	Gutiérrez-Enríquez y col. 2007 (197).
3	c.262_263delCT (p. Leu88fs*99)	F	2 (4,35)	Salgado J. y col. 2010 (212). HGMD
	c.1597delA (p. Thr533Leufs*25)	F	1 (2,17)	Díez y col. 2003 (66). BIC
10	c.1608dupT (p. Ser536?fs)	F	2 (4,35)	Freidman y col. 1994 (203). BIC
11	c.2095C>T (p. Gln699*)	N	1 (2,17)	No descrita
11	c.2701delC	F	1 (2,17)	Miramar et al. 2008 (213). UMD
11	c.3264dupT (p. Gln1089SerfsX10)	F	4 (8,70)	Llort y col. 2002 (214). BIC
11	c.3280A>T (p. Lys1094*)	N	1 (2,17)	No descrita
11	c.3331_3334delCAAG (p. Gln1111fsX1115)	F	1 (2,17)	Stegel et al. 2011 (215). HGMD
11	C.3455T>G (p. Leu1152*)	N	3 (6,52)	Caux-MoV. et al 2009. BIC
11	c.3922G>T (p. Glu1308*)	N	1 (2,17)	Diez et al. (2003) (66).
11	c.4936_4939delGAAA p. Glu1646Glnfs*1668	F	1 (2,17)	No descrita
11	c.4963delT (p. Tyr1655ThrfsX15)	F	1 (2,17)	UMD
11	c.5073dupA (p. Lys1691_Trp1692fs)	F	1 (2,17)	Marshall M et al. 2009 (216) BIC
11	c.5145_5148delGTAT (p. Leu1715Tyrfs*1123)	F	1 (2,17)	Llort et al. 2002 (214). BIC
11	c.5669_5673delATGGC	F	1 (2,17)	No descrita
11	c.6491_6494delAGTT (p. Gln2164Argfs*3)	F	2 (4,35)	Lubinski y col. 2004 (217)
13	c.7007G>A	S	1 (2,17)	Farrugia et al (2008)(218). BIC
I-17	c.7977-1G>A	S	1 (2,17)	No descrita
18	c.8201delC (p. Pro2734Leufs*4)	F	1 (2,17)	UMD
23	c.9026_9030delATCAT (p. Tyr3009_His3010fs)	F	2 (4,35)	Berta Campos y col. 2003 (219) BIC
20	c. 9117G>A	S	6 (13,04)	Bonatti y col. 2006 (220) BIC
25	c.9285C>G (p. Asp3095Glu)	M	2 (4,35)	Diez y col. (2003) (66).
25	c.9310_9311delAA (p. Lys3104Valfs)	F	1 (2,17)	Ramūnas Janavičius, 2010 (221). BIC
25	c.9382C>T (p. Arg3128*)	N	1 (2,17)	Plaschke y col. 2000 (222). BIC
<b>TOTAL</b>	25		46 (100)	

**Tabla X:** Variantes patogénicas *BRCA2*. M: Tipo de variante; F: *frameshift*; M: *missense*; N: *nonsense*; S: *splicing*.

Exón/Intrón	Mutación (cambio proteína)	M	No. Casos (%)	Reference
I-2	c.-19-21_-19-20insAT	5' UTR	1	BIC
I-2	c.81-55T>C	I	2	Borg A. y col. 2010 (223)
I-5	c. 213-116T>C	I	1	No descrita
I-6	c.302-87T>C	I	1	BIC
I-6	c.302-41T>G	I	1	No descrita
11	c.946A>G (p.Ser316Gly)	M	1	Burk-Herrick A y col. 2006 (224). BIC
11	c.981A>G (p.Thr327Thr)	Si	1	Borg A. y col. (2010) (223). BIC
11	c.2662C>T (p.His888Tyr)	M	1	Meyer y col. 2003 (225). BIC
11	c.2733A>G (p.Gly911Gly)	Si	1	Riahi y col. 2014 (226)
11	c.3433G>T (p.Val1145Phe)	M	1	No descrita
11	c.3928A>G (p.Thr1310Ala)	M	1	No descrita
18	c.5100A>G (p.Thr1700Thr)	Si	1	Judkins y col. 2005 (227)
I-21	c.5332+32C>T	I	2	No descrita
I-21	c.5333-47A>T	I	1	No descrita
I-21	c.5333-8C>T	I	1	Simard y col. 2007 (228). BIC
22	c.5334T>C (p.Asp1778Asp)	Si	1	Houdayer y col. 2012 (229).
24	c.5507_5508delAG (p.Glu1836Valfs*43)	F	1	No descrita
<b>TOTAL</b>	19		21	

**Tabla X:** Variantes de significado clínico desconocido *BRCA2*. M: Tipo de variante; F: *frameshift*; M: *missense*; I: intrónica; Si: sinónima.

Exón/Intrón	Mutación (cambio proteína)	M.	No. casos	Referencia
I-1	c.-75C>G	I	1	Díez y col. 2003 (66)
I-2	c.68-7T>A	I	1	No descrita
I-3	c.316+167T>C	I	1	No descrita
I-5	c.475+14C>T	I	1	No descrita
I-6	c.516+14C>T	I	1	Houdayer y col. 2012 (229).
I-7	c.631+25C>T	I	1	Borg A y col. 2010 (223). BIC
I-8	c.682-54T>C	I	1	No descrita
10	c.1240G>C (Ala338Thr)	M	1	No descrita
10	c.1717G>A (p.Ala573Thr)	M	1	No descrita
10	c.1803A>G (p.Lys601Lys)	Si	1	No descrita
11	c.2464T>C (p.Cys822Arg)	M	1	Thompson y col. 2013 (230). BIC
11	c.2803G>A (p.Asp935Asn)	M	1	Vogel y col. 2007. (231). BIC
11	c.2883G>A (p.Gln961Gln)	Si	1	Wagner y col. 1999 (232). BIC
11	c.3032C>G (p.Thr1011Arg)	M	1	Balia y col. 2011 (233). BIC
11	c.3225T>C (p.Ser1075Ser)	Si	1	HGMD
11	c.3516G>A (p.Ser1172Ser)	Si	1	Borg A. y col. 2010 (223). BIC
11	c.3767A>C (p.His1256Pro)	M	1	UMD
11	c.4146_4148delAGA (p.1382delGlu)	IFD	1	Wu et al 2005. BIC
11	c.4256A>C (p.Lys1419Thr)	M	1	No descrita
11	c.4316C>A (p.Ala1439Asp)	M	1	BIC
11	c.5027G>A (p.Ser1676Asn)	M	1	No descrita
11	c.6293C>T (p.Ser2098Phe)	M	1	BIC
11	c.6322C>T (p.Arg2108Cys)	M	1	Balia y col. 2011 (233). BIC
I-12	c.6938-21T>C	I	1	No descrita

**Tabla X.1:** Variantes de significado clínico desconocido de BRCA2. M: Tipo de variante; F: frameshift; M: missense; I: intrónica; Si: sinónima.

Exón/Intrón	Mutación (cambio proteína)	M.	No. casos (%)	Referencia
I-13	c.7008-14del	I	1	No descrita
15	c.7559G>T (p.Arg2520Leu)	M	1	UMD
I-16	c.7806-40A>G	I	1	Borg A. y col. 2010 (223).
I-18	c.8331+133G>A	I	1	Not reported
20	c.8503T>C (p.Ser2835Pro)	M	1	Johnson y col. 2007 (234). BIC
20	c.8632+47dup12	I	1	No descrita
22	C.8854A>G (p.Met2952Val)	M	1	HGMD
23	C.9065A>G (p.Glu3021Glu)	Si	2	No descrita
I-24	c.9256+61A>T	I	1	No descrita
I-25	c.9501+3A>T	I	1	BIC
I-26	c.9648+84G>A	I	1	Borg A. et al. 2010 (223). BIC
27	c.9783C>T (p.Asp3261Asp)	Si	1	No descrita
27	c.9843A>G (p.Pro3281Pro)	Si	2	BIC
27	c.9875C>T (p.Pro3292Leu)	M	6	Karchin R. Y col. 2008 (235). BIC
27	c.10043insA (p.Asn3348fsX3368)	F	1	No descrita
27	c.10103 C>T (p.Ser3368Phe)	M	1	No descrita
27	c.10110G>A (p.Arg3370Arg)	Si	2	Díez y col. 2003 (66). BIC
<b>TOTAL</b>	41		49	

**Tabla X.2:** Variantes de significado clínico desconocido de BRCA2. M: Tipo de variante; F:

*frameshift*; M: *missense*; I: intrónica; Si: sinónima.



## **VIII. Bibliografía**



1. International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2012. 24-4-2014. 2015.
2. Cabanes A, Vidal E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Lope V, et al. Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2010 May;21 Suppl 3:iii14-20.
3. Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larrañaga N, Capocaccia R, Martínez C, et al. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2010 May;21 Suppl 3:iii30-36.
4. Chirlaque MD, Salmerón D, Ardanaz E, Galceran J, Martínez R, Marcos-Gragera R, et al. Cancer survival in Spain: estimate for nine major cancers. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2010 May;21 Suppl 3:iii21-29.
5. Pollán M, Michelena MJ, Ardanaz E, Izquierdo A, Sánchez-Pérez MJ, Torrella A, et al. Breast cancer incidence in Spain before, during and after the implementation of screening programmes. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2010 May;21 Suppl 3:iii97-102.
6. Sant M, Chirlaque Lopez MD, Agresti R, Sánchez Pérez MJ, Holleczeck B, Bielska-Lasota M, et al. Survival of women with cancers of breast and genital organs in Europe 1999-2007: results of the EURO CARE-5 study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2015 Sep 6;
7. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-386.
8. Sasieni PD, Shelton J, Ormiston-Smith N, Thomson CS, Silcocks PB. What is the lifetime risk of developing cancer?: the effect of adjusting for multiple primaries. *Br J Cancer*. 2011 Jul 26;105(3):460-5.
9. Bernstein L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002 Jan;7(1):3-15.
10. Hankinson SE, Eliassen AH. Endogenous estrogen, testosterone and progesterone levels in relation to breast cancer risk. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Sep;106(1-5):24-30.
11. Brewster A, Helzlsouer K. Breast cancer epidemiology, prevention, and early detection. *Curr Opin Oncol*. 2001 Nov;13(6):420-5.
12. Stuckey A. Breast cancer: epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol*. 2011 Mar;54(1):96-102.
13. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet Lond Engl*. 2001 Oct 27;358(9291):1389-99.

14. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998 Mar;62(3):676–89.
15. Díez O, Gutiérrez-Enríquez S, Ramón y Cajal T. [Breast cancer susceptibility genes]. *Med Clínica.* 2006 Mar 4;126(8):304–10.
16. Chaudary MA, Millis RR, Bulbrook RD, Hayward JL. Family history and bilateral primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1985 Jun;5(2):201–5.
17. Rebbeck TR. Inherited genetic predisposition in breast cancer. A population-based perspective. *Cancer.* 1999 Dec 1;86(11 Suppl):2493–501.
18. Weber BL, Nathanson KL. Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl.* 1990. 2000 Jun;36(10):1193–9.
19. Claus EB, Risch NJ, Thompson WD. Age at onset as an indicator of familial risk of breast cancer. *Am J Epidemiol.* 1990 Jun;131(6):961–72.
20. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1250–6.
21. Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, et al. Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet.* 1997 Aug;6(8):1383–7.
22. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C, International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology.* 2001 Dec;121(6):1348–53.
23. Antoniou AC, Pharoah PDP, McMullan G, Day NE, Stratton MR, Peto J, et al. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer.* 2002 Jan 7;86(1):76–83.
24. Antoniou AC, Easton DF. Polygenic inheritance of breast cancer: Implications for design of association studies. *Genet Epidemiol.* 2003 Nov;25(3):190–202.
25. Pharoah PDP, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BAJ. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet.* 2002 May;31(1):33–6.
26. Whiffin N, Houlston RS. Architecture of inherited susceptibility to colorectal cancer: a voyage of discovery. *Genes.* 2014;5(2):270–84.
27. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* 1994 Oct 7;266(5182):66–71.

28. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995 Dec 21;378(6559):789–92.
29. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*. 2003 May;72(5):1117–30.
30. Evans DGR, Birch JM, Thorneycroft M, McGown G, Lalloo F, Varley JM. Low rate of TP53 germline mutations in breast cancer/sarcoma families not fulfilling classical criteria for Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet*. 2002 Dec;39(12):941–4.
31. Chen J, Lindblom P, Lindblom A. A study of the PTEN/MMAC1 gene in 136 breast cancer families. *Hum Genet*. 1998 Jan;102(1):124–5.
32. Leggett BA, Young JP, Barker M. Peutz-Jeghers syndrome: genetic screening. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2003 Aug;3(4):518–24.
33. Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet*. 2006 Nov;38(11):1239–41.
34. Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet*. 2007 Feb;39(2):165–7.
35. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*. 2010 May;42(5):410–4.
36. Shamseldin HE, Elfaki M, Alkuraya FS. Exome sequencing reveals a novel Fanconi group defined by XRCC2 mutation. *J Med Genet*. 2012 Mar;49(3):184–6.
37. Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jun 1;97(11):813–22.
38. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet*. 2002 May;31(1):55–9.
39. Heikkinen K, Rapakko K, Karppinen S-M, Erkkö H, Knuutila S, Lundán T, et al. RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. *Carcinogenesis*. 2006 Aug;27(8):1593–9.
40. Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, Hughes D, Ruark E, Frankum JR, et al. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet*. 2011 Sep;43(9):879–82.

41. Orr N, Lemnrau A, Cooke R, Fletcher O, Tomczyk K, Jones M, et al. Genome-wide association study identifies a common variant in RAD51B associated with male breast cancer risk. *Nat Genet.* 2012 Nov;44(11):1182–4.
42. Michailidou K, Hall P, Gonzalez-Neira A, Ghoussaini M, Dennis J, Milne RL, et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet.* 2013 Apr;45(4):353–61, 361-2.
43. Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med.* 2008 Nov 13;359(20):2143–53.
44. Chen Y, Toland AE, McLennan J, Fridlyand J, Crawford B, Costello JF, et al. Lack of germ-line promoter methylation in BRCA1-negative families with familial breast cancer. *Genet Test.* 2006;10(4):281–4.
45. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [Internet]. [cited 2016 Mar 27]. Available from: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp#genetics\\_screening](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#genetics_screening)
46. Eccles DM, Evans DG, Mackay J. Guidelines for a genetic risk based approach to advising women with a family history of breast cancer. UK Cancer Family Study Group (UKCFSG). *J Med Genet.* 2000 Mar;37(3):203–9.
47. Breast cancer | Guidance and guideline topic | NICE [Internet]. [cited 2016 Mar 27]. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/conditions-and-diseases/cancer/breast-cancer>
48. Guías Clínicas [Internet]. [cited 2016 Mar 27]. Available from: <http://www.seom.org/es/publicaciones/guias-clinicas>
49. Zugazagoitia J, Pérez-Segura P, Manzano A, Blanco I, Vega A, Custodio A, et al. Limited family structure and triple-negative breast cancer (TNBC) subtype as predictors of BRCA mutations in a genetic counseling cohort of early-onset sporadic breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Nov;148(2):415–21.
50. Kurian AW. BRCA1 and BRCA2 mutations across race and ethnicity: distribution and clinical implications. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010 Feb;22(1):72–8.
51. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DEC, Rosen B, Bradley L, Fan I, et al. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Dec 6;98(23):1694–706.
52. Rubin SC, Blackwood MA, Bandera C, Behbakht K, Benjamin I, Rebbeck TR, et al. BRCA1, BRCA2, and hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene mutations in an unselected ovarian cancer population: relationship to family history and implications for genetic testing. *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Apr;178(4):670–7.
53. Marquis ST, Rajan JV, Wynshaw-Boris A, Xu J, Yin GY, Abel KJ, et al. The developmental pattern of Brca1 expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nat Genet.* 1995 Sep;11(1):17–26.

54. Rajan JV, Wang M, Marquis ST, Chodosh LA. Brca2 is coordinately regulated with Brca1 during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 12;93(23):13078–83.
55. Brown MA, Xu CF, Nicolai H, Griffiths B, Chambers JA, Black D, et al. The 5' end of the BRCA1 gene lies within a duplicated region of human chromosome 17q21. *Oncogene*. 1996 Jun 20;12(12):2507–13.
56. Orr KS, Savage KI. The BRCA1 and BRCA2 Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Genes — Implications for DNA Damage Response, DNA Repair and Cancer Therapy. In: Chen CC, editor. *Advances in DNA Repair [Internet]*. InTech; 2015 [cited 2016 Mar 27]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-dna-repair/the-brca1-and-brca2-breast-and-ovarian-cancer-susceptibility-genes-implications-for-dna-damage-respo>
57. Meza JE, Brzovic PS, King MC, Kleit RE. Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1. *J Biol Chem*. 1999 Feb 26;274(9):5659–65.
58. Yu X, Chini CCS, He M, Mer G, Chen J. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*. 2003 Oct 24;302(5645):639–42.
59. Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GDV, Boehning D. Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J*. 2012 Apr 1;1(1).
60. Zhang F, Ma J, Wu J, Ye L, Cai H, Xia B, et al. PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr Biol CB*. 2009 Mar 24;19(6):524–9.
61. Zhang F, Fan Q, Ren K, Andreassen PR. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol Cancer Res MCR*. 2009 Jul;7(7):1110–8.
62. Manke IA, Lowery DM, Nguyen A, Yaffe MB. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*. 2003 Oct 24;302(5645):636–9.
63. Oliver AW, Swift S, Lord CJ, Ashworth A, Pearl LH. Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep*. 2009 Sep;10(9):990–6.
64. Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell*. 2001 Feb;7(2):263–72.
65. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*. 2002 Sep 13;297(5588):1837–48.
66. Díez O, Osorio A, Durán M, Martínez-Ferrandis JI, de la Hoya M, Salazar R, et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat*. 2003 Oct;22(4):301–12.

67. Infante M, Durán M, Esteban-Cardenosa E, Miner C, Velasco E. High proportion of novel mutations of BRCA1 and BRCA2 in breast/ovarian cancer patients from Castilla-León (central Spain). *J Hum Genet.* 2006;51(7):611–7.
68. Esteban Cardenosa E, Bolufer Gilabert P, de Juan Jiménez I, Palanca Suela S, Barragán González E, González Anguix V, et al. Relationship of BRCA1 and BRCA2 mutations with cancer burden in the family and tumor incidence. *Fam Cancer.* 2010 Sep;9(3):291–5.
69. de Juan Jiménez I, Esteban Cardenosa E, Palanca Suela S, Barragán González E, Aznar Carretero I, Munárriz Gandía B, et al. Low prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in the sporadic breast cancer of Spanish population. *Fam Cancer.* 2012 Mar;11(1):49–56.
70. Pal T, Permut-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer.* 2005 Dec 15;104(12):2807–16.
71. Lindahl T, Barnes DE. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2000;65:127–33.
72. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):247–54.
73. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009 Oct 22;461(7267):1071–8.
74. Bouwman P, Jonkers J. The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat Rev Cancer.* 2012 Sep;12(9):587–98.
75. Brandsma I, Gent DC. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr.* 2012;3(1):9.
76. Moynahan ME, Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Mar;11(3):196–207.
77. Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001;411(6835):366–74.
78. Haber JE. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci.* 1999 Jul;24(7):271–5.
79. McEachern MJ, Haber JE. Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:111–35.
80. Peng G. Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. *World J Clin Oncol.* 2011;2(2):73.
81. Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene.* 2003 Sep 1;22(37):5792–812.

82. Sung P, Klein H. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(10):739–50.
83. Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul;40(13):5795–818.
84. Walsh CS. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *Gynecol Oncol.* 2015 May;137(2):343–50.
85. Sung P, Robberson DL. DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell.* 1995 Aug 11;82(3):453–61.
86. Benson FE, Stasiak A, West SC. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J.* 1994 Dec 1;13(23):5764–71.
87. Forget AL, Kowalczykowski SC. Single-molecule imaging brings Rad51 nucleoprotein filaments into focus. *Trends Cell Biol.* 2010 May;20(5):269–76.
88. CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium. CHEK2\*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. *Am J Hum Genet.* 2004 Jun;74(6):1175–82.
89. Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene.* 2006;25(43):5906–11.
90. Loveday C, Turnbull C, Ruark E, Xicola RMM, Ramsay E, Hughes D, et al. Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet.* 2012 May;44(5):475–476; author reply 476.
91. Osorio A, Endt D, Fernández F, Eirich K, de la Hoya M, Schmutzler R, et al. Predominance of pathogenic missense variants in the RAD51C gene occurring in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet.* 2012 Jul 1;21(13):2889–98.
92. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet.* 2006 Aug;38(8):873–5.
93. Osorio A, Rodríguez-López R, Díez O, de la Hoya M, Ignacio Martínez J, Vega A, et al. The breast cancer low-penetrance allele 1100delC in the CHEK2 gene is not present in Spanish familial breast cancer population. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2004 Jan 1;108(1):54–6.
94. Szymanska-Pasternak J, Szymanska A, Medrek K, Imyanitov EN, Cybulski C, Gorski B, et al. CHEK2 variants predispose to benign, borderline and low-grade invasive ovarian tumors. *Gynecol Oncol.* 2006 Sep;102(3):429–31.
95. Moldovan G-L, D’Andrea AD. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet.* 2009;43:223–49.

96. D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jan;3(1):23–34.
97. Konstantinopoulos PA, Ceccaldi R, Shapiro GI, D'Andrea AD. Homologous Recombination Deficiency: Exploiting the Fundamental Vulnerability of Ovarian Cancer. *Cancer Discov*. 2015 Nov;5(11):1137–54.
98. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, De Die-Smulders C, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*. 2002 Jul 26;297(5581):606–9.
99. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet*. 2007 Feb;39(2):162–4.
100. Vaz F, Hanenberg H, Schuster B, Barker K, Wiek C, Erven V, et al. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet*. 2010 May;42(5):406–9.
101. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell*. 2006 Jun 23;22(6):719–29.
102. Chang S, Biswas K, Martin BK, Stauffer S, Sharan SK. Expression of human BRCA1 variants in mouse ES cells allows functional analysis of BRCA1 mutations. *J Clin Invest*. 2009 Oct;119(10):3160–71.
103. 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.
104. Erkkö H, Xia B, Nikkilä J, Schleutker J, Syrjäkoski K, Mannermaa A, et al. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature*. 2007 Mar 15;446(7133):316–9.
105. Peng M, Litman R, Jin Z, Fong G, Cantor SB. BACH1 is a DNA repair protein supporting BRCA1 damage response. *Oncogene*. 2006 Apr 6;25(15):2245–53.
106. Davies OR, Pellegrini L. Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51–DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Jun;14(6):475–83.
107. Miller KA, Sawicka D, Barsky D, Albala JS. Domain mapping of the Rad51 paralog protein complexes. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(1):169–78.
108. Yu X, Jacobs SA, West SC, Ogawa T, Egelman EH. Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8419–24.
109. Shin DS, Pellegrini L, Daniels DS, Yelent B, Craig L, Bates D, et al. Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *EMBO J*. 2003 Sep 1;22(17):4566–76.

110. Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, et al. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):287–93.
111. Saeki H, Siaud N, Christ N, Wiegant WW, van Buul PPW, Han M, et al. Suppression of the DNA repair defects of BRCA2-deficient cells with heterologous protein fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 6;103(23):8768–73.
112. Rajendra E, Venkitaraman AR. Two modules in the BRC repeats of BRCA2 mediate structural and functional interactions with the RAD51 recombinase. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan;38(1):82–96.
113. Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA. The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13869–74.
114. Chen CF, Chen PL, Zhong Q, Sharp ZD, Lee WH. Expression of BRC repeats in breast cancer cells disrupts the BRCA2-Rad51 complex and leads to radiation hypersensitivity and loss of G(2)/M checkpoint control. *J Biol Chem*. 1999 Nov 12;274(46):32931–5.
115. Carreira A, Hilario J, Amitani I, Baskin RJ, Shivji MKK, Venkitaraman AR, et al. The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA Binding Selectivity of RAD51. *Cell*. 2009 Mar 20;136(6):1032–43.
116. Badie S, Liao C, Thanasoula M, Barber P, Hill MA, Tarsounas M. RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylation. *J Cell Biol*. 2009 May 18;185(4):587–600.
117. Chun J, Buechelmaier ES, Powell SN. Rad51 paralog complexes BCDX2 and CX3 act at different stages in the BRCA1-BRCA2-dependent homologous recombination pathway. *Mol Cell Biol*. 2013 Jan;33(2):387–95.
118. Bennett BT, Knight KL. Cellular localization of human Rad51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of Rad51. *J Cell Biochem*. 2005 Dec 15;96(6):1095–109.
119. Liu Y, Tarsounas M, O’regan P, West SC. Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J Biol Chem*. 2007 Jan 19;282(3):1973–9.
120. Somyajit K, Subramanya S, Nagaraju G. RAD51C: a novel cancer susceptibility gene is linked to Fanconi anemia and breast cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Dec;31(12):2031–8.
121. Braybrooke JP, Li J-L, Wu L, Caple F, Benson FE, Hickson ID. Functional Interaction between the Bloom’s Syndrome Helicase and the RAD51 Paralog, RAD51L3 (RAD51D). *J Biol Chem*. 2003 Nov 28;278(48):48357–66.
122. Tarsounas M, Muñoz P, Claas A, Smiraldo PG, Pittman DL, Blasco MA, et al. Telomere Maintenance Requires the RAD51D Recombination/Repair Protein. *Cell*. 2004 Apr 30;117(3):337–47.
123. Kim YM, Choi B-S. Structural and functional characterization of the N-terminal domain of human Rad51D. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Mar;43(3):416–22.

124. National Society of Genetic Counselors : NSGC Home Page [Internet]. [cited 2016 Jan 19]. Available from: <http://www.nsgc.org/>
125. ASCO.org | Making a World of Difference in Cancer Care [Internet]. [cited 2016 Jan 19]. Available from: <http://www.asco.org/>
126. Byrski T, Huzarski T, Dent R, Gronwald J, Zuziak D, Cybulski C, et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 May;115(2):359–63.
127. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, Grzybowska E, Budryk M, Stawicka M, et al. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2010 Jan 20;28(3):375–9.
128. Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H, et al. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med.* 2003 May;9(5):568–74.
129. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature.* 2005 Apr 14;434(7035):913–7.
130. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Jul;15(8):852–61.
131. Goldgar DE, Easton DF, Byrnes GB, Spurdle AB, Iversen ES, Greenblatt MS, et al. Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):1265–72.
132. Mohammadi L, Vreeswijk MP, Oldenburg R, van den Ouweland A, Oosterwijk JC, van der Hout AH, et al. A simple method for co-segregation analysis to evaluate the pathogenicity of unclassified variants; BRCA1 and BRCA2 as an example. *BMC Cancer.* 2009;9:211.
133. Thompson D, Easton DF, Goldgar DE. A full-likelihood method for the evaluation of causality of sequence variants from family data. *Am J Hum Genet.* 2003 Sep;73(3):652–5.
134. Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature.* 2015 Oct 1;526(7571):75–81.
135. Gómez García EB, Oosterwijk JC, Timmermans M, van Asperen CJ, Hogervorst FBL, Hoogerbrugge N, et al. A method to assess the clinical significance of unclassified variants in the BRCA1 and BRCA2 genes based on cancer family history. *Breast Cancer Res BCR.* 2009;11(1):R8.

136. Domchek SM, Tang J, Stopfer J, Lilli DR, Hamel N, Tischkowitz M, et al. Biallelic deleterious BRCA1 mutations in a woman with early-onset ovarian cancer. *Cancer Discov.* 2013 Apr;3(4):399–405.
137. Spurdle AB, Whaley PJ, Thompson B, Feng B, Healey S, Brown MA, et al. BRCA1 R1699Q variant displaying ambiguous functional abrogation confers intermediate breast and ovarian cancer risk. *J Med Genet.* 2012 Aug;49(8):525–32.
138. Dorfman R, Nalpathamkalam T, Taylor C, Gonska T, Keenan K, Yuan XW, et al. Do common in silico tools predict the clinical consequences of amino-acid substitutions in the CFTR gene? *Clin Genet.* 2010 May;77(5):464–73.
139. Hicks S, Wheeler DA, Plon SE, Kimmel M. Prediction of missense mutation functionality depends on both the algorithm and sequence alignment employed. *Hum Mutat.* 2011 Jun;32(6):661–8.
140. Tavtigian SV, Greenblatt MS, Goldgar DE, Boffetta P, IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Assessing pathogenicity: overview of results from the IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):1261–4.
141. Tavtigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A. Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):1342–54.
142. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):1282–91.
143. Lindor NM, Goldgar DE, Tavtigian SV, Plon SE, Couch FJ. BRCA1/2 sequence variants of uncertain significance: a primer for providers to assist in discussions and in medical management. *The Oncologist.* 2013;18(5):518–24.
144. Ford D, Easton DF, Peto J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet.* 1995 Dec;57(6):1457–62.
145. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1995 Jan;56(1):265–71.
146. Serova OM, Mazoyer S, Puget N, Dubois V, Tonin P, Shugart YY, et al. Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer-susceptibility genes? *Am J Hum Genet.* 1997 Mar;60(3):486–95.
147. 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 J Int Cancer.* 2013 Oct 15;

148. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2002 Sep 1;20(17):3628–36.
149. Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet*. 2014 Jan;124(1):1–5.
150. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006 Jun 7;295(21):2492–502.
151. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*. 1974 Sep 6;185(4154):862–4.
152. Ng PC, Henikoff S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:61–80.
153. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010 Aug;7(8):575–6.
154. Ramesh AN, Kambhampati C, Monson JRT, Drew PJ. Artificial intelligence in medicine. *Ann R Coll Surg Engl*. 2004 Sep;86(5):334–8.
155. Ferrer-Costa C, Gelpí JL, Zamakola L, Parraga I, de la Cruz X, Orozco M. PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinforma Oxf Engl*. 2005 Jul 15;21(14):3176–8.
156. Wang J, Zhang J, Li K, Zhao W, Cui Q. SpliceDisease database: linking RNA splicing and disease. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan;40(Database issue):D1055-1059.
157. Zhang MQ. Statistical features of human exons and their flanking regions. *Hum Mol Genet*. 1998 May;7(5):919–32.
158. Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol*. 2004;11(2–3):377–94.
159. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol*. 1997;4(3):311–23.
160. Thompson ER, Boyle SE, Johnson J, Ryland GL, Sawyer S, Choong DYH, et al. Analysis of RAD51C germline mutations in high-risk breast and ovarian cancer families and ovarian cancer patients. *Hum Mutat*. 2012 Enero;33(1):95–9.
161. Lu W, Wang X, Lin H, Lindor NM, Couch FJ. Mutation screening of RAD51C in high-risk breast and ovarian cancer families. *Fam Cancer*. 2012 Sep;11(3):381–5.
162. Wickramanayake A, Wickramanyake A, Bernier G, Pennil C, Casadei S, Agnew KJ, et al. Loss of function germline mutations in RAD51D in women with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2012 Dec;127(3):552–5.

163. Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer*. 2007 Dec;7(12):937–48.
164. Diez O, Gutiérrez-Enríquez S, Balmaña J. Heterogeneous prevalence of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain according to the geographical area: implications for genetic testing. *Fam Cancer*. 2010 Jun;9(2):187–91.
165. Blay P, Santamaría I, Pitiot AS, Luque M, Alvarado MG, Lastra A, et al. Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer families from Asturias (Northern Spain). *BMC Cancer*. 2013;13:243.
166. Esteban Cardeñosa E, Bolufer Gilabert P, Palanca Suela S, Barragán González E, Oltra Soler S, Chirivella González I, et al. Mutaciones de BRCA1 y BRCA2 en familias estudiadas en el Programa de Consejo Genético en el Cáncer de la Comunidad Valenciana. *Med Clínica*. 2008 Feb;130(4):121–6.
167. Lloret G, Chirivella I, Morales R, Serrano R, Sanchez AB, Teulé A, et al. SEOM clinical guidelines in Hereditary Breast and ovarian cancer. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. 2015 Dec;17(12):956–61.
168. Pelttari LM, Heikkinen T, Thompson D, Kallioniemi A, Schleutker J, Holli K, et al. RAD51C is a susceptibility gene for ovarian cancer. *Hum Mol Genet*. 2011 Aug 15;20(16):3278–88.
169. Loveday C, Turnbull C, Ruark E, Xicola RMM, Ramsay E, Hughes D, et al. Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet*. 2012 May;44(5):475–476; author reply 476.
170. Zheng Y, Zhang J, Hope K, Niu Q, Huo D, Olopade OI. Screening RAD51C nucleotide alterations in patients with a family history of breast and ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Dec;124(3):857–61.
171. Akbari MR, Tonin P, Foulkes WD, Ghadirian P, Tischkowitz M, Narod SA. RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer patients. *Breast Cancer Res BCR*. 2010;12(4):404.
172. Pang Z, Yao L, Zhang J, Ouyang T, Li J, Wang T, et al. RAD51C germline mutations in Chinese women with familial breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Oct;129(3):1019–20.
173. Clague J, Wilhoite G, Adamson A, Bailis A, Weitzel JN, Neuhausen SL. RAD51C germline mutations in breast and ovarian cancer cases from high-risk families. *PLoS One*. 2011;6(9):e25632.
174. Romero A, Pérez-Segura P, Tosar A, García-Saenz JA, Díaz-Rubio E, Caldés T, et al. A HRM-based screening method detects RAD51C germ-line deleterious mutations in Spanish breast and ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Oct;129(3):939–46.

175. Blanco A, Gutiérrez-Enríquez S, Santamariña M, Montalban G, Bonache S, Balmaña J, et al. RAD51C germline mutations found in Spanish site-specific breast cancer and breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Aug;147(1):133–43.
176. Vuorela M, Pylkäs K, Hartikainen JM, Sundfeldt K, Lindblom A, von Wachenfeldt Wäppling A, et al. Further evidence for the contribution of the RAD51C gene in hereditary breast and ovarian cancer susceptibility. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Dec;130(3):1003–10.
177. Coulet F, Fajac A, Colas C, Eyries M, Dion-Minière A, Rouzier R, et al. Germline RAD51C mutations in ovarian cancer susceptibility. *Clin Genet.* 2013 Apr;83(4):332–6.
178. Cunningham JM, Cicek MS, Larson NB, Davila J, Wang C, Larson MC, et al. Clinical characteristics of ovarian cancer classified by BRCA1, BRCA2, and RAD51C status. *Sci Rep.* 2014;4:4026.
179. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, Lee MK, Pennil CC, Rendi MH, et al. Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2014 Feb 1;20(3):764–75.
180. Schnurbein G, Hauke J, Wappenschmidt B, Weber-Lassalle N, Engert S, Hellebrand H, et al. RAD51C deletion screening identifies a recurrent gross deletion in breast cancer and ovarian cancer families. *Breast Cancer Res BCR.* 2013;15(6):R120.
181. Jøanson L, Ahlborn LB, Steffensen AY, Djursby M, Ejlersen B, Timshel S, et al. Identification of six pathogenic RAD51C mutations via mutational screening of 1228 Danish individuals with increased risk of hereditary breast and/or ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Jan;155(2):215–22.
182. Wong MW, Nordfors C, Mossman D, Pecenetelovska G, Avery-Kiejda KA, Talseth-Palmer B, et al. BRIP1, PALB2, and RAD51C mutation analysis reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jun;127(3):853–9.
183. Kushnir A, Laitman Y, Shimon SP, Berger R, Friedman E. Germline mutations in RAD51C in Jewish high cancer risk families. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Dec;136(3):869–74.
184. Osher DJ, De Leeneer K, Michils G, Hamel N, Tomiak E, Poppe B, et al. Mutation analysis of RAD51D in non-BRCA1/2 ovarian and breast cancer families. *Br J Cancer.* 2012 April;106(8):1460–3.
185. Pelttari LM, Kiiski J, Nurminen R, Kallioniemi A, Schleutker J, Gylfe A, et al. A Finnish founder mutation in RAD51D: analysis in breast, ovarian, prostate, and colorectal cancer. *J Med Genet.* 2012 Jul;49(7):429–32.
186. Song H, Dicks E, Ramus SJ, Tyrer JP, Intermaggio MP, Hayward J, et al. Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2015 Sep 10;33(26):2901–7.

187. Thompson ER, Rowley SM, Sawyer S, kConfab, Eccles DM, Trainer AH, et al. Analysis of RAD51D in ovarian cancer patients and families with a history of ovarian or breast cancer. *PloS One*. 2013;8(1):e54772.
188. Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, Monteiro ANA, Tavtigian SV, Couch FJ, et al. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet*. 2004 Oct;75(4):535–44.
189. Armour J a. L, Barton DE, Cockburn DJ, Taylor GR. The detection of large deletions or duplications in genomic DNA. *Hum Mutat*. 2002 Nov;20(5):325–37.
190. Brownstein Z, Friedman LM, Shahin H, Oron-Karni V, Kol N, Abu Rayyan A, et al. Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in Middle Eastern families. *Genome Biol*. 2011;12(9):R89.
191. Lim BC, Lee S, Shin J-Y, Kim J-I, Hwang H, Kim KJ, et al. Genetic diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing technology: comprehensive mutational search in a single platform. *J Med Genet*. 2011 Nov;48(11):731–6.
192. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 1;108(44):18032–7.
193. Judkins T, Rosenthal E, Arnell C, Burbidge LA, Geary W, Barrus T, et al. Clinical significance of large rearrangements in BRCA1 and BRCA2. *Cancer*. 2012 Nov 1;118(21):5210–6.
194. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):e57.
195. Buffone A, Capalbo C, Ricevuto E, Sidoni T, Ottini L, Falchetti M, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in a cohort of consecutive Italian breast and/or ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Dec;106(2):289–96.
196. 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*. 2006 Aug;52(8):1480–5.
197. Gutiérrez-Enríquez S, de la Hoya M, Martínez-Bouzas C, Sanchez de Abajo A, Ramón y Cajal T, Llorca G, et al. Screening for large rearrangements of the BRCA2 gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 May;103(1):103–7.
198. Romero A, Pérez-Segura P, Tosar A, García-Saenz JA, Díaz-Rubio E, Caldés T, et al. A HRM-based screening method detects RAD51C germ-line deleterious mutations in Spanish breast and ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Oct;129(3):939–46.

199. Gevensleben H, Bossung V, Meindl A, Wappenschmidt B, de Gregorio N, Osorio A, et al. Pathological features of breast and ovarian cancers in RAD51C germline mutation carriers. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2014 Sep;465(3):365–9.
200. Minion LE, Dolinsky JS, Chase DM, Dunlop CL, Chao EC, Monk BJ. Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2. *Gynecol Oncol*. 2015 Apr;137(1):86–92.
201. Janatova M, Soukupova J, Stribrna J, Kleiblova P, Vocka M, Boudova P, et al. Mutation Analysis of the RAD51C and RAD51D Genes in High-Risk Ovarian Cancer Patients and Families from the Czech Republic. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 Jun 9 [cited 2015 Jul 23];10(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4461297/>
202. Adem C, Reynolds C, Soderberg CL, Slezak JM, McDonnell SK, Sebo TJ, et al. Pathologic characteristics of breast parenchyma in patients with hereditary breast carcinoma, including BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer*. 2003 Jan 1;97(1):1–11.
203. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*. 1994 Dec;8(4):399–404.
204. Bergman A, Flodin A, Engwall Y, Arkblad EL, Berg K, Einbeigi Z, et al. A high frequency of germline BRCA1/2 mutations in western Sweden detected with complementary screening techniques. *Fam Cancer*. 2005;4(2):89–96.
205. Eerola H, Heikkilä P, Tamminen A, Aittomäki K, Blomqvist C, Nevanlinna H. Relationship of patients' age to histopathological features of breast tumours in BRCA1 and BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res BCR*. 2005;7(4):R465-469.
206. Gabaldó Barrios X, Sarabia Meseguer MD, Alonso Romero JL, Marín Vera M, Marín Zafra G, Sánchez Henarejos P, et al. Novel BRCA1 deleterious mutation (c.1918C>T) in familial breast and ovarian cancer syndrome who share a common ancestry. *Fam Cancer*. 2014 Sep;13(3):431–5.
207. Durocher F, Tonin P, Shattuck-Eidens D, Skolnick M, Narod SA, Simard J. Mutation analysis of the BRCA1 gene in 23 families with cases of cancer of the breast, ovary, and multiple other sites. *J Med Genet*. 1996 Oct;33(10):814–9.
208. Takahashi H, Behbakht K, McGovern PE, Chiu HC, Couch FJ, Weber BL, et al. Mutation analysis of the BRCA1 gene in ovarian cancers. *Cancer Res*. 1995 Jul 15;55(14):2998–3002.
209. Musolino A, Bella MA, Bortesi B, Michiara M, Naldi N, Zanelli P, et al. BRCA mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer: a population-based study. *Breast Edinb Scotl*. 2007 Jun;16(3):280–92.

210. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):120–2.
211. Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S, et al. Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet*. 1994 Dec;8(4):392–8.
212. Salgado J, Gutiérrez C, Gil C, Robles M, García-Foncillas J. Comparative disease pattern of a patient with a novel BRCA2 truncation and knockout models for BRCA2. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Aug;123(1):291–3.
213. Miramar MD, Calvo MT, Rodriguez A, Antón A, Lorente F, Barrio E, et al. Genetic analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast/ovarian cancer families from Aragon (Spain): two novel truncating mutations and a large genomic deletion in BRCA1. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Nov;112(2):353–8.
214. Lloret G, Muñoz CY, Tuser MP, Guillermo IB, Lluch JRG, Bale AE, et al. Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain. *Hum Mutat*. 2002 Mar;19(3):307.
215. Stegel V, Krajc M, Zgajnar J, Teugels E, De Grève J, Hočevár M, et al. The occurrence of germline BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in Slovenian population. *BMC Med Genet*. 2011;12:9.
216. Marshall M, Solomon S, Lawrence Wickerham D. Case report: de novo BRCA2 gene mutation in a 35-year-old woman with breast cancer. *Clin Genet*. 2009 Nov;76(5):427–30.
217. Lubinski J, Phelan CM, Gadirian P, Lynch HT, Garber J, Weber B, et al. Cancer variation associated with the position of the mutation in the BRCA2 gene. *Fam Cancer*. 2004;3(1):1–10.
218. Farrugia DJ, Agarwal MK, Pankratz VS, Deffenbaugh AM, Pruss D, Frye C, et al. Functional assays for classification of BRCA2 variants of uncertain significance. *Cancer Res*. 2008 May 1;68(9):3523–31.
219. Campos B, Díez O, Odefrey F, Domènech M, Moncoutier V, Martínez-Ferrandis JI, et al. Haplotype analysis of the BRCA2 9254delATCAT recurrent mutation in breast/ovarian cancer families from Spain. *Hum Mutat*. 2003 Apr;21(4):452.
220. Bonatti F, Pepe C, Tancredi M, Lombardi G, Aretini P, Sensi E, et al. RNA-based analysis of BRCA1 and BRCA2 gene alterations. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006 Oct 15;170(2):93–101.
221. Janavičius R, Rudaitis V, Mickys U, Elsakov P, Griškevičius L. Comprehensive BRCA1 and BRCA2 mutational profile in Lithuania. *Cancer Genet*. 2014 May;207(5):195–205.
222. Plaschke J, Commer T, Jacobi C, Schackert HK, Chang-Claude J. BRCA2 germline mutations among early onset breast cancer patients unselected for family history of the disease. *J Med Genet*. 2000 Sep;37(9):E17.

223. Borg A, Haile RW, Malone KE, Capanu M, Diep A, Törngren T, et al. Characterization of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations and variants of unknown clinical significance in unilateral and bilateral breast cancer: the WECARE study. *Hum Mutat.* 2010 Mar;31(3):E1200-1240.
224. Burk-Herrick A, Scally M, Amrine-Madsen H, Stanhope MJ, Springer MS. Natural selection and mammalian BRCA1 sequences: elucidating functionally important sites relevant to breast cancer susceptibility in humans. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc.* 2006 Mar;17(3):257–70.
225. Meyer P, Voigtlaender T, Bartram CR, Klaes R. Twenty-three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families in Southern Germany. *Hum Mutat.* 2003 Sep;22(3):259.
226. Riahi A, Kharrat M, Ghourabi ME, Khomsi F, Gamoudi A, Lariani I, et al. Mutation spectrum and prevalence of BRCA1 and BRCA2 genes in patients with familial and early-onset breast/ovarian cancer from Tunisia. *Clin Genet.* 2015 Feb;87(2):155–60.
227. Judkins T, Hendrickson BC, Deffenbaugh AM, Eliason K, Leclair B, Norton MJ, et al. Application of embryonic lethal or other obvious phenotypes to characterize the clinical significance of genetic variants found in trans with known deleterious mutations. *Cancer Res.* 2005 Nov 1;65(21):10096–103.
228. Simard J, Dumont M, Moisan A-M, Gaborieau V, Malouin H, Durocher F, et al. Evaluation of BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence, risk prediction models and a multistep testing approach in French-Canadian families with high risk of breast and ovarian cancer. *J Med Genet.* 2007 Feb;44(2):107–21.
229. Houdayer C, Caux-Moncoutier V, Krieger S, Barrois M, Bonnet F, Bourdon V, et al. Guidelines for splicing analysis in molecular diagnosis derived from a set of 327 combined in silico/in vitro studies on BRCA1 and BRCA2 variants. *Hum Mutat.* 2012 Aug;33(8):1228–38.
230. Thompson BA, Greenblatt MS, Vallee MP, Herkert JC, Tessereau C, Young EL, et al. Calibration of multiple in silico tools for predicting pathogenicity of mismatch repair gene missense substitutions. *Hum Mutat.* 2013 Jan;34(1):255–65.
231. Vogel KJ, Atchley DP, Erlichman J, Broglio KR, Ready KJ, Valero V, et al. BRCA1 and BRCA2 genetic testing in Hispanic patients: mutation prevalence and evaluation of the BRCAPRO risk assessment model. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2007 Oct 10;25(29):4635–41.
232. Wagner TM, Hirtenlehner K, Shen P, Moeslinger R, Muhr D, Fleischmann E, et al. Global sequence diversity of BRCA2: analysis of 71 breast cancer families and 95 control individuals of worldwide populations. *Hum Mol Genet.* 1999 Mar;8(3):413–23.
233. Balia C, Galli A, Caligo MA. Effect of the overexpression of BRCA2 unclassified missense variants on spontaneous homologous recombination in human cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Oct;129(3):1001–9.

234. Johnson N, Fletcher O, Palles C, Rudd M, Webb E, Sellick G, et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet.* 2007 May 1;16(9):1051–7.
235. Karchin R, Agarwal M, Sali A, Couch F, Beattie MS. Classifying Variants of Undetermined Significance in BRCA2 with protein likelihood ratios. *Cancer Inform.* 2008;6:203–16.