



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Aportación de la Secuenciación Masiva de Nueva Generación en el Diagnóstico del Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario Mediante el Uso de un Panel de Genes**

**D<sup>a</sup> Verónica Castillo Guardiola**

**2019**



UNIVERSIDAD DE MURCIA  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO



TESIS DOCTORAL

**Aportación de la secuenciación masiva de nueva generación en  
el diagnóstico del síndrome de cáncer de mama y ovario  
hereditario mediante el uso de un panel de genes**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

**Verónica Castillo Guardiola**

Bajo la dirección de los Doctores:

M<sup>a</sup> Desamparados Sarabia Meseguer

Francisco Ruiz Espejo

José Luis Alonso Romero





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Desamparados Sarabia Meseguer, Doctora de Universidad del Área de Bioquímica Clínica en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular "B" e Inmunología , AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Aportación de la secuenciación masiva de nueva generación en el diagnóstico del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario mediante el uso de un panel de genes", realizada por D<sup>a</sup>. Verónica Castillo Guardiola, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 29 de mayo de 2019

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long vertical stroke extending downwards.





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

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

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Aportación de la secuenciación masiva de nueva generación en el diagnóstico del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario mediante el uso de un panel de genes", realizada por D<sup>a</sup>. Verónica Castillo Guardiola, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 29 de mayo de 2019

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'F' followed by a vertical line and a small flourish.

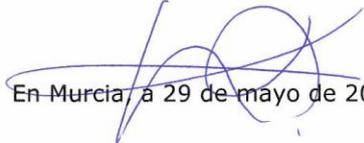




UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

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

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Aportación de la secuenciación masiva de nueva generación en el diagnóstico del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario mediante el uso de un panel de genes", realizada por D<sup>a</sup>. Verónica Castillo Guardiola, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

  
En Murcia, a 29 de mayo de 2019



*Si asumes que no hay esperanza, entonces garantizas que no habrá esperanza. Si asumes que hay un instinto hacia la libertad, que hay oportunidades para cambiar las cosas, entonces hay una posibilidad de que puedas contribuir a hacer un mundo mejor.*

Noam Chomsky



*A mis padres*

*A mi hermana*



## AGRADECIMIENTOS

Desde que me embarqué en esta aventura intuí que no iba a ser fácil escribir estas líneas, pero después de todo el camino recorrido puedo afirmarlo.

Voy a intentar ser justa.

En primer lugar, a mis Directores: Amparo Sarabia, Paco Ruiz y José Luis Alonso, por brindarme la oportunidad de aprender de vosotros y e impulsarme a desarrollar este proyecto.

Gracias por ser un ejemplo de trabajo y dedicación.

A todo el personal del Laboratorio de Genómica, por hacerme sentir en familia y tener siempre unas palabras de apoyo cuando más lo necesitaba.

A las Unidades de Consejo Genético del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y del Hospital General Universitario Morales Meseguer, por sus aportaciones y colaboración.

A todos los miembros del Servicio de Análisis Clínicos. Gracias por todo lo que he aprendido de vosotros durante los años de residencia. En especial a Teresa, por su apoyo y cariño en los momentos más complicados; y a Pepe, por su apoyo como jefe para que dedicara todo el tiempo necesario para terminar esta tesis.

A la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio, por concederme la beca post-residencia que me ha permitido finalizar este doctorado.

A Ana Isabel, mi residente mayor y guía en el mundo de la Genómica. Gracias por ser un espejo en el que mirarme cuando todo era desconocido para mí. Gracias por tu amistad y por tantos buenos momentos musicales compartidos.

A Laura Rosado, por haber sacado tiempo para ayudarme a concluir este trabajo, siempre con una sonrisa y la mejor disposición.

A mis compañeros de residencia, porque aprender con vosotros ha sido un lujo. Gracias por la empatía con la que me habéis tratado estos últimos meses.

A mis compañeros del Servicio de Docencia y Formación, por sus ánimos en estos cortos pero  
intensos meses de trabajo.

A mi gente de Granada: farmacéuticos, bioquímicos y amigos. Cualquiera que me conoce sabe  
que Granada fue un antes y un después y que me nunca me he ido del todo. Gracias porque  
cuando estoy con vosotros me doy cuenta de lo que es realmente importante. Me siento muy  
afortunada de que sigáis formando parte de mi vida y de ser testigo de la evolución de las  
vuestras.

A Felipe, porque tu entrega a todo lo que haces, tu pasión por el conocimiento y tu capacidad  
de encontrar el lado positivo de cada situación son cualidades tan inusuales como necesarias.

A mis amigas de Murcia, compañeras de guardias, viajes y conversaciones interminables. No  
imagino estos últimos años sin vosotras. Ojalá que en el camino de la vida nos mantengamos  
siempre unidas de alguna manera.

A mis amigos de Jumilla, por hacerme sentir siempre capaz de todo y tener siempre una  
palabra de ánimo. Y en especial a Eva, por hacer que esta tesis quede tan bonita.

A mi familia, por ser el pilar fundamental en el que sostenerme a lo largo de mi vida. A mi  
madre, por su amor y escucha constantes. A mi padre, por enseñarme que el éxito está en  
disfrutar de lo cotidiano y lo sencillo. A mi hermana Beatriz, por actuar con dignidad y  
honradez en cada aspecto de tu vida y por aportar cordura en los momentos más inciertos.  
Gracias a los tres por compartir conmigo lo mejor y peor de este proyecto, por animarme y  
ayudarme a desconectar cuando era necesario.

En general, a todos los que habéis sumado en este proyecto de una manera u otra.

No sé si lo hubiera logrado sin vosotros.

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



# **Índice**



Abreviaturas .....	I
Lista de figuras .....	V
Lista de Tablas .....	IX
<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1. EPIDEMIOLOGÍA.....	3
2. FACTORES DE RIESGO .....	3
3. SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIOS .....	4
3.1 Contexto y evolución del análisis genético en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario .....	5
3.2 Criterio de selección para el estudio genético .....	5
4. TIPOS DE ERRORES EN EL ADN Y MECANISMOS DE REPARACIÓN.....	6
4.1 Daños en una hebra de ADN.....	7
4.2 Daños en ambas hebras de ADN .....	9
5. PRINCIPALES GENES RELACIONADOS CON EL SCMOH .....	10
5.1 Genes de la anemia de Fanconi.....	12
5.1.1 <i>BRCA1</i> .....	13
5.1.2 <i>BRCA2</i> .....	15
5.1.3 <i>PALB2</i> .....	16
5.1.4 <i>BRIP1</i> .....	18
5.1.5 <i>RAD51C</i> y <i>RAD51D</i> .....	19
5.2 Otros genes de susceptibilidad relacionados con el SCMOH .....	21
5.2.1 <i>ATM</i> .....	21
5.2.2 <i>CHEK2</i> .....	23
5.2.3 <i>TP53</i> .....	23
6. CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE VARIANTES.....	24
7. VARIANTES CON EFECTO FUNDADOR.....	27
8. HERRAMIENTAS DISPONIBLES PARA LA CLASIFICACIÓN DE VARIANTES	28
8.1 Bases de datos.....	29
8.2 Programas predictivos o estudios <i>in silico</i> .....	30

8.3 Evaluación de la frecuencia de la variante en población control .....	31
8.4 Estudios funcionales .....	32
8.5 Co-ocurrencia en cis/trans.....	32
8.6 Estudio de co-segregación .....	33
9. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO .....	34
9.1 Pronóstico y tratamiento.....	35
9.2 Medidas de prevención .....	37
9.2.1 Detección precoz.....	37
9.2.2 Cirugía reductora de riesgo .....	37
<b>II. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>39</b>
1. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	41
2. OBJETIVOS .....	42
<b>III. Metodología.....</b>	<b>45</b>
1. PACIENTES EN ESTUDIO .....	47
1.1 Selección y clasificación de los pacientes .....	47
1.2 Características clínicas e inmunohistoquímicas de los pacientes .....	49
1.2.1 Información detallada de la historia oncológica del caso índice: .....	49
1.2.2 Información del tipo de cáncer de la historia familiar en los familiares: ...	49
2. ANÁLISIS GENÉTICO .....	50
2.1 Selección de la región a amplificar .....	50
2.2 Amplificación y purificación de ADN genómico .....	51
2.2.1 Diseño de cebadores o <i>primers</i> .....	51
2.2.2 Amplificación de los exones .....	52
3. SIMBOLOGÍA DE LOS ÁRBOLES GENEALÓGICOS.....	58
4. SECUENCIAS DE REFERENCIA UTILIZADAS.....	59
5. CATEGORIZACIÓN DE VARIANTES .....	60
5.1 Análisis molecular .....	60
5.2 Análisis clínico.....	62
5.2.1 Alamut® Visual 2.11 .....	68

5.2.2 <i>Varsome</i> .....	73
5.2.3 Otras herramientas de predicción utilizadas .....	76
5.3 Priorización de las variantes de significado clínico desconocido halladas .....	76
6. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES .....	78
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	84
<b>IV. Resultados</b> .....	<b>85</b>
1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	87
2. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO .....	88
3. EVALUACIÓN DE LOS CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	89
4. TIPOS DE VARIANTES DETECTADAS.....	90
4.1 Variantes clínicamente relevantes.....	91
4.1.1 Variantes patogénicas halladas en el gen <i>ATM</i> .....	94
4.1.2 Variantes patogénicas halladas en el gen <i>BRIP1</i> .....	105
4.1.3 Variantes patogénicas halladas en el gen <i>CHEK2</i> .....	110
4.1.4 Variantes patogénicas halladas en el gen <i>TP53</i> .....	115
4.1.5 Variantes patogénicas halladas en el gen <i>XRCC2</i> .....	117
4.1.6 Variantes patogénicas halladas en el gen <i>MUTYH</i> .....	118
4.2 Variantes con significado clínico desconocido.....	119
4.2.1 VUS priorizadas en genes con riesgo elevado de CM.....	129
4.2.2 VUS priorizadas en genes con incremento de riesgo de cáncer ginecológico .....	135
4.2.3 VUS priorizadas en genes de otros síndromes de cáncer hereditario... 137	
5. ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR Y CÁLCULO DE GENERACIONES DE LA VARIANTE PATOGENICA c.8251_8254del EN <i>ATM</i> . .....	147
<b>V. Discusión</b> .....	<b>151</b>
1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	153
2. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO .....	154
3. EVALUACIÓN DE LOS CRITERIOS.....	158
4. ESPECTRO MUTACIONAL Y FRECUENCIA MUTACIONAL EN NUESTRA POBLACIÓN .....	161

4.1 Variantes patogénicas halladas en <i>ATM</i> .....	162
4.1.1 Efecto fundador de la variante c.8251_8254del.....	165
4.2 Variantes patogénicas halladas en <i>BRIP1</i> .....	166
4.3 Variantes patogénicas halladas en <i>CHEK2</i> .....	168
4.4 Variante patogénica hallada en <i>TP53</i> : 2 mutaciones en la misma familia ...	169
4.5 Variante patogénica hallada en <i>XRCC2</i> .....	170
4.6 Variantes halladas en heterocigosis en <i>MUTYH</i> .....	171
5. ESTUDIO DE CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO.....	172
6. VARIANTES CON SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO .....	173
<b>VI. Conclusiones</b> .....	179
<b>VII. Anexos</b> .....	183
<b>VIII. Bibliografía</b> .....	191

## Abreviaturas

ACGS	Asociación de Ciencias de Genética Clínica
ACMG	Colegio Americano de Genética Médica y Genómica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>Align-GVGD</i>	<i>Align Grantham Variation Grantham Derivation</i>
AMP	Asociación de Patología Molecular
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BER	Reparación por escisión de bases
CCR	Cáncer colorrectal
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CGI	Cáncer gastrointestinal
CI	Caso índice
CM	Cáncer de mama
CMb	Cáncer de mama bilateral
CMV	Cáncer de mama en el varón
CO	Cáncer de ovario
COb	Cáncer de ovario bilateral
CPan	Cáncer de páncreas
CyC	Cáncer de cabeza y cuello
ER	Receptores de estrógenos
dNTPs	Dinucleótidos trifosfato
DSBs	<i>Double strand breaks</i> (roturas de doble hebra)

GWAS	<i>Genome-wide associations scans</i> (Estudios de asociación del genoma completo)
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i> (Base de datos de Mutaciones Génicas Humanas)
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i> (Sociedad de la Variación del Genoma Humano)
LDG	Laboratorio de Genómica
LNH	Linfoma no Hodgkin
LOVD	<i>Leiden Open Variation Database</i>
MAF	Frecuencia menor alélica
MMR	<i>Mismatch repair</i> (reparación del desajuste)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para la Información en Biotecnología)
NCCN	National Comprehensive Cancer Network (Red Nacional Integral de Cáncer)
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NGS	<i>Next generation sequencing</i> (secuenciación de nueva generación)
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i> (Unión de los extremos no homólogos)
NMD	<i>Non-sense mediated decay</i>
<i>NNSplice</i>	<i>Splice Site Prediction By Neuronal Network</i>
PARP-1	PoliADP-ribosa polimerasa 1
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RR	Riesgo relativo
SCMOH	Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i> (clasificación intolerante de tolerante)
SSBs	<i>Single-strand breaks</i> (daños en una hebra)
SSF	<i>Splice site finder</i>
PolyPhen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo)
PR	Receptores de progesterona
Tm	Temperatura de anillamiento
UTR	<i>Untranslated región</i> (Región no traducida)
VUS	Variante con significado clínico desconocido



## Lista de figuras

**Figura 1:** Tipos de errores en el ADN, sus principales vías de reparación y las enzimas implicadas.

**Figura 2:** Papel de la proteína PARP-1 en la reparación del ADN, reclutando el complejo para la reparación por VER.

**Figura 3:** Proteínas implicadas en el SCMOH y su papel dentro del proceso de recombinación homóloga.

**Figura 4:** Se representa la prevalencia de variante patogénicas en distintos genes

**Figura 5:** Esquema de los dominios funcionales de BRCA1 y de las proteínas que interaccionan con él.

**Figura 6:** Esquema de los dominios funcionales de BRCA2 y de las proteínas que interaccionan con él.

**Figura 7:** Representación esquemática de los dominios de PALB2 y Modelo de la acción colaborativa entre colaborativo entre BRCA1, BRCA2 y PALB2.

**Figura 8:** Esquema de los dominios que forman la proteína BRIP1 y de su función

**Figura 9:** Modelo de acción colaborativa de RAD51 y BRCA2 en la recombinación homóloga.

**Figura 10:** Representación esquemática de los dominios de la proteína ATM

**Figura 11:** Secuencia de reparación tras la detección del daño de ADN de doble cadena

**Figura 12:** Dominios funcionales de la proteína CHEK2

**Figura 13:** Esquema de los principales dominios de TP53

**Figura 14:** Resumen de los distintos cambios moleculares que pueden alterar el ADN

**Figura 15:** Esquema que representa un pre-ARNm de dos exones y un intrón con diferentes secuencias relevantes para el proceso de splicing

**Figura 16:** Esquema que representa la configuración trans/cis en de una determinada variante

**Figura 17:** Esquema del mecanismo de letalidad sintética de PARP-1

**Figura 18:** Programa utilizado en la PCR de amplificación

**Figura 19:** Purificación enzimática de la reacción de PCR con el reactivo ExoSap-IT

**Figura 20:** Proceso de secuenciación

**Figura 21:** Programa utilizado en la reacción de secuenciación

**Figura 22:** Imagen de un patrón electroforético

**Figura 23:** Simbología empleada en la configuración de árboles genealógicos

**Figura 24:** Interfaz del software Sophia DDM

**Figura 25:** Gráfica de los grados de conservación Align-GVGD en función de las variables GD y GV

**Figura 26:** Algoritmo utilizado para clasificar las variantes con significado clínico desconocido como VUS priorizadas o VUS no priorizadas

**Figura 27:** Localización de los STR empleados en este estudio con respecto al gen ATM

**Figura 28:** Programa utilizado en la reacción de amplificación de microsatélites.

**Figura 29:** Patrón de picos obtenido en el análisis de microsatélites

**Figura 30:** Distribución de los CI en función del tipo de cáncer diagnosticado

**Figura 31:** Tasa de detección de los criterios de selección utilizados

**Figura 32:** Distribución de las variantes halladas según su clasificación molecular y clínica

**Figura 33:** Distribución por genes de las variantes patogénicas encontradas en el estudio

**Figura 34:** Localización a nivel proteico de las variantes patogénicas y probablemente patogénicas halladas en *ATM*

**Figura 35:** Árbol familiar de la familia en la que se halló la variante 5644C>T en *ATM*

**Figura 36:** Árbol familiar de la familia en la que se halló la variante c.7708G>T en *ATM*

**Figura 37:** Árbol familiar de las familias en las que se halló la variante c.8251\_8254del en *ATM*

**Figura 38:** Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.8264\_8268del en *ATM*

**Figura 39:** Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.8977C>T en *ATM*

**Figura 40:** Localización a nivel proteico de las variantes patogénicas y probablemente patogénicas halladas en *BRIP1*

**Figura 41:** Árbol familiar de las familia en la que se halló la variante c.886G>T en *BRIP1*

**Figura 42:** Árbol familiar de la familia en la que se halló la variante c.903del en *BRIP1*

**Figura 43:** Localización a nivel de proteína de las variantes patogénicas halladas en *CHEK2*

**Figura 44:** Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.349A>G en *CHEK2*

**Figura 45:** Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.470T>C en *CHEK2*

**Figura 46:** Localización a nivel de proteína de las variantes patogénicas halladas en *TP53*

**Figura 47:** Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.334\_364dup en *TP53*

**Figura 48:** Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.677dup en *XRCC2*

**Figura 49:** Distribución por genes de las VUS halladas en el estudio

**Figura 50:** Distribución de las variantes halladas según su significado clínico

**Figura 51:** Distribución de las variantes halladas en genes asociados a un incremento de riesgo de CM y cáncer ginecológico

**Figura 52:** Número de familias portadoras de VUS y VUS priorizadas con respecto al total de familias estudiadas

**Figura 53:** Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.3402+A>C en *ATM*

**Figura 54:** Árboles genealógicos de las familias en las que se halló la variante c.8251\_8254del en *ATM* y los haplotipos obtenidos tras el análisis de microsatélites

**Figura 55:** Localización de los STR empleados en este estudio con respecto al gen *ATM*. Se remarcan los microsatélites utilizados en el cálculo de las generaciones

**Figura 56:** Diagrama de barras en el que se representa la tasa de detección desglosada por criterio

**Figura 57:** Distribución geográfica de los haplotipos encontrados en los portadores de la variante 8251\_8254del

**Figura 58:** Fenotipo de los portadores de variantes patogénicas, distribuidas por genes

## Lista de Tablas

**Tabla 1:** Propuesta de clasificación de las variantes y su correlación con la recomendación clínica

**Tabla 2:** Criterios establecidos por la SEOM para realizar el estudio genético de *BRCA1* y *BRCA2*

**Tabla 3:** Secuencia de los *primers* utilizados en la PCR de amplificación

**Tabla 4:** PCR de amplificación para un volumen total de 25  $\mu$ l

**Tabla 5:** Reacción de secuenciación

**Tabla 6:** Secuencias de referencia utilizada para cada gen

**Tabla 7:** Criterios para clasificar variantes patogénicas

**Tabla 8:** Criterios para clasificar variantes benignas

**Tabla 9:** Reglas de combinación de criterios para clasificar variantes

**Tabla 10:** Secuencias de los cebadores y tamaño de los alelos de los marcadores polimórficos de ATM utilizados para construir los haplotipos

**Tabla 11:** PCR de amplificación utilizada en el análisis de microsatélites

**Tabla 12:** Características clínicas de los casos de cáncer de mama y ovario diagnosticados en los casos índice del estudio

**Tabla 13:** Distribución de los CI con variantes patogénicas entre los grupos que cumplen y no los criterios establecidos en el laboratorio

**Tabla 14:** Variantes patogénicas halladas en el estudio con las características de la familia y de los tumores

**Tabla 15:** Variantes patogénicas halladas en *MUTYH*

**Tabla 16:** Variantes con significado clínico desconocido halladas, junto con las características fenotípicas de los casos índice portadores y las principales fuentes bibliográficas consultadas

**Tabla 17:** Variantes con significado clínico desconocido halladas, con el resumen de los resultados de los estudios *in silico* realizados, así como los criterios utilizados en su clasificación

**Tabla 18:** Comparación entre la frecuencia mutacional obtenida en el presente estudio y otros realizados en población europea

**Tabla 19:** Comparación entre la frecuencia mutacional obtenida en el presente estudio y otros realizados en población extraeuropea. o a nivel mundial

**Tabla 20:** Variantes con significado clínico incierto halladas tanto en el presente estudio como en el realizado previamente en población española por Bonache y colaboradores

# **I. Introducción**



## **1. EPIDEMIOLOGÍA**

El cáncer de mama (CM) es el más común , así como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres [1]. El CM femenino comprende un 25% de todos los casos diagnosticados en todo el mundo y un 11.6% si se tienen en cuenta ambos sexos [2]. En España la tasa de incidencia estimada en 2015 fue de 88 casos por cada 100000 habitantes, siendo el cuarto tipo de cáncer más común tras el colorrectal, próstata y pulmón [3]. Los datos de Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) indican que en 2017 se diagnosticaron aproximadamente 26000 nuevos casos de CM en España y, en 2016, 6477 muertes fueron debidas a esta causa [4]. La mortalidad por CM en España es el 18% de la mortalidad por cáncer [5]. Por otro lado, su incidencia es marcadamente mayor en países desarrollados que en aquéllos en vías de desarrollo. Esta variación internacional en la incidencia refleja las diferencias en los medios disponibles para llevar a cabo una detección precoz así como en los factores de riesgo [2]. El cáncer de mama puede tener una presentación muy variada con una amplia diversidad en sus características morfológicas, consecuencias clínicas, subtipos y prevalencia [6].

El cáncer de ovario (CO) es el séptimo cáncer más diagnosticado y la octava causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo, suponiendo un 3.6% de los casos de cáncer y un 4.3% de las muertes [7]. El riesgo de padecer CO, cáncer de trompa de Falopio o primario peritoneal es del 1.5% en la población general. El subtipo patológico predominante es el epitelial, seguido del estromal y del germinal [8]. A pesar de los avances en su tratamiento quirúrgico y farmacológico, sigue siendo el cáncer ginecológico más letal, debido principalmente a la ausencia de un método de cribado para su detección precoz. Esto conlleva que la mayoría de los pacientes sean diagnosticados en fases avanzadas de la enfermedad [9, 10]. Además, presenta una elevada resistencia a los fármacos citostáticos usados comúnmente [11].

## **2. FACTORES DE RIESGO**

En el desarrollo del CM se han identificado múltiples factores de riesgo de tipo ambiental, hormonal y genético. Dentro de los de tipo hormonal y reproductivo se incluyen una larga historia menstrual, el uso reciente de anticonceptivos o la nuliparidad. Sin embargo, la lactancia materna y la actividad

física se han asociado a una reducción de riesgo de CM [2]. Hay otros factores que son potencialmente modificables como el sobrepeso y la obesidad, el tratamiento con terapia hormonal sustitutiva, la inactividad física o el consumo de alcohol [2]. También se considera un factor de riesgo el número de familiares de primer grado con CM y la edad temprana de diagnóstico de éstos [12].

Tanto en CM y CO existe una susceptibilidad genética que se manifiesta por mutaciones en genes de alta y moderada penetrancia. La historia previa de cáncer es un factor de riesgo, ya que se ha descrito un elevado riesgo de CO en mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* previamente diagnosticadas de cáncer de mama [13]. Además, en CO, varios estudios epidemiológicos sugieren que diversos factores hormonales y reproductivos (paridad, lactancia materna, tratamiento anticonceptivo, etc.), así como ambientales y de estilo de vida (exposición al humo del tabaco y consumo de alcohol, entre otros) están implicados en su patogénesis como modificadores de riesgo [14–17].

### 3. SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIOS

El CM es el tipo de cáncer que se diagnostica con más frecuencia y el que presenta una mayor mortalidad en mujeres tanto en países desarrollados como en aquéllos en vías de desarrollo [2]. Aunque la mayoría de los casos de CM son esporádicos, se estima que el 5-10% de todos los casos de CM en mujeres están vinculados a una susceptibilidad hereditaria debida a mutaciones en genes autosómicos dominantes. Los principales genes relacionados con dicho síndrome son *BRCA1* y *BRCA2* (*breast-cancer-susceptibility genes*), aunque se han descrito otros genes que, aunque tengan una implicación menor, también están relacionados con un aumento de riesgo de cáncer de mama y ovario. De hecho, el CM es un componente de muchos síndromes de cáncer hereditario como el síndrome de Li-Fraumeni (causado por mutaciones germinales en *TP53*), el síndrome de Cowden (causado por mutaciones germinales en *PTEN*) o el síndrome de Peutz-Jeghers (causado por mutaciones germinales en *STK11*), siendo el más común el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH).

### 3.1 Contexto y evolución del análisis genético en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario

La comprensión de la etiología genética del cáncer de mama dio paso a la identificación en los años 90 de dos genes relacionados con la susceptibilidad al cáncer de mama: *BRCA1* y *BRCA2* [18, 19]. Estos genes de elevada prevalencia se caracterizan por tener un patrón de herencia autosómica dominante en cuanto a la predisposición al cáncer, de tal manera que aquellos individuos portadores de una mutación en línea germinal poseen una mayor predisposición a padecer cáncer a nivel somático. En este tipo de herencia hay que tener en cuenta que aunque la penetrancia es elevada, no es completa [20].

Desde entonces, se ha ido mejorando el conocimiento en la etiología y fisiopatología del cáncer hereditario, descubriéndose nuevos genes que también están asociados a un riesgo incrementado de padecer CM y/o CO. Por otro lado, el desarrollo de nuevas tecnologías de análisis genético como la secuenciación de nueva generación (NGS, *next generation sequencing*) ha permitido que se abarate el coste de los análisis genéticos. Todo esto ha conllevado la aparición de paneles de genes, lo cuales hacen posible que se puedan estudiar diferentes genes en un mismo análisis. Sin embargo, la aplicación de estos paneles en el ámbito clínico del SCMOH está suponiendo un reto para los profesionales del laboratorio y los clínicos, ya que se están encontrando muchas variantes en diversos genes, previamente no descritas, de las que se desconoce su implicación clínica.

### 3.2 Criterio de selección para el estudio genético

Las técnicas de diagnóstico genético aplicadas en el campo del SCMOH se centran en el análisis de mutaciones en línea germinal de los genes responsables. Dichas mutaciones están presentes en todas las células del organismo, incluidos los gametos, por lo que podrán ser transmitidos en sucesivas generaciones. En base a esto, se distinguen dos tipos de análisis genético según su finalidad:

- Diagnósticos: estos se realizan en pacientes afectados de cáncer en los que se tiene sospecha de que esta patología sea de origen hereditario. Al

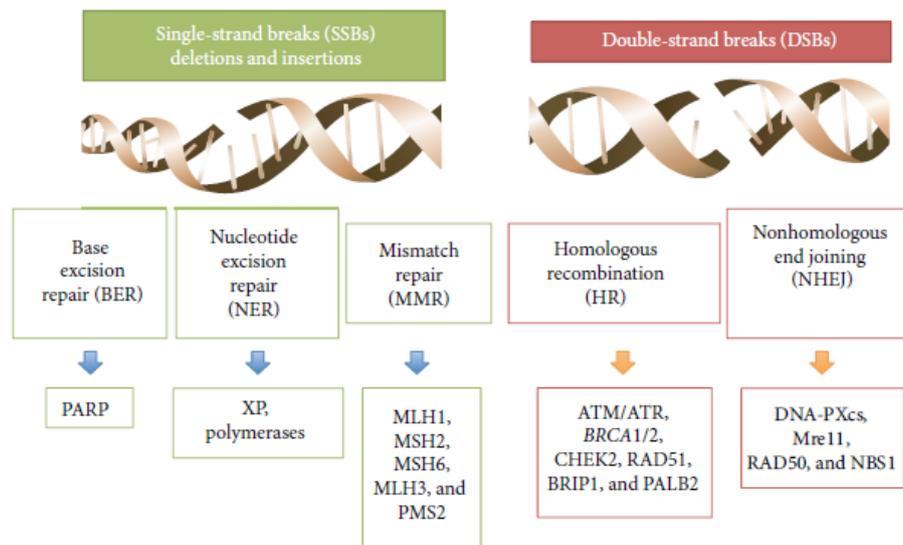
paciente seleccionado para este estudio se le denomina caso índice (CI) y se le realiza un estudio pormenorizado de aquellos genes que pueden estar implicados (al menos *BRCA1* y *BRCA2*).

- Predictivos de riesgo: estos se llevan a cabo en personas sanas familiares de un CI en el que se ha encontrado una variante que explica la enfermedad. Mediante este análisis se pretende conocer si dicho familiar ha heredado la mutación asociada a un mayor riesgo de padecer cáncer. En este caso se analizará únicamente la variante genética hallada en el CI.

La SEOM recomienda que en ambos casos se realice un correcto asesoramiento genético pre y post-análisis. Este consejo genético previo al análisis garantiza que el paciente sea informado de los beneficios y limitaciones del análisis genético. Por su parte, el consejo post-análisis permite informar sobre el riesgo de desarrollar cáncer, así como dar recomendaciones de prevención y diagnóstico precoz, o informar sobre las opciones reproductivas.

#### 4. TIPOS DE ERRORES EN EL ADN Y MECANISMOS DE REPARACIÓN

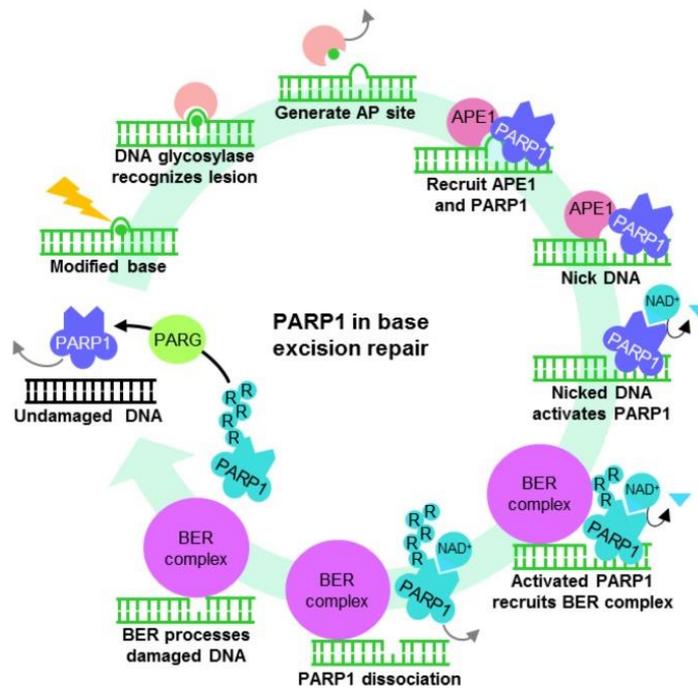
Los daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN) se pueden dividir en dos grandes grupos: daños en una única hebra de ADN (*single-strand breaks* o SSBs) y daños en ambas hebras del ADN (*double-strand breaks* o DSBs). Para cada tipo de daño existen mecanismos de reparación específicos (**Figura 1**):



**Figura 1.** Tipos de errores en el ADN, sus principales vías de reparación y las enzimas implicadas [21]

#### 4.1 Daños en una hebra de ADN

- Reparación por escisión de bases (*base-excision repair* o BER): es el mecanismo de reparación de roturas de una hebra del ADN y modificaciones de bases sin alteración de la hélice. En este proceso es fundamental la proteína PARP-1 o poliADP-ribosa polimerasa. Ésta sirve como sensor de las roturas de la cadena de ADN e inicia la cascada (**Figura 2**). Al inhibirse la actividad de PARP-1 se produce una acumulación de errores sin reparar. Esto permitió desarrollar el concepto de letalidad sintética y, por tanto, desarrollar fármacos inhibidores de PARP-1, como Olaparib, que aumentan la supervivencia libre de progresión en tumores de ovario mutados en *BRCA1* o *BRCA2* [21, 22].



**Figura 2.** Papel de la proteína PARP-1 en la reparación del ADN, reclutando el complejo para la reparación por BER.[23]. PARP-1: poliADP-ribose polimerasa, BER: reparación por excisión de bases, PARG: poliADP-ribose glicohidrasa, APE1: endonucleasaapurínica/apirimidínica 1.

- Reparación por escisión de nucleóticos (*nucleotide-excision repair* o NER): mediante este mecanismo se reparan lesiones distorsionadoras de la hélice, las cuales se producen por radiación ultravioleta y quimioterapia derivada del platino [22].
- Reparación del desajuste (*mismatch repair* o MMR): se reconocen inserciones, deleciones e incorporaciones erróneas de bases. Los genes implicados en este proceso son *MLH1* (*mutL homolog 1*), *MSH2* (*mutS homolog 2*), *MSH6* (*mutS homolog 6*), *MLH3* (*mutL homolog 6*) y *PMS2* (*PMS1 homolog 2*). Mutaciones en estos son responsables del síndrome de Lynch, un síndrome de cáncer hereditario que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal principalmente, pero también de endometrio, ovario y estómago entre otros. El fallo de este mecanismo de reparación conlleva la acumulación de secuencias repetidas de

nucleótidos que fenotípicamente se expresan como inestabilidad de microsatélites [21].

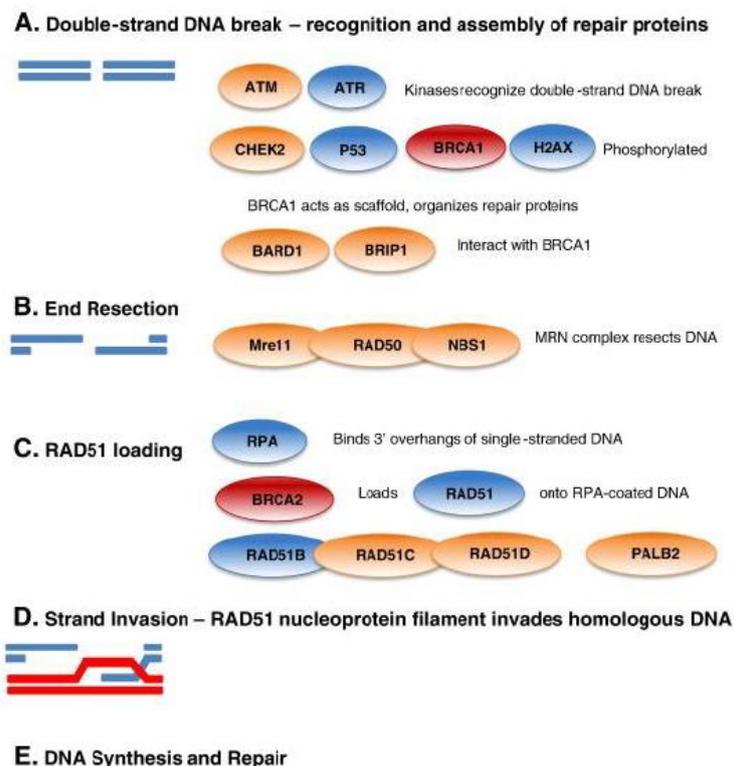
#### 4.2 Daños en ambas hebras de ADN

- Recombinación homóloga: es un tipo de recombinación genética durante la cual las secuencias de nucleótidos son intercambiadas entre dos cromátidas hermanas de ADN. Es un proceso fundamental para la conservación de los organismos, pues mantiene la integridad genómica mediante la reparación de las rupturas de la doble hebra de ADN (DSBs). Estos daños son generados durante la replicación del ADN (fase S del ciclo celular) y preferentemente reparados mediante recombinación con la cromátida hermana. Muchas proteínas relacionadas con el SCMOH están implicadas en este mecanismo de reparación como ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), CHEK2 (*checkpoint kinase 2*) y las proteínas de la anemia de Fanconi: BRCA1, BRCA2, PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*), BRIP1 (*BRCA1-interacting protein 1*), RAD51C (*RAD51 paralog C*) y RAD51D (*RAD51 paralog D*) [21, 22, 24].

En la **Figura 3** se puede observar la función de las proteínas relacionadas con el SCMOH y su implicación en el proceso de recombinación homóloga, la cual ocurre mediante los siguientes pasos:

- A. Cuando se produce una rotura de la doble cadena de ADN, se produce el reconocimiento de este sitio y la unión de proteínas reparadoras. Las kinasas ATM y ATR reconocen esta rotura y fosforilan a otras proteínas implicadas en el proceso de reparación: CHEK2, P53, BRCA1 y H2AX. BRCA1 mantiene ensambladas y organizadas a estas proteínas. A continuación, las proteínas BARD1 y BRIP1 interaccionan con BRCA1.
- B. Eliminación de los extremos 3' por acción del complejo MNR (formado por Mre11, RAD50 y NBS1)
- C. Transporte de RAD51. La proteína RPA se une a los extremos 3' de las monohebras de ADN. BRCA2 es reclutado con la ayuda de PALB2 y transporta a RAD51 al ADN cubierto por RPA con la ayuda de RAD51B, RAD51C y RAD51D.

- D. Invasión de la hebra homóloga de ADN por la proteína RAD51.  
 E. Síntesis y reparación del ADN. La cadena de ADN constituye un molde para una reparación de ADN de alta fidelidad y libre de error.



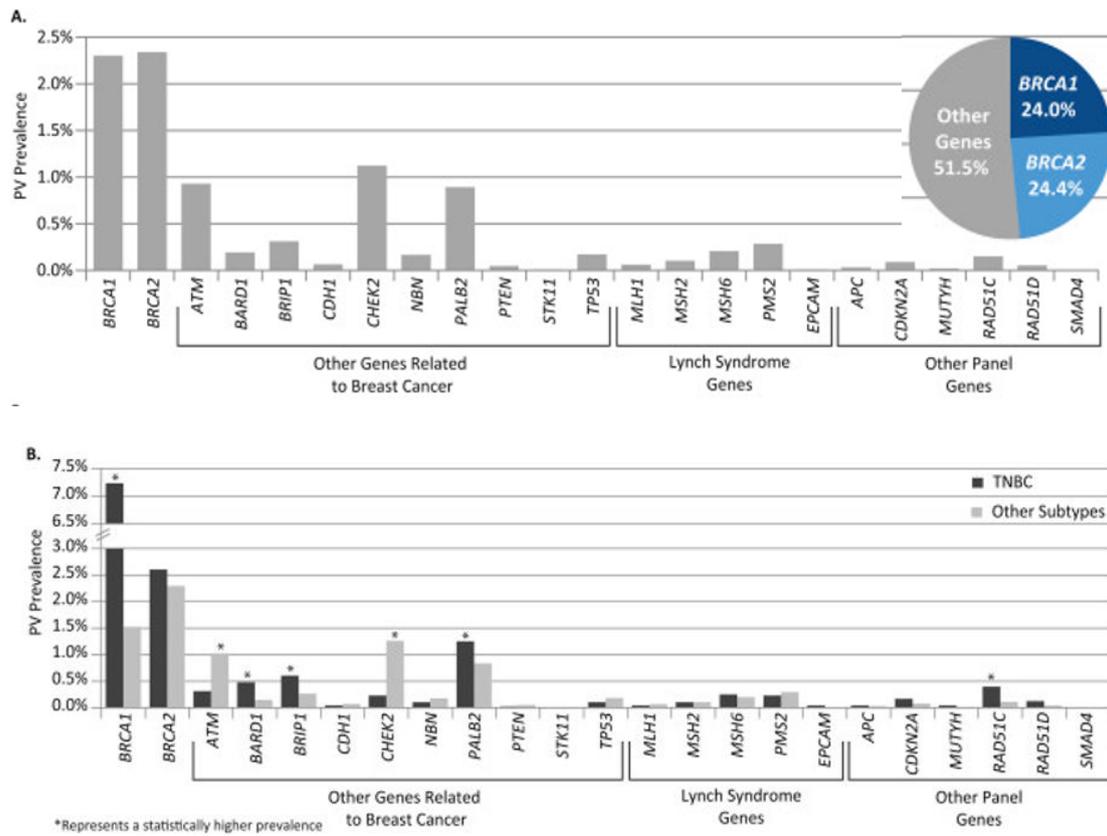
**Figura 3.** Proteínas implicadas en el SCMOH y su papel dentro del proceso de recombinación homóloga. Las proteínas implicadas en SCMOH aparecen en rojo, mientras que en naranja se remarcan otros genes que se han relacionado más recientemente con este síndrome [24].

- Unión de los extremos no homólogos (*non-homologous end joining* o NHEJ): es un método menos preciso que el anterior y más propenso a errores, pero tiene un papel crucial en la minimización de daño en el ADN en las fases G0 y G1 del ciclo celular, cuando no hay una hebra molde intacta para poder llevar a cabo una reparación homóloga [21, 22].

## 5. PRINCIPALES GENES RELACIONADOS CON EL SCMOH

Mutaciones en los dos principales genes de susceptibilidad *BRCA1* y *BRCA2*, junto con aquellas en otros genes de alta penetrancia como *TP53* y *PTEN*, son responsables del 20% de los casos de cáncer de mama familiar [25]. Para el 80% restante, los factores genéticos son más desconocidos y es

probable que se deban a mutaciones en genes de baja y moderada penetrancia que actúen junto a otros factores ambientales o hereditarios. Aunque no se descarta la posibilidad de identificar un nuevo alelo de alta penetrancia, en la actualidad se sugiere la participación de múltiples genes de susceptibilidad, pero cada uno de ellos asociado a riesgos menores. De hecho, se estima que más de la mitad de los individuos que cumplen los criterios de SCMOH de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) y que son portadores de una variante patogénica causante del síndrome, dicha variante está en un gen distinto a *BRCA1* y *BRCA2*. Estos genes son de baja y moderada penetrancia y, entre otros, se incluyen los siguientes: *CHEK2*, *BRIP1*, *ATM* y *PALB2* [26] (**Figura 4**). La mayoría de estos genes son esenciales para la estabilidad genómica celular y están relacionados con la reparación de daño en el ADN mediante recombinación homóloga. Estos genes también están asociados a susceptibilidad a otros tipos de cáncer como ovario, páncreas o colorrectal [6, 25–28]. En total, todos estos grupos de genes comprenden alrededor de un 30% del riesgo familiar de CM. Por lo tanto, sigue sin conocerse la causa de la mayoría de las agrupaciones familiares, que puede ser debida a un gran número de variantes, cada una de ellas asociada a un efecto moderado en el riesgo de CM.



**Figura 4:** Se representa la prevalencia de variante patogénicas en distintos genes en (A) todos los individuos con CM y (B) aquéllos con un estatus triple negativo (TNBC) [26].

Hasta hace unos años sólo se planteaba el estudio de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, el desarrollo de los paneles de genes ha supuesto una verdadera revolución y, en consecuencia, la práctica clínica en el campo del SCMOH ha cambiado. De hecho, actualmente la SEOM recomienda, en el caso de que se realice un análisis genético mediante paneles de genes, incluir en análisis genes como *TP53*, *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D* [29]. En cuanto a otros genes, se planteará su estudio en función de la historia familiar. A continuación se resumen las principales características de los principales genes de interés y su relación con el SCMOH.

### 5.1 Genes de la anemia de Fanconi

Las proteínas de la anemia de Fanconi participan en la reparación de lesiones especialmente perjudiciales como los entrecruzamientos intercatenarios, así como en el mantenimiento de la estabilidad genómica durante la replicación del

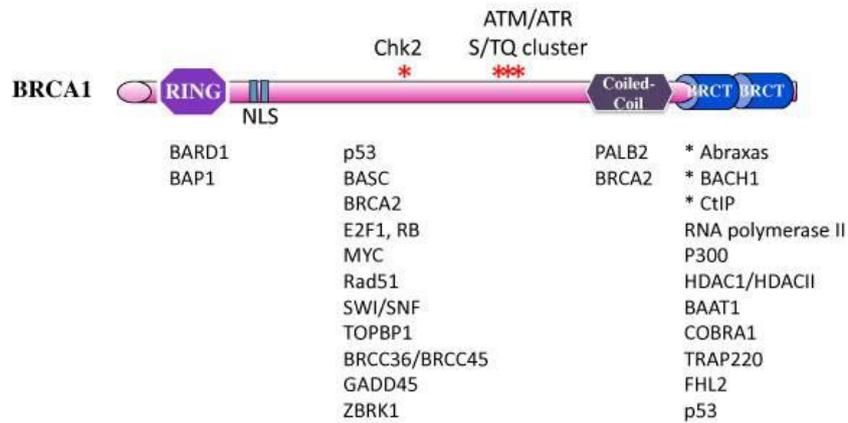
ADN. Los entrecruzamientos de ADN impiden tanto la transcripción como la replicación, por lo que deben eliminarse durante todas las etapas del ciclo celular [30].

Mutaciones bialélicas en estos genes producen dicha patología, la cual se caracteriza por fallo en la médula ósea y una elevada susceptibilidad a la leucemia mieloide aguda y a tumores sólidos, así como a errores del desarrollo. Los pacientes con anemia de Fanconi presentan hipersensibilidad a los agentes intercalantes del ADN, resultando en un aumento de las anomalías cromosómicas como las translocaciones [30].

Por otro lado, como se describe a continuación en detalle, mutaciones monoalélicas en estos genes están vinculadas a un aumento de riesgo de padecer CM y/o CO en el contexto del SCMOH [31].

### 5.1.1 *BRCA1*

El gen *BRCA1* (OMIM: 113705) se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21.31). A partir de 22 exones codificantes se origina una proteína formada por 1863 aminoácidos (NP\_009225). Esta proteína tiene cuatro dominios: un dominio de dedos de zinc o *RING finger* (mediante el cual se dimeriza con BARD1 para formar la E3 ubiquitin ligasa), el dominio coiled-coil (mediante el cual se une a PALB2) y dos copias del dominio BRCT, el cual es un dominio conservado que está presente en diversas proteínas implicadas en la reparación del ADN, al facilitar la unión de fosfoproteínas (**Figura 5**) [32, 33].



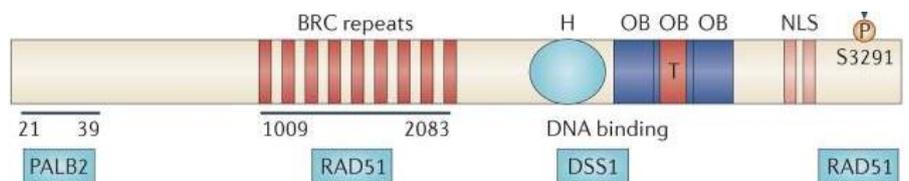
**Figura 5.** Esquema de los dominios funcionales de BRCA1 y de las proteínas que interaccionan con él. Obtenido de BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail [33].

*BRCA1* es un gen supresor de tumores involucrado en funciones celulares básicas necesarias para la replicación celular y síntesis de ADN. Las personas portadoras de variantes patogénicas en *BRCA1* tienen un riesgo acumulado a los 80 años de padecer CM del 67% [20], estando relacionado sobre todo con el triple negativo, un tipo de CM sin expresión de receptores de progesterona (PR), estrógenos (ER) y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2) [34, 35]. Un estudio reciente realizado en población de la Región de Murcia asocia mutaciones en *BRCA1* con el subtipo ductal infiltrante y, en un menor porcentaje, con los carcinomas medulares [36]. A su vez, presentan un riesgo acumulado de padecer CO a los 80 años del 45%, sobre todo de carcinoma seroso epitelial de alto grado [20, 36, 37].

Se han encontrado variantes patogénicas a lo largo de toda la secuencia codificante del gen. La mayoría son variantes que producen alteraciones en el marco de lectura y producen proteínas truncadas, principalmente mutaciones puntuales (cambios de un solo nucleótido, o pequeñas inserciones o deleciones). En cuanto a los grandes reordenamientos, la proporción varía según la población, siendo mucho más frecuentes en *BRCA1* que en *BRCA2* [38]. En España, un 8,2% de las variantes patogénicas en *BRCA1* son grandes reordenamientos [39].

### 5.1.2 BRCA2

El gen *BRCA2* (OMIM: 600185) se localiza en el cromosoma largo del cromosoma 13 (13q13.1). A partir de 26 exones codificantes origina una proteína de 3418 aminoácidos (NP\_000050). Dicha proteína contiene los dominios funcionales que están representados en la **Figura 6**. El extremo N-terminal se une a PALB2. A continuación hay ocho unidades consecutivas de repeticiones BRC mediante los cuales se produce la unión a RAD51. El dominio de unión a ADN está formado por un dominio helicoidal, tres dominios *oligonucleotide binding* (OB) y un dominio *tower* (T). Éste último facilita la unión de BRCA tanto a ADN de hebra única como de doble. Por último, el extremo C-terminal también es un punto de unión a RAD51 [40].



**Figura 6.** Esquema de los dominios funcionales de BRCA2 y de las proteínas que interaccionan con él [40].

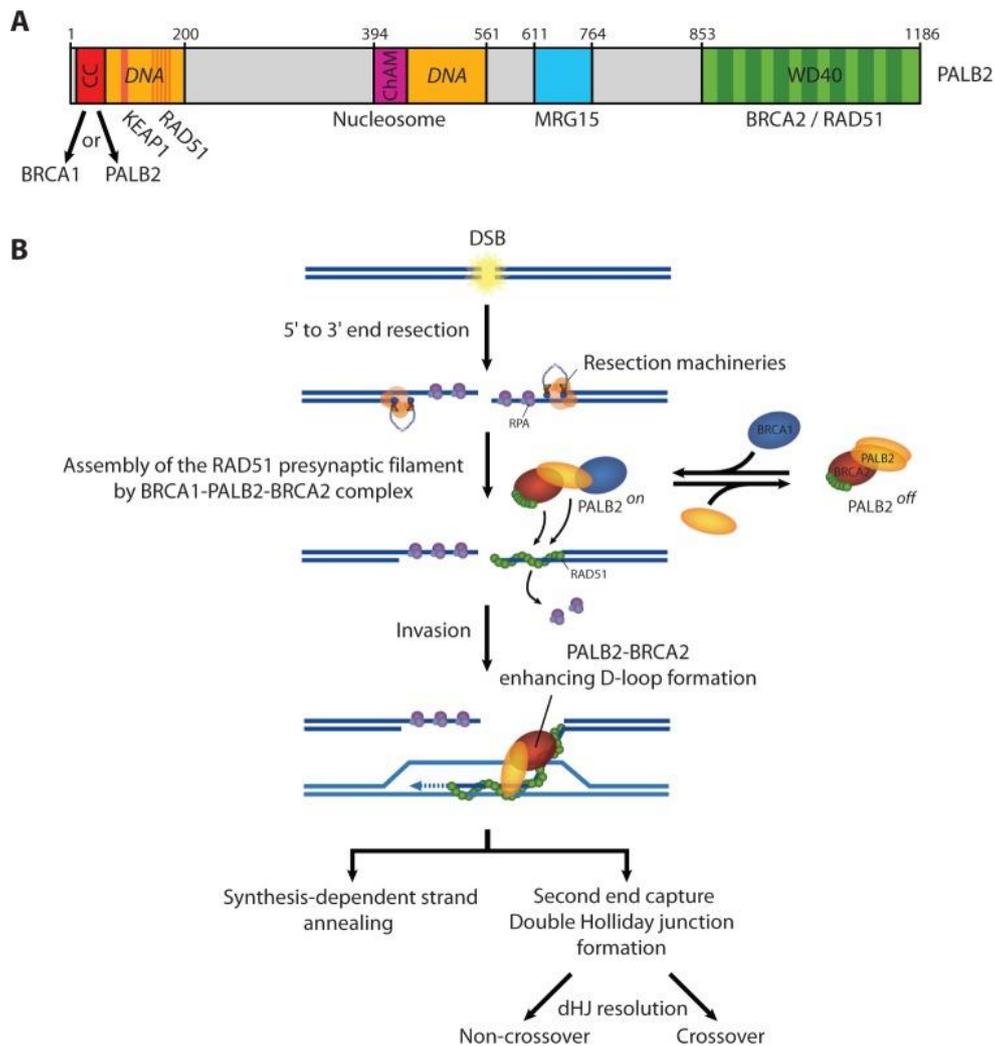
BRCA2 actúa como supresor de tumores, y tiene un papel más específico en la reparación del ADN, ya que regula la actividad del gen *RAD51C* e interacciona con PALB2. Los portadores de variantes patogénicas en este gen tienen un riesgo acumulativo a los 80 años de padecer CM del 66% y un 12% de padecer CO [20]. En hombres, se asocia a un mayor riesgo de padecer cáncer de próstata y de cáncer de mama en el varón. Al contrario de *BRCA1*, no está asociado a un subtipo histológico de CM particular, sino que es un grupo más heterogéneo. Por otro lado, el CO más común es, al igual que en portadores de mutaciones en *BRCA1*, el seroso [36, 37].

Las variantes patogénicas que se encuentran con más frecuencia son pequeñas inserciones o deleciones, mientras que el resto corresponden a mutaciones con cambio de un solo aminoácido por otro o *missense* y a alteraciones del proceso de empalme del ácido ribonucleico (ARN) o *splicing*,

siendo los grandes reordenamientos mucho menos comunes que en *BRCA1* [38, 39].

### 5.1.3 *PALB2*

El gen *PALB2* (OMIM: 610355) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 16 (16p12.2). A partir de 13 exones se codifica una proteína de 1186 aminoácidos, la cual acompaña y localiza a *BRCA2*, de ahí su nombre (*partner and localizer of BRCA2*). Dicha proteína está formada por dos dominios de unión a ADN, dos regiones de interacción con *RAD51*, un dominio ChAm o de asociación a la cromatina, un conjunto de repeticiones WD40 de 40 aminoácidos y por un dominio de autointeracción (**Figura 7A**). *PALB2* actúa con *BRCA2* en la reparación del ADN, tal y como se representa en la **Figura 7B**. La proteína *BRCA2* interacciona con *PALB2*, con *RAD51* y con la unión entre el ADN simple y el de doble cadena, produciéndose la etapa final del proceso de recombinación homóloga[41].



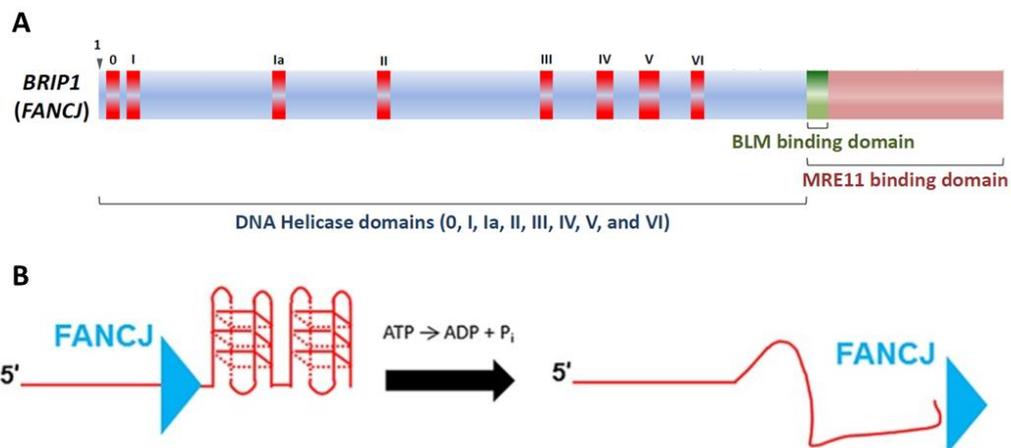
**Figura 7.** (A) Representación esquemática de los dominios de PALB2. (B) Modelo de la acción colaborativa entre colaborativo entre BRCA1, BRCA2 y PALB2. PALB2 y BRCA2 trabajan sinérgicamente para estimular la recombinación homóloga. Tras la resección del daño por MRN, el complejo PALB2-BRCA2 activa RAD51 para que se produzca la invasión de una hebra molde no dañada y una posterior reparación del daño mediante recombinación homóloga [42].

Mutaciones germinales monoalélicas en este gen impedirían que se llevara a cabo de forma correcta esta reparación, provocando un aumento del riesgo de cáncer. La introducción del análisis de este gen fue avalada por un estudio que concluyó que, a pesar de la baja frecuencia de las mutaciones en este gen (0.1%-2.7%), éstas implicaban un riesgo de desarrollar cáncer de mama similar al de *BRCA2* [43]. Por otro lado, en un estudio realizado en población española se identificaron variantes patogénicas en *PALB2* en aproximadamente el 1% de los casos de cáncer de mama familiar, así como en el 3-4% de los

casos de cáncer de páncreas familiares [25]. Además, hay diversos estudios que lo relacionan con una mayor susceptibilidad hereditaria a cáncer de mama en el varón [44].

#### 5.1.4 BRIP1

El gen *BRIP1* o *FANCI* (OMIM: 605882) está localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q23.2). Está formado por 19 exones codificantes que originan una proteína de 1249 aminoácidos (NP\_114432). Dicha proteína está compuesta por ocho dominios helicasa, un dominio de unión a BLM y otro de unión a MRE11 [45]. Actúa como una helicasa que interacciona con BRCA1 durante la reparación del ADN en la recombinación homóloga. Además, BRIP1 colabora con otras proteínas implicadas en la detección de daño en ADN y su reparación. Por otro lado, se piensa que esta proteína tiene otras funciones como aliviar el estrés de la replicación al resolver las estructuras de cuádruplex de guanina (G4), los cuales afectan a la replicación y la transcripción y juegan un papel potencial en la preservación de estructuras cromosómicas como los telómeros [46] (**Figura 8**).



**Figura 8.** (A) Esquema de los dominios que forman la proteína BRIP1. (B) BRIP1/FANCI resuelve los cuádruplex de guanina para mantener la estabilidad genómica y la homeostasis celular [45, 46].

Variantes patológicas en este gen se asocian a un riesgo incrementado de CO. Se han detectado mutaciones en este gen en 1.4% de los pacientes con

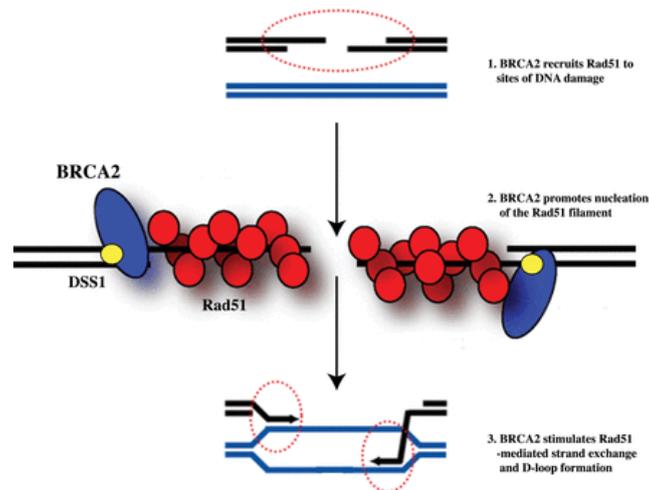
CO [47], siendo el riesgo relativo (RR) para cáncer de ovario epitelial invasivo del 11,22 (IC 95%) y del 14,09 (IC 95%) para el cáncer de ovario seroso de alto grado [48].

Aunque en general no se ha encontrado que las mutaciones en *BRIP1* estén asociadas a un mayor riesgo de CM, hay un estudio realizado en población española en el que se encontró asociación entre determinadas variantes en *BRIP1* y *PALB2* y el CM con receptores de progesterona positivos [31].

### 5.1.5 *RAD51C* y *RAD51D*

El gen *RAD51C* (OMIM: 602774) se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q22). A partir de 9 exones codificantes se origina una proteína de 376 aminoácidos (NP\_478123). El gen *RAD51D* (OMIM: 602954) también está localizado en el mismo cromosoma que el anterior (17q12). A partir de 10 exones da lugar a una proteína de 328 aminoácidos.

Las proteínas codificadas por estos genes, junto con el resto de proteínas de la familia RAD51 participan en el proceso de recombinación homóloga al formar un complejo que cataliza el emparejamiento entre el ADN de una hebra y el de dos hebras para que posteriormente se produzca la síntesis y reparación del ADN dañado. Para que esto tenga lugar es necesario que BRCA2 reclute a RAD51 y lo sitúe en el ADN dañado (**Figura 9**) [49].



**Figura 9.** Modelo de acción colaborativa de RAD51 (rojo) y BRCA2 (azul) en la recombinación homóloga [49].

Ambos genes se asocian con un riesgo incrementado de CO. El riesgo acumulado de desarrollar CO en portadores de mutaciones en *RAD51C* es del 1,3% a los 50 años. En portadoras de mutaciones en *RAD51D* suponen un riesgo acumulado relativo de padecer CO a los 50 años del 3%. En cuanto al CM, no hay suficiente evidencia que apoye la implicación de estos genes [50, 51].

En población española hay estudios en los que se detecta un 1,3% de mutaciones en *RAD51C* en familias con SCMOH, mientras que las mutaciones en familias con CM son muy raras [52]. Además, alrededor de un 1% de las familias con SCMOH españolas sin mutaciones en *BRCA1/BRCA2* son portadoras de mutaciones en *RAD51D* [53]. Dentro del CM, el más común es el carcinoma ductal *in situ* pobremente diferenciado[54]. En cuanto al ovario, un estudio realizado en población de la Región de Murcia indicó que los subtipos más asociados con mutaciones en estos genes son el mucinoso y el seroso [55].

## 5.2 Otros genes de susceptibilidad relacionados con el SCMOH

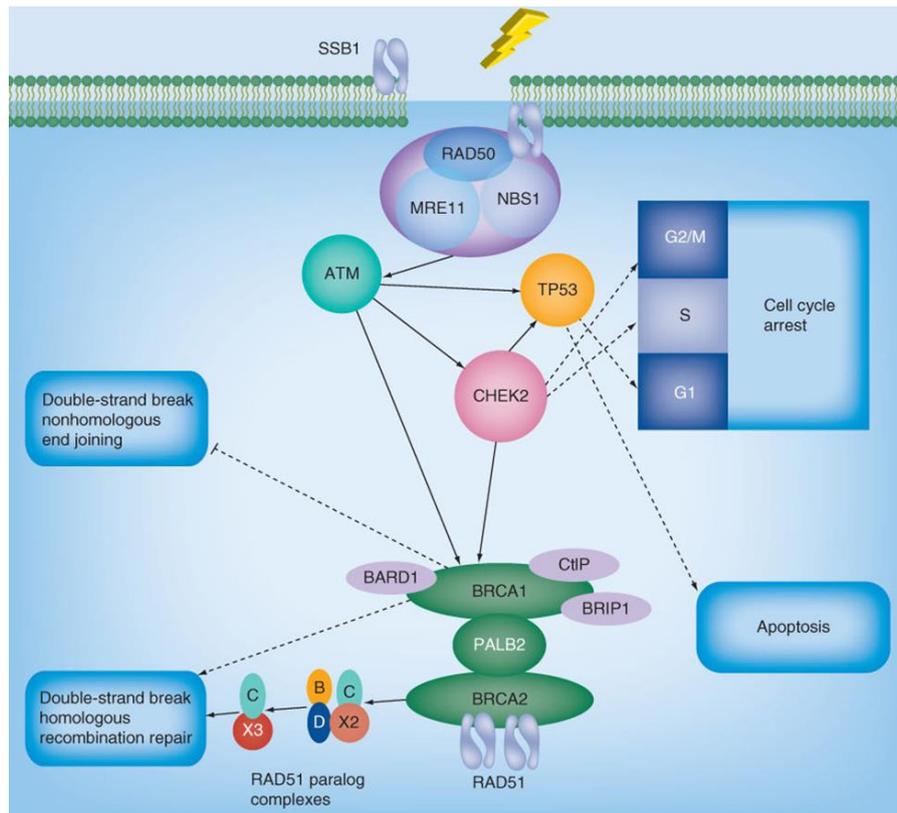
### 5.2.1 ATM

El gen *ATM* es un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 11 (11q22.3). Se caracteriza por su gran tamaño, ya que se compone por 63 exones, de los cuales 62 son codificantes y dan lugar a una proteína de 3056 aminoácidos. Ésta tiene cuatro dominios esquematizados en la **Figura 10**: TAN (esencial para el mantenimiento de la longitud de los telómeros y para la respuesta al daño del ADN), FAT (el cual interacciona con el dominio ATM kinasa para estabilizar la región C-terminal de la misma proteína), el dominio PI3-PI4 kinasa y FATC (que puede tener una función estructural o como dominio de unión a proteínas) [56–58].



**Figura 10.** Representación esquemática de los dominios de la proteína ATM [57].

El gen *ATM* codifica una proteína de la superfamilia de las fosfatidilinositol 3-kinasas, la cual juega un papel esencial en la regulación del ciclo celular y en la señalización de daño en ADN de doble cadena. Actúa fosforilando a Chk2 en respuesta a la radiación ionizante o la rotura de ADN de doble cadena, como se observa en la **Figura 11** [59].



**Figura 11.** Tras la detección del daño de ADN de doble cadena, el complejo MRN activa la ATM kinasa. Una vez fosforilada, ATM fosforila a posteriores efectores como CHEK2 y p53, los cuales producen la detención del ciclo celular para dar tiempo a que se repare el ADN. A su vez, p53 juega un papel importante en la señalización de la apoptosis. Finalmente, se produce el reclutamiento de las proteínas responsables de la reparación de ADN mediante recombinación homóloga activándolo [59].

Mutaciones bialélicas en este gen producen una enfermedad de herencia autosómica recesiva conocida como ataxia-teleangiectasia, la cual se caracteriza por ataxia cerebelar progresiva, telangiectasia, enfermedades inmunes y predisposición a cáncer (sobre todo linfomas y leucemia), así como una sensibilidad anormal a la radiación ionizante [60, 61]. En cuanto a las mutaciones en heterocigosis, hay estudios que las asocian con un aumento de riesgo de CM [62], estimándose un riesgo relativo del 2.8% [63]. Los portadores de mutaciones en *ATM* tienen un riesgo en toda una vida de desarrollar CM del 38%. También se sugiere un aumento de riesgo de cáncer en otras localizaciones como estómago, pancreático, colorrectal, melanoma, etc.[64]. Por otro lado, la presencia de mutaciones en este gen tendría implicaciones en el

tratamiento del paciente ya que se ha estudiado que en portadores de estas mutaciones que reciben radioterapia aumenta el riesgo de CM contralateral [65]. Sin embargo, no hay evidencia suficiente para desaconsejar la radioterapia en estos portadores [66].

En población española, se estima que en familias con sólo CM hay una frecuencia de mutaciones en este gen del 2%, un porcentaje mayor al de otras poblaciones [67].

### 5.2.2 CHEK2

El gen *CHEK2* (OMIM: 604373) se localiza en el brazo largo del cromosoma 22 (22q12.1). Existen varios transcritos, siendo el más común el formado por 14 exones codificantes que originan una proteína de 543 aminoácidos (NP\_009125), cuyos dominios principales se esquematizan en la **Figura 12**. Esta proteína se conoce como checkpoint kinasa 2, una proteína supresora de tumores, la cual regula la división celular para evitar que las células se dividan de manera rápida e incontrolada (**Figura 11**). Variantes patogénicas en este gen se asocian a un riesgo incrementado de CM en personas con historia familiar de CM y CO. En pacientes portadores de mutaciones en este gen el riesgo acumulado de padecer CM en una vida oscila entre el 28-37%. Esta variante se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollar un CM positivo para receptores de estrógenos [68–70].



**Figura 12.** Dominios funcionales de la proteína CHEK2: dominio N-terminal con *cluster* SQ/TQ, dominio FHA (forkhead-associated domain) y dominio kinasa [59].

### 5.2.3 TP53

El gen *TP53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1) y es un gen supresor de tumores de alta penetrancia. Tiene varios transcritos, de los cuales el más largo está compuesto por 10 exones codificantes y da lugar a la proteína p53, formada por 393 aminoácidos y que actúa como un factor de

transcripción nuclear conocido como el *guardián del genoma*. En la **Figura 11** se resume su función en la detención del ciclo celular y en la señalización de la apoptosis.

Esta proteína está formada por los siguientes dominios principales: un dominio de transactivación en el extremo N-terminal (el cual es esencial para inducir factores de transcripción), un dominio de unión a ADN y un dominio de oligomerización (esencial para la tetramerización que es necesaria para el funcionamiento de TP53 *in vivo*) (**Figura 13**) [59].



**Figura 13.** Esquema de los principales dominios de TP53 (dominio de transactivación en naranja, dominio de unión al ADN en verde y dominio de tetramerización en morado) [59]

Mutaciones germinales en *TP53* son causantes del síndrome de Li Fraumeni, una enfermedad genética autosómica dominante que confiere un elevado riesgo de tumores en diversas localizaciones: sarcoma de tejidos blandos, osteosarcoma, mama, cerebral, de la glándula adrenal y leucemia, entre otros [71]. Dentro del cáncer de mama, se asocia con el subtipo inmunohistoquímico HER2-positivo [26]. Las mutaciones *de novo* en este gen son frecuentes, en torno a un 7-20%, por lo que es probable que se encuentre una variante patogénica en *TP53* en un caso índice sin que esté presente necesariamente en sus progenitores [72]. Portadoras sanas de una mutación en este gen tienen un riesgo de cáncer de mama de 56% a la edad de 45 años y mayor de 90% a la edad de 60 años [73, 74].

Al igual que ocurre con los portadores de mutaciones en *ATM*, los pacientes con síndrome de Li Fraumeni tienen una sensibilidad aumentada a las radiaciones [75].

## 6. CARACTERIZACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE VARIANTES

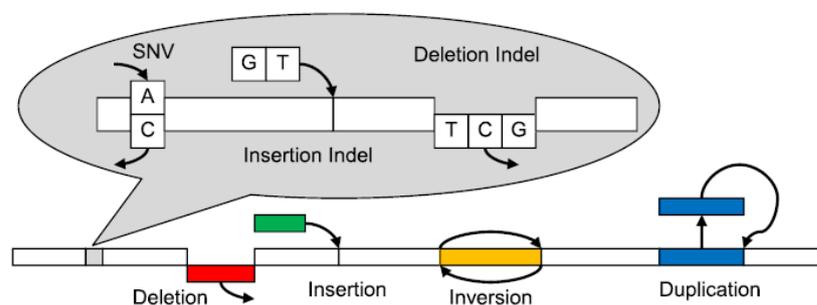
Una vez realizado un análisis genético, se debe llevar a cabo la clasificación de las variantes halladas en éste. Dicha clasificación se puede realizar desde el punto de vista molecular, en función de cómo afecta el cambio

a la estructura del gen o de la proteína que traduce éste; o bien desde el punto de vista clínico, según la implicación que dicha variante tenga en el desarrollo de una determinada enfermedad.

La nomenclatura de las distintas variantes localizadas sigue la normativa propuesta por la Human Genome Variation Society (HGVS) [76].

a) Clasificación molecular de variantes (**Figura 14**):

- Inserciones y deleciones: se introducen o se pierden uno o varios nucleótidos de la secuencia. Si el número de nucleótidos agregados o perdidos no es múltiplo de tres, se alteraría el marco de lectura (*variante frameshift*), produciéndose una proteína truncada.
- Cambios de un solo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphism*): se cambia un nucleótido de la secuencia original por otro distinto. Esto puede tener como consecuencia el cambio no altere la secuencia de aminoácidos (variante sinónima o silenciosa), que se produzca un cambio de aminoácido (variante con cambio de sentido o *missense*), que se introduzca un codón de parada prematuro UAG, UGA o UAA (variante sin sentido o *nonsense*) o que se altere el proceso de *splicing* del ARN.
- Inversiones: se trata de un cambio estructural en el que un segmento de cromosoma cambia de sentido dentro del mismo.
- Duplicaciones: se trata de un cambio estructural en el que se repite un fragmento de nucleótidos junto al original.



**Figura 14.** Resumen de los distintos cambios moleculares que pueden alterar el ADN [77].

b) Clasificación de variantes desde el punto de vista clínico

Con el objetivo de facilitar la interpretación de las variantes de las variantes halladas en un análisis genético, así como para mejorar el asesoramiento genético, Lindor y colaboradores desarrollaron un modelo de clasificación de variantes, que se muestra en la **Tabla 1** [78]. De la misma forma, la Sociedad Internacional de tumores gastrointestinales hereditarios desarrolló un esquema estandarizado de clasificación de variantes en cinco clases [79]. Más recientemente, el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica ha publicado unas guías para la interpretación de variantes, manteniéndose la clasificación en cinco clases, las cuales se detallan a continuación:

- Variantes no patogénicas: variantes que no modifican el riesgo de aparición del SCMOH.
- Variantes probablemente no patogénicas.
- Variantes de significado clínico desconocido (VUS, *variant of uncertain significance*): aquellos cambios cuya influencia en la susceptibilidad a presentar SCMOH no esté aún establecidas. Recientemente y debido a la expansión del uso clínico de los paneles de genes se ha acuñado el concepto de VUS priorizada. Éste hace referencia a aquellas variantes de significado clínico desconocido que, según indican los estudios *in silico* y la bibliografía, entre otros, tienen una mayor probabilidad de tener un efecto deletéreo en la proteína [80].
- Variantes probablemente patogénicas
- Variantes patogénicas: variantes causantes de la enfermedad de estudio. Suelen ser cambios sin sentido o que alteran el marco de lectura, grandes deleciones o que producen una inactivación completa por alteración en el *splicing*.

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 1.** Propuesta de clasificación de las variantes y su correlación con la recomendación clínica. Modificada de Lindor y col., 2013 [78].

## 7. VARIANTES CON EFECTO FUNDADOR

En el campo de la “genética de poblaciones” se define como efecto fundador a la pérdida de variación genética que ocurre cuando se crea una nueva población a partir de un pequeño número de individuos que no son genéticamente representativos de la población de la que proceden. Dichos “fundadores” sólo portarían una parte de la variabilidad genética de la población original. Este concepto fue establecido por Ernst Mayr en 1942 [81].

En el ámbito de la predisposición a cáncer, este concepto explicaría la diferencia de frecuencia mutacional en un determinado gen de riesgo entre distintas poblaciones. Dado el caso de una pequeña población en la que existe una mutación fundadora en un gen de predisposición, es muy probable que la frecuencia mutacional en dicho gen sea superior a la encontrada en la población general. Sin embargo, es posible encontrar una mutación fundadora en localizaciones geográficas distintas, ya que esto podría explicarse por un evento migratorio de parte de la población.

Cuando se sospecha que una variante hallada se trata de una fundadora, se debe demostrar que está asociada a un haplotipo común en todos los

portadores de dicha mutación. Para ello se utilizan marcadores genéticos cercanos a la mutación y que no estén separados por recombinación meiótica. Los marcadores más útiles incluyen polimorfismos de nucleótido único y las repeticiones cortas en tándem, también conocidos como microsatélites.

## 8. HERRAMIENTAS DISPONIBLES PARA LA CLASIFICACIÓN DE VARIANTES

Como se ha comentado previamente, el desarrollo tecnológico en el ámbito del cáncer hereditario ha permitido que se analicen muchos genes a la vez. Esto permite una mejora del rendimiento diagnóstico del análisis genético pero, a su vez, ha producido un aumento de hallazgos de variantes no descritas o clasificadas previamente. Por lo tanto, será labor de los profesionales del laboratorio asesorar al clínico o al propio paciente sobre el significado clínico de dichos hallazgos. Para ello se deben consultar bases de datos como LOVD (*Leiden Open Variation Database*), *ClinVar* en *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, o *HGMD (Human Gene Mutation Database)*. Para predecir el posible potencial patogénico de estas variantes se pueden usar herramientas web como *MutationTaster*, *SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant)* o *PolyPhen (Polymorphism Phenotyping)*.

Además, se recomienda seguir los criterios y guías de las principales sociedades científicas, como el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG), la Asociación de Patología Molecular (AMP) y la Asociación de Ciencias de Genética Clínica (ACGS) [82, 83]. Estas establecen criterios de evidencia de patogenicidad, que pueden ser muy fuertes, fuertes, moderados y secundarios, así como otros criterios que apoyan la benignidad de dichas variantes. Al combinar estos criterios se pueden categorizar las variantes halladas según la clasificación anterior. Dentro de los criterios fuertes y muy fuertes de patogenicidad están aquellas variantes que son *de novo*, que producen cambios sin sentido, que alteran el marco de lectura o que afectan a sitios de *splicing* en genes en los que la pérdida de heterocigosidad en tejido es un mecanismo conocido de la enfermedad. También hay otros criterios menos determinantes pero que también se utilizan para clasificar variantes patogénicas como la co-segregación de la variante con la enfermedad en los familiares

afectados o que los estudios *in silico* sugieran una capacidad de la variante para alterar el *splicing* [82, 83].

A continuación se describen los principales recursos disponibles para valorar clínicamente las variantes génicas halladas en un estudio genético. Conocerlas es de gran importancia para saber si dichas variantes han sido previamente descritas y clasificadas clínicamente o si, por el contrario, son variantes no descritas y por tanto se desconoce su implicación en la clínica de los pacientes.

### 8.1 Bases de datos

Hay distintas bases de datos creadas por grupos de trabajos especializados que están disponibles en la red.

- I. ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>): es un archivo público de acceso libre en el cual se reportan variantes génicas y su implicación clínica, siempre con pruebas que lo apoyen. Esta base de datos pertenece al Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI).
- II. dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>): es una base de datos de polimorfismos (*SNPs*, *single nucleotide variants*), pequeñas inserciones y deleciones, microsatélites y variantes no polimórficas. Al igual que la anterior, pertenece a NCBI.
- III. Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>): es un buscador de genomas de vertebrados, que apoyan la investigación en genómica comparativa, evolución, variación de secuencias y regulación transcripcional. Ensembl registra genes, incluye múltiples alineamientos, predice la función reguladora y reúne variantes encontradas relacionadas con una determinada enfermedad.
- IV. 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.
- V. LOVD (Leiden Open Variation Database) (<http://www.lovd.nl/3.0/home>): es una base de datos diseñada para recopilar y visualizar variantes en la secuencia de ADN. Su objetivo principal es encontrar si existe una

relación entre dichas variantes y determinadas enfermedades hereditarias y su pronóstico.

## 8.2 Programas predictivos o estudios *in silico*

Hay una gran variedad de herramientas *in silico* que pueden ayudar a la correcta interpretación de las variantes. Los algoritmos utilizados son diferentes y pueden incluir la importancia de la alteración tanto a nivel de nucleótido como a nivel de aminoácido. Estos programas se pueden dividir en dos grupos: aquéllos que predicen si el cambio es perjudicial para la función o estructura de la proteína resultante y los que predicen si se altera el *splicing*.

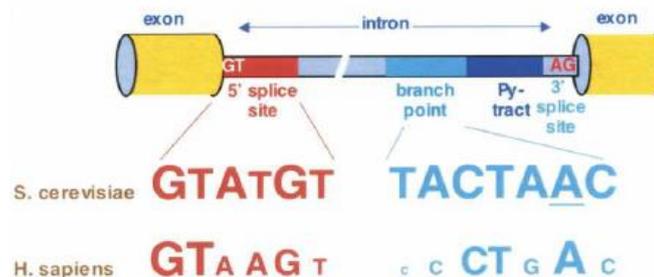
El impacto de las alteraciones *missense* depende de varios criterios. Los principales se resumen a continuación:

- I. Localización dentro de la proteína [82]:
  - Si la variante se encuentra en un dominio funcional de conocida importancia para la función de la proteína y en el que las variantes *missense* conocidas son todas patogénicas, existe una elevada probabilidad de que ésta sea patogénica.
  - Existen zonas donde se ha descrito una mayor frecuencia de variantes patogénicas. Se conocen como *hot spot* y si una variante se encuentra en esta zona, la posibilidad de que sea patogénica es elevada.
  - Que la variante se halle en el mismo codón que otra variante patogénica apoya una probable patogenicidad de la nueva variante.
- II. Grado de conservación: si una zona del genoma está altamente conservada a lo largo de la evolución, se presupone de gran importancia estructural o funcional, por lo que una alteración tiene altas posibilidades de ser deletérea [82].
- III. Consecuencias bioquímicas del cambio de aminoácidos: si se produce una sustitución de un aminoácido por otro de características similares, la posibilidad de que este cambio sea dañino es menor que si el nuevo aminoácido tiene unas características fisicoquímicas (tamaño, polaridad, etc.) que el original [82].

La principal limitación de estas herramientas es la dificultad de su interpretación debido a su baja especificidad, lo que conlleva que muchas

variantes se predigan falsamente como patogénicas. Los programas *in silico* más empleados para la interpretación de variantes *missense* son *PolyPhen2*, *SIFT*, *MutationTaster*, *Align GVGD*, entre otros [82].

En cuanto a los programas que predicen el efecto en el *splicing*, generalmente tienen una mayor sensibilidad (90-100%) con respecto a la especificidad (60-80%). Estos predicen sitios de empalme probables. La gran mayoría de los intrones conocidos comienzan con un sitio donador que es complementario a una secuencia estándar del ARN, es particular al dinucleótido “GU” en el extremo 5’, y casi todos los intrones terminan con un “AG” en el extremo 3 (Figura 15)’. La evidencia actual sugiere que la estructura de la secuencia del *branchpoint* también está conservada en distintas especies. El principal inconveniente sigue siendo la dificultad de su interpretación ya que la mayoría no predicen el efecto de un variante determinada. Además, no hay estudios de evaluación a gran escala de estas herramientas. Entre los programas utilizados para predecir el efecto de una variante en el *splicing* están *GeneSplicer*, *Human Splicing Finder*, *NNSplice* y *MaxEntScan* [82, 84].



**Figura 15.** Esquema que representa un pre-ARNm de dos exones y un intrón con diferentes secuencias relevantes para el proceso de *splicing*. Sólo los primeros (GT) y los últimos (AG) dos nucleótidos del intrón se encuentran altamente conservados a lo largo de la evolución [85].

### 8.3 Evaluación de la frecuencia de la variante en población control

Determinar la frecuencia de una variante en la población general o en una población control es de utilidad para conocer su patogenicidad. Esto se puede hacer mediante una búsqueda en las bases de datos poblacionales como la del

Proyecto 1000 Genomas o del Consorcio de Agregación de Exomas (ExAc). La primera no permite determinar la ausencia de una variante pero tiene una gran representación de diferentes poblaciones. La segunda recoge datos de frecuencia alélica de más de 60000 exomas de diferentes poblaciones. En general, una frecuencia alélica en población control superior a la esperada para una determinada enfermedad apoya una interpretación benigna. Por otro también se puede utilizar una población control propia formada por individuos sanos para la enfermedad de interés. Sin embargo, muchas variantes benignas son únicas para determinados individuos o familias, con lo que la ausencia en población control no es suficiente para establecer la patogenicidad de la variante [82].

#### **8.4 Estudios funcionales**

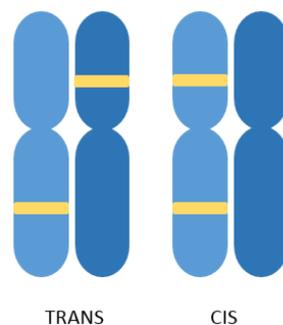
Los estudios funcionales son una herramienta poderosa para determinar la patogenicidad, pero no todos son efectivos para determinar el impacto sobre el gen o la funcionalidad de la proteína. La evidencia es mayor si el ensayo refleja la totalidad de la función biológica de la proteína comparada con sólo una parte de esta función. Los estudios funcionales que determinan el impacto de las variantes a nivel de ARN mensajero (ARNm) pueden ser altamente informativos a la hora de evaluar los efectos en la estabilidad del ARNm, su procesamiento y traducción entre otros [82].

#### **8.5 Co-ocurrencia en cis/trans**

En una enfermedad de tipo recesivo, si la variante a clasificar se encuentra en el alelo distinto a otra variante previamente clasificada como patogénica (*trans*), existe un riesgo incrementado de que la nueva variante sea patogénica. Si, por el contrario, ambas variantes se encuentran en el mismo alelo (*cis*), es más probable que la nueva variante sea benigna. Esto se debe a que si ambas variantes se encuentran en *cis*, el otro alelo estaría intacto (**Figura 16**).

Por el contrario, si se trata de una patología de herencia dominante, la interpretación sería la contraria, ya que el que ambos alelos se encuentren dañados conllevaría un defecto que provocaría la letalidad embrionaria. Por lo tanto, si la variante a clasificar se encuentra en *trans* con otra patogénica es más probable que la nueva variante sea no patogénica. Este sería el caso de la

mayoría de los casos de SCMOH ya que está vinculado a mutaciones en genes autosómicos dominantes. Sin embargo, como se ha descrito previamente, aunque mutaciones monoalélicas en muchos de estos genes se asocian a un incremento de riesgo de cáncer, cuando éstas son bialélicas, tienen lugar otro conjunto de enfermedades de mayor gravedad como son la anemia de Fanconi (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* y *RAD51D*) o la ataxia telangiectasia (*ATM*). En consecuencia, habría que interpretar los datos con cautela. Además, para saber las variantes están en cis o en trans se deben estudiar los padres del caso índice, algo que no siempre es posible [82].



**Figura 16.** Esquema que representa la configuración trans/cis en de una determinada variante (representada en color amarillo).

## 8.6 Estudio de co-segregación

Un estudio de cosegregación consiste en analizar en otros miembros de la familia (afectados y no afectados) la variante hallada. Si la variante está presente en los familiares afectados y ausente en los no afectados, se podría afirmar que la variante co-segrega con la enfermedad. Sin embargo, se debe tener precaución a la hora de usar la co-segregación para clasificar clínicamente una variante, ya que ésta evidencia una relación entre el *locus* y la enfermedad pero no confirma la patogenicidad de la variante en sí. Además, se deben tener en cuenta la presencia de posibles fenocopias o de que la co-segregación se deba a un desequilibrio de ligamiento con la verdadera variante patogénica. Actualmente, también se debe profundizar en la relación biológica entre familiares, ya que existe la posibilidad de no paternidad biológica (donación de esperma y ovocitos o adopción, principalmente) [82].

## 9. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO

Los resultados del asesoramiento genético pueden clasificarse en dos grupos:

- Test informativo: cuando se halla una variante con relevancia clínica que permite explicar la situación clínica del paciente. Dentro de este grupo se pueden distinguir dos opciones:

a) Verdadero positivo: se trata de un resultado informativo obtenido en el caso índice de la familia. Dado el caso, éste puede informar a sus familiares para que decidan si quieren ser estudiados para conocer su riesgo. Si a uno de estos familiares se le detectara la misma mutación, también se trataría de un verdadero positivo.

b) Verdadero negativo: este resultado se obtendría tras un análisis genético realizado en un familiar de un portador de una mutación, siempre y cuando no se encuentre la variante hallada previamente en el caso índice. Cuando esto ocurre, se asume que el familiar tiene un riesgo similar a la población general de padecer la enfermedad.

- Test no informativo: cuando no se detecta ninguna variante que pueda explicar la clínica del paciente. Se distinguen dos subgrupos:

c) Negativo no informativo: en el estudio no se ha encontrado ninguna variante con una relevancia clínica. Por lo tanto, no se puede afirmar pero tampoco rechazar la posibilidad de que la enfermedad esté relacionada con causas genéticas. Las recomendaciones dependerán de su historia personal y familiar de cáncer.

d) Variante de significado clínico desconocido: se ha encontrado una alteración en alguno de los genes de susceptibilidad a la enfermedad, pero no se puede asegurar que esta sea la responsable de la situación clínica de la familia. Sin embargo, es posible que dicha variante sea clasificada en un futuro con un mayor conocimiento ésta. Las recomendaciones dependerán de los antecedentes personales y familiares de cáncer.

En función del resultado obtenido, éste podrá tener consecuencias en el pronóstico del paciente, la estrategia de tratamiento empleada, así como en las

medidas de prevención empleadas tanto en el propio paciente como en sus familiares portadores de la mutación.

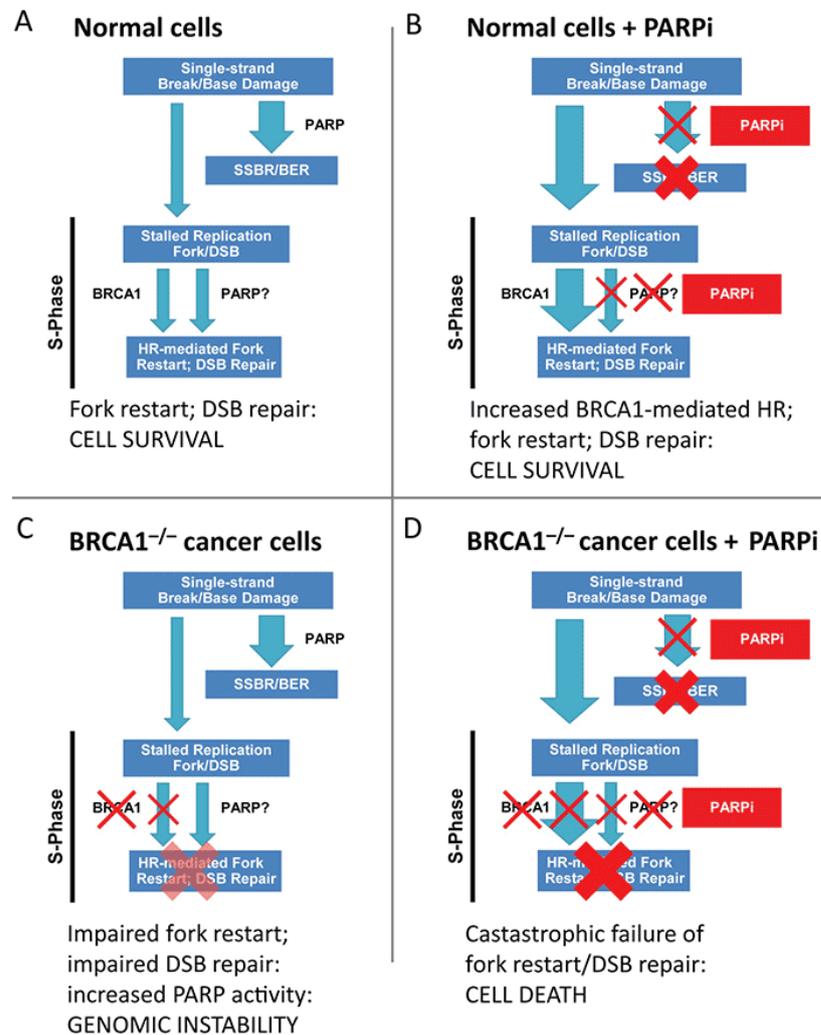
### 9.1 Pronóstico y tratamiento

Según un meta-análisis de 11 estudios, aquellos pacientes con CM y portadores de una mutación en *BRCA1* tienen una peor supervivencia global que los no portadores. Esto puede deberse a que los CM relacionados con *BRCA1* habitualmente son de alto grado y triple negativos. Sin embargo, no se ha encontrado una diferencia significativa entre portadores y no portadores de mutaciones en *BRCA2* [35, 86].

En cuanto al CO, un meta-análisis mostró que los portadores de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* tenían una mayor supervivencia global que los no portadores, así como una mayor supervivencia libre de progresión [86].

Por otro lado, los pacientes con CM que son portadores de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* tienen un riesgo mayor de desarrollar un CM contralateral que aquellos con CM esporádico. Por lo tanto, el diagnóstico genético tendrá influencia sobre el tratamiento loco-regional empleado. Diferentes estudios han demostrado una elevada sensibilidad a esquemas basados en platinos de los tumores relacionados con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, por lo que ésta se considera la principal terapia neoadyuvante [29, 87]. En el CO relacionado con *BRCA1* y *BRCA2* también se ha observado una mejora del pronóstico, mayor tasa de respuesta e intervalos libres de tratamiento entre recaídas más largas cuando en el tratamiento se incluyen estos fármacos. Esto puede atribuirse al defecto en la recombinación homóloga que producen las mutaciones en estos genes, lo que provoca un aumento de la sensibilidad a los derivados de platinos y otros agentes que actúan sobre el ADN como las antraciclinas [88].

Además de los anteriores, en los últimos años se ha comenzado a emplear nuevos fármacos denominados inhibidores de PARP-1 como el Olaparib, Niraparib o Rucaparib. Estos se desarrollaron a partir del concepto de letalidad sintética, término con el que se conoce a aquellas situaciones en las que dos mutaciones o alteraciones por sí solas no ocasionan daño al organismo pero tienen un efecto letal al combinarse entre sí [22]. Esto queda esquematizado en la **Figura 17**:



**Figura 17.** En células normales, PARP interviene en la reparación de daño en una hebra de ADN. Si se inhibe esta proteína, se refuerza el proceso de recombinación homóloga a modo de compensación. Si por el contrario el defecto está en el proceso de recombinación homóloga, es el mecanismo dependiente de PARP el reforzado. Sin embargo, cuando ambas vías están alteradas, no hay manera de reparar las lesiones, lo que lleva a la muerte celular [89].

## 9.2 Medidas de prevención

Las medidas de prevención pueden estar enfocadas a la detección precoz o a la reducción de riesgo mediante cirugía.

### 9.2.1 Detección precoz

La Sociedad Española de Oncología Médica ha establecido medidas de detección temprana en portadores de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*:

- En el CM, el uso conjunto de la resonancia magnética de la mama y de la mamografía aumenta la sensibilidad del cribado en mujeres portadoras. Por lo tanto, se recomienda una resonancia magnética anual a partir de los 25 años y a partir de los 30 se añade una mamografía a este control hasta los 70 años. En cuanto a los varones la evidencia es menor, pero se recomienda comenzar el cribado mediante mamografía a partir de los 40 años.
- En cuanto al CO, la detección precoz no está garantizada, pero si no se ha optado por la cirugía reductora de riesgo se recomienda realizar ecografías transvaginales y determinación de Ca125 a partir de los 35 años [29].

### 9.2.2 Cirugía reductora de riesgo

En el caso del CM, la mastectomía bilateral es una opción para portadores sanos en *BRCA1* y *BRCA2*, así como la mastectomía contralateral en los afectados jóvenes.

En cuanto al CO, se recomienda la salpingooforectomía bilateral entre los 35-40 años tras completar los deseos reproductivos, ya que no existen métodos seguros de detección precoz [29].

En lo referente al resto de genes relacionados con el SCMOH, no existe tanta experiencia clínica como para *BRCA1* y *BRCA2*. La NCCN ha establecido unas guías clínicas con recomendaciones diferentes para cada gen en función de la evidencia actual. En la mayoría de los casos estas recomendaciones se limitan a las medidas de detección precoz, mientras son más cautas en lo

referente a las medidas quirúrgicas, por las consecuencias que estas conllevan [66].

## **II. Hipótesis y objetivos**



## 1. IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El CM es el más común en mujeres en todo el mundo, mientras que el cáncer de ovario representa entre el 20-25% de los tumores ginecológicos y presenta gran malignidad.

Aunque la mayoría de los casos de CM y CO son esporádicos, se estima que el 5-10% de todos los casos están vinculados a una susceptibilidad hereditaria debida a mutaciones en genes autosómicos dominantes de alta y moderada penetrancia.

La comprensión de la etiología genética permitió que en los años 90 se identificasen los dos genes principales de susceptibilidad al cáncer de mama: *BRCA1* y *BRCA2* (breast-cancer-susceptibility genes). Sin embargo, en la actualidad se sugiere la participación de múltiples genes, cada uno de ellos asociado a riesgos menores, que a su vez actúan junto a factores ambientales. Entre estos genes se incluyen genes de alta riesgo para CM (*TP53*, *PTEN* y *PALB2*) así como genes de moderado riesgo de CM (*CHEK2*, *ATM*, *NF1* y *NBN*), genes con riesgo de CM impreciso pero elevado (*CDH1* y *STK11*) y genes con riesgo para CO (*RAD51D*, *BRIP1*, y genes MMR), entre otros [29]. Estos genes se asocian con susceptibilidad a otros tipos de cáncer como el de páncreas, colon y próstata, entre otros. Muchos de ellos son esenciales para mantener la estabilidad genómica de las células y están relacionados funcionalmente con la reparación de ADN mediante recombinación homóloga.

La aparición de la secuenciación de nueva generación ha permitido el desarrollo de paneles de genes. En consecuencia, la práctica clínica en el campo de SCMOH ha cambiado, ya que varios genes pueden ser estudiados en el mismo análisis y, por tanto, con un menor coste económico que si se estudiaran de manera individual.

Sin embargo, este aumento de información debe ir acompañado de una correcta interpretación de la misma. Al tratarse de una tecnología de incipiente instauración en el ámbito clínico existen todavía muchas incertidumbres en cuanto al vínculo entre los resultados obtenidos y su implicación en la práctica clínica. Es frecuente que mediante esta tecnología se encuentren variantes de nueva descripción, por lo que la responsabilidad de los profesionales del

laboratorio será clasificar e interpretar estas variantes. El desarrollo de este proyecto permitirá que en un futuro próximo, tanto los profesionales del laboratorio como los clínicos responsables del asesoramiento genético tengan un mayor conocimiento de los principales genes y variantes implicados en el SCMOH en nuestra población.

Por otro lado, la Sociedad Española de Oncología Médica estableció unos criterios de selección de pacientes para el estudio genético de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. En el caso de considerarse la realización de un panel de genes, se recomienda incluir genes con utilidad clínica, como *TP53*, *PALB2*, *BRIP1* y *RAD51C*. Es por esto que recientemente se ha planteado la situación de la existencia de un gran número de pacientes con estudio no informativo para *BRCA1* y *BRCA2* que se pueden beneficiar de una ampliación del estudio genético mediante un panel de genes relacionados. Por lo tanto, es de interés profundizar en la idoneidad de estos criterios en el panorama actual, así como evaluar la posibilidad de actualizarlos.

## 2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la utilidad clínica del análisis mediante paneles de genes en pacientes con síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario.

Objetivos específicos:

1. Determinar el rendimiento diagnóstico del análisis mediante paneles de genes en pacientes con SCMOH y con un test previo de *BRCA1* y *BRCA2* no informativo.
2. Evaluar los criterios de selección para realizar el análisis genético mediante panel de genes.
3. Caracterizar las variantes genéticas encontradas en los genes incluidos en el panel, tanto desde el punto de vista molecular como clínico.
4. Evaluar la frecuencia mutacional de los distintos genes estudiados en nuestra población
5. Llevar a cabo un estudio de correlación genotipo-fenotipo en aquellas variantes clínicamente relevantes halladas.

6. Describir la incidencia de variantes de significado clínico desconocido, así como de VUS priorizadas.



## **III. Metodología**



## 1. PACIENTES EN ESTUDIO

Entre abril de 2016 y mayo de 2018, se seleccionaron los casos índice pertenecientes a 138 familias que cumplían criterios de inclusión para el síndrome de 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 las consultas de Consejo Genético de los servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de la Arrixaca y Hospital Universitario Morales Meseguer, ambos en Murcia. 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 SEOM [29] (**Tabla 2**).

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

**Tabla 2.** Criterios establecidos por la SEOM para realizar el estudio genético de *BRCA1* y *BRCA2*. CM: cáncer de mama, CO: cáncer de ovario.

Posteriormente, en las reuniones periódicas del Comité de Consejo Genético de SCMOH, integrado por los responsables de las consultas previamente mencionadas y por los facultativos especialistas en Análisis Clínicos responsables del Laboratorio de Genómica (LDG), se escogieron aquellos pacientes a los que se ampliaría el estudio a un análisis de paneles de genes. En dicho comité se consensuaron los criterios de inclusión para el análisis genético mediante panel de genes:

Análisis genético para *BRCA1* y *BRCA2* no informativo más alguno de los siguientes:

Criterios que tienen en cuenta la historia familiar de cáncer:

- C1: Tres o más individuos de dos generaciones distintas que están afectados por cáncer de mama u ovario. Al menos dos individuos deben haber sido diagnosticados antes de los 50 años o uno antes de los 40.
- C2: Dos o más individuos han sido diagnosticados de cáncer de mama u ovario antes de los 35 años.
- C3: Se ha diagnosticado un caso de cáncer de mama en el varón y otro de mama u ovario antes de los 50 años.
- C4: Un caso de ovario antes de los 35 años y un caso de cáncer de mama antes de los 50 años en un familiar de primer grado.

Criterios que tienen en cuenta la historia personal de cáncer:

- C5: Diagnóstico de carcinomas de mama y ovario en la misma paciente, siempre y cuando uno de ellos sea diagnosticado antes de los 50 años.
- C6: Un único individuo ha sido diagnosticado de cáncer de mama u ovario antes de los 25 años.

Además, se determinó que la decisión final de ampliar o no este estudio se tomaría en el contexto del Comité de Consejo Genético, por lo que hubo algunos casos índice que no cumplían estrictamente los criterios de selección indicados.

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

## **1.2 Características clínicas e inmunohistoquímicas de los pacientes**

Se consultaron las historias clínicas de todos los pacientes incluidos en el estudio y se recogió la siguiente información:

### **1.2.1 Información detallada de la historia oncológica del caso índice:**

- a) Tipo de cáncer
- b) Edad del diagnóstico
- c) Histología del cáncer
- d) Estadificación: T (tamaño o extensión del tumor primario), N (grado de diseminación a los ganglios linfáticos) y M (presencia o no de metástasis).
- e) Inmunohistoquímica de los cánceres de mama: receptores estrogénicos, receptores Her-2/neu (HER) y clasificación molecular.

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<sup>®</sup>, para los pacientes del Hospital Clínico Virgen de la Arrixaca, así como la plataforma AGORA<sup>®</sup> para los pacientes del Hospital Universitario Morales Meseguer. Además, en algunas familias de mayor antigüedad fue necesario revisar datos clínicos en formato papel almacenadas en el archivo del LDG.

## 2. ANÁLISIS GENÉTICO

Una vez seleccionados los pacientes, en el Laboratorio de Genómica se realizó el estudio genético con paneles de genes mediante secuenciación masiva de nueva generación (NGS). Para ello, previamente se extrajo ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de todos los casos índices y familiares mediante el sistema automático de Promega (*Maxwell 16 Blood DNA Purification kit*) a partir de 400  $\mu$ L de sangre periférica, extraída en tubo con anticoagulante EDTA. A continuación se empleó el kit *BRCA Hereditary Master™ Plus* de Agilent® y posterior secuenciación con la plataforma de *Miseq*, Illumina. Dicho kit incluyó el análisis de los siguientes genes de alta y moderada penetrancia relacionados con el SCMOH: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *STK11*, *PTEN*, *CDH1*, *ATM*, *MUTYH*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RAD50*, *BLM*, *NBN*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *BARD1*, *MRE11A*, *MEN1*, *XRCC2* y *FAM175A*. Posteriormente, el personal facultativo realizó el análisis bioinformático, para el que se utilizó la plataforma Sophia DDM. Ésta se desarrolló en 2011 por Sophia Genetics para hacer frente al gran número de datos obtenidos en los análisis mediante secuenciación de nueva generación, ya que detecta, anota y pre-clasifica las variantes genómicas.

Finalmente, el doctorando llevó a cabo la clasificación molecular y clínica de las variantes obtenidas, así como el estudio de secuenciación por Sanger para la validación de las variantes patogénicas y probablemente patogénicas halladas en los CI y el estudio de familiares. Para ello se empleó la reacción enzimática dideoxi desarrollada por F. Sanger en 1977 [90], siguiendo los pasos que a continuación se detallan.

### 2.1 Selección de la región a amplificar

Para seleccionar la región a amplificar se utilizaron bases de datos como la del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) o *Ensembl* que permiten explorar las distintas regiones del gen. De esta forma se pudo localizar la posición a nivel genómico y codificante de las variantes a comprobar. Esta información se utilizó para elegir los exones a amplificar en cada uno de los genes en los que se había encontrado una variante clínicamente relevante.

## 2.2 Amplificación y purificación de ADN genómico

### 2.2.1 Diseño de cebadores o *primers*

Para asegurarnos de que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) de amplificación se realizara de forma correcta y específica nos apoyamos en una interfaz de web: *Primer3plus*. La especificidad de la unión de un primer está determinada por sus distintas propiedades como la temperatura de fusión ( $T_m$ ), el contenido de GC y su autocomplementariedad. Estos factores pueden ser calculados con *Primer3plus*, de manera que como resultado se obtiene una selección de los *primers* más adecuados para amplificar la secuencia de interés [91]. En la **Tabla 3** se detallan los cebadores utilizados para la comprobación de las variantes patogénicas o probablemente patogénicas obtenidas, especificándose el gen, la temperatura de anillamiento ( $T_a$ ) utilizada y el tamaño de los amplicones.

Gen	Exón	Ta (°C)	Cebador	Tamaño del amplicón (pb)
ATM	2	63	F5'-TTGTGCCTTTGACCAGAATG-3' R5'-GATCTCGAATCAGGCGCTTA-3'	377
	37	63	F5'-TCAAACACTATTGGGTGGATTTGTT-3' R5'-TGGGATTCCATCTTAAATCCAT-3'	287
	52	63	F5'-CCCAGTGCAGTATCTAGACAGTAA-3' R5'-AAAAGGTACGTATGTTTAAATCCAAA-3'	297
	56	63	F5'-ATTGGTTTTGAGTGCCCTTTG-3' R5'-TGTTTTTGGTGAACAAACAGAAGT-3'	247
	62	63	F5'-CTGGTTCTACTGTTTCTAAGTATGTGA-3' R5'-TGAAAAACTGACAACAGGACCTT-3'	250
CHEK2	3	64	F5'-ATTCAACAGCCCTCTGATGC-3' R5'-GGGAAAATATCTAAAAACAATGACC-3'	229
	4	63	F5'-TCTGCTATTCAAAGTCTGAAACAA-3' R5'-CACTTAAACCATATTCTGTAAGGACA-3'	283
BRIP1	7	67	F5'-CCTTTCTTACAGCCCCCTGG-3' R5'-ACTCACGTTTTTCCCATCTAGCA-3'	309
XRCC2	3	63	F5'-CTTACAGGAGTCTACTCTGAGGAAAT-3' R5'-CACACATAGGAGGATCCCTTG-3'	500
TP53	4	64	F5'-GTCCAGATGAAGCTCCCCAGA-3' R5'-GCCAGGCATTGAAGTCTCAT-3'	247

**Tabla 3.** Secuencia de los *primers* utilizados en la PCR de amplificación.

### 2.2.2 Amplificación de los exones

Se amplificaron cada uno de los exones y regiones flanqueantes de los genes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

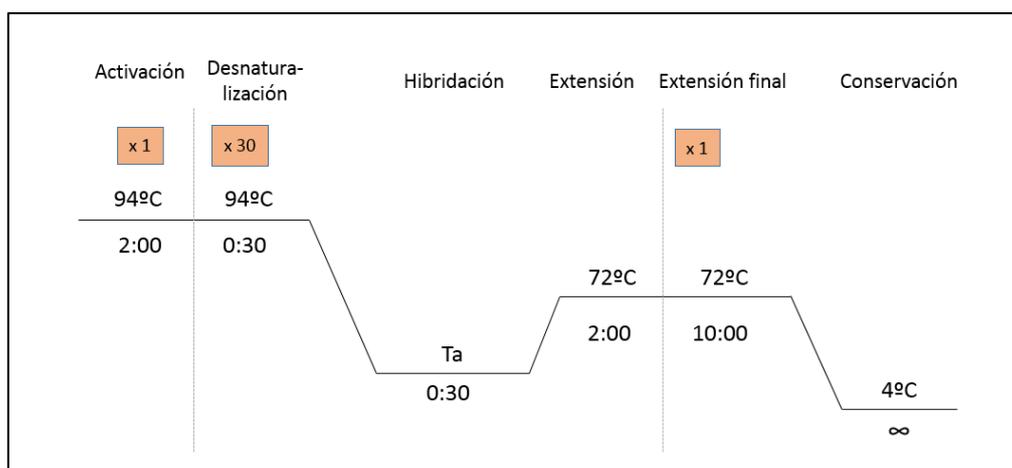
Las reacciones de amplificación se realizaron para cada uno de los fragmentos según la **Tabla 4**.

PCR	V ( $\mu$ l)	Concentración final
H <sub>2</sub> O	10,875	-
Tampón (5x)	5	1x
DNTPs (2mM)	2,5	0,2 mM
Cl <sub>2</sub> Mg (25 mM)	2	2 mM
Cebador F+R (10 $\mu$ M)	1+1	0,4 mM
Taq (5 U/ $\mu$ l)	0,125	0,625 U
ADN (20 ng/ $\mu$ l)	2,5	50 ng

**Tabla 4.** PCR de amplificación para un volumen total de 25  $\mu$ l. F: *forward*, R: *reverse*, DNTPs: deoxinucleósidos trifosfato.

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 fue 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.

La PCR se realizó en varias fases dentro del termociclador (**Figura 18**): reactivación de la polimerasa, 30 ciclos de desnaturalización de la hebra molde-anillamiento del cebador-extensión de la secuencia y extensión final.



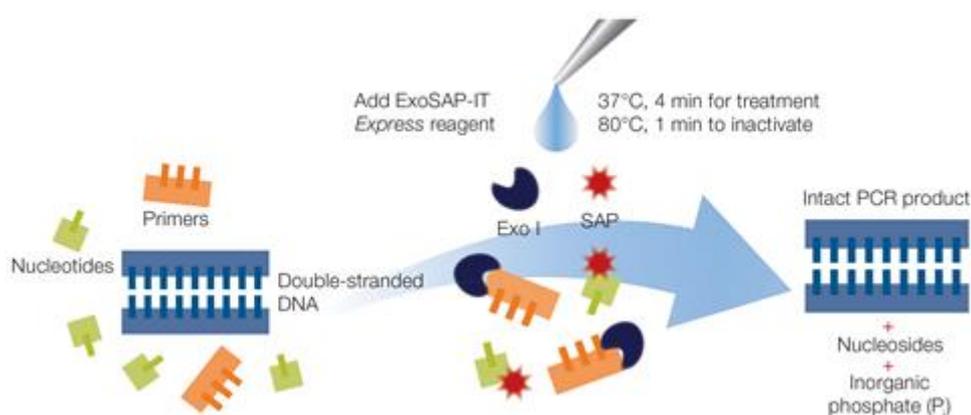
**Figura 18.** Programa utilizado en la PCR de amplificación. Ta: temperatura de anillamiento.

### Verificación de la amplificación

Para verificar la correcta amplificación de los fragmento, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con tampón TBE 1X (Tris 89mM-ácido bórico 89mM-EDTA 2mM) a pH 8.4 de Bio-Rad. Para el revelado se utilizó *GelRed* (0.1 µl *GelRed*/1 µl gel) (*GelRed Nucleic Acid Gel Satín*, 10000X en agua. Catalog number: 41003. Biotium), una solución de tinción fluorescente de ácido nucleico. Se cargaron aproximadamente 3 µl 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). Para el revelado se utilizó el sistema Genius de Syngene de captación de imágenes.

### 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 la fosfatasa alcalina, que elimina los restos de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) (**Figura 19**). Se mezclaron 5 µl de producto de reacción de PCR con 2 µl de *Exosap-It*. Con un termociclador se incubaba 15 minutos a 37°C y seguidamente 15 minutos a 80°C, consiguiéndose la inactivación de la enzima.



**Figura 19.** Purificación enzimática de la reacción de PCR con el reactivo ExoSAP-IT. Modificado de *ThermoFisher scientific*.

---

### Secuenciación automática directa

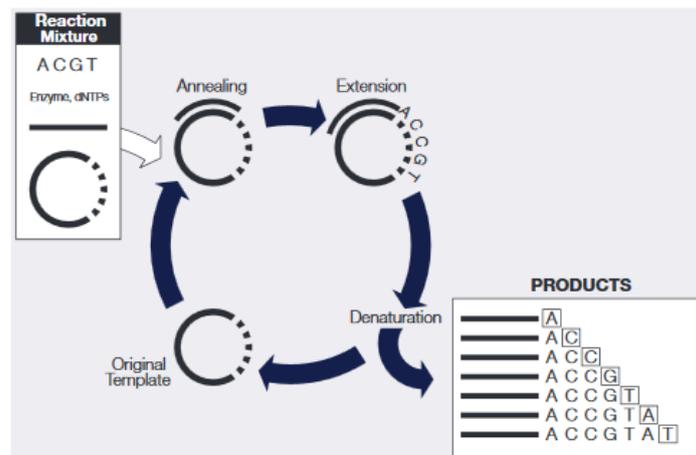
Se utilizó la secuencia automática por electroforesis capilar como técnica de comprobación de alteraciones deletéreas detectadas en el panel de genes. Se realizó una nueva PCR con el amplicón purificado empleando el Kit *BigDye Terminator* (BDt) v1.1 de *Applied Biosystems*, una adaptación de la reacción enzimática dideoxi de Sanger [90]. Las secuencias se analizaron por electroforesis capilar en el analizador ABI3130 de cuatro capilares (*Applied Biosystems*).

Para la reacción de secuenciación se utilizaron los mismos cebadores que para la PCR pero a una concentración de 3.2  $\mu\text{l}$ . Se trabajó con un volumen final de 5  $\mu\text{l}$ . (**Tabla 5**).

Reacción de secuenciación	V ( $\mu\text{l}$ )
H <sub>2</sub> O	1,5
Tampón potenciador de la secuenciación (10x)	1,5
Big Dye	0,5
Cebador F+R (3,2 $\mu\text{M}$ )	0,5
Amplicón purificado	1
Volumen total	5

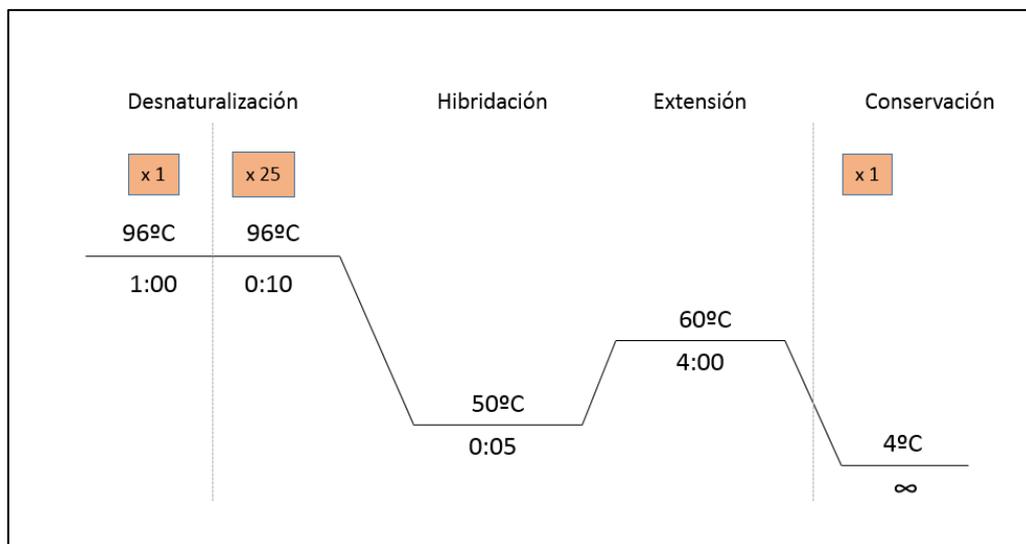
**Tabla 5.** Reacción de secuenciación. F: *forward*, R: *reverse*.

Se utilizó una mezcla de los cuatro deoxi-nucleótidos y dideoxi-nucleótidos terminadores marcados con diferentes fluorocromos. Estos últimos son utilizados como sustratos por la ADN polimerasa pero, una vez incorporados, detienen la elongación de la cadena (**Figura 20**).



**Figura 20.** Proceso de secuenciación (imagen obtenida de *ThermoFisher Scientific*)

El programa del termociclador que se utilizó para la reacción de secuenciación consta de las siguientes fases: desnaturalización y 25 ciclos de hibridación y extensión (**Figura 21**).



**Figura 21.** Programa utilizado en la reacción de secuenciación.

### Purificación de los productos de secuenciación

Tras la reacción de secuenciación se eliminaron los restos de dNTPs sobrantes y posibles impurezas.

Se utilizaron las columnas *EdgeBio Performa DTR (Dye Terminator Removal) Gel Filtration Cartridges*. El protocolo a seguir es el siguiente:

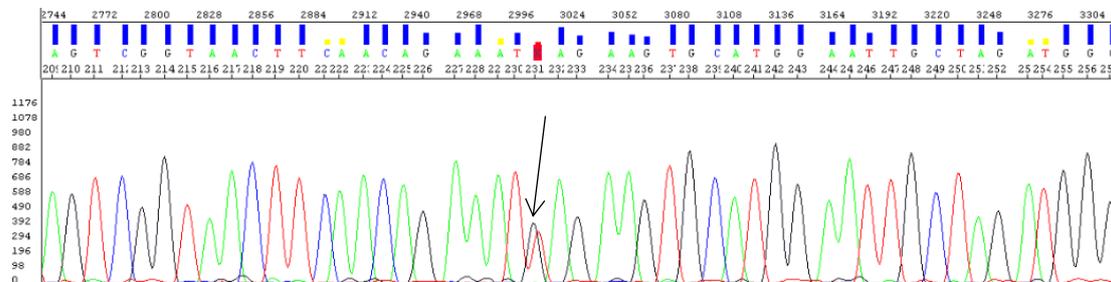
- Centrifugación de las columnas a 3000 rpm durante 2 minutos. Se elimina el agua restante y se coloca la columna en un vial de 1.5 ml nuevo.
- Se añaden 10 µl de agua miliQ a 5 µl de la reacción de secuenciación, obteniéndose un volumen final de 15 µl. Éste es depositado en el centro de la columna.
- Centrifugación a 3000 rpm durante 2 minutos.
- Se añaden 10 µl de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*) al producto eluido. De esta forma se desnaturaliza la doble hebra del ADN.
- Se traspasan las muestras purificadas a una placa de 96 pocillos (*MicroAmp™. Optical 96-Well Reaction Plate. Applied Biosystems*) adaptada para el secuenciador.

### Electroforesis capilar

Las secuencias fueron analizadas por electroforesis capilar a través del equipo ABI3130, utilizando 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*.

Las secuencias obtenidas y marcadas con fluorocromos se separaron por electroforesis capilar, la cual permite separar fragmentos cuya longitud sólo difiere en un nucleótido. Al final del capilar hay un láser que excita a las moléculas marcadas con fluorescencia y se detecta dicha fluorescencia, la cual queda registrada.

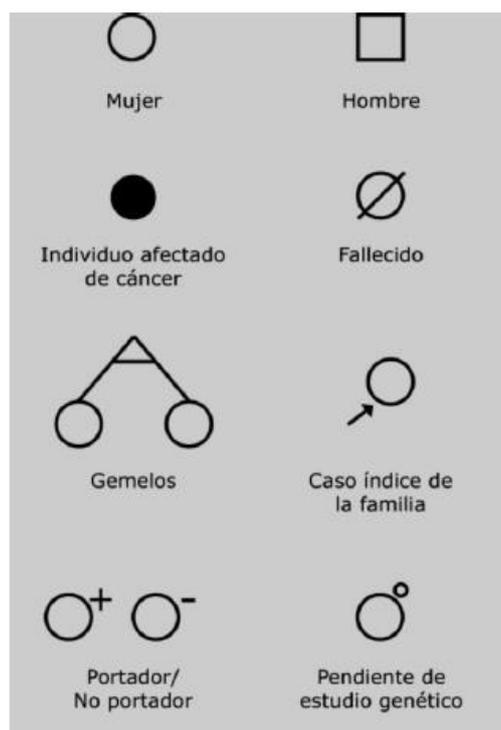
Los análisis de las secuencias se realizaron con los soportes informáticos suministrados por la casa *Applied Biosystems: Foundation Data Collection v3.0, Sequencing analysis v.5.2* y *Seqscape v.2.5* (**Figura 22**)



**Figura 22.** Imagen de un patrón electroforético en el que se observa una variante en heterocigosis de una guanina (G) en el lugar de una timina (T).

### 3. SIMBOLOGÍA DE LOS ÁRBOLES GENEALÓGICOS

En la **Figura 23** 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 por cáncer aparecen con el símbolo relleno en color negro. La línea diagonal indica que el individuo está fallecido. Dos individuos unidos por una línea transversal en la parte superior indican que se trata de gemelos univitelinos. En el caso se distingue por una flecha. El símbolo “+” se utiliza para los portadores de la variante estudiada, mientras que el símbolo “-” se refiere al no portador.



**Figura 23.** Simbología empleada en la configuración de árboles genealógicos.

#### 4. SECUENCIAS DE REFERENCIA UTILIZADAS

En la **Tabla 6** se muestran el transcrito utilizado para cada gen. En aquellos en los que se utilice más de una secuencia de referencia distinta, se indicará dado el caso.

<b>GEN</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>GEN</b>	<b>SECUENCIA</b>
<i>ATM</i>	NM_000051.3	<i>MSH6</i>	NM_000179.2
<i>BARD1</i>	NM_000465.3	<i>MUTYH</i>	NM_001128425.1
<i>BLM</i>	NM_000057.2	<i>NBN</i>	NM_002485.4
<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	<i>PALB2</i>	NM_024675.3
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	<i>PMS2</i>	NM_000535.5
<i>BRIP1</i>	NM_032043.2	<i>PTEN</i>	NM_000314.4
<i>CDH1</i>	NM_001317184.1	<i>RAD50</i>	NM_005732.3
<i>CHEK2</i>	NM_007194	<i>RAD51C</i>	NM_058216.1
<i>FAM175A</i>	NM_139076.2	<i>RAD51D</i>	NM_001142571.1
<i>MEN1</i>	NM_130804.2	<i>TP53</i>	NM_000546.5
<i>MLH1</i>	NM_000249.3	<i>XRCC2</i>	NM_005431.2
<i>MSH2</i>	NM_000251.2		

**Tabla 6.** Secuencias de referencia utilizada para cada gen

## 5. CATEGORIZACIÓN DE VARIANTES

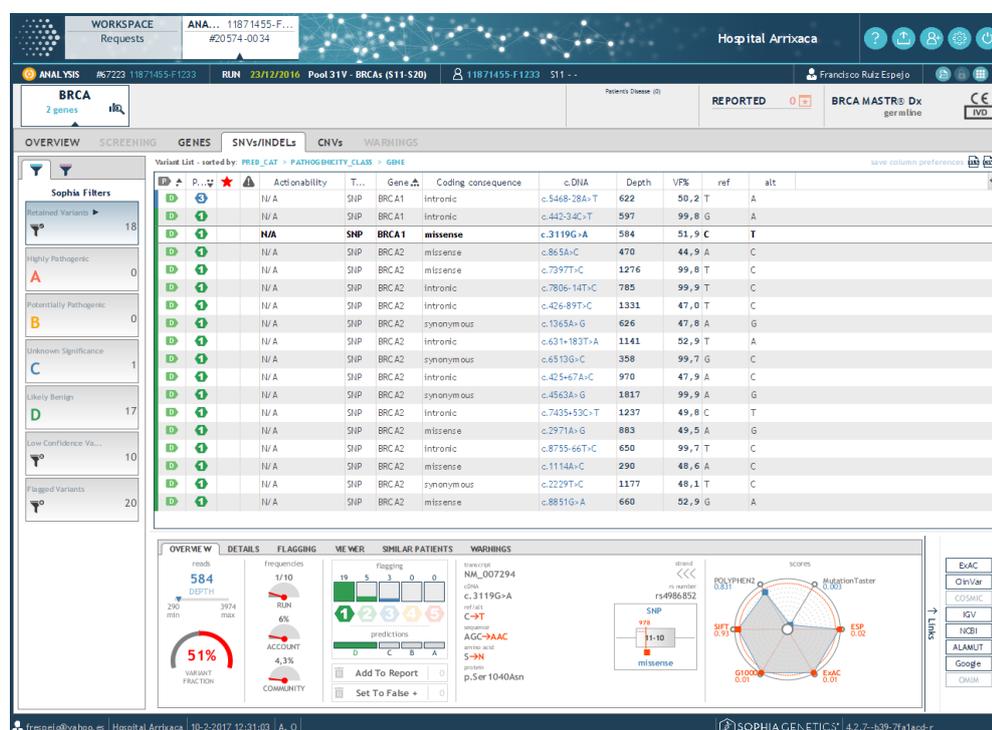
Dicha clasificación realizó tanto desde el punto de vista molecular, en función de cómo afecta el cambio a la estructura del gen o de la proteína que traduce éste; como desde el punto de vista clínico, según la implicación que dicha variante tenga en el desarrollo de una determinada enfermedad.

### 5.1 Análisis molecular

A continuación se detallan las herramientas web utilizadas para el análisis molecular de las variantes:

- Plataforma *Sophia DDM*. Dicha plataforma fue desarrollada por Sophia Genetics y mostró la lista de variantes encontradas en cada paciente junto con información técnica como el número de lecturas y la profundidad de lectura, así como una serie de detalles de cada una de ellas: posición en el codificante, la secuencia de referencia utilizada, el exón en el que se encontró, el número identificativo en *reference SNP* en el caso de que la variante estuviese registrada en la base de datos dbSNP y datos de

frecuencias en la población (**Figura 24**). En este estudio se tuvieron en cuenta sólo las variantes con una frecuencia alélica mayor o igual a 20.



**Figura 24.** Interfaz del software Sophia DDM.

- *Mutalyzer*. Para nombrar las distintas variantes localizadas se utilizó la nomenclatura que sigue la normativa propuesta por la *Human Genome Variation Society* (HGVS). Con el fin de hacerlo correctamente, se empleó la herramienta web *Mutalyzer*.
- *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se trata de una plataforma pública estadounidense que promueve la ciencia y la salud al proporcionar acceso a información biomédica. Dispone de una gran cantidad de recursos y bases de datos que abarcan distintos ámbitos de conocimiento:
  - *Gene* y *Protein*: Se utilizaron para la comprobación de la posición de la variante a nivel de genómico, codificante y proteína.
  - *dbSNP*: es un repositorio central de variantes génicas en diferentes especies. En ella se incluyen variaciones de un único nucleótido, pequeñas inserciones y deleciones, así como

microsatélites, entre otros. Se utilizó para identificar las variantes ya que cada una tiene su propio y único código rs o *RefSNP clúster*.

- *Ensemb Genome Browser*. Es un navegador genómico para genomas de vertebrados que apoya la investigación sobre la evolución, la comparación de genomas, así como de la variación de secuencias, entre otros. Es un sistema de almacenamiento, acceso y manipulación de ensamblajes del genoma. Además, recoge datos sobre distintas enfermedades [92]. El proyecto comenzó en 1999 ante la inminente finalización del Proyecto Genoma Humano con el fin de proporcionar y centralizar recursos para genetistas y biólogos moleculares que estudiaban el genoma humano. Desde el año 2000 se ha utilizado para para la anotación y visualización de genomas de vertebrados, así como para integrar dichas anotaciones con otros datos biológicos disponibles y publicar toda esta información de manera gratuita. Actualmente, en su versión 94 incluye información de más de 120 especies distintas, siendo las más consultadas la de humano, ratón y pez cebra. Se utilizó para localizar las variantes halladas en una determinada secuencia genómica, transcrito o secuencia proteica.

## 5.2 Análisis clínico

Mediante la búsqueda exhaustiva en las siguientes bases de datos y el empleo de distintas herramientas *in silico*, las variantes se categorizaron de acuerdo a un sistema de cinco categorías asociado a recomendaciones clínicas [79]. Las categorías fueron las siguientes:

- Variantes benignas: carecen de relevancia clínica ya que no modifican el riesgo de padecer la enfermedad.
- Variantes probablemente benignas.
- Variantes de significado clínico desconocido: aquellos cambios cuya influencia en la susceptibilidad a presentar la enfermedad no están aún establecidas.
- Variantes probablemente patogénicas.
- Variantes patogénicas: variantes causantes de la enfermedad de estudio. Suelen ser cambios sin sentido o que alteran el marco de lectura, grandes

deleciones o que producen una inactivación completa por alteración en el *splicing*.

Para llevar a cabo esta clasificación se utilizaron los criterios de la guía clínica del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG). Estos criterios de clasificación presentan distintos grados de evidencia de patogenicidad (**Tabla 7**) y de benignidad (**Tabla 8**). De forma que mediante un algoritmo que utiliza la combinación de ambos se pueden clasificar las variantes (**Tabla 9**).

Evidencia de patogenicidad	Categoría
<b>Muy fuerte</b>	<p>PVS1: variante nula (sin sentido, con alteración del marco de lectura, se alteran <math>\pm 1</math> sitios de <i>splicing</i>, codón de inicio, deleción de uno o varios exones) en un gen en el que la pérdida de función es un mecanismo conocido de enfermedad</p> <p>Advertencias:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Atención a los genes en los que la pérdida de función no es un mecanismo conocido de enfermedad.</li> <li>- Precaución a la hora de interpretar las variantes con pérdida de función en el extremo 3' o al final del gen.</li> <li>- Atención en las variantes de <i>splicing</i> que predicen la pérdida de un exón pero que dejan intacta el resto de la proteína.</li> <li>- Precaución cuando haya presencia de múltiples transcritos.</li> </ul>
<b>Fuerte</b>	<p>PS1: El mismo cambio de aminoácido ha sido establecido como variante patogénica independientemente del cambio de nucleótido.</p> <p>Advertencia: precaución con los cambios que afectan el <i>splicing</i> en lugar de un cambio a nivel proteico.</p> <p>PS2: Variante <i>de novo</i> en una paciente con la enfermedad pero sin historia familiar (se debe confirmar tanto la maternidad como la paternidad).</p> <p>PS3: Estudios funcionales <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> bien establecidos que apoyen el efecto dañino en el gen o su producto.</p> <p>PS4: La prevalencia de la variante en individuos afectados está incrementada significativamente al compararla con la prevalencia en los controles.</p>

Evidencia de patogenicidad	Categoría
<b>Moderado</b>	PM1: Localizado en un punto caliente mutacional y/o un dominio funcional bien establecido.
	PM2: ausente en controles en el proyecto 1000 Genomas, <i>Exome Sequencing Project</i> o <i>Exome Aggregation Consortium</i> .
	Advertencia: los datos poblacionales para inserciones/deleciones pueden ser poco adecuados si se obtienen por secuenciación de nueva generación.
	PM3: para enfermedades recesivas, detectada en trans con una variante patogénica.
	PM4: la longitud de la proteína cambia como resultado de inserción/delección en zonas no repetidas o por variantes con pérdida del codón de parada.
	PM5: Nueva variante de tipo <i>missense</i> en el mismo residuo don de un cambio <i>missense</i> distinto se ha definido como patogénico.
<b>Secundario</b>	PP1: Consegregación de la variante con la enfermedad en varios familiares afectados en un gen relacionado con la enfermedad.
	PP2: Variante <i>missense</i> en un gen con una baja tasa de variantes <i>missense</i> benignas y en el que las variantes tipo <i>missense</i> son un mecanismo común de enfermedad.
	PP3: Varias líneas de evidencia computacional apoyan un efecto deletéreo en un gen o su producto.
	Advertencia: dado que muchos algoritmos <i>in silico</i> usan la misma entrada o parecidas cada algoritmo no debe contabilizarse como un criterio independiente.
	PP4: El fenotipo del paciente o la historia familiar es altamente específica para una enfermedad con una única etiología genética.
	PP5: Fuentes reconocidas informaron de manera reciente dicha variante como patogénica, pero no hay evidencia disponible para que el laboratorio realice una evaluación independiente.

**Tabla 7.** Criterios para clasificar variantes patogénicas

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

**Tabla 8.** Criterios para clasificar variantes benignas

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

**Tabla 9.** Reglas de combinación de criterios para clasificar 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 éstas habían sido previamente descritas además de conocer su significado patológico:

- *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se utilizaron los siguientes recursos:
  - o La base de datos *dbSNP*. En este caso se utilizó para obtener información sobre el posible efecto fisiopatológico de las variantes y de su frecuencia en distintas poblaciones (*GnomAD*, 1000 Genomas, *ExAC*).

- La base de datos *ClinVar* es un archivo público de informes sobre el vínculo entre variantes génicas en humanos y el fenotipo resultante, con evidencia que lo justifique. *ClinVar* procesa diversas presentaciones de variantes encontradas en muestras de pacientes, así como afirmaciones sobre su significado clínico, información sobre el grupo que ha clasificado dicha variante y otra información adicional. Se utilizó para clasificar la relevancia clínica las diversas variantes halladas en el estudio genético, así como para presentar las variantes encontradas que no habían sido descritas previamente.
- *LitVar* es una base de datos de artículos científicos. Permite la búsqueda de información relevante de determinadas variantes en la literatura biomédica disponible. Sus resultados se extraen automáticamente de artículos disponibles en *PubMed*. Se utilizó para consultar la evidencia disponible en la bibliografía sobre las variantes encontradas en el análisis genético.
- *Human Gene Mutation Database (HGMD)*. Constituye una recopilación exhaustiva de datos de mutaciones germinales en genes asociados con enfermedades hereditarias humanas. Entre los datos catalogados se incluyen sustituciones de una única base en regiones codificantes, reguladoras o importantes para el *splicing*, microdeleciones, microinserciones, inserciones-deleciones, expansiones de repeticiones, así como grandes deleciones e inserciones, duplicaciones y grandes reordenamientos. Nos permite conocer citas bibliográficas de cada variante.

Además, se emplearon distintas herramientas bioinformáticas que, junto las bases de datos previamente mencionadas, fueron de gran utilidad para interpretar clínicamente las variantes. Hay una gran variedad de herramientas *in silico* que utilizan diferentes algoritmos y pueden presumir la importancia de la alteración tanto a nivel de nucleótido como a nivel de aminoácido. Estos programas se pueden dividir en dos grupos: aquéllos que predicen si el cambio es perjudicial para la función o estructura de la proteína resultante y los que predicen si se altera el *splicing*. Las herramientas del primer grupo estudian

varias características como los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos sustituidos, el grado de conservación evolutiva, el entorno de la secuencia del aminoácido afectado o la alteración en las propiedades estructurales de la proteína. En cuanto al segundo grupo, ejecutan distintos algoritmos que permiten identificar secuencias que pueden funcionar como donadores y aceptores de *splicing*. Utilizan los conocimientos actuales en cuanto a la composición de secuencias en los sitios de empalme y asignan un valor determinado a la probabilidad de que la posición estudiada esté un uno de estos sitios, ayudando a predecir el efecto de la variante sobre este proceso de *splicing*.

A continuación se describen las principales herramientas utilizadas, englobadas principalmente en dos *software* de apoyo a decisiones: *Alamut® Visual* y *Varsome*.

### 5.2.1 Alamut® Visual 2.11

*Alamut® Visual* es un navegador de genes humanos que presenta anotaciones relevantes de bases de datos públicas como NCBI o UCSC y obedece a la nomenclatura HGVS. Engloba un gran conjunto de herramientas de predicción que ayudan a determinar el impacto funcional de las variantes estudiadas.

A continuación se describen las herramientas bioinformáticas incluidas en este *software* que se emplearon en la clasificación clínica de las variantes.

Entre los que estudian el grado de conservación evolutiva y el impacto en la función de la proteína se encuentran los siguientes:

a) *Grantham matrix score* o distancia *Grantham*

Se trata de una fórmula que permite calcular diferencias entre aminoácidos. Combina propiedades fisicoquímicas como son la composición, polaridad y el volumen molecular y se obtiene un resultado de valor numérico que oscila entre 5 (la menor variación, como sería el intercambio de leucina por isoleucina) y 215 (el mayor cambio, que sería el intercambio de entre cisteína y triptófano). Una puntuación elevada indica una gran diferencia entre los dos aminoácidos [93].

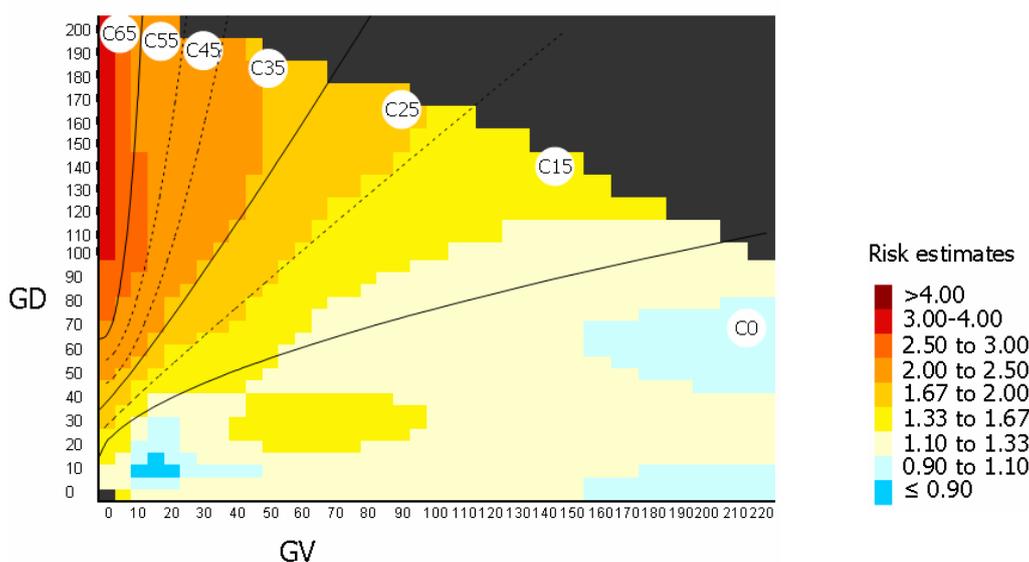
Esta puntuación se utilizó para evaluar el efecto de una sustitución de un aminoácido por otro en las variantes *missense*.

Hay múltiples herramientas que calculan el grado de conservación de un residuo. Para ello se realiza un alineamiento de secuencias múltiples genómicas o de proteínas de distintas especies con respecto a las del humano. Dentro de estas herramientas, las más conocidas y utilizadas son *Align-GVGD* y *SIFT*, las cuales se describen a continuación.

*b) Align-Grantham Variation Grantham Deviation (Align-GVGD)*

*Align-GVGD* es un algoritmo que combina las características biofísicas de los aminoácidos y el alineamiento de secuencias múltiples para predecir el efecto de las variantes tipo *missense*.

Es una extensión de la distancia de *Grantham*. Utiliza dos métodos para cuantificar el grado de conservación basadas en el alineamiento múltiple de secuencias (MSA, *multiplex sequence alignment*). El grado de variación bioquímica entre aminoácidos en un determinado MSA es convertida en una puntuación de variación *Grantham* (GV, *Grantham Variation*), mientras que la desviación de *Grantham* (GD, *Grantham Deviation*) refleja la distancia bioquímica entre el aminoácido mutante y el original. Posteriormente estos dos valores se combinan para predecir el efecto de cada sustitución, obteniéndose un resultado entre los siguientes C0, C15, C25, C35, C45, C55 y C65; siendo C0 el que tiene una menor probabilidad de alterar la función, y C65 el que más [94]. En la **Figura 25** se representa gráficamente las clases de conservación posibles de las variantes tras el cálculo de estas variables.



**Figura 25.** Gráfica de los grados de conservación *Align-GVGD* en función de las variables *GD* y *GV*.

### c) *Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)*

Se trata de un algoritmo que predice el impacto potencial de la sustitución de aminoácidos en la función de la proteína. Clasifica este efecto como tolerada o deletérea. Para ello tiene en cuenta la conservación evolutiva de la proteína al compararla con secuencias homólogas, así como la severidad del cambio de aminoácido. Éste algoritmo asume que hay determinadas posiciones de una secuencia proteica que tienen importancia en su función y, por tanto, han sido conservadas a lo largo de la evolución. En consecuencia, una sustitución en estas posiciones podría afectar la función de la proteína. De este modo, puede predecir los efectos de todas las sustituciones posibles en cada posición de la secuencia [95].

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

Este *software* predice el impacto de las sustituciones de aminoácidos en la estabilidad y función de las proteínas humanas teniendo en cuenta aspectos estructurales y evolutivos. Realiza anotaciones funcionales de cambios de un solo nucleótido o *SNPs*, mapea la codificación de estos *SNPs* a transcritos génicos, extrae anotaciones sobre las secuencias proteicas y sus características

estructurales y construye perfiles de conservación. La información sobre la secuencia proteica la obtiene de la base de datos *UniProtKB*, mientras que los datos sobre la estructura tridimensional provienen de anotaciones de la base de datos *DSSP (Dictionary of Secondary Structure in Proteins)* y otros son calculados por el propio *software*. Teniendo en cuenta todas estas propiedades se estima la probabilidad de que una variante *missense* sea dañina.

Para predecir el efecto funcional del cambio se utiliza un algoritmo *Naïve Bayes* desarrollado mediante aprendizaje automático supervisado. Para ello se utilizaron dos pares de conjuntos de datos [96]:

- *HumDiv*: a partir de la base de datos *UniProtKB* recoge todos los alelos dañinos con efectos conocidos en la función molecular y que producen enfermedades Mendelianas. Además recoge diferencias entre proteínas humanas y sus homólogos en los mamíferos más cercanos que son asumidas como neutrales.
- *HumVar*: está compuesta por todas las mutaciones causantes de enfermedad disponibles en *UniProtKB*, así como *SNPs* no sinónimos con una frecuencia del alelo menos común (*MAF, minor allele frequency*) mayor del 1% sin vínculo con enfermedades.

Clasifica las variantes de forma cualitativa como benignas, posiblemente dañinas o probablemente dañinas en función de los límites de ratio de falsos positivos optimizados para cada uno de los dos modelos.

#### e) *MutationTaster*

Es una aplicación que se utiliza para evaluar el potencial de una variante para causar enfermedad. Lleva a cabo una serie de test *in silico* para estimar el impacto de la variante tanto a nivel de ADN como de proteína. Entre ellos se incluyen análisis de conservación, alteraciones de *splicing*, pérdida de las características de la proteína y cambios que afecten a la cantidad de ARNm. Posteriormente los resultados se evalúan por un algoritmo *Naïve Bayes* que predice el potencial deletéreo.

Dependiendo de la naturaleza de la alteración, *MutationTaster* elige entre tres modelos de predicción: para variantes sinónimas, para variantes tipo *missense* y para cambios complejos de la secuencia de aminoácidos [97].

La versión más actual, *MutationTaster2*, incluye todos los *SNPs* e *indels* del proyecto 1000 Genomas, así como aquéllas que ya son conocidas como causantes de enfermedad en *ClinVar* y *HGMD Public*. Para reducir el número de falsos positivos en el estudio de posibles variantes que afecten al *splicing*, *MutationTaster2* sólo tiene en cuenta las que se encuentren en los bordes entre intrón y exón.

Su principal limitación es el estudio de variantes intragénicas. Además, se ha diseñado para la identificación de variantes con un impacto importante (por ejemplo, en enfermedades monogénicas), mientras que no pretende predecir consecuencias de variantes comunes con efectos leves [98].

Seguidamente, se describen aquellas herramientas utilizadas para predecir un posible impacto en el *splicing*:

a) *MaxEntScan*

Es un método basado en el principio de máxima entropía, desarrollado en el instituto tecnológico de Massachusetts y descrito en 2004. Se basa en la capacidad de modelar las secuencias de motivos cortos involucrados en el *splicing* de ARN y tiene en cuenta tanto las dependencias adyacentes como las no adyacentes.

Se utilizan modelos de sitio de empalme para el sitio 5', para el que se utilizan secuencias de pares de bases (pb); y para el sitio 3', para el que se usan 23 pb. Se asigna un log odd ratio (MAXENT score), cuya puntuación es mayor al incrementarse la probabilidad de que esta secuencia se trate de un verdadero sitio de empalme [99].

b) *Splice Site Prediction By Neuronal Network (NNSplice)*

Se trata de un método de reconocimiento de sitios de empalme. Éste utiliza dos redes neurales basadas en frecuencias de dinucleótidos. Analiza la estructura de los sitios donadores y aceptores utilizando estas redes de forma separada para reconocer cada sitio [100].

### c) *Splice Site Finder (SSF)*

Es un método basado en matrices de peso de posición calculadas a partir de un conjunto de uniones exón-intrón humanos constitutivos donadores (tanto GT como GC) y aceptores. Se utilizan las matrices descritas por Zhang et al y los algoritmos descritos por Shapiro et al. Estos predicen potenciales exones utilizando puntuaciones basadas en tablas de peso de nucleótidos. Además de encontrar la mayoría de los exones conocidos, también predice potenciales exones que se utilizarían en situaciones de *splicing* alternativo [101].

### d) *GeneSplicer*

Es un sistema para detección de sitios de empalme en ADN genómico de varias especies eucariotas. Para ello se combinan diversas técnicas de detección de lugares de empalme, como los modelos de Markov [102].

En cuanto a las predicciones sobre el efecto en el *splicing* proporcionadas por el *Software Alamut® Visual*, sólo se consideraron relevantes aquéllas en las que al menos dos de las cuatro herramientas bioinformáticas utilizadas coincidieron en la interpretación, siempre y cuando el resto no proporcionasen una predicción opuesta [103]. Además, sólo se tuvieron en cuenta aquellas que predecían un cambio cerca del borde intrón-exón ( $\pm 12$  pb), descartándose aquéllas que predecían un cambio en zona exónica alejada de los bordes exón-intrón, así como las que predecían un alteración en un sitio consenso muy lejano del nucleótido donde se produce el cambio.

## 5.2.2 *Varsome*

Es una herramienta de búsqueda de variantes genómicas humanas que permite investigar las variantes en su contexto genómico, recoge datos de múltiples bases de datos y aspira a que la comunidad comparta su conocimiento sobre variantes.

*Varsome* incluye información de 30 bases de datos externas que describen más de 500 millones de variantes. Además, los resultados no se limitan a variantes conocidas, sino que se puede introducir cualquier tipo de variante en formato HGVS o localización genómica.

Por otro lado, la patogenicidad se determina utilizando un clasificador automático que evalúa las variantes según las guías de la ACMG. De esta forma las clasifican como patogénicas, probablemente patogénicas, probablemente benignas, benignas o de significado clínico desconocido. Además, permite modificar manualmente aquellos criterios dependientes de la familia. Por lo tanto, la clasificación otorgada por *Varsome* se revisó en función de las características de la familia.

A continuación se resumen las principales herramientas de predicción incluídas por *Varsome*.

Entre los que estudian el grado de conservación evolutiva y el impacto en la función de la proteína se encuentran los siguientes:

- a) *DANN*. Es un método de puntuación basado en un algoritmo de redes neurales profundas que fue desarrollado en la Universidad de California. Esta herramienta prioriza las variantes causales putativas, como las derivadas del estudio de asociación del genoma completo (GWAS). El rango de valores oscila entre 0 y 1, siendo 1 la mayor posibilidad de ser patogénica [104].
- b) *MutationTaster*: previamente explicado
- c) *FATHMM* y *FATHMM-K*. El nombre proviene de las siglas de análisis funcionales mediante el modelo oculto de Markov. Predice efectos de mutaciones *missense* y se basa en una combinación de conservación de secuencias y pesos de patogenicidad. *MKL* añade al *FATHMM* original la posibilidad de predecir efectos no codificantes al integrar información funcional de ENCODE [105].
- d) *MetaSVM* y *MetaLR*. Son métodos de puntuación conjunto que integra los valores de nueve herramientas de predicción y frecuencias alélicas. El primero utiliza un método de soporte meta-analítico que integra distintos datos, con lo que es capaz de detectar genes asociados a enfermedades a lo largo de distintos estudios. El segundo utiliza un método de regresión logística. Ambas han sido probadas en más de 36000 variantes de *UniProt* [106].

- e) *GERP (Genomic Evolutionary Rate Profiling)*. Es una puntuación de conservación calculada mediante cuantificación de déficits de sustitución a lo largo de múltiples alineamientos de ortólogos. Se utiliza el genoma de 35 mamíferos [107].
- f) *Phylogenetic P-values* y *phastCons: PhyloPway* y *phastConsway*. Son programas que proporcionan puntuación de conservación basada en múltiples alineamientos dados por un árbol filogenético que predice la tasa de evolución comparada con lo que se espera de la deriva natural. Utiliza distribuciones del número de sustituciones basadas en el modelo oculto de Markov. *PhyloP20way* se basa en el alineamiento múltiple de secuencias de 19 genomas de mamíferos con el genoma humano, mientras que *PhyloP100way* utiliza 99 secuencias de genomas de vertebrados. A mayor puntuación, más conservado está el residuo [108, 109].
- g) *SiPhy* (análisis filogenético específico de situación). Es una herramienta de conservación que emplea secuencias genómicas profundas de 29 mamíferos para detectar bases que han sido seleccionadas evolutivamente. Esto le permite estimar tanto los patrones de sustitución poco probables así como las desaceleraciones y aceleraciones de las tasas de mutación. Modela la conservación no sólo como una disminución en la tasa de mutación sino que también tiene en cuenta el patrón de las mutaciones [110].
- h) *Fitcons-gm (FITness CONSequences of functional annotation)*. *Fitcons* identifica regiones genómicas que están bajo presión selectiva. Integra señales epigenómicas de tres líneas celulares, utilizando *Fitcons-gm* la línea celular GM12878 [111].
- i) *LRT (likelihood ratio test)*. Predice variaciones deletéreas mediante la identificación de regiones proteicas altamente conservadas utilizando conjuntos de datos de genómica comparativa de 32 especies vertebradas [112].
- j) *Mutation assessor*. Predice el impacto funcional de cambios en la proteína mediante el grado de conservación de homólogos de esta proteína [113].
- k) *SIFT*: descrito previamente

- l) *Provean*. Es una herramienta *in silico* que predice cómo las variantes afectan a la función biológica de la proteína. Esta predicción se basa en puntuaciones derivadas de alineamientos de secuencias por pares entre la secuencia problema y las secuencias relacionadas a nivel proteico [114].

A continuación se describen aquellas herramientas incluidas en *Varsome* que se utilizaron en la predicción de un posible impacto en el *splicing*:

- a) *dbSNV* (*database splicing consensus single nucleotide variant*). Incluye todas las variantes (aproximadamente 15 millones) en las regiones de consenso de *splicing*. El modelo se desarrolló a partir de siete herramientas de predicción de *splicing* previamente existentes [115].

### 5.2.3 Otras herramientas de predicción utilizadas

- a) *pMut*.

Esta herramienta, lanzada por primera vez en 2005, utiliza un clasificador basado en una red neural que utiliza datos en batería extraídos de *SwissProt*, utiliza secuencias de conservación y predicción de cambios en las propiedades fisicoquímicas, así como información sobre interacción entre proteínas como características principales.

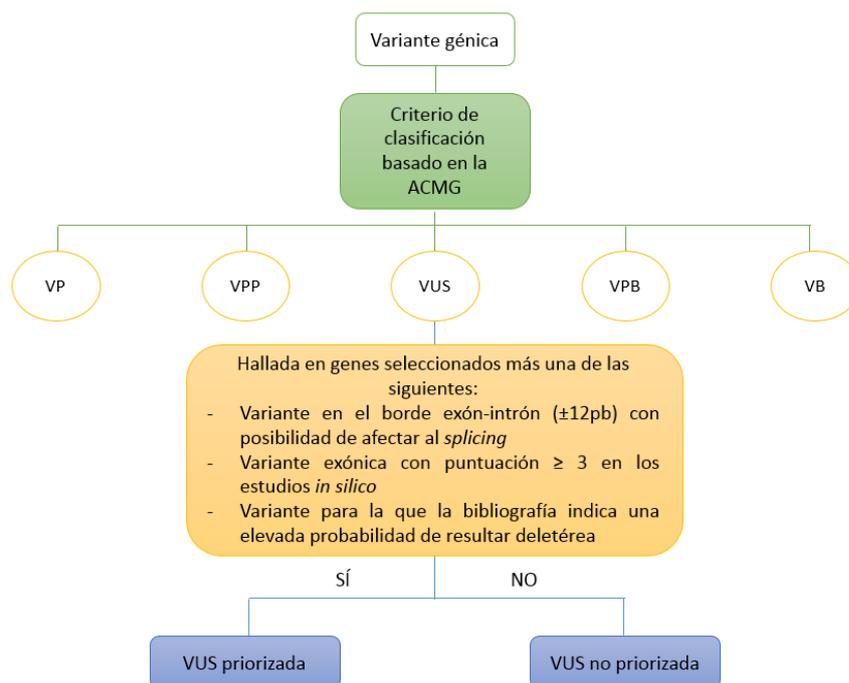
Las características de conservación derivan de buscadores de clústeres como *UniRef100* y *UniRef90*, utilizando *PSI-Blast* y también múltiples alineaciones de secuencias generadas utilizando *Kalign2*. El clasificador proporciona una puntuación entre 0 y 1, siendo neutrales las variantes con un valor entre 0 y 0.5, mientras que las que dan un valor entre 0.5 y 1 se clasifican como patológicas. La precisión aumenta con puntuaciones extremas [116].

### 5.3 Priorización de las variantes de significado clínico desconocido halladas

Una vez clasificadas las variantes halladas, se realizó una priorización de aquellas VUS que tenían un mayor riesgo de tener un efecto deletéreo en la proteína. Para ello se utilizaron unos criterios basados en los utilizados por Bonache y colaboradores[80] (**Figura 26**). Se seleccionaron las variantes

halladas en genes en los que se había establecido un riesgo incrementado de CM (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *STK11*, *TP53*, *PTEN*) y cáncer ginecológico (*BARD1*, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*) [117]. Además, deben de cumplir al menos uno de los siguientes criterios:

- Aquellas variantes que, por encontrarse en el borde exón-intrón ( $\pm 12$  pb), podían alterar el *splicing*. No se priorizaron si las herramientas *in silico* incluidas en *Varsome* y *Alamut* las predijeron como benignas o si había bibliografía disponible que previamente confirmara su benignidad.
- Aquellas variantes exónicas que obtuvieron una puntuación de 3 o mayor al sumar las herramientas *in silico* indicadas en la **Tabla 17** (*SIFT*, *PolyPhen-2*, *Mutation Taster*, *Align GV-GD*, *Grantham*, *Pmut* y *Varsome*) que apoyaban la patogenicidad de la variante. Se siguió el siguiente criterio:
  - *SIFT* (D), *Polyphen-2* (PRD, probablemente dañina), *Mutation Taster* (CE, causante de enfermedad), *Align GV-GD* (C45, C55 y C65), *Grantham* (Large), *Pmut* (D), *Varsome* (D): 1 punto
  - *Polyphen-2* (PSD, posiblemente dañina), *Align GV-GD* (C35) *Grantham* (Moderate): 0,5 puntos
- Aquéllas variantes en las que se encontró bibliografía que indicaba un posible efecto deletéreo de ésta en la función de la proteína. Para revisar la bibliografía se utilizó *LitVar*, *PubMed* y *Varsome*.



**Figura 26.** Algoritmo utilizado para clasificar las variantes con significado clínico desconocido como VUS priorizadas o VUS no priorizadas.

## 6. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES

La técnica de microsatélites se utilizó para el estudio de tres familias aparentemente no emparentadas entre sí y que fueron portadoras de una misma mutación en ATM (c.8251\_8254del). El objetivo era demostrar la existencia de un efecto fundador al compartir un ancestro común.

En total se estudiaron nueve individuos de estas tres familias, de los cuales ocho fueron portadores de la mutación c.8251\_8254del.

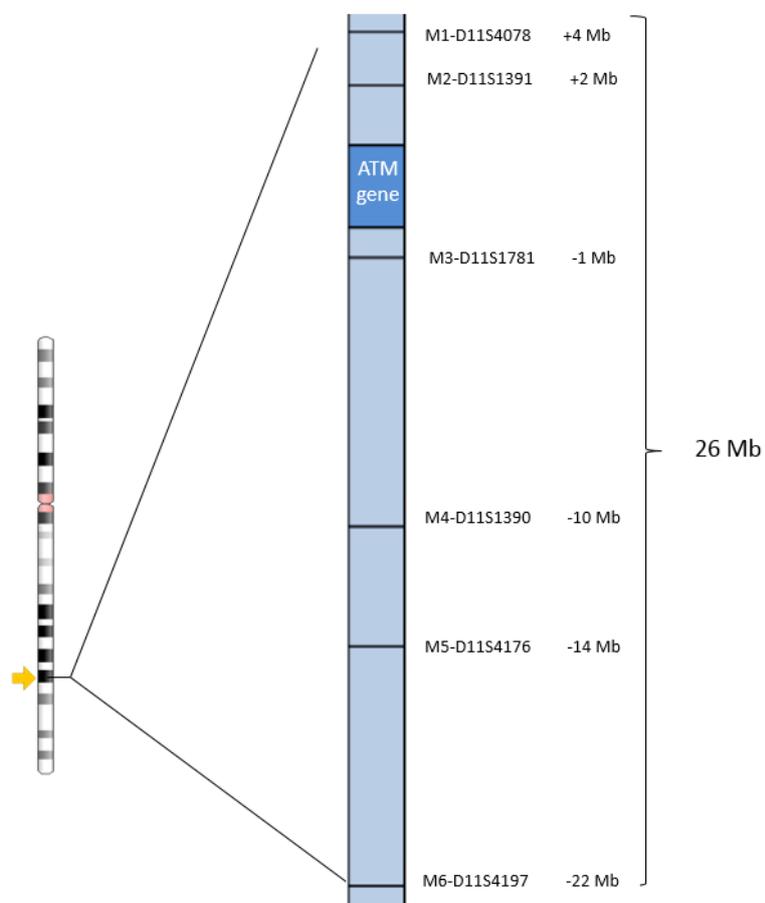
Para ello se realizó un análisis del haplotipo utilizando como marcadores los siguientes microsatélites o pequeñas repeticiones en tándem (STR, *short tandem repeats*) en el cromosoma 11q22-23: D11S4078, D11S1391, D11S1781, D11S4159, D11S4108, D11S1782, D11S1390, D11S4141, D11S4176, D11S1332, D11S4197 y D11S4959. Para encontrar dichos marcadores se utilizó el navegador genómico *Ensembl* que permite explorar las regiones flanqueantes del gen en busca de marcadores de distintos tipos. Además, enlaza directamente con la base de datos de sondas (*Probe*) de la NCBI (*National Center for*

*Biotechnology Information*), donde se encuentran las secuencias de cebadores de amplificación de los STR. El tamaño de los alelos de los marcadores polimórficos utilizados para construir los haplotipos se encuentran en la **Tabla 10** mientras que la localización de estos con respecto al gen está representada en la **Figura 27**.

De los STR estudiados, se desecharon aquéllos que no amplificaron correctamente. Finalmente se seleccionaron los siguientes STR: M1 (D11S4078), M2 (D11S1391), M3 (D11S1781), M4 (D11S1390), M5 (D11S4176) y M6 (D11S4197), los cuales se estudiaron también en 24 controles sanos procedentes de una genoteca disponible en el laboratorio con objeto de demostrar que el haplotipo común no se encontraba en población control, así como para estimar la antigüedad de dicha variante.

MARCADORES MICROSATÉLITES EN ATM			
STR	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Tamaño alelo (pb)
D11S4078	[6FAM]AGGCTAACCAGCCAACATT	CGGGCTATAAACTCAAGTCTC	135-159
D11S1391	[6FAM]TGCATGCATACATACATACATA	CATCCATCCCTCTGTCTCTG	158-178
D11S1781	[6FAM]AGCTGTTCTTGTCACAGGAGAG	ACAAATTGTCAGTGCCCC	243-251
D11S4159	[6FAM]CCGGAGAGCAGTTTGTGT	ATTCGGAGCCACTCCCT	164-200
D11S4108	[6FAM]TGGCAAGTGGCAGGAT	GCCCATAGATGGATGAGTAGA	113-131
D11S1782	[6FAM]AAAGTATGGCCTCTATCCAAA	AGCTTCATTATGTGAGGAGTAAATA	160-170
D11S1390	[6FAM]GGGTGGAATCCTTCAGAATT	AAATATTACCGGGCTTGGAC	145-165
D11S4141	[6FAM]GCCTTCCTACTTCTGTTCTG	ATGGAGGCTGTCAAAGATT	166-186
D11S4176	[6FAM]AGACTCTCTCGTCCTCAGGG	GGGTAGCACTCCCAGGTT	224-254
D11S1332	[6FAM]TATTAGGCAGGGTTTCCAGA	CTTACAGATGGCCTCTCATAGA	182-204
D11S4197	[6FAM]TGAGGTCAATGTTGGTTTC	TAGTAGAATCTCATAGTTCTGTGG	227-271
D11S4959	[6FAM]GACACTAGGAGAGCTCATGACC	CAGGTGGGCAGTTATCACAC	343-359

**Tabla 10.** Secuencias de los cebadores y tamaño de los alelos de los marcadores polimórficos de ATM utilizados para construir los haplotipos. Los cebadores *forward* se marcaron con el fluoróforo FAM para poder determinar el tamaño de los fragmentos en función del otro fluoróforo (LIZ-500), empleado en el análisis de fragmentos.



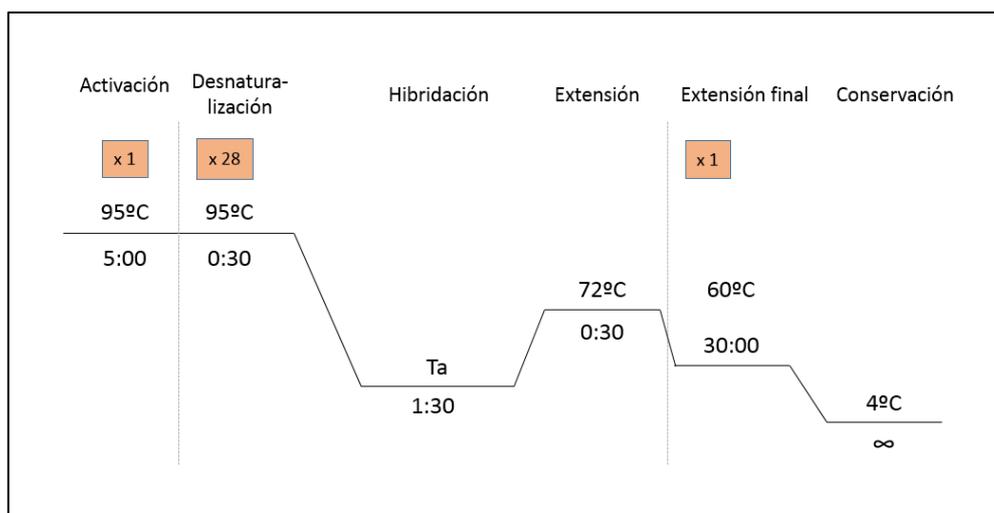
**Figura 27.** Localización de los STR empleados en este estudio con respecto al gen *ATM*.

Cada marcador se amplificó mediante PCR utilizando un kit de PCR de microsatélites *Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen)*. Previamente, se reconstituyeron los viales de *primers* liofilizados con tampón estándar (TE) hasta una concentración de 100  $\mu$ M. Posteriormente, en un mismo tubo se añadió 20  $\mu$ l de mix de *primers* (10  $\mu$ l de *Forward* y 10  $\mu$ l de *Reverse*) a 180  $\mu$ l de agua, obteniéndose una concentración de *primers* de 10  $\mu$ M (**Tabla 11**).

PCR microsatélites	V (µl)
H <sub>2</sub> O	2
Master mix	6,25
Cebador F+R (10 µM)	1,25
Q-solution	2,5
ADN (25 ng/µl)	0,5
Volumen total	12,5

**Tabla 11.** PCR de amplificación utilizada en el análisis de microsatélites. F: *forward*, R: *reverse*.

El programa de amplificación utilizado constó de los pasos esquematizados en la **Figura 28**.

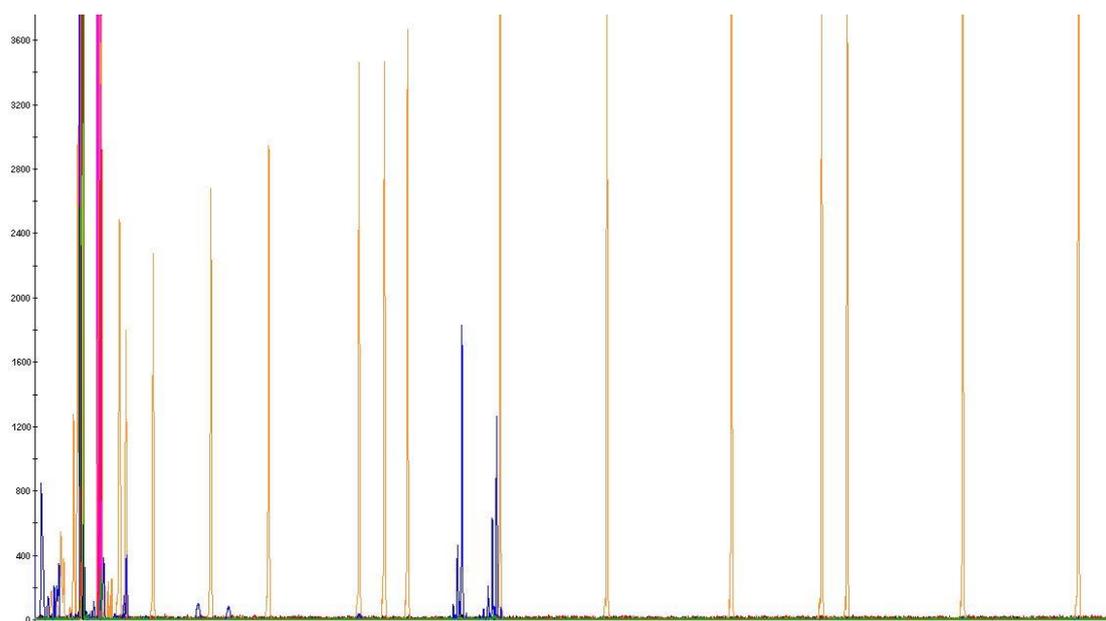


**Figura 28.** Programa utilizado en la reacción de amplificación de microsatélites. Ta: temperatura de anillamiento

Una vez finalizado el paso de amplificación se llevó a cabo la electroforesis capilar en el analizador ABI3130 mediante análisis de fragmentos. Para ello se mezcló 1 µl del producto de amplificación con 12 µl de formamida Hi-Di y 0.5 µl del marcador de tamaños LIZ-500 (*Gene Scan-500 LIZ Size Standard*) y se desnaturizó durante 3 minutos a 95°.

Los datos obtenidos tras la electroforesis capilar se analizaron en el *software* Genemapper v 4.0 facilitado por *Applied Biosystems*. Se obtuvieron dos

picos por cada STR (en azul). Estos se correspondían con los tamaños de los fragmentos amplificados, uno de procedencia paterna y otro materna (**Figura 29**). En el caso de individuos homocigotos, se obtuvo un único pico azul. Los picos naranjas pertenecían al estándar de tamaño LIZ-500. De esta forma se pudieron conocer ambos alelos y determinar los haplotipos de cada individuo.



**Figura 29.** Patrón de picos obtenido en el análisis de microsatélites. Se observan dos picos azules que se corresponden con los tamaños de los dos fragmentos amplificados, siendo uno el alelo paterno y otro el materno.

Para realizar el cálculo de generaciones se utilizó la ecuación desarrollada por Machado y colaboradores [118]:  $G = \log \delta / \log(1 - \theta)$ , en la que  $\delta$  hace referencia a la medida del desequilibrio de ligamiento entre la variante y cada uno de los marcadores más cercanos (D11S4078 y D11S4176 en este caso). El desequilibrio de ligamiento se calcula a partir de la prevalencia del alelo entre los afectados ( $P_d$ ) y la prevalencia del alelo entre los alelos control ( $P_n$ ) mediante la fórmula  $\delta = (P_d - P_n) / (1 - P_n)$ . Por otro lado,  $\theta$  representa la fracción de recombinación entre el marcador y el gen, calculada a partir de las distancias entre los marcadores y el gen. Estas se obtuvieron a partir de la base de datos *Ensembl*.

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

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

Las condiciones de aplicación de los análisis estadísticos se verificaron antes de su aplicación. La normalidad se contrastó mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff.

Para realizar el contraste de hipótesis para variables cuantitativas se utilizó el test exacto de Fisher en muestras pequeñas (si la frecuencia esperada en alguna de las casillas es menor de 5) y el test de Chi cuadrado cuando se trataba de muestras grandes. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor “p” asociado a la prueba estadística de contraste fue menor a 0,05.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v 15.0.

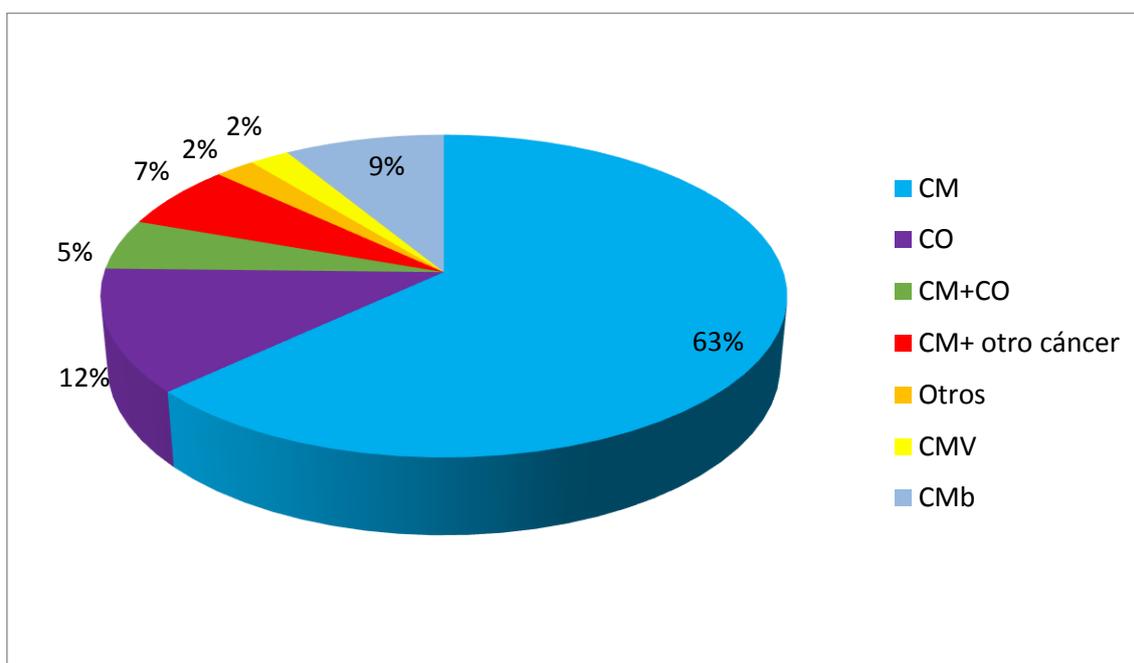
## **IV. Resultados**



## 1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

De los 138 casos índice analizados, 82 (59%) procedieron del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca y 56 (41%) al Hospital General Universitario Morales Meseguer. Además, se estudiaron 41 familiares, de los cuales 15 resultaron portadores. De ellos, sólo 3 habían desarrollado algún tipo de cáncer en el momento del estudio.

En los casos índice, el cáncer más diagnosticado fue el CM unilateral, seguido del CO y del CM bilateral, como se representa en la **Figura 30**. En la **Tabla 12** se resumen las características clínicas de los CM y CO diagnosticados en el estudio. Dentro de los CM, el ductal fue el más común, mientras que en el CO predominó el seroso.



**Figura 30.** Distribución de los CI en función del tipo de cáncer diagnosticado. CM: cáncer de mama, CO: cáncer de ovario, CMV: cáncer de mama en el varón, CMb: cáncer de mama bilateral.

Cáncer de mama		Cáncer de ovario	
Edad de diagnóstico		Edad de diagnóstico	
Media±DE	42,60±11,68	Media±DE	44,58±14,70
Tipo de cáncer de mama (%)		Co-afectación (%)	
CM unilateral	101 (85,59)	CO	17 (70,83)
CM bilateral	17 (14,41)	CO+CM	7 (29,17)
Subtipo histológico (%)		Subtipo histológico (%)	
Ductal	114 (84,44)	Seroso	13 (54,17)
Lobulillar	6 (4,44)	Mucinoso	1 (4,17)
Secretor	1 (0,74)	Adenocarcinoma	1 (4,17)
Medular	1 (0,74)	Mulleriano	1 (4,17)
Papilar	1 (0,74)	Granuloso	1 (4,17)
Mucinoso	2 (1,48)	Carcinosarcoma	1 (4,17)
Sarcomatoide	1 (0,74)	Otros	2 (8,33)
Desconocido	9 (6,67)	Desconocido	4 (16,67)

**Tabla 12.** Características clínicas de los casos de cáncer de mama y ovario diagnosticados en los casos índice del estudio.

## 2. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

Los 138 casos índice del presente estudio habían sido seleccionados utilizando los criterios de la SEOM para analizar los genes *BRCA1* y *BRCA2*, obteniéndose un resultado no informativo en todos ellos. Posteriormente, se amplió el estudio a paneles de genes siguiendo los criterios aplicados en el Comité de Consejo Genético.

El rendimiento diagnóstico obtenido previamente en el laboratorio para variantes patogénicas en *BRCA1* y *BRCA2* fue del 11% en 1729 familias estudiadas. En el presente estudio se registraron un total de 11 variantes

clínicamente relevantes en un total de 11 casos índice de, lo que supuso un 7,97% de los 138 CI analizados.

### 3. EVALUACIÓN DE LOS CRITERIOS DE SELECCIÓN

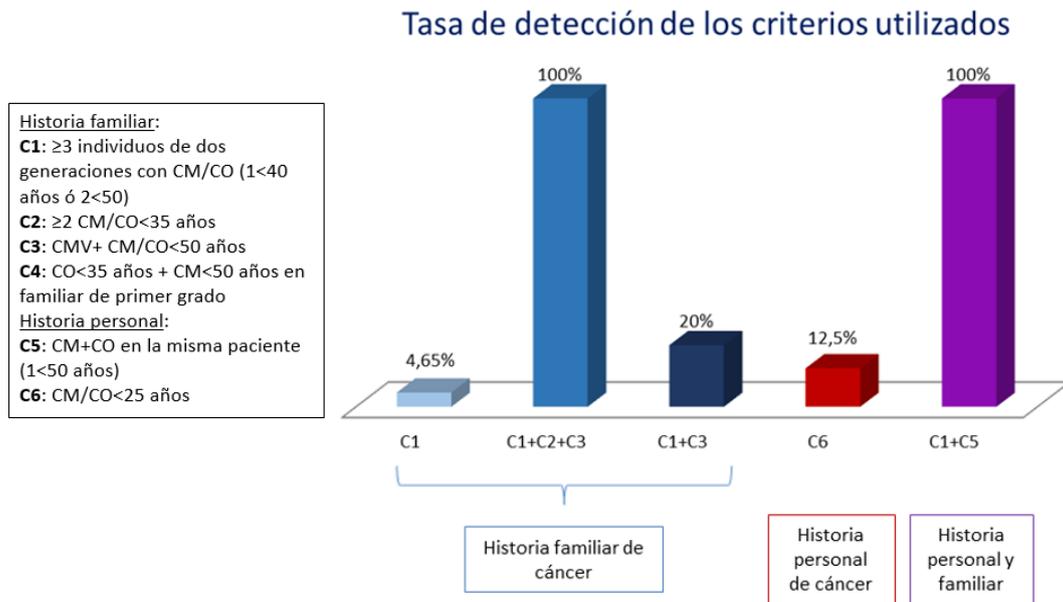
De los 138 casos índice, 75 cumplían estrictamente alguno de los criterios de selección aplicados, mientras que 63 no cumplían ninguno de ellos.

Para evaluar la pertinencia de los criterios de selección utilizados para ampliar el estudio genético, se determinó la tasa de variantes patogénicas en el grupo que cumplía criterios y en el que no. La tasa de variantes patogénicas fue del 9,33% (7/75) para los individuos que cumplían los criterios de selección y del 6,35% (4/61) para aquellos que no cumplieron nuestros criterios (test estadístico de Chi cuadrado  $P=0,52$ ) (**Tabla 13**). Por lo tanto, no se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos.

	CI cumple criterios	CI no cumple criterios	Total	Test de Chi cuadrado
Presencia de variante patogénica	7 (9,33%)	4 (6,35%)	11 (7,97%)	P=0,52
Ausencia de variante patogénica	68 (90,67)	59 (93,44%)	127 (92,03%)	

**Tabla 13.** Distribución de los CI con variantes patogénicas entre los grupos que cumplen y no los criterios establecidos en el laboratorio.

Los criterios de selección se dividieron en dos grupos: los que tenían en cuenta la historia familiar de cáncer (C1-C4) y los que tenían en cuenta la historia personal (C5 y C6). De manera individual, los criterios con una mayor tasa de detección fueron el C6 (12,5%), seguido del C1 (4,6%). El resto de criterios, de manera individual, presentaron una tasa de detección del 0%. Además, ninguno de los portadores de una variante patogénica del estudio cumplió el criterio C4. Sin embargo, la combinación de los criterios C1+C2+C3, así como la combinación de los criterios C1+C5 mostraron una tasa de detección del 100%, mientras que con la combinación de C1+C3 se obtuvo una tasa de detección del 20% (**Figura 31**).



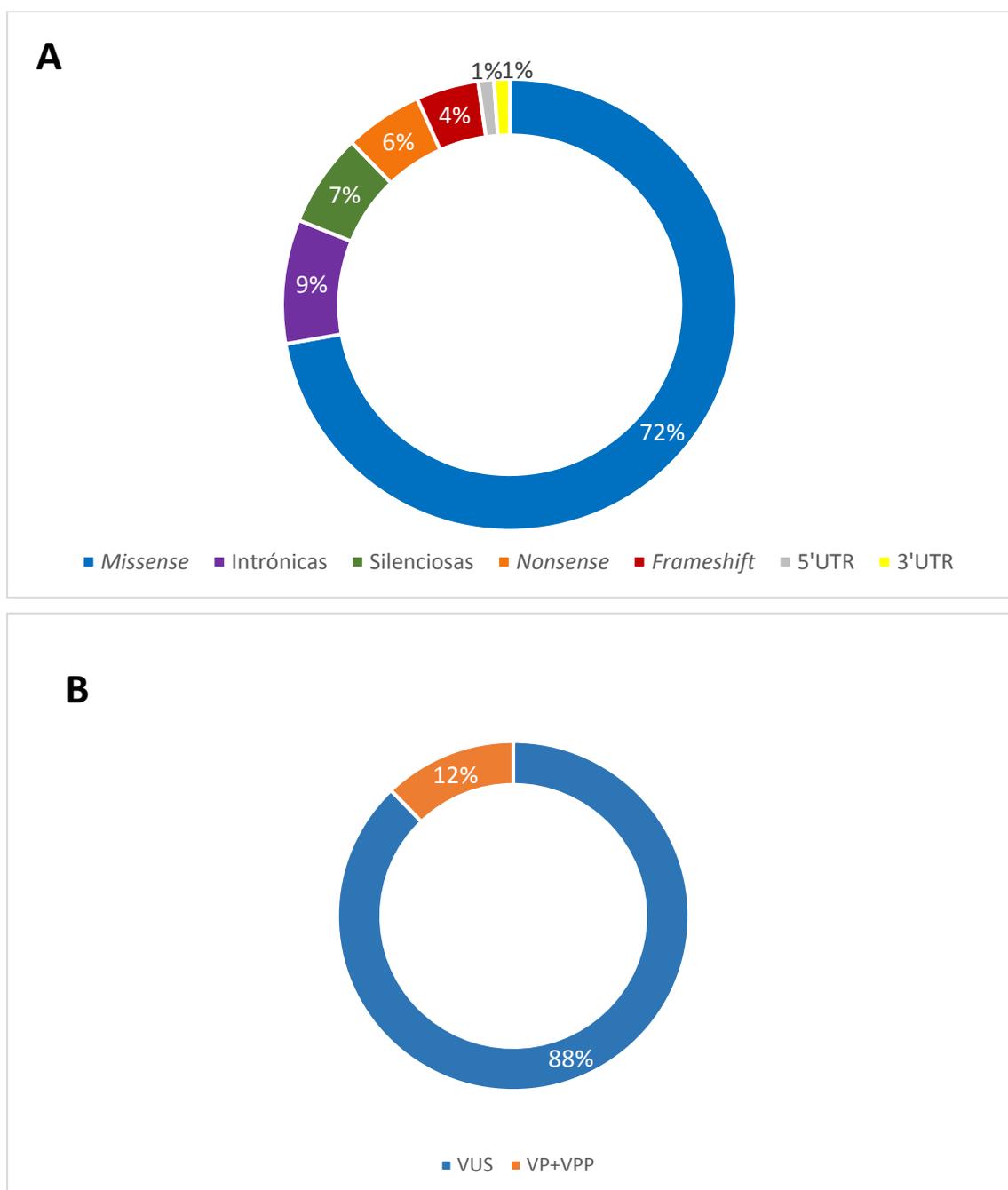
**Figura 31.** Tasa de detección de los criterios de selección utilizados: C1: ≥3 individuos de dos generaciones con CM/CO (1< 40 años ó 2<50), C2: ≥2 CM/CO<35 años, C3: CMV+ CM/CO<50 años, C4: CO<35 años + CM<50 años en familiar de primer grado, C5: CM+CO en la misma paciente (uno<50 años), C6: CM/CO<25 años.

#### 4. TIPOS DE VARIANTES DETECTADAS

Se hallaron un total de 90 variantes, incluyendo las de significado clínico desconocido, probablemente patogénicas y patogénicas. Sólo se contabilizaron aquellas variantes exónicas o que se encontraban en el borde exón-intrón ( $\pm 12$ pb).

Desde el punto de vista molecular, se detectaron: 65 cambios de tipo *missense*, 8 intrónicas, 6 silenciosas, 5 sin sentido, 4 cambios con alteración del marco de lectura o *frameshift*, 1 en región no codificante aguas arriba (*untranslated upstream*, 5'UTR) y 1 en región no codificante aguas abajo (*untranslated downstream*, 3'UTR) (**Figura 32A**)

Desde el punto de vista clínico, del total de variantes contabilizadas, 79 (88%) fueron variantes de significado clínico desconocido y 11 (12%) fueron clínicamente relevantes (patogénicas y probablemente patogénicas) (**Figura 32B**).



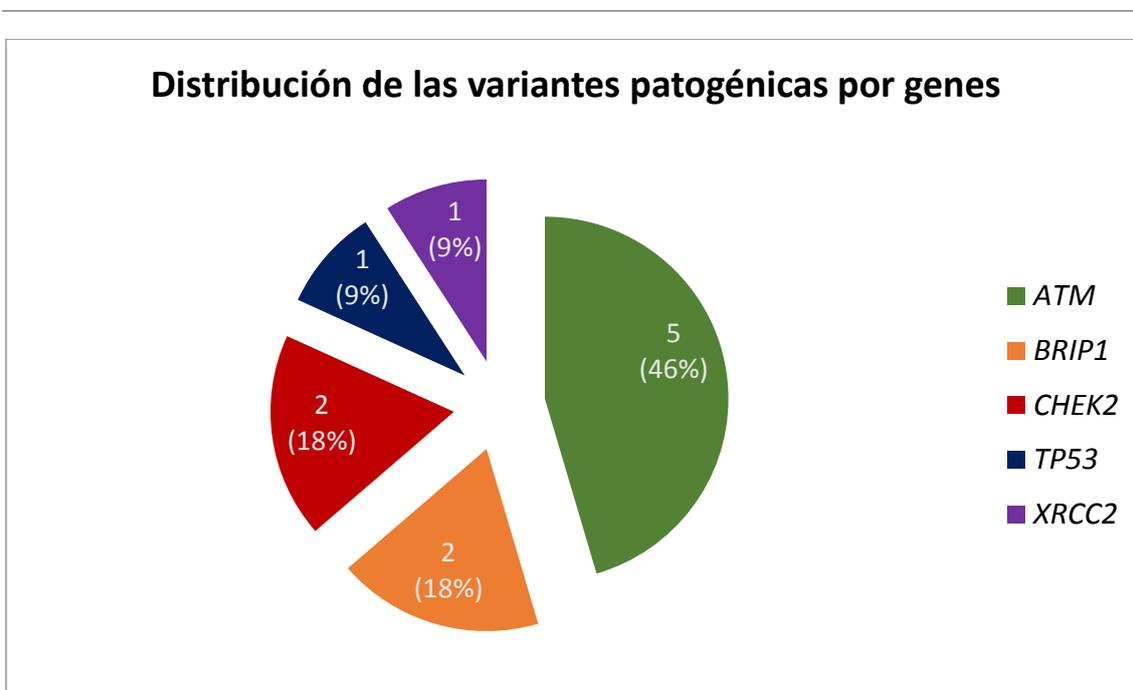
**Figura 32.** A) Distribución de las variantes halladas según su clasificación molecular. B) Distribución de las variantes según su clasificación clínica. 5'UTR: *untranslated upstream*, 3'UTR: *untranslated downstream*

#### 4.1 Variantes clínicamente relevantes

De las 90 variantes detectadas, 11 se consideraron patogénicas o probablemente patogénicas. De ellas, 7 ya estaban descritas en la bibliografía y 4 fueron de nueva descripción. La distribución por genes se muestra en la **Figura**

**33.** Destaca que casi la mitad de las variantes detectadas se encontraron en un mismo gen: *ATM*.

A continuación, para cada variante patogénica se realiza un análisis molecular del cambio producido, revisión bibliográfica disponible sobre la misma, los criterios utilizados para su clasificación según la ACMG, descripción de las familias portadoras, así como un estudio genotipo-fenotipo global de todas ellas. En la **Tabla 14** se reflejan las principales características de estas variantes y del fenotipo encontrado.



**Figura 33.** Distribución por genes de las variantes patogénicas encontradas en el estudio.

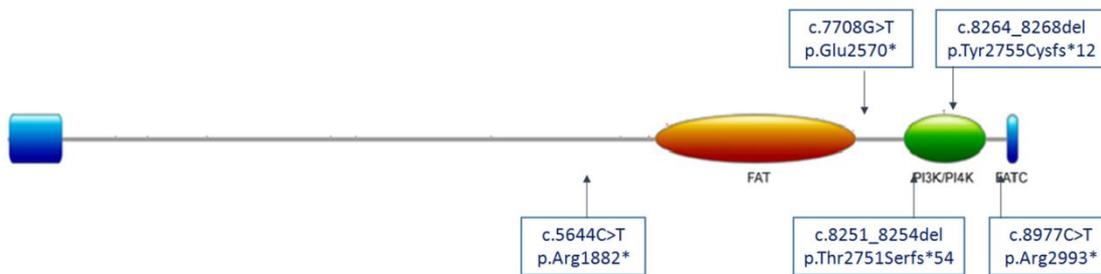
---

Gen	Exón/ Intrón	Variante genética	Cambio a nivel de proteína	refSNP	ClinVar	Tipo de variante	Criterios ACMG	Tipo de tumor (edad de diagnóstico)		Histopatología	Subtipo molecular
ATM	37	c.5644C>T	p.(Arg1882*)	rs786204433	188737	N	PVS1 PM2 PP3+PP5	CI	CO (29)	Seroso	-
								F	CM (63)	CDI	RE/RP
	52	c.7708G>T	p.(Glu2570*)	rs1555124587	558735	N	PVS1 PM2 PP3	CI	LNH (50) CMV (63)	DLBCL CDI	- RE/RP
								CI	CM (34)	CDI	RE/RP/HER2
	56	c.8251_8254del	p.Thr2751Serfs*54	rs786202120	183425	Fm	PVS1 PM1+PM2	F	Melanoma (68)	-	-
								CI	CM (53)	CLI	RE/RP
								CI	CMV (35)	CDI	RE/RP/HER2
62	c.8264_8268del	p.Tyr2755Cysfs*12	rs730881294	181865	Fm	PVS1 PM1+PM2 PP5	F	CM (56)	CDI	RE/RP	
							CI	CM (37)	CDI	DESC	
BRIP1	7	c.886G>T*	p.(Glu296*)	rs876660125	430641	N	PVS1 PM1+PM2 PP3	CI	CMb (18) Glioblastoma (21)	CDIS -	HER2 -
		c.903del	p.Leu301Phefs*2	rs876659490	232007	Fm	PVS1 PM1+PM2	CI	CO (63)	Peritoneal	-
CHEK2	4	c.349A>G	p.Arg117Gly	rs28909982	128071	M	PS3 PM1 PP3+PP5	CI	CM (29)	CDI	ER/PR
	5	c.470T>C	p.Ile157Thr	rs17879961	5591	M	PS3 PM1 PP3+PP5	CI	CO (41)	Indiferenciado	-
TP53	4	c.334_364dup*	p.Val122Glyfs*37	rs1555526495	430665	Fm	PVS1 PM1+PM2 PP3	CI	CMb (18) Glioblastoma (21)	CDIS	HER2
XRCC2	3	c.677dup	p.(Tyr226*)	REV	REV	N	PVS1 PM1 PP3	CI	CO (39) CM (60)	- CDI	- RP/RE

**Tabla 14.** Variantes patogénicas halladas en el estudio con las características de la familia y de los tumores. N: *nonsense*, Fm: *frameshift*, M: *missense* CI: caso índice, F: familiar, CDI: carcinoma ductal infiltrante, CDIS: carcinoma ductal *in situ*, CM: cáncer de mama, CMb; cáncer de mama bilateral, CMV: cáncer de mama en el varón, LNH: linfoma no Hodgkin, DLBCL: linfoma difuso de células grandes, RP: receptores de progesterona, RE: receptores estrogénicos, HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, DESC: desconocido, REV: en revisión.

#### 4.1.1 Variantes patogénicas halladas en el gen *ATM*

*ATM* es el gen en el que se han encontrado la mayoría de variantes patogénicas. Se encontraron 5 variantes patogénicas en 6 familias, lo que equivale a una tasa mutacional 4,35%. Todas las variantes fueron de tipo *frameshift* o *nonsense* y se localizaron en la segunda mitad de la proteína, como muestra la **Figura 34**. Por lo tanto, es posible que se produzca un mecanismo de degradación de ARNm conocido como *non-sense mediated decay* (NMD). Este es un mecanismo de supervivencia mediante el que se eliminan transcritos de ARNm que tienen codones de stop prematuros, por lo que la proteína no se llegaría a sintetizar [119].



**Figura 34.** Localización a nivel proteico de las variantes patogénicas y probablemente patogénicas halladas en *ATM*. Modificado de Athanasakis y colaboradores [57].

- **c.5644C>T**

a) Descripción molecular de la variante

Esta variante está presente en una de las familias portadoras. Se encuentra en el exón 37 del gen *ATM*, produciendo un codón de parada prematuro en el codón 1882, con lo que produce una proteína truncada. En el caso de síntesis proteica, se perderían los dominios FAT, PI3-PI4 kinasa y FATC, con lo que la proteína no podría llevar a cabo su función correctamente.

Esta variante ha sido descrita en distintas publicaciones, tanto en pacientes con ataxia telangiectasia (en homocigosis) como en pacientes con cáncer de mama (en heterocigosis) en poblaciones de origen ibérico, marroquí y brasileño [120–123].

## b) Categorización clínica

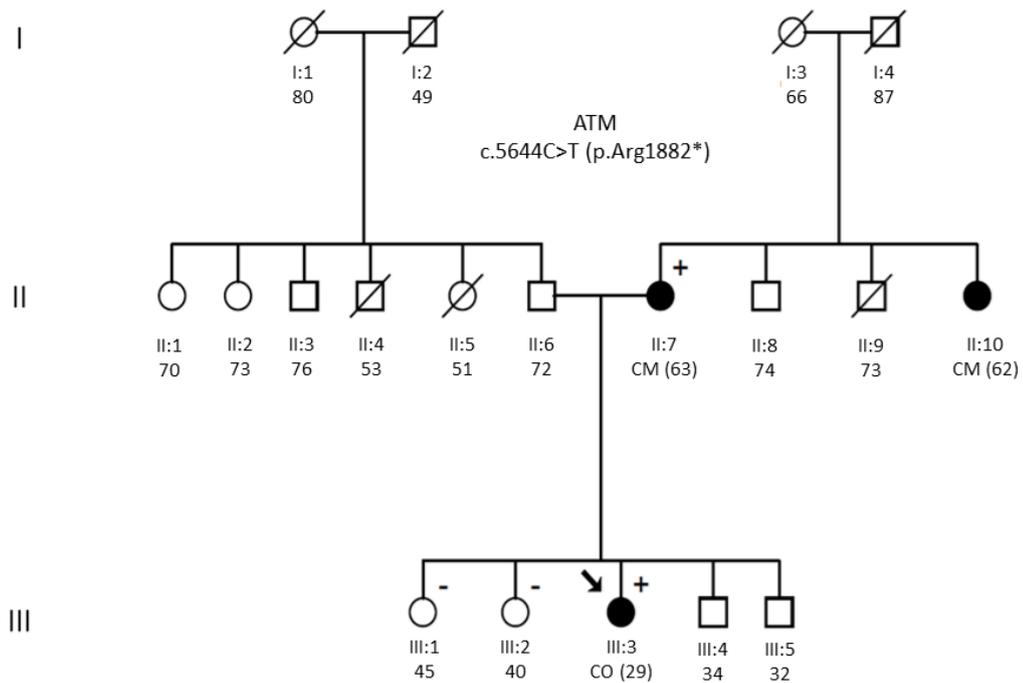
Esta variante se clasificó como patogénica siguiendo las guías clínicas de la ACMG en base a los siguientes criterios: se trata de una variante sin sentido (PVS1), no se ha encontrado en controles (PM2), los programas *in silico* utilizados la predicen como patogénica (PP3) y en *ClinVar* se ha clasificado como patogénica o probablemente patogénica por varios usuarios (PP5) (**Tabla 14**).

## c) Descripción de la familia

En la **Figura 35** se representa la familia en la que se encontró la variante c.5644C>T. La CI (III:3) de esta familia fue diagnosticada de un cáncer de ovario seroso *borderline* en estadio IA a los 29 años. Tiene dos hermanos y dos hermanas sanos. Su madre fue diagnosticada de cáncer de mama ductal invasivo positivo para receptores hormonales y HER2-negativo a los 63 años. También su tía materna fue diagnosticada de cáncer de mama a los 62 años. El estudio se amplió a su madre y hermanas. La única que también portaba la mutación fue la madre (II:7).

## d) Estudio genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
2	1 (50)	64	0	1 (50)	29	0



**Figura 35.** Árbol familiar de la familia en la que se halló la variante 5644C>T en *ATM*. CM: cáncer de mama, CO: cáncer de ovario.

- **c.7708G>T**

a) Descripción molecular de la variante

Esta variante está presente en una de las familias del estudio. Se encuentra en el exón 52, produciendo un codón de parada prematuro en el codón 2570, lo que da lugar a una proteína truncada. En caso de síntesis proteica, esto supondría la pérdida de los dominios PI3-PI4 kinasa y FATC.

No se había descrito previamente en bases de datos ni en la bibliografía.

b) Categorización clínica

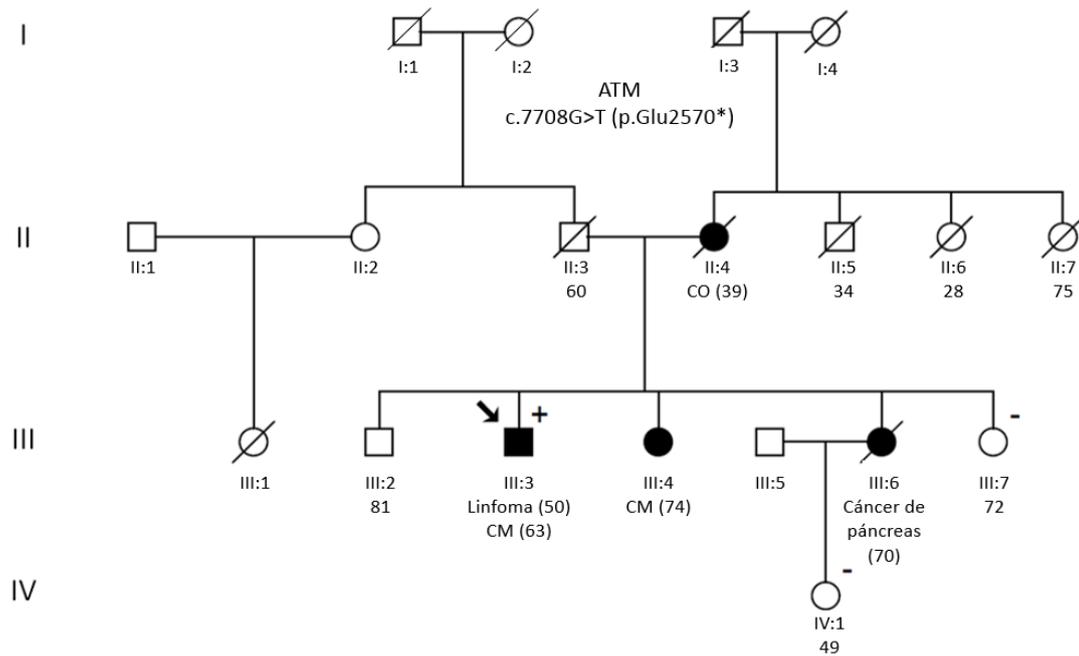
Fue clasificada como patogénica siguiendo los criterios de la ACMG: se trata de una variante sin sentido que da lugar a una proteína truncada (PVS1), está ausente en controles en los diferentes estudios poblacionales (PM2) y distintas herramientas *in silico* apoyan un efecto deletéreo en el gen o la proteína resultante (PP3) (**Tabla 14**).

## c) Descripción de la familia

En la **Figura 36** está representada la familia en la que se halló la variante c.7708G>T. El CI de esta familia es un varón diagnosticado a los 50 años de un Linfoma no Hodgkin y de un cáncer de mama ductal invasivo positivo para receptores hormonales y HER2-negativo a los 63 años. Tiene tres hermanas y un hermano: una de las hermanas había fallecido de cáncer de páncreas a los 70 años, otra fue diagnosticada de cáncer de mama a los 74 años y el resto estaban sanos. Por otro lado, la madre del caso índice había fallecido a los 40 años de un cáncer de ovario diagnosticado a la edad de 39. El estudio se amplió a su hermana sana y a la sobrina (hija de su hermana fallecida). Ambas resultaron no portadoras.

## d) Estudio genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	63	0	0	-	-



**Figura 36.** Árbol familiar de la familia en la que se halló la variante c.7708G>T en ATM.

- **c.8251\_8254del**

a) Descripción molecular de la variante

Esta variante está presente en dos de las familias del estudio. Posteriormente apareció en otras dos familias no pertenecientes al estudio, demostrándose un efecto fundador. Se encuentra en el exón 56, produciendo una alteración del marco de lectura que da lugar a un codón de parada prematuro en el codón 2804, lo que da lugar a una proteína truncada. En el caso de síntesis proteica, se perdería parte del dominio PI3-PI4 kinasa y del dominio FATC completo.

Se había descrito previamente en una familia española cuyo CI había sido diagnosticada de un cáncer de mama antes de los 50 años [67].

## b) Categorización clínica

Fue clasificada como patogénica siguiendo los criterios de la ACMG: se trata de una variante sin sentido que da lugar a una proteína truncada (PVS1), se encuentra en un punto caliente mutacional en el que la mayoría de las variantes halladas son patogénicas (PM1) y está ausente en controles en los diferentes estudios poblacionales (PM2) (**Tabla 14**) [82].

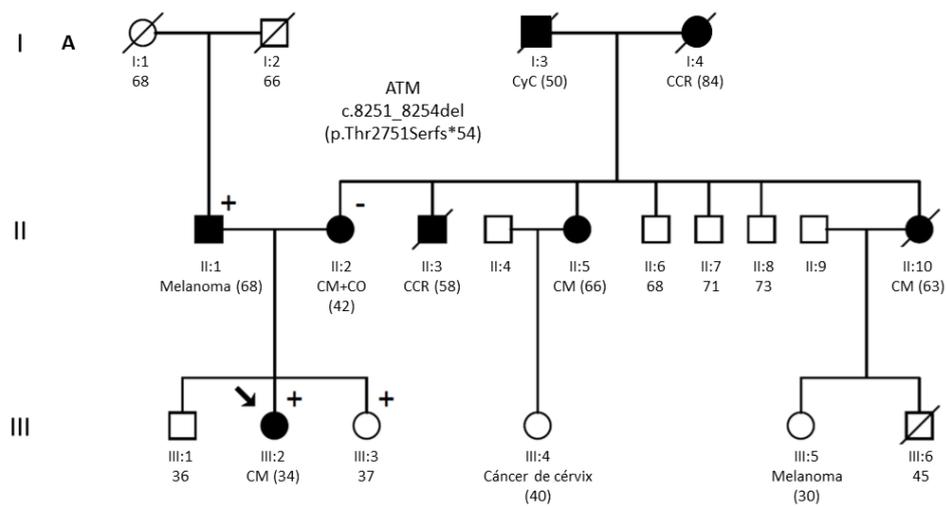
## c) Descripción de la familia

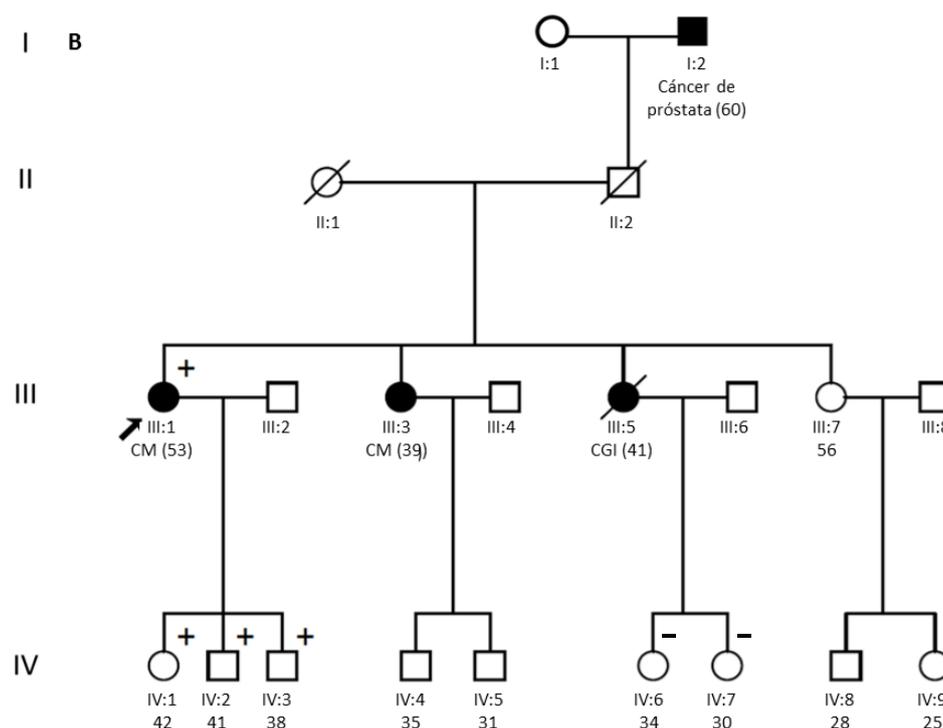
F1 (**Figura 37A**): La CI de esta familia fue una mujer diagnosticada a los 34 años de un cáncer de mama ductal invasivo positivo para receptores hormonales y HER2. A su vez, su madre había sido diagnosticada de un cáncer de mama y ovario a los 42 años y su padre de un melanoma con 68 años. Además, la CI tenía un hermano y una hermana, ambos sanos en el momento del estudio. Se amplió el estudio genético a sus hermanos y progenitores. Tanto el padre como la hermana resultaron portadores.

F2 (**Figura 37B**): La CI de esta familia fue una mujer diagnosticada a los 53 años de un cáncer de mama lobulillar positivo para receptores hormonales. De las tres hermanas del CI, una había fallecido de un cáncer gástrico diagnosticado a los 41 años, otra había sido diagnosticada de cáncer de mama a los 39 años y una estaba sana en el momento del estudio. Además, la CI tenía dos hijos y una hija sanos. El estudio genético se amplió a los hijos e hijas del CI, resultando todos portadores de la variante. Además se estudiaron dos de las sobrinas del CI, resultando ambas no portadoras. Una importante limitación fue el no poder estudiar a la hermana con CM, ya que hubiese sido interesante, en el caso de resultar positivo, para realizar un estudio genotipo-fenotipo más completo.

d) Estudio genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama			Otros tipos de cáncer		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)	Tipo de cáncer	Casos (%)	Edad diagnóstico
3	2 (66.7)	44±13	0	Melanoma	1 (33,3)	68





**Figura 37.** Árbol familiar de las familias en las que se halló la variante c.8251\_8254del en *ATM*. CCR: cáncer colorrectal, CyC: cáncer de cabeza y cuello, CGI: cáncer gastrointestinal.

- **c.8264\_8268del**

a) Descripción molecular de la variante

Esta variante está presente en una familia del estudio. Se encuentra en el exón 56, produciendo una alteración del marco de lectura que da lugar a un codón de parada prematuro en el codón 2766, lo que da lugar a una proteína truncada. En el caso de sintetizarse la proteína, se perdería parte del dominio PI3-PI4 kinasa y del dominio FATC completo.

Esta variante se había descrito previamente en diversas publicaciones, tanto asociada a ataxia telangiectasia (en homocigosis) como a cáncer de mama y tumores cerebrales (en heterocigosis). Se había encontrado en diversas poblaciones: española, brasileña, costarricense, noruega, británica y española [65, 120, 124–128].

## b) Categorización clínica

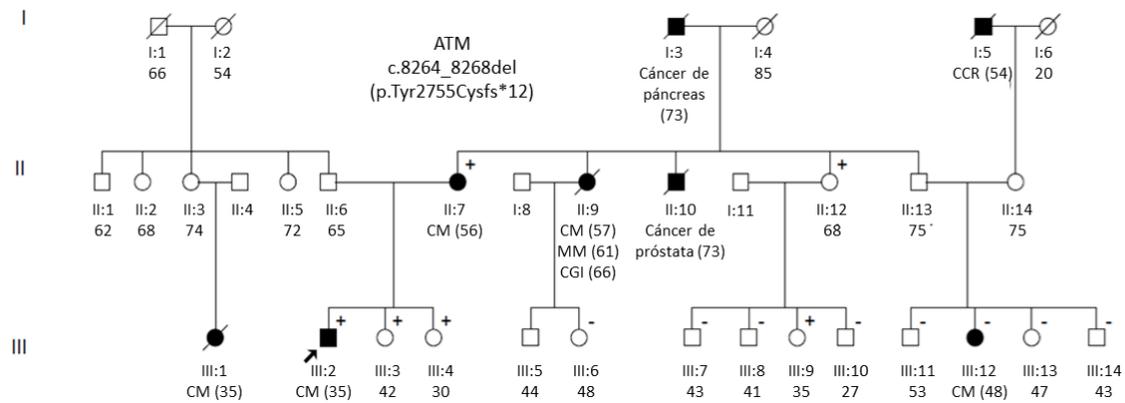
Fue clasificada como patogénica siguiendo los criterios de la ACMG: se trata de una variante sin sentido que da lugar a una proteína truncada (PVS1), se encuentra en un punto caliente mutacional en el que la mayoría de las variantes halladas son patogénicas (PM1) y está ausente en controles en los diferentes estudios poblacionales (PM2). Además, en *ClinVar* ha sido clasificada como patogénica por múltiples usuarios (PP5) (**Tabla 14**) [82].

## c) Descripción de la familia

En la **Figura 38** se representa la familia en la que se halló la variante c.8264\_8268del. El CI de esta familia fue un varón diagnosticado a los 35 años de un cáncer ductal invasivo positivo para receptores hormonales y HER2-positivo. La madre del CI había sido diagnosticada a los 56 años de un cáncer de mama ductal invasivo positivo para receptores hormonales y HER2-negativo. Además, una tía materna había fallecido tras ser diagnosticada de cáncer de mama, mieloma y cáncer gástrico y un tío materno había fallecido de un cáncer de páncreas diagnosticado a los 73 años, mientras que el tío y la tía materna restantes estaban sanos. Asimismo, una prima hermana materna había sido diagnosticada de un cáncer de mama triple negativo a los 48 años. Por otro lado, en la rama paterna tenía una prima hermana fallecida de un cáncer de mama diagnosticado a los 35 años. Se amplió el estudio a su madre. Por último, el CI tenía dos hermanas sanas en el momento del estudio. El estudio genético permitió confirmar el origen materno de la variante, ya que tanto la madre como la tía sana fueron portadoras, así como las hermanas y una de las primas hermanas del CI.

## d) Estudio genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)
2	2 (100)	46±15	0



**Figura 38.** Árbol familiar de la familia en la que se halló la variante c.8264\_8268del en ATM. MM: mieloma múltiple.

- **c.8977C>T**

a) Descripción molecular de la variante

Esta variante está presente en una familia del estudio. Se encuentra en el exón 62, produciendo una mutación sin sentido que origina un codón de parada prematuro en el residuo 2993. Aunque esto sólo produce la pérdida del 2% de la proteína, al tratarse de una variante *nonsense*, es posible que se active el mecanismo NMD. En el caso de sintetizarse la proteína, se perdería el dominio FATC.

Esta variante se había descrito previamente en diversas publicaciones, tanto asociada a ataxia telangiectasia (en homocigosis) como al síndrome cáncer de mama y ovario (en heterocigosis). Se había encontrado en diversas poblaciones: española, hispanoamericana, turca y canadiense [65, 120, 125, 129, 130].

## b) Categorización clínica

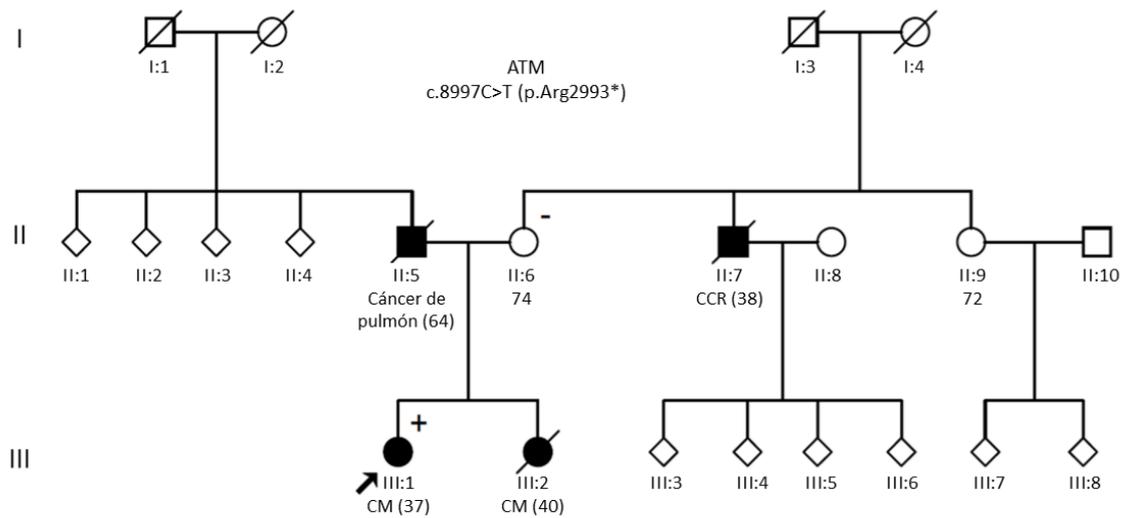
Fue clasificada como patogénica siguiendo los criterios de la ACMG: se trata de una variante sin sentido que da lugar a una proteína truncada (PVS1), se encuentra en un punto caliente mutacional en el que la mayoría de las variantes halladas son patogénicas (PM1) y está ausente en controles en los diferentes estudios poblacionales (PM2). Por otro lado, varias herramientas *in silico* apoyan su patogenicidad (PP3). Además, en *ClinVar* ha sido clasificada como patogénica por múltiples usuarios (PP5) (**Tabla 14**) [82].

## c) Descripción de la familia

En la **Figura 39** está representado el árbol familiar de la familia en la que se encontró la variante c.8977C>T. El CI de esta familia fue una mujer diagnosticada a los 37 años de cáncer de mama ductal invasivo. No se pudo obtener información de la inmunohistoquímica del tumor. La hermana del CI había fallecido de un cáncer de mama diagnosticado a los 40 años. A su vez, el padre de ambas había fallecido de un cáncer de pulmón a los 64 años. Por rama materna, la madre estaba sana en el momento del estudio, mientras que un tío materno había fallecido de un cáncer de colon a los 38 años. El estudio genético de la variante se amplió a la madre, la cual resultó no portadora. Por tanto, se supuso que la variante tenía un origen paterno, aunque no se pudo confirmar al estar su padre fallecido.

## d) Estudio genotipo-fenotipo

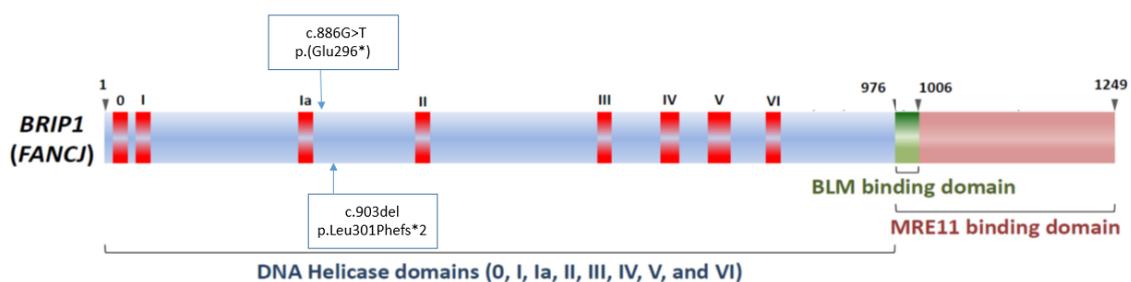
Nº portadores	Cáncer de mama		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)
1	1 (100)	37	0



**Figura 39.** Árbol familiar de la familia en la que se halló la variante c.8977C>T en *ATM*.

#### 4.1.2 Variantes patogénicas halladas en el gen *BRIP1*

En *BRIP1* se hallaron dos variantes patogénicas en dos familias, lo que supuso una frecuencia mutacional del 1,45%. Como muestra la **Figura 40**, ambas variantes se encuentran muy cercanas entre sí en el primer tercio de la proteína. Una es una variante *nonsense* y la otra *frameshift*, por lo que ambas son susceptibles de ocasionar NMD.



**Figura 40.** Localización a nivel proteico de las variantes patogénicas y probablemente patogénicas halladas en *BRIP1*. Modificado de Oussalah y colaboradores [45].

- **c.886G>T**

a) Descripción molecular de la variante

Esta variante está presente en una de las familias del estudio. En el CI de dicha familia también se halló una variante patogénica en el gen *TP53*, la cual se comentará más adelante. Se encuentra en el exón 7 del gen *BRIP1*, produciendo un codón de parada prematuro en el codón 296, con lo que produce una proteína truncada con pérdida del 76% de la proteína. En consecuencia, en el caso de síntesis proteica, se perderían varios de los dominios con actividad helicasa, la región de interacción con BRCA1, los dominios de unión a BLM y MRE11 y tres de los cuatro dominios de unión a azufre, esenciales para la actividad helicasa.

Esta variante no se había descrito previamente en bibliografía ni en bases de datos, de manera que fue incluida en *ClinVar* por primera vez. Además, se publicó un caso clínico en el que se describió esta variante, junto con la encontrada en *TP53* [131].

b) Categorización clínica

Esta variante se clasificó como patogénica siguiendo las guías clínicas de la ACMG en base a los siguientes criterios: se trata de una variante sin sentido (PVS1), se encuentra en un punto caliente mutacional (PM1), no se ha encontrado en controles (PM2) y los programas *in silico* utilizados la predicen como patogénica (**Tabla 14**) (PP3) [82].

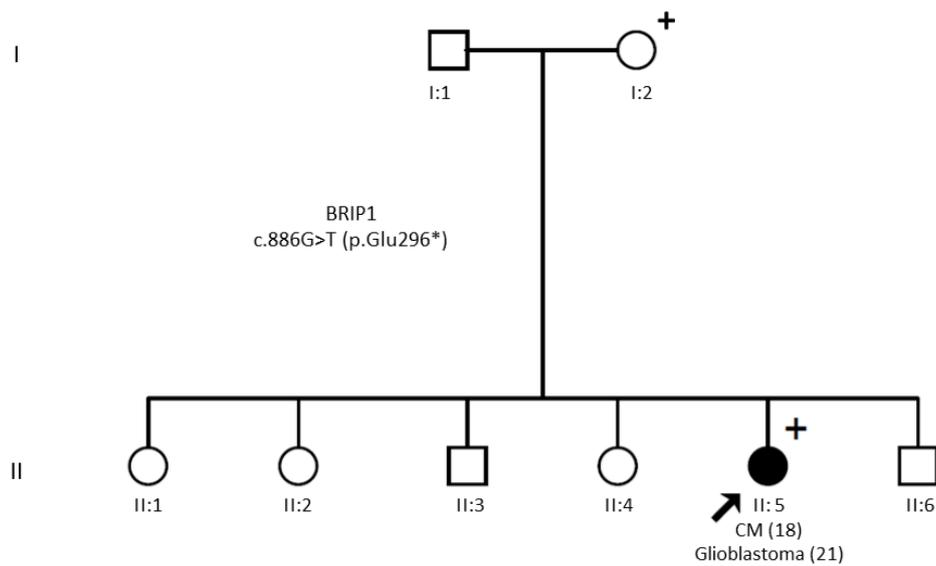
c) Descripción de la familia

En la **Figura 41** se muestra el árbol genealógico de la familia en la que se ha hallado la variante c.886G>T en *BRIP1*. La CI de esta familia fue diagnosticada de un cáncer de mama bilateral a los 18 años. El análisis anatomopatológico mostró que se trataba de un carcinoma ductal infiltrante bilateral negativo para receptores hormonales y HER2-positivo. Tras una respuesta completa al tratamiento y meses en ausencia de enfermedad, a los 21 años fue diagnosticada de un glioblastoma multiforme con un análisis inmunohistoquímico con mutaciones inactivantes de p53.

Era la quinta hija de una familia de cuatro hermanas y dos hermanos sin historia familiar de cáncer. Al ampliar el estudio genético a su madre, ésta resultó también portadora de esta variante.

d) Estudio genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)
1	1 (100)	18	1 (100)



**Figura 41.** Árbol familiar de la familia en la que se halló la variante c.886G>T en *BRIP1*.

- **c.903del**

a) Descripción molecular de la variante

Esta variante está presente en una de las familias del estudio. Se encuentra en el exón 7 del gen *BRIP1*, produciendo una alteración del marco de lectura que ocasiona un codón de parada prematuro en el codón 302, con lo que produce una proteína truncada con pérdida de gran parte de la proteína. En consecuencia, se pierden varios de los dominios con actividad helicasa, la región de interacción con BRCA1, los dominios de unión a BLM y MRE11 y tres de los cuatro dominios de unión a azufre, esenciales para la actividad helicasa.

Esta variante sólo ha sido descrita por un usuario en *ClinVar*, pero no aparece en bibliografía.

b) Categorización clínica

Esta variante se clasificó como patogénica siguiendo las guías clínicas de la ACMG en base a los siguientes criterios: se trata de una variante que da lugar a una proteína truncada (PVS1), se encuentra en un punto caliente mutacional (PM1), no se ha encontrado en controles (PM2). Las herramientas *in silico* utilizadas indicaron que se trataba de un residuo no conservado (BP4). Sin embargo, la combinación de criterios fueron acordes con una clasificación patogénica de la variante (**Tabla 14**) [82].

c) Descripción de la familia

En la **Figura 42** se representa el árbol familiar de la familia en la que se halló la variante c.903del. La CI de esta familia fue diagnosticada a los 63 de una carcinomatosis de peritoneal de posible origen ovárico. El padre de la CI había fallecido de cáncer de pulmón, mientras que la hermana había fallecido a los 60 años de cáncer de ovario. La CI tenía además tres hermanos varones sin historia personal de cáncer. Una de sus sobrinas había fallecido de un cáncer de mama diagnosticado antes de los 40 años. El estudio genético se amplió a las tres hijas e hijo de la CI, todos sanos en el momento del estudio. Todos resultaron no portadores de la mutación.

d) Estudio genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	63	0

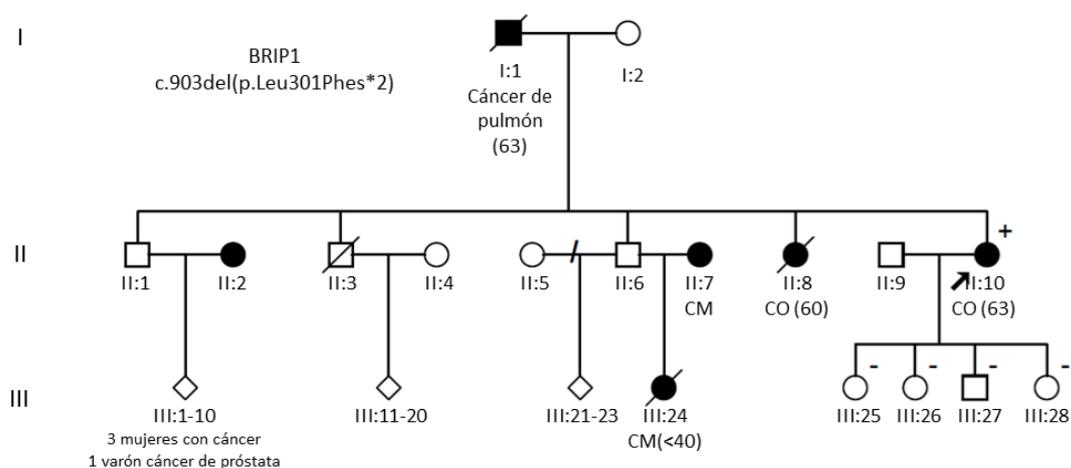
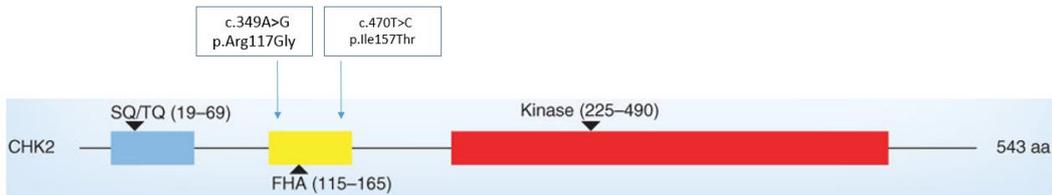


Figura 42. Árbol familiar de la familia en la que se halló la variante c.903del en *BRIP1*.

### 4.1.3 Variantes patogénicas halladas en el gen *CHEK2*

En *CHEK2* se hallaron dos variantes patogénicas. Se detectaron 2 variantes patogénicas en dos familias, lo que supuso una frecuencia mutacional del 1,45%. Su localización a nivel proteico se representa en la **Figura 43**.



**Figura 43.** Localización a nivel de proteína de las variantes patogénicas halladas en *CHEK2*. Modificado de Tavgian y colaboradores [59].

- **c.349A>G**

a) Descripción molecular de la variante

Esta variante está presente en una de las familias del estudio. Se encuentra en el exón 2 del gen *CHEK2*, produciendo un cambio de arginina por glicina en el residuo 117. Se trata de un residuo altamente conservado (clase C65 en Align GVGD) que se encuentra en el dominio FHA de la proteína.

Esta variante se había descrito ampliamente en bibliografía y bases de datos en diversas poblaciones, principalmente asociado a un riesgo incrementado de cáncer de mama, pero también se ha observado en casos de cáncer de próstata familiar [124, 132–136]. Un estudio funcional realizado por Sodha N. y colaboradores demostró que esta variante producía una incapacidad de responder al daño en el ADN de la proteína resultante, ya que su actividad está reducida al verse disminuida su fosforilación [137].

b) Categorización clínica

Esta variante se clasificó como probablemente patogénica siguiendo las guías clínicas de la ACMG en base a los siguientes criterios: hay estudios funcionales que demuestran el efecto deletéreo de la variante (PS3), se encuentra en un punto caliente mutacional (PM1), las diferentes líneas

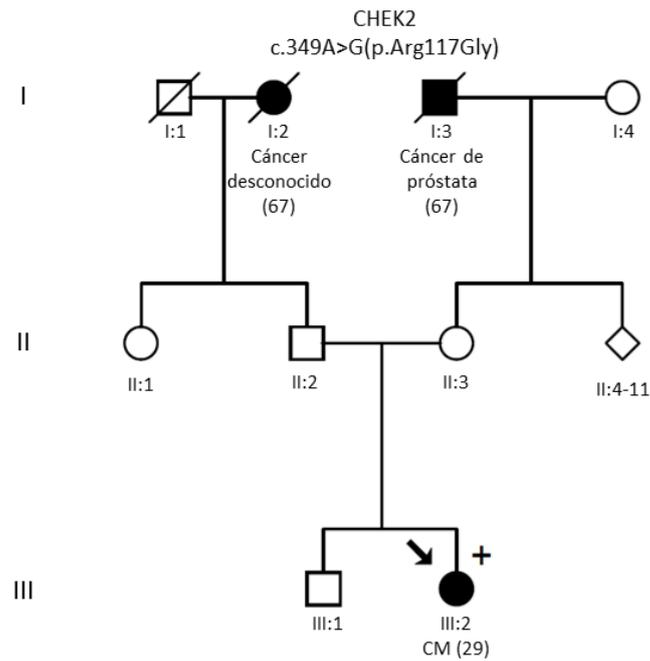
mutacionales la predicen como patogénica (PP3) y diversos usuarios la han clasificado como patogénica o probablemente patogénica en *ClinVar* (PP5) (**Tabla 14**) [82].

c) Descripción de la familia

En la **Figura 44** se representa en árbol genealógico de la familia en la que se halló la variante c. 349A>G. La CI de esta familia fue diagnosticada a los 29 años de un cáncer ductal invasivo de mama derecha. El análisis inmunohistoquímico mostró que se trataba de tumor positivo para receptores hormonales y HER-2 negativo. Posteriormente, a los 41 años sufrió una recaída en la mama restante. Presentaba una historia familiar de cáncer poco informativa: abuelo materno fallecido de cáncer de próstata a los 67 años y abuela paterna fallecida a los 67 años de un cáncer de origen desconocido. Hasta el momento no se ha podido ampliar el estudio genético a ningún familiar.

d) Estudio genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de mama		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)
1	1 (100)	29	-



**Figura 44.** Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.349A>G en *CHEK2*.

- **c.470T>C**

a) Descripción clínica de la variante

Esta variante está presente en una de las familias del estudio. Se encuentra en el exón 3 del gen *CHEK2*, produciendo un cambio de isoleucina por treonina en el residuo 157, que se encuentra en el dominio FHA de la proteína. Diversos estudios mostraron una capacidad disminuida para unirse *in vivo* a CDC25A, TP53 y BRCA1 [138–140]. Además, un estudio realizado por Kilpivaara y colaboradores sugirió un efecto negativo de esta variante en la proteína en portadores heterocigotos, ya que se formarían heterodímeros con el *CHEK2* no afectado [141].

Esta variante se había descrito ampliamente en bibliografía y bases de datos. Según la bibliografía disponible, se trata de una variante con origen en Croacia, aunque se ha descrito en poblaciones muy diversas (Polonia, Finlandia y Rumanía, entre otras), y se ha asociado con un incremento del riesgo de mama

ovario, páncreas, colorrectal, tiroides, así como el testicular y el renal entre otros.[21, 141–145]. Dentro del cáncer de mama, tiene una mayor asociación con el subtipo lobular [146], mientras que en el ovario se ha asociado a los subtipos *borderline*, cistoadenoma e invasivos de bajo grado [147]

#### b) Categorización clínica

Esta variante se clasificó como *probablemente* patogénica siguiendo las guías clínicas de la ACMG en base a los siguientes criterios: varios estudios funcionales demuestran un efecto deletéreo de esta variante en la proteína resultante (PS3), se encuentra en un punto caliente mutacional (PM1), las diferentes líneas mutacionales la predicen como patogénica (PP3) y diversos usuarios la han clasificado como patogénica o probablemente patogénica en *ClinVar* (PP5) (**Tabla 14**) [82].

#### c) Descripción de la familia

En la **Figura 45** está representado el árbol familiar correspondiente a la familia en la que se halló la variante c.470T>C en *CHEK2*. El CI de esta familia fue una mujer diagnosticada a los 41 años de un cáncer de ovario indiferenciado. Tenía antecedentes familiares de cáncer por ambas ramas. En la rama paterna, su padre había fallecido de un cáncer gástrico-esofágico, la abuela paterna había fallecido de un CM, una tía paterna había sido diagnosticada de CM, y la hija de ésta había fallecido de cáncer de páncreas. Por rama materna, su abuelo había fallecido de leucemia. Al ampliar el estudio genético, resultaron portadoras tanto la madre como la hermana y la tía materna, todas ellas sanas en el momento del estudio. Hasta el momento no se ha podido ampliar el estudio genético a ningún familiar.

d) Estudio genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1 (100)	41	0

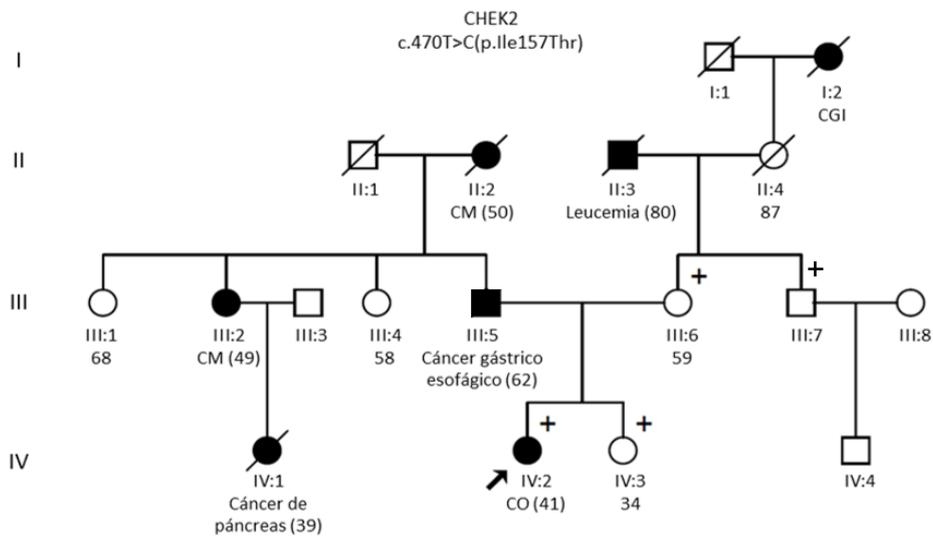


Figura 45. Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.470T>C en *CHEK2*.

#### 4.1.4 Variantes patogénicas halladas en el gen *TP53*

En *TP53* se halló una variante patogénica en una familia, lo que supuso una tasa mutacional del 0,72%. La variante se localiza en el dominio de unión a ADN de la proteína, tal y como se representa en la **Figura 46**.



**Figura 46.** Localización a nivel de proteína de las variantes patogénicas halladas en *TP53* [59].

- **c.334\_364dup**

a) Descripción molecular de la variante

Esta variante está presente en una de las familias del estudio. En el CI de dicha familia también se halló una variante patogénica en el gen *BRIP1*, la cual se ha comentado previamente. Se trata de una duplicación que ocurre en el exón 4 del gen *TP53*, produciendo una alteración del marco de lectura que da lugar a un codón de parada prematuro en el codón 158. Esto podría originar pérdida de ARNm mediante NMD. En el caso de sintetizarse la proteína, se produciría una proteína truncada con pérdida de una amplia extensión del dominio de unión a ADN y el dominio de tetramerización.

Esta variante no se había descrito previamente a este estudio en bibliografía ni en bases de datos, de manera que fue incluida en *ClinVar* por primera vez y el caso clínico fue publicado [131].

b) Categorización clínica

Esta variante se clasificó como patogénica siguiendo las guías clínicas de la ACMG en base a los siguientes criterios: se trata de una variante que da lugar a una proteína truncada (PVS1), se encuentra en un punto caliente mutacional que está en un dominio funcional de gran importancia para la correcta función de

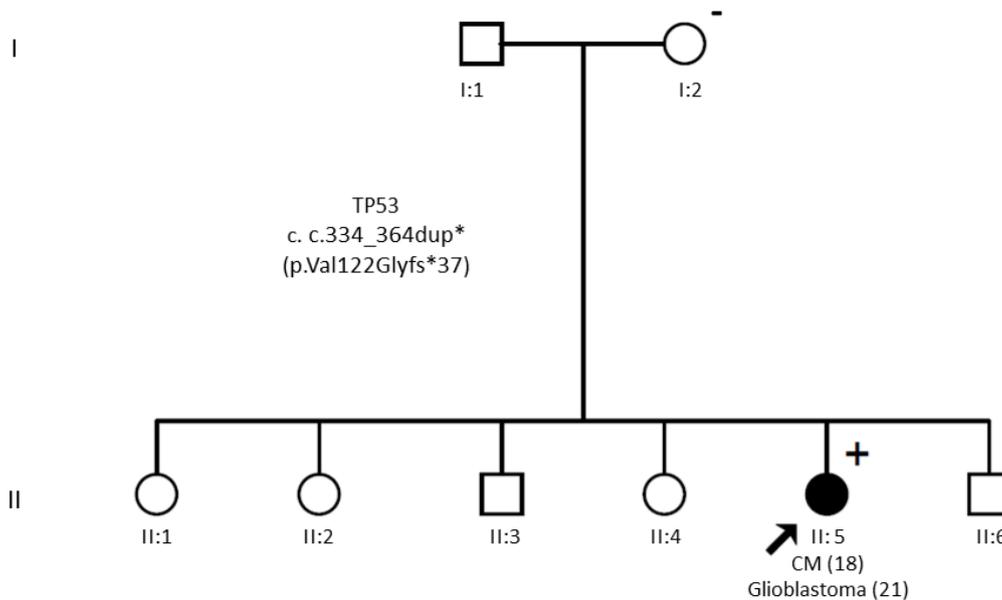
la proteína (PM1), no se ha encontrado en controles (PM2) y los programas *in silico* utilizados la predicen como patogénica (PP3) (**Tabla 14**) [82].

c) Descripción de la familia

En la **Figura 47** se muestra el árbol genealógico de la familia en la que se halló la variante c.334\_364dup en *TP53*. Se ha descrito previamente la historia de cáncer de esta familia. Al ampliar el estudio genético a su madre, ésta resultó no portadora de esta variante.

d) Estudio genotipo-fenotipo

Cáncer de mama			
Nº portadores	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer bilateral (%)
1	1 (100)	18	1 (100)



**Figura 47.** Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.334\_364dup en *TP53*.

### 3.1.5 Variantes patogénicas halladas en el gen XRCC2

En XRCC2 se halló una variante patogénica en una familia, lo que supuso una tasa mutacional del 0,72%. La variante se describe a continuación.

- **c.677dup**

a) Descripción molecular de la variante

Esta variante está presente en una de las familias del estudio. Se trata de una duplicación que ocurre en el tercer exón del gen que origina un codón de prematuro en el residuo 226. Esto supone la pérdida de aproximadamente el 20% de la proteína.

Esta variante no se había descrito previamente en bibliografía ni en bases de datos

b) Categorización clínica

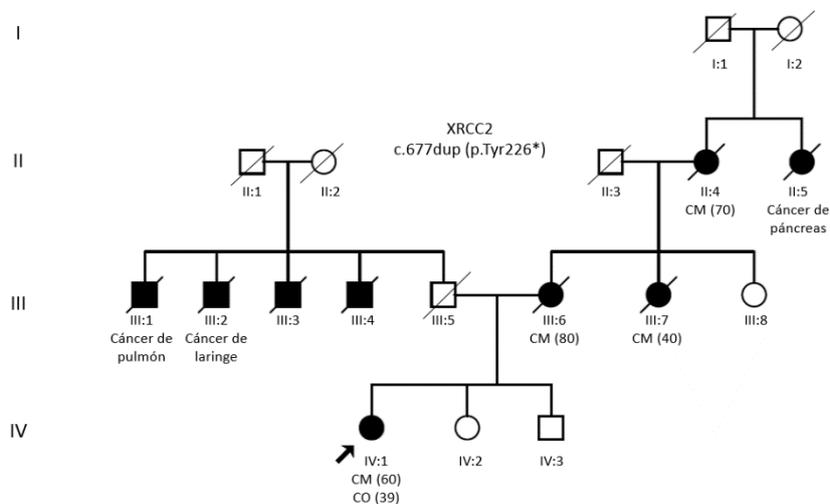
Según los siguientes criterios de la ACMG se clasificó como patogénica: se trata de una mutación sin sentido (PVS1), no se ha encontrado en estudios poblacionales (PM2) y los programas *in silico* utilizados apoyaron su patogenicidad (PP3) (**Tabla 14**)

c) Descripción de la familia

En la **Figura 48** se muestra el árbol genealógico de la familia en la que se halló la variante c.677dup en XRCC2. El CI de esta familia fue una mujer diagnosticada de cáncer de ovario a los 39 años y posteriormente de cáncer de mama a los 60. Por vía materna existían los siguientes antecedentes de cáncer: madre fallecida a los 80 años de cáncer de mama, tía materna fallecida a los 40 años de cáncer de mama, abuela materna fallecida de cáncer de mama a los 70 años y hermana de ésta fallecida de cáncer de páncreas. Por vía paterna varios de sus tíos habían fallecido de cáncer (laringe y pulmón entre otros desconocidos). No se amplió el estudio a ningún familiar.

## d) Estudio genotipo-fenotipo

Nº portadores	Cáncer de ovario		
	Casos (%)	Edad diagnóstico	Casos cáncer de mama y ovario (%)
1	1(100)	39	1 (100)



**Figura 48.** Árbol familiar de la familia en la que se halló la variante c.677dup en *XRCC2*.

#### 4.1.6 Variantes patogénicas halladas en el gen *MUTYH*

Como hallazgo incidental, se encontraron 2 variantes patogénicas en un total de 5 familias. En homocigosis o en doble heterocigosis, las variantes en *MUTYH* producen poliposis atenuada. Sin embargo, actualmente no hay evidencia suficiente que apoye una asociación entre la presencia en heterocigosis de variantes en *MUTYH* y un incremento del riesgo de cáncer de mama y ovario. Por lo tanto, éstas no se incluyeron en el cálculo del rendimiento diagnóstico. Las variantes halladas en este estudio se muestran en la **Tabla 15**.

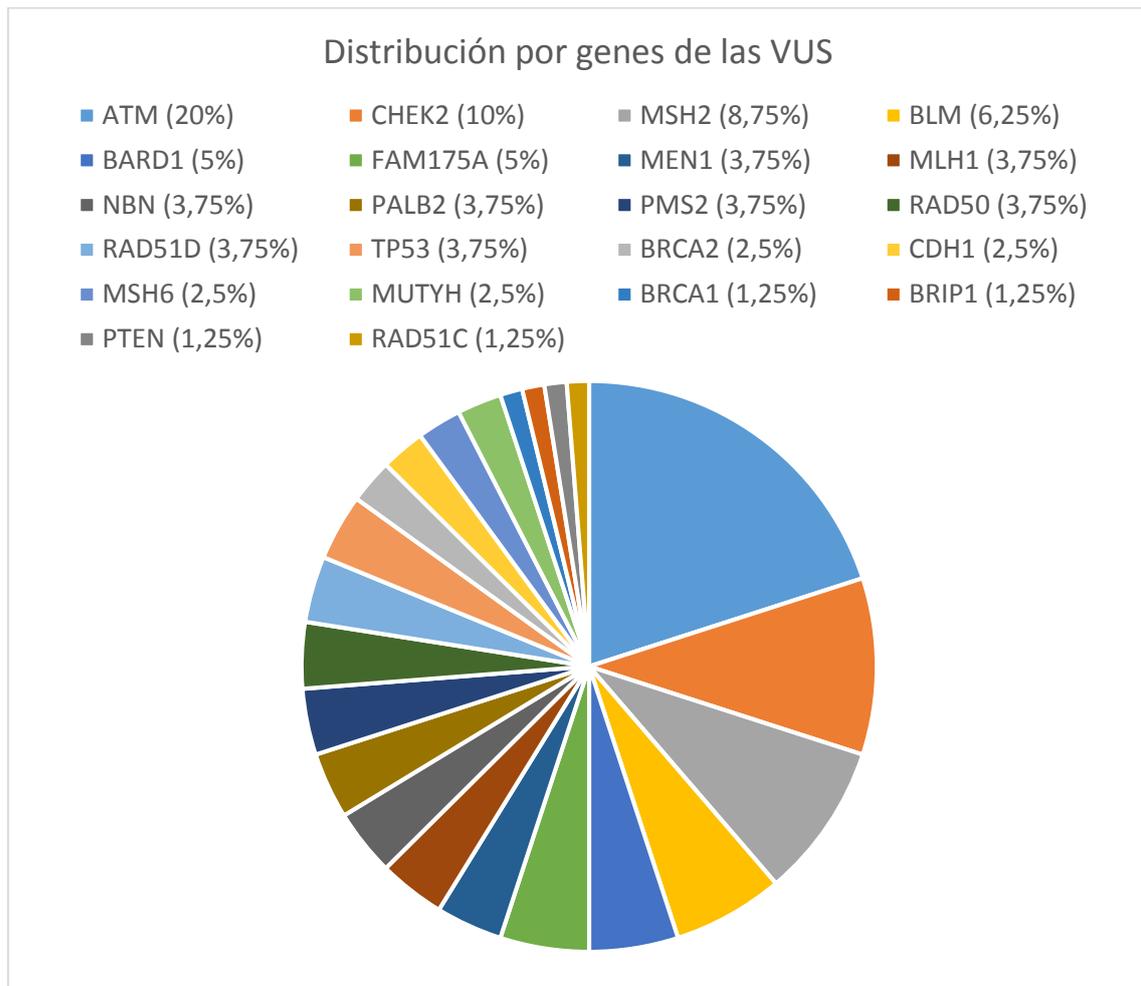
Gen	Exón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	refSNP	Nº de casos
<i>MUTYH</i>	7	c.536A>G	p.Tyr179Cys	rs34612342	2
	13	c.1187G>A	p.Gly396Asp	rs36053993	3

**Tabla 15.** Variantes patogénicas halladas en *MUTYH*

## 4.2 Variantes con significado clínico desconocido

Se detectaron 79 variantes de significado clínico desconocido. De ellas, 10 no habían sido descritas en bases de datos. Refiriéndonos al tipo de cambio, se detectaron: 66 de tipo *missense*, 8 intrónicas, 3 silenciosas, 1 en la región 5'UTR y 1 en la región 3'UTR (**Tabla 16**).

Estas variantes se distribuyeron en 22 genes. En la **Figura 49** se representa la distribución de estas variantes por genes. Al igual, que en el caso de las variantes patogénicas, los principales genes en los que se hallaron VUS fue *ATM*, seguido de *CHEK2*.



**Figura 49.** Distribución por genes de las VUS halladas en el estudio.

Gen	Exón/ Intrón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Tipo de variante	RefSNP	ClinVar	Nº casos	Caso índice	Referencia bibliográfica
ATM	6	c.610G>A	p.Gly204Arg	M	rs147915571	127419	1	CM (33)	-
	8	c.967A>G	p.Ile323Val	M	rs587781511	141123	1	CM (47)	Li A. y col. [148] Carranza D. y col. [125]
	IN8	c.1066-6T>G	-	I	rs201686625	3038	1	CMb (41)	Ding H. y col. [149]
	9	c.1229T>C	p.Val410Ala	M	rs56128736	127332	1	CM (46)	Liang WS. y col. [150] Edvardsen H. y col. [151] Thorstenson YR. y col. [152]
	15	c.2289T>A	p.Phe763Leu	M	rs34231402	127347	1	CM (47)	Yurgelun MB. y col. [153]
	20	c.2944C>T	p.Arg982Cys	M	rs587779830	127363	1	CM (52)	-
	22	c.3277A>G	p.Ile1093Val	M	rs876659667	232276	1	CMb (43)	-
	IN23	c.3402+3A>C	-	I	ND	ND	1	CM (34)	-
	29	c.4388T>G	p.Phe1463Cys	M	rs138327406	127388	2	COb (34) CM (49)	Stafford JL. y col. [154]
	40	c.5975A>C	p.Lys1992Thr	M	rs150757822	127415	2	CM + CPan (66) CM (41)	Hajkova N. y col. [155] Shindo K. y col. [156]
	41	c.6067G>A	p.Gly2023Arg	M	rs11212587	127416	1	CMb (39)	Mangone FR. y col. [122] Podralska M. y col. [157] Thorstenson YR y col. [152]
	IN45	c.6572+11C>T	-	I	rs368049107	490663	1	CM (55)	-

Gen	Exón/ Intrón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Tipo de variante	RefSNP	ClinVar	Nº casos	Caso índice	Referencia bibliográfica
ATM	49	c.7187C>G	p.Thr2396Ser	M	rs370559102	127478	1	CO (18)	Goldstein AM. y col. [158]
	51	c.7618G>A	p.Val2540Ile	M	rs35203200	141579	1	CMb (41)	Stafford JL. y col. [154]
	56	c.8207A>G	p.Asn2736Ser	M	rs1190456608	453723	1	CO (63)*	-
	58	c.8495G>A	p.Arg2832His	M	rs529296539	133638	1	CMb (38,56)	-
BARD1	3	c.253G>T	p.Val85Leu	M	rs370359540	142450	1	CM (30)	Irminger-Finger I. y col. [159]
	3	c.277C>A	p.Gln93Lys	M	ND	ND	1	CM (30)	-
	4	c.570T>A	p.Asp190Glu	M	ND	ND	1	CM (42)	-
	5	c.1346A>G	p.Gln449Arg	M	rs916069875	422972	1	CM (24)	-
BLM	3	c.763A>G	p.Ser255Gly	M	ND	568392	1	CM (33)	-
	8	c.1928G>A	p.Arg643His	M	rs12720097	12740	2	CMb (39)	-
								CM (41)	
	13	c.2657A>C	p.His886Pro	M	rs1420145471	ND	1	CM (48)	-
	17	c.3283C>A	p.Gln1095Lys	M	rs754127572	ND	1	CM (49)	-
IN21	c.4076+4T>G	-	I	rs183176301	136520	2	CMb (55) CM (30)	Goidescu IG. y col. [160]	
BRCA1	15	c.4582C>G	p.Leu1528Val	M	ND	ND	1	CM (45)	-

Gen	Exón/ Intrón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Tipo de variante	RefSNP	ClinVar	Nº casos	Caso índice	Referencia bibliográfica
BRCA2	11	c.2119G>A	p.Asp707Asn	M	rs80358487	ND	1	CO (32)	-
	11	c.4396T>A	p.Leu1466Ile	M	rs1555283763	531308	1	C end (53) CM (65)	-
BRIP1	15	c.2220G>T	p.Gln740His	M	rs45589637	133752	3	CM (39)	Penkert J. y col. [161] Kahn R. y col. [162]
								CO (59)	
								CM (16)	
CDH1	7	c.854C>T	p.Thr285Ile	M	rs587781634	141288	2	CM (47)	-
								CM (40)	
	7	c.867G>A		M	rs754143182		1	CM (36)	-
CHEK2	2	c.134C>T	p.Thr45Met	M	rs558321010	230559	1	CO (18)	-
	IN3	c.320-5T>A	-	I	rs121908700	133527	2	CM (27)	Mucaki EJ. y col. [163] Decker B. y col. [164] Castéra L. y col. [165] Kraus C. y col. [166]
								CM (37)	
	4	c.442A>G	p.Arg148Gly	M	rs876660482	233550	1	CM (47)	Yorczyk A. y col. [167]
	10	c.1008G>A	p.Gln336Gln	S	rs201544715	279766	1	CM (38)	-
	12	c.1216C>T	p.Arg406Cys	M	rs587782527	142533	1	CM (23)	Mohamad S. y col. [168] Rashid MU. y col. [169] Osorio A. y col. [170]
	14	c.1427C>T	p.Thr476Met	M	rs142763740	128060	1	CM (21)	Yurgelun MB. y col. [171] Eliade M. y col. [124] Roeb. Y col. [172]
15	c.1489G>A	p.Asp497Asn	M	rs143965148	142445	1	CC (24) CM (39)	-	

Gen	Exón/ Intrón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Tipo de variante	RefSNP	ClinVar	Nº casos	Caso índice	Referencia bibliográfica
<i>CHEK2</i>	16	c.1562G>A	p.Arg521Gln	M	rs373959274	185219	1	CMV (53)	-
<i>FAM175A</i>	5	c.323A>T	p.Gln108Leu	M	ND	ND	1	CMb (40) CyC (61)	-
	6	c.588A>G	p.Gln196Gln	M	rs1422802770	ND	1	CM (36)	-
	X	c.635T>G	p.Val212Gly	M	ND	ND	1	Liinfoma (50) CMV (63)*	-
	IN8	c.797-11A>G	-	I	rs776370144	ND	1	CM (33)	-
<i>MEN1</i>	5'UTR	c.-2C>T	-	5'UTR	rs653534	219693	1	CM (18)	-
	10	c.1420G>C	p.Glu474Gln	M	rs1182898331	ND	1	CMb (48)	-
	11	c.1633C>T	p.Pro545Ser	M	rs745404679	200987	1	CM (37)	Cuny T. y col. [173]
<i>MLH1</i>	2	c.157G>A	p.Glu53Lys	M	rs63751199	234586	1	CO (39) CM (47)	-
	5	c.386G>A	p.Ser129Asn	M	rs755678310	ND	1	CM (16)	-
	11	c.976G>T	p.Val326Leu	M	ND	ND	1	CM (47)	-
<i>MSH2</i>	3	c.470G>C	p.Gly157Ala	M	rs765489269	216361	1	CM (39)	-
	6	<a href="#">c.1045C&gt;G</a>	p.Pro349Ala	M	rs267607939	90512	1	CM (42)	Rubio Del Campo A. y col. [174] Cragun D. y col. [175]
	7	c.1130A>G	p.Gln377Arg	M	rs776174711	237358	1	CMb (46)	-
	9	c.1405C>G	p.Leu469Val	M	rs780702096	455490	1	CM (56)	-
	12	c.1782A>G	p.Thr595Thr	M	rs1316152213	479847	1	CM (46)	-
	12	<a href="#">c.1787A&gt;G</a>	p.Asn596Ser	M	rs41295288	41646	3	CM (29) CM (46) CM (27)	Jóri B. y col. [176]

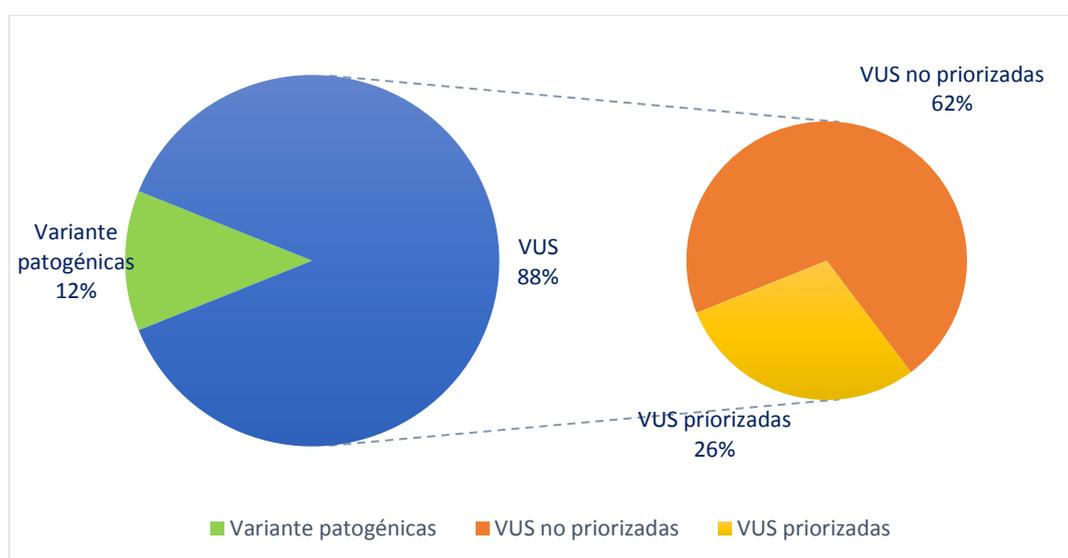
Gen	Exón/ Intrón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Tipo de variante	RefSNP	ClinVar	Nº casos	Caso índice	Referencia bibliográfica
<i>MSH2</i>	3'UTR	c*10_*12del	-	3'UTR	rs764232113	419175	1	CMb (41)	-
<i>MSH6</i>	4	c.2281A>G	p.Arg761Gly	M	rs199876321	140836	1	CMb (41)	Rey JM. Y col. [177]
	9	c.3883C>T	p.Pro1295Ser	M	ND	ND	1	CO (39) CM (60)*	-
<i>MUTYH</i>	3	c.196>A	p.Ala66Thr	M	rs1064793421	418771	1	CO (63)	-
	10	c.890G>A (NM_001048171)	p.Arg297Lys	M	rs149342980	182694	1	CM (49)	-
<i>NBN</i>	3	c.283G>A	p.Asp95Ans	M	rs61753720	127869	1	CM (33)	Karageorgos I. y col. [178] Gao P. y col. [179] Desjardins S. y col. [180]
	13	c.1999T>C	p.Ser667Pro	M	rs587780091	127863	1	CM (38) CO (46)	-
	IN13	c.2071-4A>G	-	I	rs746994234	219601	1	CM (47)	-
<i>PALB2</i>	4	c.742G>C	p.Val248Leu	M	rs572102702	418891	1	CM (18) Glio (21)*	-
	4	c.814G>A	p.Glu272Lys	M	rs515726127	126772	1	CM (21)	Kuusisto KM. y col. [181]
	8	c.2816T>G	p.Leu939Trp	M	rs45478192	126683	3	CM (36)	Southey MC. Y col. [133] Catucci I. y col. [182] Myszka A. y col. [183] Park JY. y col. [184]
								CM (47)	
CM (36)									
<i>PMS2</i>	4	c.279A>G	p.Gln93Gln	S	rs1554304728	484258	1	CMb (54)	
	12	c.2012C>T	p.Thr671Met	M	rs587780046	127770	1	CO (25)	Yang XR. y col. [185]
<i>PTEN</i>	5	c.456A>G	p.Leu152Leu	S	rs779626613	185952	1	CM (45)	Kechagioglou P. y col. [186]

Gen	Exón/ Intrón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Tipo de variante	RefSNP	ClinVar	Nº casos	Caso índice	Referencia bibliográfica
RAD50	14	c.2397G>C	p.Gln799His	M	rs61749630	128004	1	CM (27)	-
	16	c.2548C>T	p.Arg850Cys	M	rs181961360	128006	1	CM (35)	Castellanos E. y col. [187]
	IN 18	c.2923-7T>C	-	I	rs1329253830	548815	1	CM (47)	-
RAD51C	1	c.134A>G	p.Glu45Gly	M	rs587781383	140940	1	CM (30)	Sopik V. y col. [188]
RAD51D	1	c.26G>C	p.Cys9Ser	M	rs140825795	127886	1	CMb (54)	Wickramanayake A. y col. [189] Song H. y col. [51]
	3	c.323G>T	p.Arg108Leu	M	ND	ND	1	CM (52)	-
	5	c.472A>G	p.Asn158Asp	M	rs141690729	182858	1	CM (49)	-
TP53	5	c.469G>A	p.Val157Ile	M	rs121912654	185404	1	CM (45)	Jalkh N. y col. [190]
	6	c.665C>A	p.Pro222Gln	M	ND	ND	1	CM (47)	-
	8	c.869G>A	p.Arg290His	M	rs55819519	127825	1	CM (24)	Stjepanovic N. y col. [191] De Andrade KC. y col. [192, 193]

**Tabla 16.** Variantes con significado clínico desconocido halladas, junto con las características fenotípicas de los casos índice portadores y las principales fuentes bibliográficas consultadas. Se destacan en color aquellas variantes de significado clínico desconocido encontradas en estudios de población española de la manera siguiente: morado para las variantes que se habían encontrado en el artículo de Tavera-Tapia y colaboradores [67], azul para las que se habían descrito en el artículo de Bonache y colaboradores [80], naranja para las que aparecían en ambos estudios.

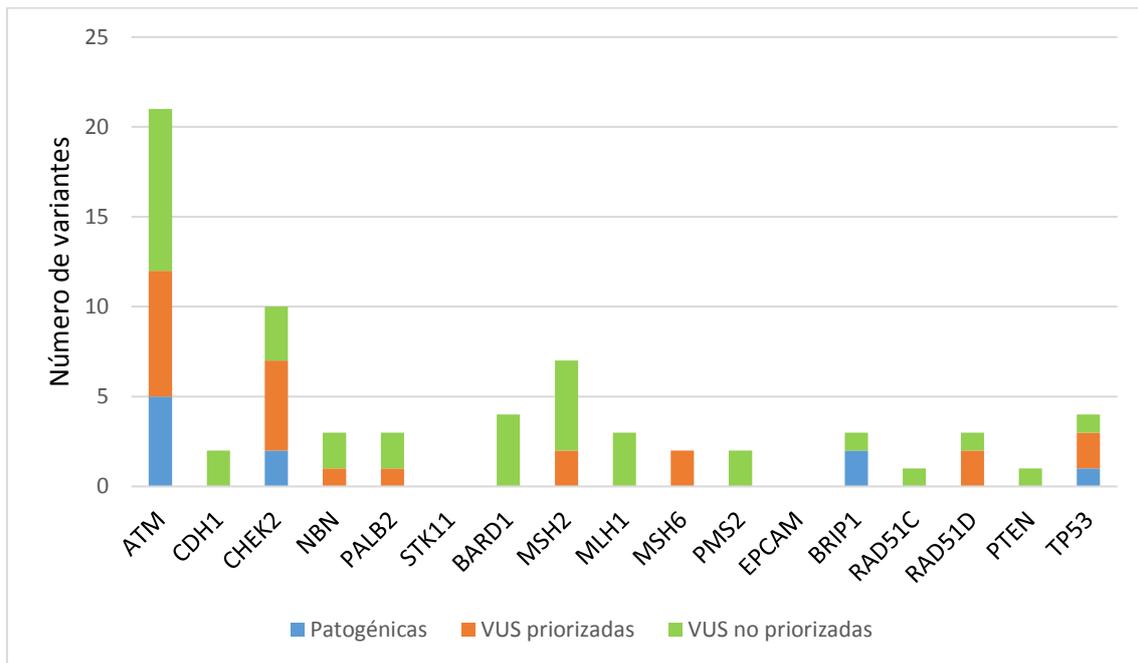
Para clasificar las variantes descritas en la **Tabla 16** como VUS, se utilizaron herramientas bioinformáticas *in silico*, cuyos resultados se resumen en la **Tabla 17**.

Posteriormente, se realizó una priorización de las variantes con mayor riesgo de resultar patogénicas y, por tanto, en las que merece la pena realizar más estudios para determinar su efecto clínico. En la **Figura 50** se representa la proporción de los distintos tipos de variantes halladas según su clasificación clínica: variantes patogénicas y VUS (dentro de las cuales estarían las VUS priorizadas y las VUS no priorizadas).



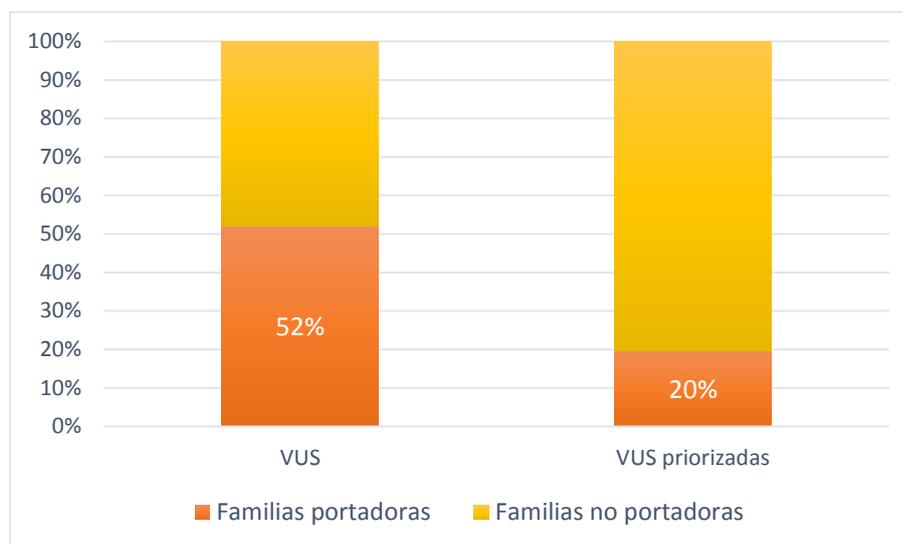
**Figura 50.** Distribución de las variantes halladas según su significado clínico.

En total se priorizaron 23 de las 79 VUS halladas (29%). La distribución de variantes patogénicas, VUS priorizadas y VUS no priorizadas entre los distintos genes de riesgo se resume en la **Figura 51**.



**Figura 51.** Distribución de las variantes halladas en genes asociados a un incremento de riesgo de CM y cáncer ginecológico. Se muestra, dentro de cada gen, el número de variantes patogénicas, VUS priorizadas y VUS no priorizadas halladas en el estudio.

Un total de 72 CI fueron portadores de al menos una variante de significado clínico desconocido, lo que supuso aproximadamente un 52% de la población estudiada. Si nos referimos a aquellas familias portadoras de una VUS priorizada, el porcentaje se reduciría al 20% (27/138) (**Figura 52**).



**Figura 52.** Número de familias portadoras de VUS y VUS priorizadas con respecto al total de familias estudiadas.

A continuación se describen las VUS priorizadas, las cuales están señaladas en negrita en la **Tabla 17**.

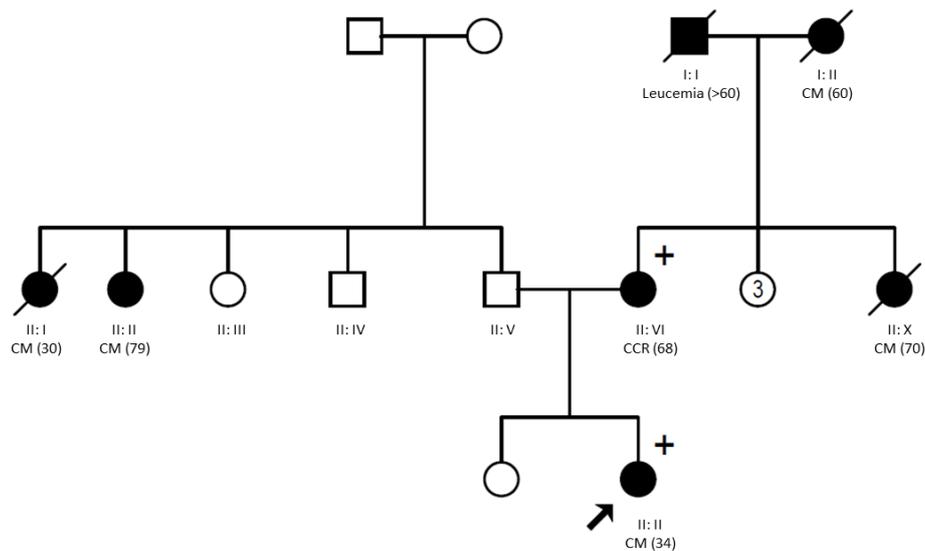
#### 4.2.1 VUS priorizadas en genes con riesgo elevado de CM

En los pacientes con variantes patogénicas en genes *ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *PALB2*, *PTEN* y *STK11* existe un riesgo elevado de padecer CM [117].

De las variantes de significado clínico desconocido halladas en *ATM*, merece la pena destacar las siguientes:

- La variante **c.967A>G** produce un cambio de isoleucina por valina en el residuo 323. Aunque las herramientas bioinformáticas utilizadas proporcionan predicciones discordantes, se debería considerar su posible patogenicidad ya que en la bibliografía consultada se ha hallado en pacientes con ataxia telangiectasia. En uno de estos estudios, realizado sobre una cohorte de población española, esta variante se clasificó como deletérea y se afirmó que afectaba a la función de la proteína [125, 148].

- La variante **c.1229T>C** produce un cambio de valina por alanina en el residuo 410 de la proteína. La mayoría de las herramientas bioinformáticas utilizadas predijeron un efecto deletéreo de ésta, y el cambio supondría un efecto moderado en las propiedades fisicoquímicas de un aminoácido poco conservado evolutivamente. En la bibliografía más reciente se clasificó como VUS [150]. Por lo tanto, se necesita más estudios que concluyan el efecto clínico de la variante.
- La variante **c.2944C>T** produce un cambio de arginina por cisteína en el residuo 982 de la proteína. La mayoría de las herramientas bioinformáticas utilizadas apoyan un efecto deletéreo de esta variante. De hecho, según las herramientas bioinformáticas *Align GVGD* y la puntuación *Grantham* se trata de un aminoácido moderadamente conservado y el cambio produce un cambio importante en las propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, no se ha encontrado bibliografía que demuestre que la alteración produzca un efecto en la función de la proteína. Por lo tanto, se requiere profundizar más en esta variante para determinar su asociación con un mayor riesgo de cáncer.
- La variante intrónica **c.3402+3A>C** tiene un alto riesgo de afectar el *splicing* según las herramientas utilizadas. Esta variante no había sido descrita previamente en bases de datos ni en la bibliografía. Se halló en un caso índice que se trató de una mujer diagnosticada de cáncer de mama a los 34 años y con historia familiar de CM en ambas ramas familiares. Ante la sospecha de que la variante pudiera afectar al *splicing* alternativo, se aconsejó realizar estudio de cosegregación de la variante, por lo que se estudió a su madre, diagnosticada de cáncer de colon a los 68 años, la cual también resultó portadora de la variante (**Figura 53**). Por lo tanto, sería necesario completar el estudio de cosegregación. Ya que no quedan afectados vivos en esa rama familiar, sólo se podrían estudiar familiares sanos. Además habría que realizar un estudio del ARNm para comprobar si se produce una pérdida (*skipping*) del exón 23 o cualquier otra alteración en el *splicing*.



**Figura 53.** Árbol familiar de la familia en las que se halló la variante c.3402+A>C en ATM.

- La variante **c.4388T>G** produce un cambio de fenilalanina por cisteína en el residuo 1463 de la proteína. Se ha encontrado en dos familias, cuyos CI son una mujer diagnosticada de cáncer de ovario bilateral a los 34 años y otra mujer diagnosticada de cáncer de mama a los 49 años. La mayoría de las herramientas bioinformáticas utilizadas apoyan un efecto deletéreo de esta variante. Se trata de un residuo altamente conservado según estas herramientas y se predice que el cambio de aminoácidos produce una importante alteración de las propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, la bibliografía consultada no es concluyente al respecto, por lo que más estudios son necesarios para determinar la patogenicidad de la variante.
- La variante **c.5975A>C** produce un cambio de lisina por treonina en el aminoácido 1992 de la proteína. Se trataría de un efecto moderado en las propiedades fisicoquímicas que afectaría a un aminoácido poco conservado evolutivamente. La mayoría de las herramientas *in silico* predicen patogénica, pero la bibliografía disponible no ha establecido la implicación clínica de la variante, por lo que se necesitan más estudios que concluyan la implicación clínica de esta variante.

- La variante **c.6067G>A** produce un cambio de glicina por arginina en el residuo 2023 de la proteína. La mayoría de las herramientas bioinformáticas utilizadas apoyan su patogenicidad. De hecho, se predice que el residuo afectado está moderadamente conservado y el cambio produce un efecto moderado en las propiedades fisicoquímicas. Esta variante fue descrita en pacientes con cáncer de mama en estudios previos realizados en población austriaca, brasileña y polaca, prediciéndose como potencialmente patogénica pero no se ha confirmado con estudios funcionales o de casos controles [122, 152, 157]. Por lo tanto, se requieren más estudios para llegar a conclusiones sobre su efecto deletéreo y una posible asociación con un mayor riesgo de cáncer.

De las variantes de significado clínico desconocido halladas en el gen *CHEK2* destacaron las siguientes:

- La variante intrónica **c.320-5T>A** tiene un alto riesgo de afectar al *splicing* según las herramientas bioinformáticas integradas en el software *Alamut* y en *Varsome*. Dicha variante había sido previamente descrita en la bibliografía, en la que se hace referencia a un posible efecto en el *splicing* [163, 164]. De hecho, en un estudio llevado a cabo por Decker y colaboradores se encontró una asociación estadísticamente significativa entre esta variante y un incremento de riesgo de cáncer de mama, ya que se predice una reducción del reconocimiento del sitio aceptor normal del *splicing*, así como una introducción de un nuevo sitio aceptor tres nucleótidos aguas arriba. Esto conllevaría un cambio que preservaría el marco de lectura [164]. En un análisis mediante RT-PCR realizado por Kraus C. y colaboradores se obtuvo un resultado confuso, ya que se identificó una variante que carecía de los exones 3 y 4, pero sin generarse un codón de parada prematuro. Sin embargo, la cantidad del transcrito acortado en comparación con el alelo salvaje fue <20%. Esto sugirió que esta variante reducía pero no eliminaba el uso del sitio aceptor del *splicing* constitutivo y, por lo tanto, puede considerarse como un alelo hipomórfico [166].
- La variante **c.442A>G** produce un cambio de arginina por glicina en el residuo 148 de la proteína. Las herramientas *in silico* indican que no se

trataba de un residuo muy conservado y las alteraciones fisicoquímicas del cambio de aminoácido son moderadas. Sin embargo, los programas predictores de *splicing* incluidos en *Alamut* predicen la posibilidad de una alteración a este nivel, ya que se encuentra a tres nucleótidos del final del segundo exón codificante. Sin embargo, en *Varsome* se predijo una baja probabilidad de afectación del *splicing*. Por otro lado, esta variante aparece en la literatura pero no se menciona un efecto en el empalme de ARN. Por tanto, se debería realizar un estudio de ARNm para comprobar si se produce una alteración a este nivel.

- La variante **c.1008G>A** es una variante sinónima que se encuentra en el último nucleótido del octavo exón codificante el gen. Las herramientas *in silico* utilizadas predicen que el cambio de nucleótido produce una posible pérdida de un sitio donador y de un sitio aceptor. Sin embargo, la variante, aunque presente en las principales bases de datos, no aparece en la bibliografía, por lo que merecería la pena profundizar en el posible efecto en el *splicing*. Para ello se debería realizar un estudio de ARNm para comprobar si se altera en proceso de empalme o si se produce algún fenómeno de *skipping*.
- La variante **c.1216C>T** produce un cambio de arginina por cisteína en el residuo 406 de la proteína. Según las herramientas bioinformáticas utilizadas, supone un cambio en un aminoácido no conservado pero con un efecto importante en las propiedades fisicoquímicas. Además, también las herramientas SIFT y *Mutation Taster* la predicen como deletérea. Esta variante se había encontrado previamente en pacientes con CM y CO en distintas poblaciones, incluyendo la española. En un estudio realizado por Osorio y colaboradores, la variante se encontró en una familia con dos casos de CM y estuvo ausente en los 400 individuos del grupo control [170]. Sin embargo, no cumple ninguno de los criterios de benignidad o patogenicidad de la ACMG, por lo que se necesitan más estudios para determinar el efecto clínico de la variante.
- La variante **c.1427C>T** produce un cambio de treonina por metionina en el residuo 476. Se trata de un residuo ligeramente conservado (C15 según *Align GVGD*) y se predice que el cambio de aminoácido altera moderadamente las características fisicoquímicas. La mayoría de las

herramientas bioinformáticas la predicen deletérea. Además se había descrito previamente en bibliografía, principalmente en pacientes con cáncer de mama pero también en cáncer colorrectal [124, 171, 172]. En un estudio funcional *in vivo* realizado en levaduras por Roeb W. y colaboradores se observó que esta variante ocasionaba una respuesta reducida al daño en el ADN [172]. Esto, junto con el fenotipo alarmante del caso índice estudiado (cáncer de mama a los 21 años), hace que sea necesario confirmar su patogenicidad mediante un estudio de cosegregación de la variante.

De las variantes de significado clínico desconocido halladas en el gen *NBN* destacaron las siguientes:

- La variante **c.283G>A** es una variante que produce un cambio de ácido aspártico por asparagina en el residuo 95 de la proteína. La mayoría de las herramientas bioinformáticas utilizadas la predicen como deletérea. Sin embargo, la bibliografía disponible es contradictoria a la hora de determinar el efecto clínico de la variante. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios que concluyan el efecto de la variante.
- La variante **c.2071-4A>G** es una variante intrónica con un alto riesgo de afectar al *splicing* según las herramientas bioinformáticas integradas en el software *Alamut* y en *Varsome*. Según estas, es posible que se pierda un sitio aceptor en la posición c.2071 y que se cree uno nuevo tres nucleótidos aguas arriba (c.2071-3). Sin embargo, no aparece en la bibliografía y en *ClinVar* se ha clasificado en la mayoría de los registros como VUS. Esta variante se halló en una paciente diagnosticada de un CM a los 47 años. Por lo tanto, sería necesario realizar un estudio mediante RT-PCR para comprobar si se altera el ARNm.

De las variantes de significado clínico desconocido halladas en el gen *PALB2* destacaron las siguientes:

- La variante **c.2816T>G** produce un cambio de leucina por triptófano en el residuo 939 de la proteína. Éste está altamente conservado, aunque según la puntuación *Grantham* el cambio afecta ligeramente a las propiedades fisicoquímicas. Por otro lado, la mayoría de los programas *in*

*silico* la predican como patogénica. Además, esta variante se había descrito previamente en la bibliografía, tanto en pacientes con cáncer de mama como en pacientes con cáncer de ovario [182–184]. Sin embargo, no se pudo confirmar el vínculo entre la variante y la enfermedad: un estudio funcional realizado por Park JY y colaboradores afirmó esta variante alteraba parcialmente el complejo PALB2-RAD51C-BRCA2 y, por tanto, estaba disminuido el proceso de recombinación homóloga inducido por daño de doble hebra en el ADN, lo que conllevó una mayor sensibilidad a la radiación ionizante [184]. Posteriormente, una revisión realizada por Catucci y colaboradores., en la que se analizaron los resultados de distintos estudios casos-contróles en lo que se incluía esta variante, concluyó que no estaba asociada a riesgo de cáncer de mama [182]. Ante estos resultados, sería interesante realizar un estudio de cosegregación en las tres familias en las que se ha hallado la variante, para así completar la información presente en los estudios ya realizados y así ayudar a esclarecer la patogenicidad de esta variante.

#### 4.2.2 VUS priorizadas en genes con incremento de riesgo de cáncer ginecológico

En los pacientes con variantes patogénicas en genes *BARD1*, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D* existe un riesgo elevado de padecer cánceres de tipo ginecológico, como el CO [117].

De las variantes con significado clínico desconocido halladas en *MSH2* destacaron las siguientes:

- La variante **c.1045C>G** produce un cambio de prolina por alanina en el residuo 349. Supondría un efecto pequeño en las propiedades fisicoquímicas en un residuo levemente conservado según las herramientas bioinformáticas utilizadas. Según la bibliografía disponible, un cambio en el mismo aminoácido está relacionado con el síndrome de Lynch [174]. Además, en un artículo de Cragun D. y colaboradores se mencionó esta variante como clínicamente accionable [175].
- La variante **c.1130A>G** produce un cambio de glutamina por arginina en el residuo 377 de la proteína. La mayoría de las herramientas *in silico*

predijeron esta variante como patogénica. Sin embargo, no hay información sobre ella en la bibliografía disponible. Por lo tanto, sería necesario profundizar más en esta variante para concluir su categorización clínica.

De las variantes con significado clínico desconocido halladas en *MSH6* destacaron las siguientes:

- La variante **c.2281A>G** produce un cambio de arginina por glicina en el aminoácido 761. Esto produciría un efecto moderado en las propiedades fisicoquímicas en un residuo no conservado. Además, la mayoría de las herramientas *in silico* utilizadas la predicen como deletérea. Por lo tanto, sería interesante realizar un estudio de cosegregación que ayude a concluir la patogenicidad de esta variante.
- La variante **c.3883C>T** produce un cambio de prolina por serina en el residuo 1295 de la proteína. La puntuación *Grantham* indica un efecto moderado en las propiedades fisicoquímicas de un residuo que, según *Align GVGD* está altamente conservado. Además, la mayoría de las herramientas *in silico* utilizadas la predicen como deletérea y todavía no ha sido descrita en bibliografía ni bases de datos. Esta variante se encontró en el mismo CI portador de la variante patogénica c.677dup en *XRCC2*. Dada la dudosa accionabilidad clínica de las variantes patogénicas en *XRCC2*, y dado que dicho CI había sido diagnosticado de CO a los 39 años, debería de plantearse la posibilidad de que esta variante esté implicada en la patología del CI. Por lo tanto, son necesarios más estudios para determinar la patogenicidad de esta variante.

De las variantes con significado clínico desconocido halladas en *RAD51D* destacaron las siguientes:

- La variante **c.26G>C** produce un cambio de cisteína por serina en el residuo 9 de la proteína. La mayoría de las herramientas bioinformáticas predicen el cambio como deletéreo. Sin embargo, un estudio reveló una misma frecuencia en controles en americanos de origen europeo [189]. Por lo tanto, son necesarios más estudios para determinar su relación con el riesgo de cáncer.

- La variante **c.323G>T** produce un cambio de arginina por leucina en el residuo 108. Esta variante no había sido descrita previamente en bases de datos ni en la bibliografía. Las herramientas bioinformáticas utilizadas prevén un potencial efecto en el *splicing*, ya que se encuentra en el último nucleótido del tercer exón del gen. Por lo tanto, se vería afectado el sitio donador, con una alta probabilidad de perderse. Por lo tanto, este potencial efecto debe comprobarse mediante retrotranscripción y estudio del ARNm para comprobar si se ha producido un *skipping* del exón o cualquier fenómeno relacionado con el proceso de empalme.

#### 4.2.3 VUS priorizadas en genes de otros síndromes de cáncer hereditario

En los pacientes con variantes patogénicas en genes *TP53* y *PTEN*, responsables del síndrome de Li Fraumeni y del síndrome de Cowden, respectivamente, existe predisposición a padecer CM [117].

De las variantes de significado clínico desconocido halladas en el gen *TP53* destacaron las siguientes:

- La **c.665C>A** produce un cambio de prolina por glutamina en el aminoácido 222. Se trataría de un efecto moderado en las propiedades fisicoquímicas en un residuo no conservado según las herramientas bioinformáticas utilizadas. La mayoría de los programas *in silico* utilizados la predicen deletérea. Además, es una variante que no había sido descrita en bases de datos ni en la bibliografía previamente. Por lo tanto, se requiere profundizar en esta variante para determinar su relación con el Síndrome de Li Fraumeni.
- La variante **c.869G>A** produce un cambio de arginina por histidina en el residuo 290. Los estudios *in silico* realizados para esta variante no predicen patogenicidad. Sin embargo, en la base de datos *Uniprot* se clasifica como causante de enfermedad. Además, en la bibliografía se indica que la variante se ha encontrado en familias con fenotipo compatible con el síndrome de Li Fraumeni, aunque existen discrepancias a la hora de su interpretación clínica [191–193]. En este estudio la variante se halló en una paciente diagnosticada con cáncer ductal infiltrante de mama a la edad de 24 años. Además, su tío materno había sido

diagnosticado de leucemia a los 54 años. Por lo tanto, sería interesante investigar en profundidad la patogenicidad de esta variante, ampliando el análisis genético a los familiares para poder realizar un estudio de cosegregación.

Gen	Variante	Cambio de aminoácido	Análisis <i>In-silico</i>								Clasificación clínica ACMG
			SIFT	PolyPhen-2	MT	GV-GD	Grantham	Pmut	<i>AlaMut</i>	<i>Varsome</i>	
ATM	c.610G>A	p.Gly204Arg	T (0,29)	PSD (0,914)	CE (0,967)	C0	M (125)	N (87%)	NR	NR	BP1
	<b>c.967A&gt;G</b>	p.Ile323Val	T	PRD (0,979)	CE (0,999)	C0	S (29)	N (91%)	NR	NR	PM1+PM2 PP5 BP1
	c.1066-6T>G	-	-	-	-	-	-	-	AS (c.1066) SSF (-0,7%) MaxEnt (-23%) NNSplice (-3,6%) GeneSplicer (-)	NR <i>Splicing</i> (0,0078)	BP6
	<b>c.1229T&gt;C</b>	p.Val410Ala	D (0,02)	B (0,434)	CE (0,968)	C25	S (64)	N (88%)	NR	D	PP3 BP1
	c.2289T>A	p.Phe763Leu	T (1)	B (0,003)	P (0,975)	C0	S (22)	N (93%)	NR	NR	PM1 BP1
	<b>c.2944C&gt;T</b>	p.Arg982Cys	D (0,01)	PRD (1)	CE (1)	C35	L (180)	N (88%)	NR	D	PM2 PP3 BP1
	c.3277A>G	p.Ile1093Val	T	B (0)	P (1)	C0	S (29)	N (96%)	NR	B	PM1+PM2 BP1+BP4
	<b>c.3402+3A&gt;C</b>	-	-	-	-	-	-	-	DS (c.3402) SSF (-12,5%) MaxEnt (-100%) NNSplice (-97%)	D <i>Splicing</i> (0,9998)	PM2 PP3
	<b>c.4388T&gt;G</b>	p.Phe1463Cys	D (0)	PRD (1)	CE (1)	C55	L (205)	N (84%)	NR	D	PP3 BP1
	<b>c.5975A&gt;C</b>	p.Lys1992Thr	T	PSD (0,730)	CE (1)	C0	M (78)	N (92%)	NR	D	PM1 PP3 BP1
<b>c.6067G&gt;A</b>	p.Gly2023Arg	D (0,01)	PRD (1)	DC (1)	C25	M (125)	N (92%)	NR	D	PM1 PP3 BP1	

Gen	Variante	Cambio de aminoácido	Análisis <i>In-silico</i>								Clasificación clínica ACMG	
			SIFT	PolyPhen-2	MT	GV-GD	Grantham	Pmut	<i>AlaMut</i>	<i>Varsome</i>		
ATM	c.6572+11C>T	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	B	PM2 BP4
	c.7187C>G	p.Thr2396Ser	T	B (0,095)	P	C0	S (58)	N (93%)	NR	NR	PM1 BP1	
	c.7618G>A	p.Val2540Ile	T (0,41)	PSD (0,714)	CE (0,999)	C0	S (58)	N (93%)	NR	NR	PM1+PM2 BP1	
	c.8207A>G*	p.Asn2736Ser	T (0,22)	PSD (0,937)	CE (1)	C0	S (46)	N (84%)	NR	D	PM2 PP3 BP1+BP5	
	c.8495G>A	p.Arg2832His	T (0,44)	PSD (0,770)	CE (1)	C0	S (29)	N (94%)	NR	NR	PM1+PM5 BP1	
BARD1	c.253G>T	p.Val85Leu	T (0,48)	PSD (0,779)	CE (0,995)	C0	S (32)	N (88%)	NR	NR	BP1	
	c.277C>A	p.Gln93Lys	T (1)	PSD (0,791)	P (0,62)	C0	S (53)	N (96%)	NR	NR	PM2 BP1	
	c.570T>A	p.Asp190Glu	T (1)	B (0)	P (1)	C0	S (45)	N (97%)	NR	B	PM2 BP1+BP4	
	c.1346A>G	p.Gln449Arg	T (0,17)	B (0,075)	P (0,721)	C0	S (43)	N (88%)	NR	B	PM2 BP1+BP4	
BLM	c.763A>G	p.Ser255Gly	T (0,52)	B (0,001)	P (1)	C0	S (56)	N (97%)	NR	B	PM1 BP4	
	c.1928G>A	p.Arg643His	T (0,20)	B (0,004)	CE (0,603)	C0	S (29)	N (93%)	NR	B	BP4	

Gen	Variante	Cambio de aminoácido	Análisis <i>In-silico</i>								Clasificación clínica ACMG
			SIFT	PolyPhen-2	MT	GV-GD	Grantham	Pmut	<i>AlaMut</i>	<i>Varsome</i>	
BLM	c.2657A>C	p.His886Pro	T (0,28)	B (0,002)	CE (1)	C0	M (77)	D (87%)	NR	NR	PM2
	c.3283C>A	p.Gln1095Lys	T (0,64)	B (0,001)	P (0,993)	C0	S (53)	N (92%)	NR	NR	PM2
	c.4076+4T>G	-	-	-	-	-	-	-	DS (c.4076) SSF (+0.1%) MaxEnt (-12%) NNSplice (-6,5%) GeneSplicer (-39,5%)	B <i>Splicing</i> <0.0001	BP4
BRCA1	c.4582C>G	p.Leu1528Val	T (0,27)	B (0,010)	P (1)	C0	S (32)	N (89%)	NR	NR	PM1+PM2 BP1
BRCA2	c.2119G>A	p.Asp707Asn	T (0,64)	B (0,244)	P (1)	C0	S (23)	N (96%)	NR	NR	PM1+PM2 BP1
	c.4396T>A	p.Leu1466Ile	T (0,37)	PSD (0,745)	P (1)	C0	S (5)	N (96%)	NR	B	PM1+PM2 BP1+BP4
BRIP1	c.2220G>T	p.Gln740His	T	PRD	DC	C0	S (24)	N	NR	NR	BP1
CDH1	c.854C>T	p.Thr285Ile	D (0,04)	B (0,452)	P (1)	C15	M (89)	D (80%)	NR	NR	BP1
	c.867G>A	p.Ala289=	-	-	-	-	-	-	NR	NR	BP7

Gen	Variante	Cambio de aminoácido	Análisis <i>In-silico</i>								Clasificación clínica ACMG
			SIFT	PolyPhen-2	MT	GV-GD	Grantham	Pmut	<i>AlaMut</i>	<i>Varsome</i>	
CHEK2	c.134C>T	p.Thr45Met	D (0,02)	PRD (0,998)	P (0,989)	C0	M (81)	N (96%)	NR	NR	PM1+PM2
	<b>c.320-5T&gt;A</b>	-	-	-	-	-	-	-	AS (c.320) SSF (-6,9%) MaxEnt (-22,3%) NNSplice (-32,8%) GeneSplicer (-58,4%)	<i>Splicing</i> (0,8037)	PP3
	<b>c.442A&gt;G</b>	p.Arg148Gly	D (0,03)	PRD (1)	CE (1)	C15	M (125)	N (84%)	DS (c.444) SSF (-3,4%) MaxEnt (-18,7%) NNSplice (-0,7%) GeneSplicer (-61,7%) AS (c.444) SSF (-) MaxEnt (-) NNSplice (-) c.444+5 SSF (+73,75) MaxEnt (+137,1%)	D <i>Splicing</i> (0,0067)	PM1+PM2 PP3
	<b>c.1008G&gt;A</b>	p.Gln336Gln	-	-	-	-	-	-	DS (c.1008) SSF (-14,7%) MaxEnt (-78%) NNSplice (-89,6%) GeneSplicer (-) AS (c1008+1) SSF (-) MaxEnt (-) NNSplice (-) GeneSplicer (-)	D <i>Splicing</i> (0,9999)	PM1+PM2 PP3
	<b>c.1216C&gt;T</b>	p.Arg406Cys	D (0,03)	PSD (0,833)	CE (1)	C0	L (180)	N (87%)	NR	NR	-
	<b>c.1427C&gt;T</b>	p.Thr476Met	D (0)	PRD (1)	CE (0,999)	C15	M (81)	D (93%)	NR	D	PM1+PM5 PP3
	c.1489G>A	p.Asp497Asn	T (0,83)	B (0)	P (1)	C0	S (23)	N (91%)	-	B	BP4

Gen	Variante	Cambio de aminoácido	Análisis <i>In-silico</i>								Clasificación clínica ACMG
			SIFT	PolyPhen-2	MT	GV-GD	Grantham	Pmut	<i>AlaMut</i>	<i>Varsome</i>	
<i>CHEK2</i>	c.1562G>A	p.Arg521Gln	T (0,09)	PRD (1)	CE (1)	C0	S (43)	N (83%)	NR	NR	PM1+PM2
<i>FAM175A</i>	c.323A>T	p.Gln108Leu	D (1)	PRD (1)	CE (1)	C0	M (113)	N (82%)	NR	NR	PM2
	c.588A>G	p.Gln196Gln	-	-	P (1)	-	-	-	NR	NR	BP7
	c.635T>G*	p.Val212Gly	D (0)	PRD (1)	CE (1)	C0	M (109)	D (85%)	NR	D	PM2 PP3 BP5
	c.797-11A>G	-	-	-	-	-	-	-	NR	B <i>Splicing</i> ( $<0.0001$ )	PM2 BP4
<i>MEN1</i>	c.-2C>T	-	-	-	-	-	-	-	NR	D	PM2 PP3
	c.1420G>C	p.Glu474Gln	D (0,03)	PSD (0,519)	P (0,855)	C0	S (29)	N (95%)	NR	D	PP3
	c.1633C>T	p.Pro545Ser	T (0,39)	PRD (0,99)	CE (1)	C0	M (74)	N (96%)	NR	D	PM1 PP3+PP5
<i>MLH1</i>	c.157G>A	p.Glu53Lys	T (0,25)	PSD (0,741)	CE (1)	C0	S (56)	N (85%)	NR	D	PM1+PM2 PP3
	c.386G>A	p.Ser129Asn	T (0,26)	B (0,002)	CE (1)	C0	S (46)	N (87%)	NR	B	PM1+PM2 BP4
	c.976G>T	p.Val326Leu	D (0,05)	B (0,05)	CE (1)	C0	S (32)	N (86%)	NR	NR	PM1+PM2

Gen	Variante	Cambio de aminoácido	Análisis <i>In-silico</i>								Clasificación clínica ACMG
			SIFT	PolyPhen-2	MT	GV-GD	Grantham	Pmut	<i>AlaMut</i>	<i>Varsome</i>	
MSH2	c.470G>C	p.Gly157Ala	T (0,12)	PSD (0,885)	CE (1)	C0	S (60)	N (82%)	NR	D	PM+PM2 PP3
	<b>c.1045C&gt;G</b>	p.Pro349Ala	D (0)	PRD (1)	CE	C25	S (27)	D (90%)	NR	D	PM1+PM2 PP3
	<b>c.1130A&gt;G</b>	p.Gln377Arg	T (0,11)	B (0,001)	CE (1)	C0	S (43)	D (80%)	NR	D	PM1+PM2 PP3
	c.1405C>G	p.Leu469Val	T (0,29)	PSD (0,581)	CE (1)	C0	S (32)	N (87%)	NR	D	PM1+PM2 PP3
	c.1782A>G	p.Thr595Thr	-	-	CE (1)	-	-	-	NR	NR	PM1+PM2 BP7
	c.1787A>G	p.Asn596Ser	T (0,63)	B (0,012)	CE (1)	C0	S (46)	N (88%)	NR	NR	PM1
	c*10_*12del	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	PM2 BP6
MSH6	<b>c.2281A&gt;G</b>	p.Arg761Gly	D (0,02)	B (0,048)	CE (1)	C0	M (125)	D (88%)	NR	D	PM+PM2 PP3 BP1
	<b>c.3883C&gt;T*</b>	p.Pro1295Ser	D (0)	PRD (0,999)	CE (1)	C65	M (74)	N (89%)	NR	D	PM1+PM2 PP3 BP1+BP5
MUTYH	c.196>A	p.Ala66Thr	T (0,26)	B (0,003)	P (1)	C0	-	N (95%)	NR	B	PM2 BP4
	c.890G>A (NM_001048171)	p.Arg297Lys	T (0,81)	B (0)	CE (0,985)	C0	S (26)	-	DS c.891 SSF (12,3%) MaxEnt (15,8%) NNSplice (40,5%) GeneSplicer (20,4%)	B <i>Splicing</i> (0.0001)	BP4

Gen	Variante	Cambio de aminoácido	Análisis <i>In-silico</i>							Clasificación clínica ACMG	
			SIFT	PolyPhen-2	MT	GV-GD	Grantham	Pmut	<i>AlaMut</i>		<i>Varsome</i>
NBN	<b>c.283G&gt;A</b>	p.Asp95Ans	T (0,44)	PRD (1)	CE (1)	C0	S (23)	N (83%)	NR	D	PP3 BP1
	c.1999T>C	p.Ser667Pro	T (0,32)	B (0,001)	P (1)	C0	M (74)	N (97%)	NR	B	PM2 BP1+BP4
	<b>c.2071-4A&gt;G</b>	-	-	-	-	-	-	-	AS c.2071-3 SSF (89,85) MaxEnt (4,32) NNSplice (0,53) GeneSplicer (3,4) AS c.2071 SSF (-100%) MaxEnt (-41,6%) NNSplice(-1,9%) GeneSplicer (-35,5%)	D <i>Splicing</i> (0,9987)	PM2 PP3
PALB2	c.742G>C*	p.Val248Leu	T (0,5)	B (0,004)	P (1)	C0	S (32)	N (98%)	NR	B	PM1+PM2 BP1+BP4+BP5
	c.814G>A	p.Glu272Lys	T (1)	PSD (0,565)	P (1)	C0	S (56)	N (97%)	NR	B	PM1+PM2 BP1+BP4
	<b>c.2816T&gt;G</b>	p.Leu939Trp	D (0)	PRD	CE (0,999)	C55	S (61)	D (84%)	NR	D	PM1 PP3 BP1
PMS2	c.279A>G	p.Gln93Gln	-	-	CE (1)	-	-	-	NR	NR	PM+PM2 BP6+BP7
	c.2012C>T	p.Thr671Met	T (0,07)	PSD (0,843)	P (0,926)	C0	M (81)	N (87%)	NR	NR	PM1 BP1
PTEN	c.456A>G	p.Leu152=	-	-	CE (1)	-	-	-	NR	P	PM1 PP3

Gen	Variante	Cambio de aminoácido	Análisis <i>In-silico</i>								Clasificación clínica ACMG
			SIFT	PolyPhen-2	MT	GV-GD	Grantham	Pmut	<i>AlaMut</i>	<i>Varsome</i>	
RAD50	c.2397G>C	p.Gln799His	T (0,20)	PRD (0,966)	CE (0,993)	C0	S (24)	N (95%)	DS c.2397 SSF (-13,3%) MaxEnt (-6,5%) NNSplice (-0,5%) GeneSplicer (-56,5%)	<i>Splicing</i> (0,9997)	BP1
	c.2548C>T*	p.Arg850Cys	D (0,02)	PRD (0,999)	CE (1)	C15	L (180)	D (78%)	NR	D	PP3 BP1+BP5
	c.2923-7T>C	-	-	-	-	-	-	-	NR	B <i>Splicing</i> (<0,0001)	BP4
RAD51C	c.134A>G	p.Glu45Gly	T (0,16)	B (0,002)	CE (0,816)	C0	M (98)	N (83%)	NR	NR	PM2
RAD51D	<b>c.26G&gt;C</b>	p.Cys9Ser	T (0,20)	PSD (0,714)	CE (1)	C0	M (112)	D (88%)	NR	D	PP3 BP1
	<b>c.323G&gt;T</b>	p.Arg108Leu	T (0,14)	PSD (0,470)	P (1)	C0	M (102)	-	SD c.323 SSF (-18,6%) MaxEnt (-100%) NNSplice (-98,5%) GeneSplicer (-)	B <i>Splicing</i> (0,9981)	PM2 BP1+BP4
	c.472A>G	p.Asn158Asp	T (0,56)	PSD (0,918)	P (0,897)	C0	S (23)	N (87%)	NR	NR	BP1
TP53	c.469G>A	p.Val157Ile	T (0,15)	PSD (0,885)	CE (0,036)	C0	S (29)	N (94%)	NR	NR	PM1+PM5
	<b>c.665C&gt;A</b>	p.Pro222Gln	T (0,06)	PSD (0,782)	CE (0,956)	C0	M (76)	D (83%)	NR	D	PM1+PM2 PP3
	<b>c.869G&gt;A</b>	p.Arg290His	T (0,16)	B (0)	CE (0,995)	C0	S (29)	N (90%)	NR	NR	PM1+PM5 PP5

**Tabla 17.** Variantes con significado clínico desconocido halladas, con el resumen de los resultados de los estudios *in silico* realizados, así como los criterios utilizados en su clasificación. En negrita aparecen las variantes priorizadas.\* Variantes que se han hallado en pacientes que ya eran portadores de alguna variante patogénica.

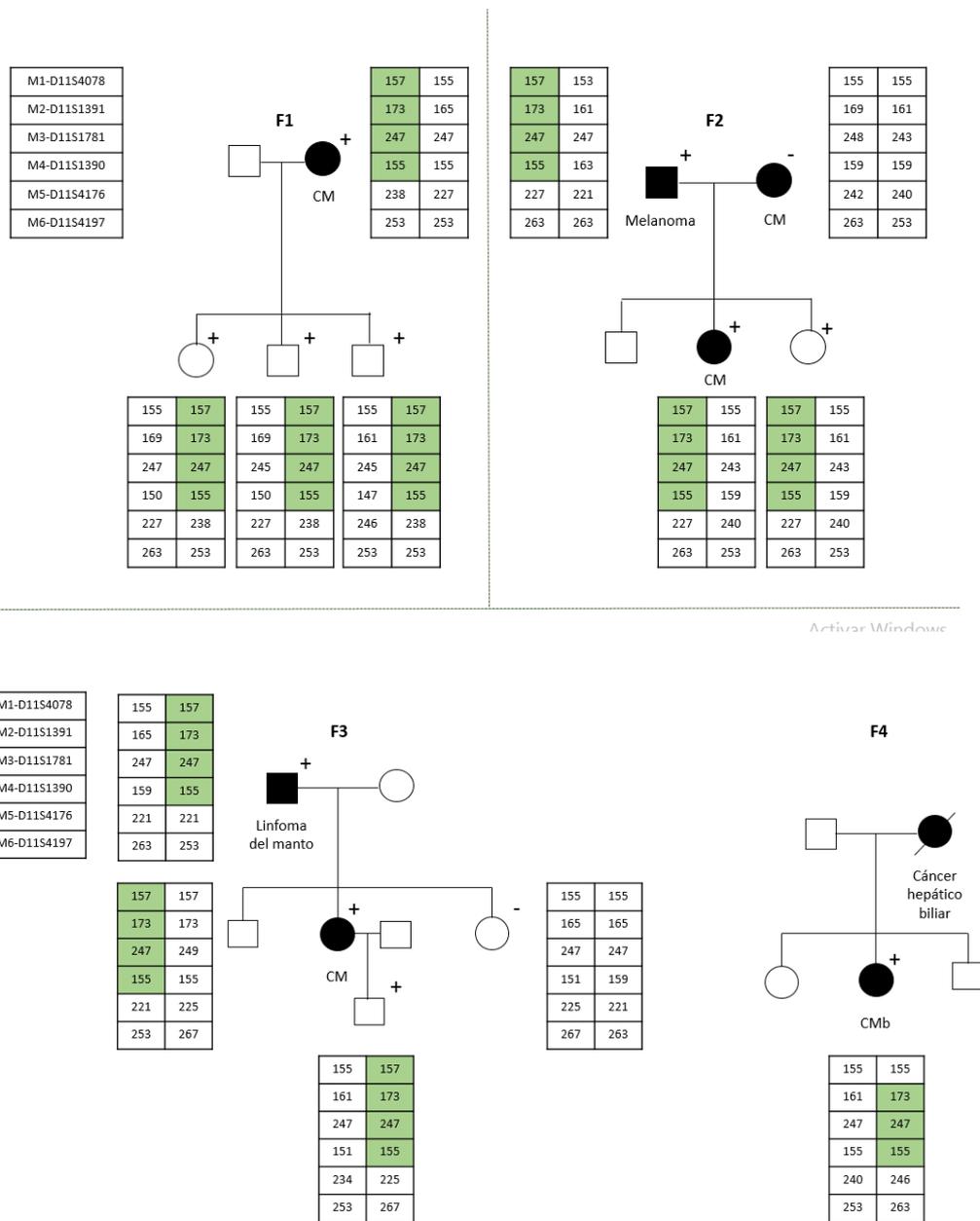
## 5. ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR Y CÁLCULO DE GENERACIONES DE LA VARIANTE PATOGENICA c.8251\_8254del EN ATM.

La variante patogénica *frameshift* c.8251\_8254del (p.Thr2751Serfs\*54) detectada en *ATM* (anteriormente explicada), se había descrito únicamente una vez en la bibliografía en una familia española. Además, se ha encontrado en dos familias de este estudio junto con otras dos familias estudiadas no incluidas en este estudio. Por este motivo, se procedió a realizar estudios de haplotipo con marcadores STR en regiones colindantes a la mutación y el gen *ATM* para poder demostrar que tenían un ancestro común y, por lo tanto, se trataba de un posible efecto fundador en nuestra región.

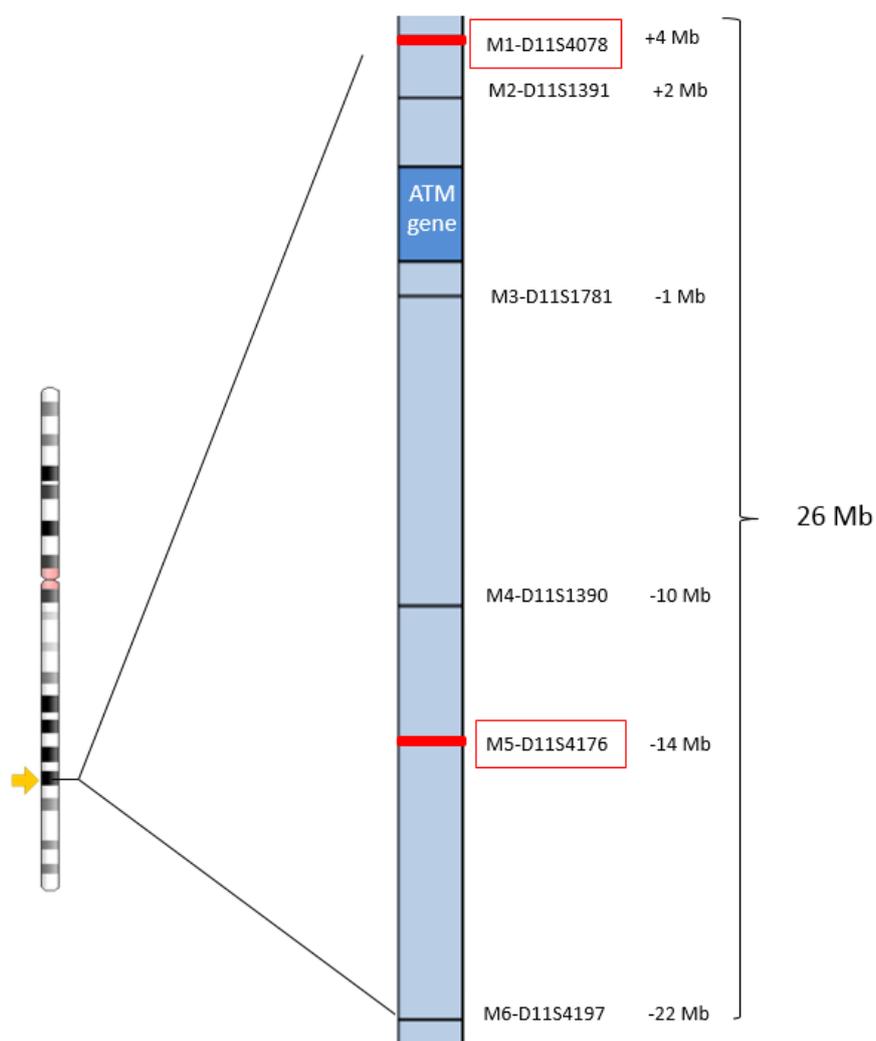
Se procedió al estudio de genotipado con seis marcadores STR seleccionados M1 (D11S4078), M2 (D11S1391), M3 (D11S1781), M4 (D11S1390), M5 (D11S4176) y M6 (D11S4197) en 13 pacientes (11 portadores de la mutación y 2 no portadores) de las 4 familias y en 24 controles sanos. Se pudo comprobar que 10 de los portadores de la variante tenían el mismo haplotipo común (157pb-173pb-247pb-155pb) en los marcadores M1-M4 (D11S4078, D11S1391, D11S1781, D11S1390) respectivamente (**Figura 54**). Este haplotipo no se encontró en ninguno de los no portadores ni en los controles sanos analizados.

Hubo un portador en el que se encontró una variación a este haplotipo común, ya que el único miembro estudiado de la familia F4 difirió en el marcador M1. Por otro lado, a partir del marcador M5 el haplotipo es distinto entre familias.

El alelo 157pb de M1 se encontró en 10 de los 11 afectados ( $P_d=0,9$ ) y en 5 de los 63 alelos control ( $P_n=0,08$ ). Por otro lado, el alelo 238 en M5 se encontró en 4 de los 11 afectados ( $P_d=0,4$ ) y en 3 de los 63 alelos control ( $P_n=0,05$ ). A partir de estos datos, se realizó el cálculo del desequilibrio de ligamiento ( $\delta$ ) para los marcadores M1 y M5, siendo 0,332 y 0,901 respectivamente. La fracción  $\theta$  se determinó a partir de las distancias entre los marcadores M1 y M5 y la mutación. La distancia para M1 fue de 4 cM y la de M5 fue 14 cM, asumiendo que 1cM era equivalente a 1Mb aproximadamente (**Figura 55**). Según estos datos, se estimó que la mutación tuvo lugar hace aproximadamente 5 generaciones, unos 125 años asumiendo 25 años por cada generación.



**Figura 54.** Árboles genealógicos de las familias en las que se halló la variante c.8251\_8254del en ATM y los haplotipos obtenidos tras el análisis de microsatélites. En verde se marca el haplotipo común a todas ellas. CM: cáncer de mama, CMb: cáncer de mama bilateral.



**Figura 55.** Localización de los STR empleados en este estudio con respecto al gen *ATM*. Se remarcan los microsatélites utilizados en el cálculo de las generaciones de la variante c.8251\_8254del.



## **V. Discusión**



## 1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra estuvo formada por una cohorte de 138 que cumplían criterios de selección de SCMOH según las recomendaciones de la SEOM. La mayoría de los CI habían sido diagnosticados de CM (118 CI, 86%), mientras que una pequeña parte de los CI padecieron CO (24 CI, 17%). En torno a un 5% de los CI estuvieron afectados tanto por CM como por CO. Esto fue compatible con la menor incidencia del CO frente al CM en la población general. Por lo tanto, esta característica de la muestra justificaría una mayor frecuencia mutacional en genes asociados a un incremento de riesgo de CM (*ATM*, *CHEK2* y *PALB2* entre otros), frente a los genes vinculados a un incremento de riesgo de CO (*RAD51D*, *BRIP1* y los asociados al síndrome de Lynch entre otros).

Las familias incluidas en el presente habían sido analizadas previamente para *BRCA1* y *BRCA2*, resultando no portadoras. Posteriormente se aplicaron unos criterios de selección consensuados en el Comité de Consejo Genético para ampliar el estudio genético a paneles de genes. En otros estudios realizados en población española también se partió de población *BRCA1/2* negativa [67, 80], mientras que en otros estudios europeos se seleccionó una muestra con un estado mutacional desconocido para *BRCA1/2* [166, 194–196]. En la mayoría de estos estudios se utilizaron criterios de selección en los que se tenía en cuenta la historia personal y familiar de CM y CO [67, 80, 166, 194–196].

Se encontraron variantes patogénicas en 26 individuos: 11 CI y 15 familiares. De los familiares portadores sólo 3 habían sido diagnosticados de cáncer en el momento del estudio. En consecuencia, hubo un total de 12 individuos sanos susceptibles de beneficiarse de las acciones clínicas preventivas oportunas. Esto supuso el 80% de los familiares portadores y el 46% del total de portadores.

## 2. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

Se comparó el rendimiento diagnóstico obtenido en el presente estudio con el obtenido en estudios previos realizados en distintas poblaciones. En la **Tabla 18** se resumen los genes en los que se han encontrado mutaciones en estudios realizados con paneles de genes en población europea, así como el rendimiento diagnóstico obtenido, comparándolo con el obtenido en este estudio. A continuación, la **Tabla 19** es similar pero con estudios realizados fuera de Europa o a nivel mundial. Merece la pena destacar que en estos últimos el número de familias estudiadas fue mucho mayor. Gracias a este mayor tamaño muestral, se pudo realizar estudios de correlación genotipo-fenotipo, así como calcular el riesgo relativo de cada uno de los genes.

Con el objeto de que los resultados fueran comparables entre sí, para el cálculo de la frecuencia mutacional no BRCA se tuvieron en cuenta, siempre que fue posible, todas las variantes patogénicas de los genes incluidos en cada estudio.

			FRECUENCIA MUTACIONAL (%)												
Fuente	nº de CI	nº de genes	BRCA 1/2	No BRCA	ATM	BRIP1	CHEK2	TP53	XRCC2	MUTYH*	PALB2	RAD51C	RAD51D	CDH1	NBN
<b>Estudio actual</b>	138	26	11	8	4,35	1,45	1,45	0,72	0,72	3,62	-	-	-		
Bonache (España) [80]	192	34	NI	9	1,56	0,52	0,52	1,04	0,52	3,64	2,08	-	1,04	-	-
Tavera-Tapia (España) [67]	392	80	NI	6	1,94	-	0,51	-	0,26	-	1,28	0,26	0,26	-	-
Kraus (Alemania) [166]	581	14	12	6	0,5	NI	1,7	0,3	NI	NI	1	0,9	0,2	-	1
Schroeder (Alemania) [196]	620	10	9	3	0,65	NI	0,97	0,16	NI	NI	0,32	-	-	0,48	0,32
Castéra (Francia) [195]	5131	34	8	5	1,04	0,48	1,16	0,50	0,05	2,36	0,89	0,53	0,22	0,05	0,22
Éliade (Francia) [124]	583	25	9	6	1,5	0,2	2	0,3	NI	1,2	0,6	-	NI	-	NI

**Tabla 18.** Comparación entre la frecuencia mutacional obtenida en el presente estudio y otros realizados en población europea. Para la el cálculo de la frecuencia mutacional “No BRCA” no se han tenido en cuenta las variantes patogénicas halladas en heterocigosis en MUTYH. NI: no incluido,

“-”: no se han encontrado variantes patogénicas en estos genes.

\*En heterocigosis

			FRECUENCIA MUTACIONAL (%)												
Fuente	nº de CI	nº de genes	BRCA 1/2	No BRCA	ATM	BRIP1	CHEK2	TP53	XRCC2	MUTYH <sup>*</sup>	PALB2	RAD51C	RAD51D	CDH1	NBN
<b>Estudio actual</b>	138	26	11	8	4,35	1,45	1,45	0,72	0,72	3,62	-	-	-	-	-
Buyts (Mundial) [26]	35409	25	4	5	0,93	0,31	1,12	0,17	-	-	0,89	0,15	0,05	0,06	0,17
Couch (EEUU, caucásicos) [197]	41611	21	4	6	1,06	0,28	1,73**	0,15	-	-	0,87	0,13	0,09	0,06	0,19
Kurian (Mundial) [198]	95561	25	4	4	0,67	0,28	0,81	0,04	-	-	0,52	0,15	0,07	0,04	0,19
Susswein (EEUU) [199]	10030	29	3	6	0,90	0,31	1,92	0,18	0,03	-	0,57	0,17	0,13	0,04	0,14
Lilyquist (EEUU, Ascendencia europea) [200]	7768	19	7	6**	0,87	0,99	0,43**	NI/-	NI/-	NI/-	0,36	0,79	0,31	-	0,38
Kapoor (EEUU) [201]	337	5-43	4	4	0,59	-	0,59	0,30	NI/-	0,59	0,89	-	-	-	0,30

**Tabla 19.** Comparación entre la frecuencia mutacional obtenida en el presente estudio y otros realizados en población extraeuropea. o a nivel mundial. Para el cálculo de la frecuencia mutacional No BRCA no se han tenido en cuenta las variantes patogénicas halladas en heterocigosis en *MUTYH*. NI: no incluido,

“-”: no se han encontrado variantes patogénicas en estos genes.

\*En heterocigosis

\*\* No se tuvo en cuenta la variante c.470T>C en *CHEK2*

El rendimiento diagnóstico obtenido previamente en el laboratorio para variantes patogénicas en *BRCA1* y *BRCA2* fue del 11% en 1729 familias estudiadas. Esto fue similar a lo hallado en otros estudios realizados en población europea (**Tabla 18**) y superior a la hallada en estudios realizados fuera de Europa o a nivel mundial (**Tabla 19**). Estas diferencias pudieron deberse a la utilización de distintos criterios de selección, ya que aunque todos se basan en los establecidos por la NCCN, cada país y aseguradora establece sus propios criterios. Otro factor que pudo influir fue las diferencias entre poblaciones y las distintas metodologías empleadas.

En cuanto al rendimiento diagnóstico en genes no *BRCA* fue del 8%. Este resultado fue similar a los obtenidos en estudios publicados previamente en población europea y estadounidense. En el estudio en población española publicado por Bonache y colaboradores se obtuvo una tasa de detección del 8% en genes distintos a *BRCA1/2*. En dicho estudio se incluyeron 192 casos índice y los genes estudiados se dividieron en dos grupos: genes asociados a riesgo y genes candidatos. La tasa de detección indicada se calculó teniendo en cuenta los 34 genes asociados a riesgo, excluyéndose las variantes monoalélicas en *MUTYH* y la variante c.470T>C (p.Ile157Thr) en *CHEK2*, al considerarse una variante de bajo riesgo [80, 202]. Incluso si en el presente estudio hubiésemos rechazado esta variante en *CHEK2* y la hallada en *XRCC2*, se hubiese obtenido un resultado similar de tasa de detección (7%, 9/138). En otros estudios realizados en población europea, la tasa de detección de genes distintos a *BRCA1* y *BRCA2* osciló entre el 3% y el 8% [80, 124, 166, 195, 196], siendo la más alta la obtenida en población española. En cuanto a los estudios realizados en población estadounidense, las tasas de detección fueron similares, oscilando entre 4% y 6% [26, 197–201]. Entre estos estudios hubo diferencias en la selección de genes así como en los criterios de selección utilizados, por lo que esto podría explicar la diferencia entre los resultados obtenidos.

Por lo tanto, se estimó un rendimiento conjunto entre *BRCA1/2* y otros genes de susceptibilidad del 19%. Esto no fue más que una aproximación, ya que se utilizaron los criterios de selección del comité para elegir a las familias no *BRCA* de este estudio.

Aunque más adelante se discutirán los resultados obtenidos desglosados por genes, destaca que la mayor tasa de detección global obtenida fue la de los estudios realizados en población española.

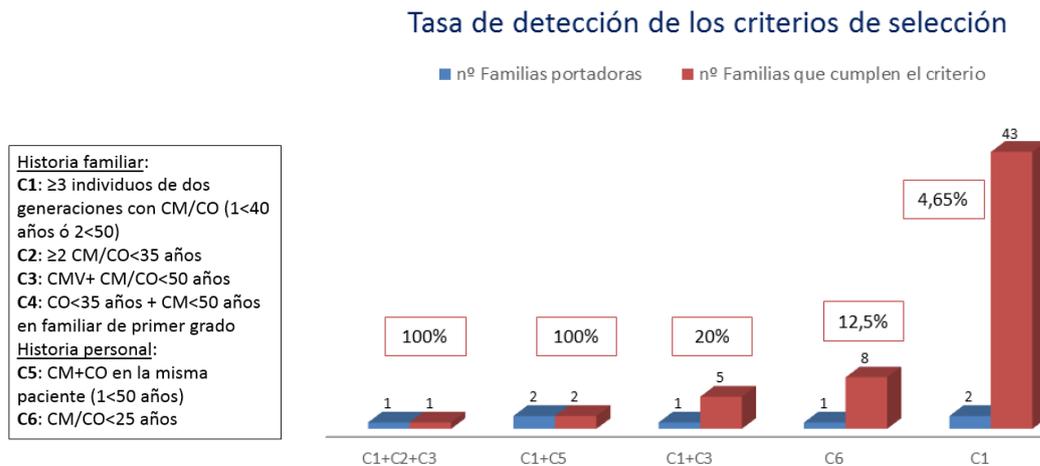
### 3. EVALUACIÓN DE LOS CRITERIOS

En los 138 CI de este estudio se había realizado un estudio genético previo para mutaciones *BRCA1/2*, para el que se seleccionaron mediante los criterios establecidos por la SEOM [29]. De ellos, sólo 75 cumplían estrictamente los criterios del Comité de Consejo Genético, mientras que los 63 restantes se incluyeron en el estudio en el contexto del Comité, atendiendo a características no incluidas en los criterios pero que hicieron sospechar de un SCMOH. Si se tienen en cuenta sólo aquellos pacientes que cumplieron estrictamente los criterios consensuados en el Comité, la tasa de detección aumenta del 8% a un 9,3% (7/75). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el grupo que cumplía estos criterios y el que sólo cumplía los criterios de la SEOM no cumplía. Esto fue compatible con la bibliografía disponible. Recientemente se han publicado diversos estudios que ponen en duda la efectividad del uso de criterios de selección para realizar estudios genéticos, ya que se estima que en torno a un 50% de los portadores de mutaciones en genes de riesgo no cumplen los criterios establecidos [203, 204]. En los estudios realizados por Beitsch y colaboradores y por Yang y colaboradores en los que se incluyeron pacientes que cumplían criterios para estudio genético y pacientes que no los cumplían, no se encontraron diferencias entre las tasas de detección de variantes patogénicas entre ambos grupos [203, 205]. Los resultados entre el presente estudio y los referidos no son extrapolables ya que en nuestro caso se partió de una población negativa para *BRCA1* y *BRCA2*, que cumplía los criterios de selección de la SEOM y a los que se les aplicó unos nuevos criterios para ampliar estudio a paneles.

Tradicionalmente los criterios de la SEOM se habían utilizado para seleccionar familias susceptibles de ser portadoras de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, en este trabajo se incluyeron una serie de genes relacionados con predisposición a cáncer de mama y/o ovario pero también con otros tipos de cáncer, como el cáncer de colon en el caso de los genes MMR. Por lo tanto, al haber utilizado criterios de selección asociados al CM y CO,

determinados genes podrían estar infradetectados. En un estudio previo sobre el uso de paneles de genes en el síndrome de Lynch se identificaron mutaciones en genes distintos a los MMR como *BRCA1*, *BRCA2* y *ATM*, entre otros [153]. Por otro lado, en otro estudio realizado en pacientes portadores de variantes patogénicas en los genes MMR se observó que un 22% de los portadores cumplían criterios para estudio de *BRCA1* y *BRCA2* pero no de síndrome de Lynch [206]. Esto indicaría un solapamiento entre las características de los distintos síndromes de cáncer hereditario

En la **Figura 56** se muestra la tasa de detección de los distintos criterios de selección utilizados en este trabajo. El criterio que mostró una mayor tasa de detección individual fue el criterio C6 (1/8, 12,5%) seguido del C1 (2/43, 4,65%). Éste último fue el criterio que más se cumplió en la cohorte de 138 CI. Sin embargo, la tasa de detección mejoró al combinar varios criterios entre sí. Esta mejora fue más relevante si se combinaban varios criterios que tenían en cuenta la historia familiar (C1+C2+C3) y criterios que tienen en cuenta la historia familiar y la personal de cáncer (C1+C5), obteniéndose valores de tasa de detección de hasta el 100%. Este aumento en la tasa de detección fue a costa de reducir el número de CI que lo cumplían (sólo un paciente en el caso de C1+C2+C3 y dos en el caso de C1+C5).



**Figura 56.** Diagrama de barras en el que se representa la tasa de detección desglosada por criterios. En rojo aparece el número total de familias que cumplieron el criterio y, en azul, las que fueron portadoras de alguna variante patogénica.

Esto está en la línea habitual de la mayoría de los criterios establecidos por los diferentes países o aseguradoras médicas, los cuales se derivan de los criterios establecidos por la NCCN y se basan tanto en la presencia de historia personal como familiar de cáncer. Sin embargo, si se hubiesen utilizado estos criterios de manera estricta, en torno a un 36% de los casos índice portadores (4/11) se habrían quedado sin diagnosticar y, por lo tanto, ni ellos ni sus familiares se hubiesen podido beneficiar de las acciones clínicas y/o preventivas correspondientes. Esto, junto con la evidencia referenciada, indica una tendencia a la relajación o incluso desaparición de los criterios de selección para la realización de análisis genéticos, o bien la creación de unos nuevos criterios enfocados a cáncer hereditario en general. De hecho, desde el descubrimiento de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, los criterios para su análisis se han ido modificando en función de los recursos sanitarios de cada país, con el abaratamiento de las técnicas de diagnóstico molecular, así como con el desarrollo de evidencia científica que vinculaba mutaciones en estos genes con un incremento de riesgo de cáncer independientemente de la historia familiar, y con la aparición de nuevas terapias basadas en el estado mutacional de estos genes [204]. Sin embargo, son necesarios más estudios que permitan dilucidar si el sistema sanitario está preparado para prescindir de los criterios y extender

el estudio genético a todos los casos de cáncer de mama y ovario esporádicos, con las consecuencias que tendría tanto a nivel de laboratorio (aumento del número de análisis genéticos) como a nivel de los clínicos (aumento de personas en seguimiento por alto riesgo de cáncer). Dado que se trata de un estudio retrospectivo hubo una importante limitación a la hora de evaluar los criterios de selección, ya que el grupo control no se trató de un grupo que únicamente cumplía los criterios de selección de la SEOM, sino que fueron seleccionados dentro del contexto del Comité de Consejo Genético, y es imposible saber si otros portadores habrían quedado fuera del estudio

#### 4. ESPECTRO MUTACIONAL Y FRECUENCIA MUTACIONAL EN NUESTRA POBLACIÓN

En este estudio se han encontrado variantes patogénicas en *ATM*, *BRIP1*, *CHEK2*, *TP53*, *XRCC2* y *MUTYH*. Estos son los principales genes afectados en otros estudios previos, aunque difieren en la ausencia de mutaciones en genes como *PALB2*, *RAD51C*, *RAC51D*, *CDH1* y *NBN*, los cuales sí están presentes en otros estudios [26, 80, 195]. Además, se detectaron 4 nuevas variantes patogénicas previamente no descritas.

Como se puede observar en las **Tablas 18 y 19**, la mayor tasa de detección global obtenida fue la de los estudios realizados en población española (en el caso de *TP53*, más del doble). Además, dentro de los genes en los que se encontraron variantes patogénicas en este trabajo, la tasa mutacional obtenida en este estudio fue mayor a la obtenida en el resto de estudios en la mayoría de los casos. Las únicas excepciones ocurrieron en *CHEK2*, ya que en el estudio se encontró una tasa de detección similar aunque ligeramente superior en otros trabajos previos. Todas estas variaciones pueden deberse a los distintos criterios de selección utilizados. Estos varían entre los distintos sistemas nacionales de salud y aseguradoras. Además, no todos estos estudios se realizaron en familias con SCMOH, sino que algunos de ellos se refirieron a cáncer de mama únicamente [197], ovario [200] o cáncer hereditario en general [199]. Por otro lado, es de esperar que, al tratarse de distintas poblaciones, el espectro mutacional también sea distinto, ya que se puede ver afectado tanto por los fenómenos migratorios (la Región de Murcia es una comunidad receptora

de inmigración de distintos orígenes, como Latinoamérica y Marruecos), como por zonas con mayor nivel de endemismo.

#### 4.1 Variantes patogénicas halladas en *ATM*

*ATM* es el gen en el que se encontraron la mayoría de variantes patogénicas. Se hallaron 5 variantes patogénicas en 6 familias, lo que equivale a una tasa mutacional del 4,35%. Otros estudios realizados en población española mostraron una tasa mutacional menor: entre un 1,6% y un 2,3% de los pacientes con cáncer de mama/ovario en población española [62, 67, 80], así como otros realizados en población europea: oscilando entre un 0,5% (población alemana) y un 3,7% (población austriaca) [124, 152, 166, 195, 196]. Los diferentes resultados de prevalencia entre estos estudios y el presente pueden deberse a los distintos criterios de selección utilizados ya que aunque siempre están basados en la historia personal y/o familiar de cáncer pueden variar en algunos puntos que pueden ser cruciales para la especificidad. Además, en algunos de éstos estudios la población seleccionada era *BRCA1/BRCA2* negativa y en otros no se conocía el estado mutacional en *BRCA1* y *BRCA2*. Otra diferencia puede ser la tecnología empleada para la detección de variantes: en los estudios de Tavera-Tapia y de Bonache y colaboradores se utilizaron paneles al igual que en este estudio, mientras que Brunet y colaboradores secuenciaron el gen *ATM* mediante secuenciación Sanger [62, 67]. Por último, las características particulares de cada población pudieron ser determinantes para los resultados obtenidos.

Merece la pena destacar que la variante c.8251\_8254del en *ATM* fue la única de las halladas en el presente estudio que coincidió con las halladas en otros estudios españoles, lo que sugiere una gran heterogeneidad de las variantes existentes en población española, por lo que este estudio añade información significativa sobre el espectro de variantes patogénicas en *ATM* en población española [67].

El cáncer más comúnmente diagnosticado en los portadores de mutaciones en *ATM* fue el cáncer de mama, estando presente en las seis familias previamente descritas. Esto es compatible con estudios previos disponibles en la bibliografía, incluyendo los realizados en población española [62, 65, 67, 80].

Goldgar y colaboradores estimaron que las mujeres portadoras de mutaciones truncantes en *ATM* tenían un riesgo de cáncer de mama similar a las mujeres portadoras de mutaciones germinales en *BRCA2* [207]. Sin embargo, un resultado a destacar fue que dos de los seis portadores diagnosticados de CM fueron varones. Este dato no se había encontrado en los estudios previamente mencionados, por lo que sería necesario realizar más estudios para dilucidar una posible implicación de variantes patogénicas en *ATM* en el incremento de riesgo de CMV. En cuanto a la histopatología del cáncer de mama, en este estudio al más diagnosticado fue el ductal invasivo. No hay estudio que demuestren un vínculo entre variantes patogénicas en *ATM* y el fenotipo histopatológico. Balleine y colaboradores intentaron encontrar esta relación pero concluyeron que no había características histopatológica distintivas de los cánceres de mama en portadores de variantes patogénicas en *ATM* [208]. Con respecto al subtipo molecular del cáncer de mama, todos los individuos con variantes patogénicas en *ATM* expresaban receptores hormonales (para estrógenos y progesterona). Sin embargo, hay una mayor heterogeneidad en la expresión del receptor HER2, aunque está ausente en la mayoría de los pacientes. Ninguno de ellos fue triple negativo. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Buys y colaboradores, en cuyo estudio observaron que las mujeres con subtipos de cáncer de mama distinto al triple negativo solían ser portadoras de mutaciones en *ATM* y en *CHEK2* [26]. La edad media del primer diagnóstico de CM fue de  $48,7 \pm 13$  años, lo que fue similar al obtenido por Tavera-Tapia y colaboradores ( $47,4$  años) [67].

Además del CM, en estas familias se diagnosticaron otros tipos de cáncer: CO en una mujer de 29 años, melanoma en un hombre de 68 años que desarrolló metástasis pulmonares a los 69 y un linfoma no Hodgkin a los 50 años en un hombre que posteriormente desarrolló un cáncer de mama. Estudios anteriores sostenían la idea de que mutaciones en *ATM* estaban vinculadas a un riesgo incrementado, principalmente, de CM [26, 62, 65, 67, 207], pero la mayoría de ellos apoyaban una relación con otros tipos de cáncer como ovario, próstata, páncreas, colorrectal o estómago [152, 209–212]. En el estudio realizado por LaDuca y colaboradores se realizó un análisis mediante paneles de genes en más de 2000 pacientes y se encontraron mutaciones en *ATM* en familias de alto

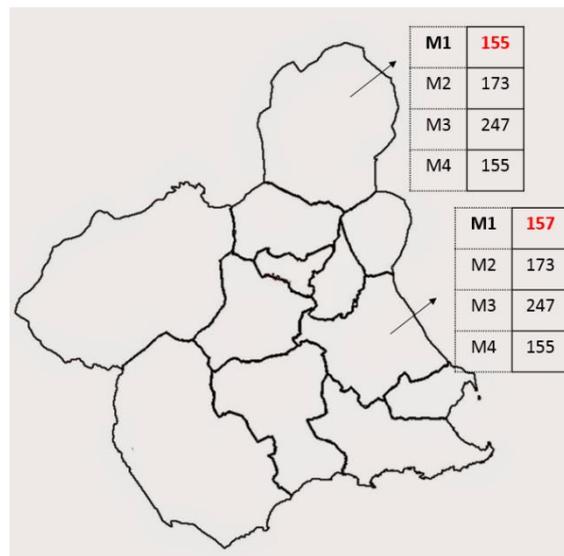
riesgo de mama y ovario así como en cáncer de ovario a cualquier edad [212]. Además, Minion y colaboradores exploraron genes distintos a *BRCA1* y *BRCA2* que estaban implicados a predisposición hereditaria a CO. En los individuos con CO los genes más frecuentemente mutados fueron *BRIP1* y *MSH6*, seguidos de *ATM*, obteniendo una frecuencia similar de mutaciones en *ATM* que en la cohorte de CM [211]. Esto explicaría el fenotipo de la familia portadora de la variante c.5644C>T (**Tabla 14**), en la cual hay dos portadores: una con CO y otra con CM. Dombernowsky y colaboradores detectaron una predisposición a melanoma en portadores de una variante patogénica *missense*. Esto es posible biológicamente, ya que otros estudio mostraron que *ATM* era importante para la reparación de daños en el ADN en respuesta a la luz ultravioleta. Sin embargo, Spoerri y colaboradores sugirieron que el defecto en el punto de control dependiente de ATM que producía inestabilidad genómica en el melanoma era distinto al que alteraba la sensibilidad a radiaciones ionizantes. Esta alteración no afecta a la función pero hace imposible mantener la detención del ciclo celular debido a una elevación de PLK1 (un desencadenante temprano de la transición G2/M) [213]. Por lo tanto, es difícil saber si la variante patogénica en *ATM* es la causa primaria del melanoma en una de las familias portadoras de la variante c.8251\_8254del (**Tabla14**). En cuanto a las patologías hematológicas, es bien conocido que la ataxia-telangiectasia está asociada un riesgo elevado de leucemias y linfomas. El estudio de La Plagia y colaboradores estimaron la frecuencia de portadores de mutaciones en *ATM* en mujeres con CM e historia familiar tanto de CM y de patologías hematológicas. La frecuencia fue 6,56%, significativamente mayor que la observada en la población general (0,3-0,6%). Sin embargo, ninguno de los casos descritos se trató de linfoma, sino de leucemias y sarcomas de Kaposi [214]. Esto fue consistente con la revisión anterior de Boulwood, quien sugirió que la inactivación del gen *ATM* debía tener importancia en la patogénesis de neoplasias linfoides esporádicas. No obstante, propuso que las mutaciones en este gen en pacientes con linfoma eran somáticas en lugar de germinales y estaban relacionadas, sobretodo, con leucemia linfoide y linfoma del manto, lo que no es el caso de lo encontrado en la familia portadora de la variante c.7708G>T (**Tabla 14**) [215]. Por lo tanto, no se puede asumir que el linfoma no Hodgkin de este paciente se deba a la mutación en *ATM*.

#### 4.1.1 Efecto fundador de la variante c.8251\_8254del

En este estudio, tras realizar un análisis de haplotipo, se ha demostrado la presencia de un efecto fundador de la variante 8251\_8254del. Esta estaba presente en cuatro familias diferentes de la Región de Murcia y se había descrito previamente en el artículo español de Tavera-Tapia y colaboradores [67]. Este hecho podría explicar la mayor tasa de detección de mutaciones en *ATM* en nuestra población comparado con lo descrito previamente en la bibliografía.

De las cuatro familias portadoras de la variante, se halló el mismo haplotipo M1-M4 (157pb-173pb-247pb-155pb) en 10 de los portadores de 3 familias. Sin embargo, en la cuarta familia en la que sólo se había estudiado un CI, este haplotipo común varió en el primer microsatélite (155pb-173pb-247pb-155pb). Esto indicaría que esta última familia guardaría un menor grado de parentesco que las otras tres entre ellas. Llamó la atención que las tres familias que compartían el primer haplotipo procedían del área metropolitana de Murcia, mientras la familia con el segundo haplotipo procedía de la comarca del Altiplano, de forma que la diferencia en el haplotipo se asoció también a una mayor lejanía geográfica (**Figura 57**). Es posible que se encuentren más familias portadoras de esta variante en un futuro ya que el análisis genético mediante paneles de genes está reemplazando gradualmente al estudio de genes individuales como *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, dado que se estimó una antigüedad de la variante de sólo unas 5 generaciones, se prevé que el número de familias afectadas sea modesto. Sería interesante, en el caso de hallar más familias con esta variante, realizar el estudio de microsatélites para obtener información más completa sobre su origen y antigüedad.

Una limitación importante fue la imposibilidad de obtener información sobre el origen de la primera familia donde se encontró la mutación por primera vez ni haber podido realizar el estudio de microsatélites a ésta [67].



**Figura 57.** Distribución geográfica de los haplotipos encontrados en los portadores de la variante 8251\_8254del.

#### 4.2 Variantes patogénicas halladas en *BRIP1*

En *BRIP1* se hallaron dos variantes patogénicas en dos familias, lo que supuso una tasa mutacional del 1,45%. Otros estudios realizados en población española y europea otorgaron resultados similares aunque ligeramente inferiores (<1%) [80, 124, 195]. Esto puede deberse principalmente a la diferencia entre criterios de selección y a las características de cada población.

De las dos mutaciones halladas en *BRIP1*, la variante c.886G>T se encontró en una mujer que también fue portadora para una variante en *TP53* y cuyo fenotipo fue más compatible con un síndrome de Li Fraumeni que con el SCMOH. En cuanto a la variante c.903del, ésta se encontró en una paciente diagnosticada a los 63 años de una carcinomatosis peritoneal de posible origen ovárico. Esto está acorde con la evidencia disponible, que vincula la presencia de variantes patogénicas en *BRIP1* con un riesgo incrementado de cáncer de ovario [216]. En estos estudios se observó que los portadores en este gen tenían edades de diagnóstico más tardías (63,8 años) y en un estadio más tardío que los no portadores [48, 217]. Además, el subtipo histológico más común fue el seroso. Ramus y colaboradores encontraron que la distribución de mutaciones en *BRIP1* no era aleatoria, sino que existía una asociación entre la localización

de la variante y el riesgo a padecer cáncer de ovario, de forma que la mayoría de las variantes patogénicas identificadas en los casos de cáncer de ovario epitelial se localizaban en los dos primeros tercios del gen (entre los nucleótidos 68 y 2508), con lo que se truncaba la proteína antes del dominio de unión a BRCA1 [48]. Esto concuerda con los resultados hallados en el presente estudio, ya que las dos variantes patogénicas encontradas en *BRIP1* se localizaron al principio del gen.

Existe controversia en cuanto a la aplicabilidad del hallazgo de variantes patogénicas en *BRIP1* en la prevención de cáncer de mama y ovario, ya que se considera un gen de riesgo moderado para el desarrollo de cáncer de ovario y con un riesgo incierto para el cáncer de mama. Desafortunadamente, no existen métodos de detección precoz para el cáncer de ovario. Existen pruebas de laboratorio y de imagen como los marcadores tumorales CA-125 y HE4 y la ultrasonografía vaginal, pero su utilidad en el diagnóstico precoz es muy limitada. Por otro lado, la principal estrategia reductora de riesgo es la salpingo-ooforectomía precoz, pero dados los perjuicios conocidos de ésta, debe ser considerada con precaución. Esto, junto con el riesgo a lo largo de la vida reducido y las edades tardías de diagnóstico apoyan la cirugía postmenopáusica frente a la premenopáusica [218–220]. Según las guías de la NCCN se debe considerar la salpingo-ooforectomía reductora de riesgo a partir de los 45-50 años o antes en función de la historia familiar específica de cáncer de ovario [66].

En lo que se refiere a la aplicabilidad terapéutica, se ha sugerido que, ya que *BRIP1* es una proteína implicada en la reparación del ADN mediante recombinación homóloga, las mutaciones podrían ser dianas terapéuticas para los inhibidores de la PARP-1. Sin embargo, no existe evidencia clínica suficiente que justifique el uso de estos fármacos en pacientes con CO y que sean portadoras de variantes patogénicas en *BRIP1*, por lo que sigue siendo una hipótesis y se requieren ensayos clínicos concluyentes al respecto [219, 221–223].

### 4.3 Variantes patogénicas halladas en *CHEK2*

En *CHEK2* se hallaron dos variantes patogénicas en dos familias, lo que supuso una tasa mutacional del 1,45%. Esto es similar a las tasas de detección encontradas en estudios previos realizados en población española y europea, cuyo valor oscila desde <1% y un 2% entre los distintos estudios [166, 194–196].

La variante c.349A>G se encontró en una paciente diagnosticada a los 29 años de un CDI positivo para receptores hormonales. Esto es compatible con la evidencia disponible, que vincula la presencia de variantes patogénicas en *CHEK2* con un incremento de riesgo de CM, especialmente para los positivos para receptores estrogénicos y para aquellas con diagnóstico precoz (edad media de 47,7 años) [73, 164, 197].

En cuanto a la variante c.470T>C, se halló en una paciente diagnosticada de CO indiferenciado a los 41 años. Un estudio realizado por Szymanska-Pasternak y colaboradores asoció la presencia de esta variante con un riesgo incrementado de CO borderline, invasivo de bajo grado y cistoadenomas, pero no con los de alto grado [147]. Sin embargo, otros estudios realizados en portadores de *CHEK2* no se ha encontrado un incremento de riesgo de CO [21, 66]. De hecho, esta variante se considera de bajo riesgo, ya que incrementa el riesgo de CM en menor proporción que la media de las mutaciones en este gen con una odds ratio de 1,58 (95% CI=1,42-1,75;  $p<0,00001$ ) [202].

No hay consenso entre las guías clínicas de los distintos países en cuanto a la utilidad del cribado de cáncer de mama mediante resonancia magnética en pacientes con mutaciones en genes de moderada penetrancia como *CHEK2*, por lo que se requieren más estudios al respecto y que planteen la situación de una efectividad diferente en función de la situación clínica del portador. En general se recomienda que el asesoramiento no se base únicamente en la presencia de mutación, sino que se debe tener en cuenta la historia familiar para justificar un riesgo suficiente para que el cribado mediante resonancia magnética sea eficaz. Además, ya que el riesgo de la mayoría de las variantes *missense* no está claro y algunas, como la c.470T>C tienen un riesgo menor, las guías de la NCCN recomiendan que el manejo dependa del riesgo específico de cada variante. En general, estas guías proponen realizar una mamografía anualmente y considerar

la resonancia magnética con contraste a partir de los 40 años. En cuanto a la mastectomía reductora de riesgo la evidencia es insuficiente, por lo que el manejo debe decidirse en función de la historia familiar [224].

#### 4.4 Variante patogénica hallada en *TP53*: 2 mutaciones en la misma familia

En *TP53* se halló una variante patogénica, lo que supuso una tasa mutacional del 0,72%. Este resultado fue compatible con los obtenidos previamente en otros estudios realizados en población española y europea, los cuales fueron <1%. [166, 194, 195].

La variante c.334\_364dup se encontró en una familia cuyo caso índice fue portadora también de la variante c.886G>T en *BRIP1*. Se trató de una paciente diagnosticada de un cáncer de mama bilateral a los 18. El estudio histológico determinó que se trataba de un carcinoma ductal infiltrante. Los resultados del estudio inmunohistoquímico para niveles de expresión resultó negativo para receptores hormonales y positivo para HER2. Tras tres ciclos de quimioterapia con docetaxel, pertuzumab y trastuzumab, respondió totalmente al tratamiento, llegando a completar 22 ciclos, pero rechazó recibir más tratamiento. En consecuencia, continuó acudiendo al hospital para revisiones. El resultado del PET/TAC fue normal en dos ocasiones seguidas separadas de cinco meses. Dos meses más tarde, la paciente fue diagnosticada de un glioblastoma multiforme a los 21 años, con un estudio inmunohistoquímico con presencia de mutaciones p53 *null*, lo que era compatible con una mutación en *TP53*. Se trató con temozolamida y radioterapia pero finalmente la paciente falleció a los pocos meses del diagnóstico.

Ninguna de las variantes halladas había sido descrita previamente en la bibliografía hasta el momento [131]. Al estudiar a la madre del caso índice, sólo fue portadora de la variante en *BRIP1*. No fue posible localizar al padre para estudiarlo, pero en el momento del estudio no sufría ninguna patología asociada al síndrome de Li Fraumeni. Dado esto y la alta frecuencia de variantes germinales *de novo* en *TP53* (de hasta un 20% con un mínimo del 7%), consideramos la posibilidad de que se tratara de una variante *de novo* [72]. Sin embargo, esto no se pudo asegurar porque fue imposible estudiar a más miembros de la familia.

Las mutaciones germinales en *TP53* originan el síndrome de Li Fraumeni, una enfermedad autosómica dominante que aumenta el riesgo de tumores en varias localizaciones: sarcoma de tejidos blandos, osteosarcoma, CM, tumor cerebral, cáncer de la glándula adrenal y leucemia, entre otros [71]. Con respecto al CM, el riesgo en mujeres portadoras en *TP53* es del 56% a los 45 años y del 90% a los 60 [73, 74]. Además, los portadores de mutaciones en este gen se asocian con el subtipo inmunohistoquímico HER2-positivo, mientras que las variantes patogénicas en *BRIP1* se relacionan más con un incremento de riesgo de CO [26]. Por lo tanto, tanto la localización de los tumores como el subtipo inmunohistoquímico, así como la edad temprana de diagnóstico estaban más asociadas al síndrome de Li Fraumeni que con el SCMOH, así que se concluyó que esta variante patogénica en *TP53* fue la responsable de los tumores del caso índice. De hecho, la paciente cumplía criterios de Chompret (CM antes de los 31 años) para realizar el estudio genético de *TP53* [225]. Sin embargo, gracias a que se realizó un panel de genes se obtuvo una información genética más completa, detectándose una variante en *BRIP1*. Este hallazgo no fue de utilidad en el caso índice pero sí en su madre, la cual también se pudo beneficiar del asesoramiento genético.

#### **4.5 Variante patogénica hallada en *XRCC2***

En *XRCC2* se halló una variante patogénica, lo que supuso una tasa mutacional del 0,72%. Este resultado fue compatible con el obtenido previamente en otro estudio realizado en población española (<1%) [80].

La variante c.677dup se halló en una familia cuyo caso índice fue una mujer diagnosticada de un CO con histopatología desconocida a los 39 años y de un carcinoma ductal infiltrante a los 60. El CM fue positivo para receptores hormonales y negativo para HER2. A su vez, por rama materna la paciente tenía una historia familiar de cáncer llamativa, con tres casos de cáncer de mama: madre, tía y abuela a los 80,40 y 70 años respectivamente. Además, por vía paterna varios tíos habían fallecido de cáncer de pulmón o laringe.

*XRCC2* es una proteína paróloga de *RAD51*, una de las proteínas clave de la recombinación homóloga. Su actividad depende de la familia de parálogos, entre los que se encuentra *RAD51C*, *RAD51D* y *XRCC2*, entre otros. De hecho,

a nivel celular se ha observado que las células deficientes en *XRCC2* presentan una gran inestabilidad genética debido a un déficit en la recombinación homóloga. Además, *XRCC2* es importante en la prevención de la segregación incorrecta de los cromosomas, lo que podría ocasionar aneuploidías [226]. Por otro lado, se ha descrito la presencia de variantes deletéreas en homocigosis en pacientes con una afectación similar a la anemia de Fanconi [227]. Por lo tanto, dado que muchos de los genes relacionados con la anemia de Fanconi se consideran genes de predisposición al SCMOH, *XRCC2* se trata de un gen candidato para predisposición a cáncer [80]. Sin embargo, aunque se han encontrado portadores monoalélicos de variantes patogénicas en *XRCC2*, diversos estudios han sido incapaces de confirmar la asociación entre mutaciones en este gen y un incremento en el riesgo de CM [164, 228, 229]. Por lo tanto, aunque esta variante no había sido descrita previamente en la bibliografía ni en bases de datos y de que se clasificó como patogénica según los criterios de la ACMG, la accionabilidad clínica es dudosa ya que, en lo referente a los portadores de mutaciones en el gen *XRCC2*, no hay evidencia científica suficiente que justifique llevar a cabo acciones clínicas preventivas o terapéuticas, recomendándose que para el manejo se tengan en cuenta tanto la historia familiar como otros factores clínicos [224]. En este caso, el CI no tiene familiares afectados vivos a los que estudiar para observar si hay cosegregación con la enfermedad y hasta el momento no se ha ampliado el estudio genético a otros familiares. Por lo tanto, se necesitan más estudios que permitan determinar la implicación de este gen en el SCMOH.

#### **4.6 Variantes halladas en heterocigosis en *MUTYH***

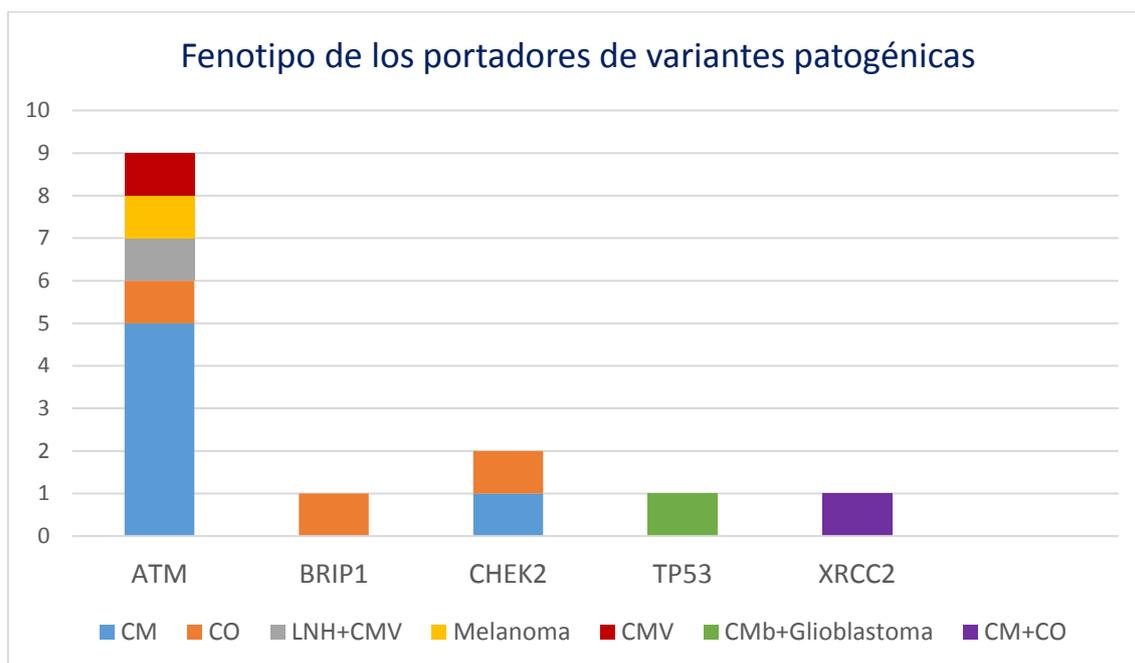
Se hallaron dos variantes patogénicas en cinco pacientes. Ambas se hallaron en heterocigosis, lo que supuso una tasa mutacional del 3,62%, muy similar a la obtenida en el estudio realizado por Bonache. (3,64%). Sin embargo, este valor es superior a la tasa mutacional esperada en controles sanos, en torno a al 1,5-2% [230].

Mutaciones bialélicas en *MUTYH* son causantes de la poliposis atenuada, un síndrome asociado a un incremento de riesgo de padecer adenomas y cáncer colorrectal entre 18-100 veces superior a la población general. Las dos variantes halladas en este estudio son las variantes patogénicas más comunes, ya que

entre las dos suponen un 50-82% de las mutaciones en *MUTYH* identificadas en población europea con poliposis adenomatosa asociada a este gen [231]. Además, hay estudios que han vinculado mutaciones monoalélicas en *MUTYH* con incremento de riesgo de determinados tipos de cáncer, como el colorrectal [232]. Sin embargo, en lo que se refiere al incremento de riesgo de CM, la implicación de las mutaciones monoalélicas en *MUTYH* es controvertido, ya que algunos estudios determinaron una asociación modesta [231, 233, 234] y otros no encontraron evidencias de un incremento en el riesgo [235, 236]. Por lo tanto, las guías de la NCCN recomiendan que para el manejo de los portadores monoalélicos se tenga en cuenta la historia familiar de cáncer así como otros datos clínicos, ya que no hay evidencia suficiente que justifique la realización de acciones clínicas terapéuticas o preventivas específicas. En el Comité de Consejo Genético se decidió informar estas variantes en heterocigosis, dada la frecuencia mutacional en la población, sólo con interés reproductivo. Por lo tanto, dado el caso, se amplió el estudio en *MUTYH* a las parejas de los CI.

## 5. ESTUDIO DE CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Debido al limitado tamaño muestral, sólo se encontraron 14 portadores diagnosticados de cáncer en el momento del estudio, por lo que el número de casos fue insuficiente para realizar un estudio de correlación genotipo-fenotipo concluyente. En la **Figura 58** se representa el fenotipo hallado en los portadores de variantes patogénicas en cada gen, ya explicados en el apartado anterior. Los portadores en *ATM* fueron los que presentaron una mayor heterogeneidad en cuanto a fenotipo, mientras que los resultados obtenidos en *BRIP1* y *TP53* fueron los que estuvieron más acorde con la bibliografía disponible [21, 26, 217, 225]. Sería necesario aumentar el tamaño muestral, así como ampliar el análisis genético al mayor número posible de familiares para realizar una correlación genotipo-fenotipo más decisiva, así como para dilucidar la implicación clínica de las variantes c.470T>C en *CHEK2* y c.677dup en *XRCC2*.



**Figura 58.** Fenotipo de los portadores de variantes patogénicas, distribuidas por genes. CM: cáncer de mama, CO: cáncer de ovario, LNH: linfoma no Hodgkin, CMV: cáncer de mama en el varón, CMB: cáncer de mama bilateral

La principal limitación fue que no todos los familiares con cáncer pudieron ser estudiados, dado que algunos de ellos fallecieron y otros no pudieron ser reclutados. Podríamos sospechar que estos individuos eran portadores siempre y cuando pertenecieran a la línea familiar en la que se encuentra la variante, pero no fue posible demostrarlo. Además, hubo familias en las que el origen de la mutación fue desconocido porque los padres no fueron estudiados. En estos casos sería interesante encontrar otro familiar al que realizar el test genético para encontrar el origen.

## 6. VARIANTES CON SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONOCIDO

En una cohorte de 138 CI, se encontraron 79 VUS en un total de 26 genes estudiados. De ellas, 10 fueron de nueva descripción. Al igual que ocurrió con las variantes patogénicas, el gen donde se encontró un mayor número de VUS fue *ATM*. Esto puede explicarse, entre otros factores, por el gran tamaño del gen y de la proteína resultante.

Según las recomendaciones de expertos y la declaración europea de consenso publicadas recientemente, se recomienda informar las VUS halladas en *BRCA1/2*, así como en otros genes, aunque se puntualizó que las VUS halladas en genes de alto riesgo tendrían una mayor importancia clínica que las halladas en genes de bajo riesgo. Sin embargo, esta información no debe usarse en la toma de decisiones clínicas o para análisis predictivo. En el caso del Comité de Consejo Genético, se decidió de forma consensuada no informar estas VUS, para no incrementar la incertidumbre a los clínicos y pacientes [237].

Se encontraron 79 variantes de significado clínico desconocido en un total de 26 genes estudiados. De ellas, 59 (75%) se encontraron en 17 genes asociados a un riesgo incrementado para cáncer de mama y ginecológico distintos a *BRCA1* y *BRCA2*. En el estudio realizado en población española por Bonache y colaboradores se categorizaron 383 VUS en 34 genes asociados a riesgo de cáncer, lo que supuso el 90% de las variantes halladas en dichos genes. El aspecto principal que justifica la diferencia entre estos resultados es que en el presente estudio sólo se incluyeron variables exónicas y las que se encontraban en el borde intrón-exón ( $\pm 12$  pb), mientras que en el estudio previo se incluyó mayor zona intrónica ( $\pm 50$  pb). Además, en el presente estudio se estudiaron 26 genes, frente a los 34 del estudio previo. En otro estudio de mutaciones en *BRCA1/2* realizado por Gabaldó y colaboradores en población de la Región de Murcia se hallaron 25 VUS, lo que supuso el 13% de las variantes halladas[36]. Esto muestra como al incrementar el número de genes estudiados también se incrementa el número de VUS detectadas.

Tras realizar una profunda revisión bibliográfica y los estudios *in silico* indicados en la **Tabla 17** fueron priorizadas 23, lo que supuso un 29% del total de VUS halladas. En el estudio previo de Bonache y colaboradores se priorizaron 35 variantes, un 9% de las VUS. Esta diferencia sustancial se explicaría porque en el estudio previo se seleccionó un número de VUS mucho mayor que en éste. Por otro lado, de las VUS halladas en el presente estudio, 13 se habían descrito previamente en estudios realizados en población española [67, 80]. Esto supuso sólo un 16% del total de VUS, lo que indica una gran heterogeneidad de variantes a lo largo de la población española. Este bajo nivel de coincidencia también puede deberse a que son pocos los datos relativos a estudios mediante paneles

de genes en población española. Es posible que cuando se amplíe el número de individuos españoles, aparezcan más variantes coincidentes.

Un total de 72 CI fueron portadores de al menos una variante de significado clínico desconocido, lo que supuso aproximadamente un 52% de la población estudiada. Si nos referimos a aquellas familias portadoras de una VUS priorizada, el porcentaje se reduciría al 20% (27/138). En un estudio de mutaciones en *BRCA1/2* en población de la Región de Murcia realizado por Gabaldó y colaboradores se hallaron 25 VUS, lo que supuso tan sólo el 5,6% de las familias estudiadas[36]. La mayor prevalencia hallada en el presente estudio podría explicarse porque el número de genes estudiados es mayor. Además, existe una mayor experiencia en el estudio de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, mientras que muchos de los genes incluidos en el presente estudio han comenzado a estudiarse con el desarrollo de los paneles de genes, por lo que hay menor información sobre las variantes en estos genes nuevos y, por tanto, es más probable encontrar VUS.

Si comparamos las VUS halladas en el presente estudio y en el de Bonache y colaboradores, hay 12 variantes que se han encontrado en ambos estudios. Estas variantes se muestran en la **Tabla 20**. De ellas, la clasificación clínica coincidió en el 75% de los casos (9/12). En los tres casos en los que hubo discrepancias se encontró que en el estudio actual se clasificaron como priorizadas, mientras que en el previo dos de ellas fueron VUS no priorizadas e incluso una de ellas fue benigna.

Gen	Variante	Clasificación en el presente estudio	Clasificación en el estudio de Bonache y colaboradores
ATM	<b>c.1229T&gt;C</b>	<b>VUS priorizada</b>	<b>VUS no priorizada</b>
	c.2289T>A	VUS no priorizada	VUS no priorizada
	c.4388T>G	VUS priorizada	VUS priorizada
BLM	c.4076+4T>G	VUS no priorizada	VUS no priorizada
BRIP1	c.2220G>T	VUS no priorizada	VUS no priorizada
CHEK2	c.320-5T>A	VUS priorizada	VUS priorizada
MSH2	c.1045C>G	VUS priorizada	VUS priorizada
	c.1787A>G	VUS no priorizada	VUS no priorizada
PALB2	<b>c.2816T&gt;G</b>	<b>VUS priorizada</b>	<b>Benigna</b>
RAD50	c.2548C>T	VUS no priorizada	VUS priorizada
RAD51D	<b>c.26G&gt;C</b>	<b>VUS priorizada</b>	<b>VUS no priorizada</b>
TP53	c.869G>A	VUS priorizada	VUS priorizada

**Tabla 20.** Variantes con significado clínico incierto halladas tanto en el presente estudio como en el realizado previamente en población española por Bonache y colaboradores. VUS: variante con significado clínico desconocido. En negrita se marcan aquéllas en la que la categorización clínica fue discrepante.

La variante c.1229T>C se categorizó como VUS priorizada con una puntuación de 3 al emplear las herramientas *in silico* previamente descritas, la mínima establecida en los criterios. Por lo tanto, si se hubiesen utilizado unos criterios más estrictos, probablemente no se habría priorizado. En cuanto a la variante c.2816T>G, es en la que hay una mayor discrepancia de categorización, ya que en este estudio se clasificó como VUS priorizada, mientras que en el estudio previo se había categorizado como benigna basándose en la literatura disponible. Un estudio realizado por Southey y colaboradores en una gran

cohorte de casos controles estableció que no había evidencia de una asociación entre esta variante y el riesgo de CM y CO. Este hallazgo fue similar al obtenido en la revisión realizada por Catucci y colaboradores, que establecieron una ausencia de asociación entre dicha variante y el incremento de riesgo de CM. Sin embargo, en otro estudio previo realizado por Park y colaboradores se observó que esta variante producía una alteración en la recombinación homóloga. Además, obtuvo una puntuación de 6 al emplear las herramientas *in silico* descritas, lo que nos hizo clasificarla como VUS priorizada. Finalmente, la variante c.26G>C se categorizó como VUS priorizada al obtener una puntuación de 4 en las herramientas *in silico* utilizadas. La diferente clasificación se debió a la utilización de distintos criterios de priorización y al empleo de distintos estudios *in silico*.

De las VUS priorizadas, sólo una se encontró en un CI que ya portaba una variante patogénica. Se trató de la variante c.677dup en *XRCC2*, la cual tuvo una dudosa accionabilidad clínica. Por lo tanto, podría tratarse de un caso de sinergia entre ambas variantes. Sería necesario realizar un estudio de cosegregación de ambas variantes para determinar cuál es la que con más probabilidad está causando la clínica del CI o si podrían ser ambas y, en consecuencia, decidir las acciones preventivas y terapéuticas a tomar en la familia.

Según las recomendaciones de expertos y la declaración de consenso europea antes mencionadas, el asesoramiento genético siempre debería quedar abierto a la posibilidad de que individuos ya analizados puedan ser contactados en el caso de que aparezca nueva información que afecte a la clasificación de variante en particular [237]. Por lo tanto, sería interesante realizar un seguimiento de los portadores de VUS hallados en este estudio, especialmente de aquellos casos índice en los que se encontró una VUS priorizada.



## **VI. Conclusiones**



## Conclusión 1

El estudio mediante un panel de genes (*BRCA Hereditary MasterTM* Plus de Agilent®) en pacientes con criterios de SCMOH y con test previo *BRCA1/2* no informativo consigue mejorar el rendimiento diagnóstico en un 8% en la población estudiada, resultado similar a lo descrito previamente en la bibliografía.

## Conclusión 2

La aplicación de criterios adicionales de selección a los propuestos por la Sociedad Española de Oncología Médica para el estudio genético mediante panel de genes en población *no BRCA* no contribuye de manera significativa a aumentar el rendimiento diagnóstico.

## Conclusión 3

La caracterización molecular de los paneles de genes generó un gran número de variantes *missense* que, en la mayoría de los casos se categorizaron clínicamente como variantes de significado clínico desconocido, mientras que la mayoría de las variantes clasificadas como patogénicas y probablemente patogénicas fueron de tipo *nonsense* o *frameshift*. Este estudio ha aportado la identificación de 14 variantes (4 clínicamente relevantes y 10 VUS) previamente no descritas.

## Conclusión 4

La incidencia de mutaciones del gen *ATM* es del 4,35%, más alta que en otros estudios con población europea o mundial. Es destacable la aportación al rendimiento diagnóstico de la variante 8251\_8254del en *ATM*, presente en dos familias del estudio y que proviene de un ancestro común de la Región de Murcia.

## Conclusión 5

En los estudios de correlación genotipo-fenotipo en los portadores de variantes patogénicas en los genes *no BRCA* destaca el cáncer de mama unilateral como el fenotipo más frecuente, seguido del cáncer de ovario. En cuanto a las características histopatológicas de los casos cáncer de mama, todos fueron positivos para receptores hormonales, excepto en la portadora de la

variante patogénica en *TP53*. Este resultado es similar a los comunicados en otros estudios.

## **Conclusión 6**

El 52% de la población estudiada es portadora de alguna variante de significado clínico desconocido, mientras que el 20% es portadora de alguna VUS priorizada. Por tanto, es recomendable el uso de algoritmos de priorización de VUS para reducir el número inicial de éstas en los estudios con paneles de genes.

## **VII. Anexos**



## **Anexo A**

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

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

### **Introducción**

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

### **¿Para qué se hace?**

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

### **¿Qué le vamos a hacer?**

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

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

Los resultados de esta prueba podrían ayudarle a usted y a su médico a tomar decisiones informadas sobre su atención médica, tales como pruebas de detección, 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.

Hasta hace poco, los estudios genéticos consistían básicamente en determinar *de forma sucesiva, uno a uno*, la secuencia de ADN de uno o de varios genes causantes de una enfermedad o de un trastorno genético. La **secuenciación masiva**, como su propio nombre indica, permite determinar *de forma simultánea* la secuencia de ADN de un número variable de genes.

### ¿Qué genes se estudian?

En la mayoría de los casos el estudio se limita inicialmente al análisis de un grupo o **panel de genes** relacionados con la enfermedad o el trastorno genético que ha motivado el estudio.

Las variantes génicas (patogénicas o probablemente patogénicas) relacionadas con una mayor predisposición a padecer la enfermedad, encontradas en el estudio, se comprobarán nuevamente utilizando la misma muestra de sangre periférica mediante el método de confirmación Sanger.

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

### ¿Qué limitaciones tiene esta técnica?

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

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

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

Nos podemos encontrar ante cuatro situaciones posibles:

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

### ¿Qué hallazgos se informan al paciente y cuáles no?

*Se informan:*

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

*No se informan:*

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

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

### **¿Qué alternativas hay?**

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

### **¿NOS AUTORIZA?**

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

Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y será tratada en conformidad con la Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999 y los derechos conlleva de acceso, cancelación, rectificación y oposición.

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

### **DECLARACIONES Y FIRMAS**

**Declaro mi conformidad con los puntos siguientes:**

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

Deseo que el ADN extraído de mí / la persona bajo mi tutela legal sea analizado mediante técnicas de secuenciación masiva de un panel de genes para valorar susceptibilidad heredada al cáncer.

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

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

Con relación a la posible utilización de la muestra de ADN:

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

Deseo / No deseo que el excedente de la muestra de ADN quede conservada y custodiada en el H. Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (HUVA).

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

Autorizo/ No autorizo a que parte de la muestra de ADN conservada en el HUVA sea utilizada de forma anónima en el proceso de desarrollo y homologación de estas pruebas genéticas.

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

**1. Firma del/la paciente:**

D./D.<sup>a</sup> ..... con D.N.I. ....

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

Firma del paciente Fecha: ...../...../.....

**2. Firma de familiar o tutores**

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

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

Firma del tutor o familiar Fecha: ..... /...../ .....

**3. Relativo al médico que solicita:**

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

Firma del médico Fecha: ...../...../.....

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

D./Dña.....con D.N.I.....

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

.....

Firma del paciente Fecha: ...../...../.....

## **VIII. Bibliografía**



- [1] Winters S, Martin C, Murphy D, et al. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017; 151: 1–32.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394–424.
- [3] Galceran J, Ameijide A, Carulla M, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex* 2017; 19: 799–825.
- [4] Las cifras del cáncer en España 2018, <https://www.seom.org/ultimas-noticias/106525-las-cifras-del-cancer-en-espana-2018> (accessed 6 September 2018).
- [5] López-Abente G, Aragonés N, Pérez-Gómez B, et al. Time trends in municipal distribution patterns of cancer mortality in Spain. *BMC Cancer* 2014; 14: 535.
- [6] Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, et al. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2015; 16: 2177–2185.
- [7] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: E359-386.
- [8] Reid BM, Permut JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* 2017; 14: 9–32.
- [9] Santaballa A, Barretina P, Casado A, et al. SEOM Clinical Guideline in ovarian cancer (2016). *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex* 2016; 18: 1206–1212.
- [10] Walker JL, Powell CB, Chen L-M, et al. Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer. *Cancer* 2015; 121: 2108–2120.
- [11] Meinhold-Heerlein I, Hauptmann S. The heterogeneity of ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 289: 237–239.
- [12] McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321: 624–628.
- [13] Metcalfe KA, Lynch HT, Ghadirian P, et al. The risk of ovarian cancer after breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 222–226.
- [14] Huiart L, Sylvestre M-P. Re: Pregnancies, breastfeeding, and breast cancer risk in the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study (IBCCS). *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1130–1131; author reply 1131.

- [15] Kotsopoulos J, Lubinski J, Gronwald J, et al. Factors influencing ovulation and the risk of ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int J Cancer* 2015; 137: 1136–1146.
- [16] Milne RL, Knight JA, John EM, et al. Oral contraceptive use and risk of early-onset breast cancer in carriers and noncarriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 2005; 14: 350–356.
- [17] Kotsopoulos J, Huzarski T, Gronwald J, et al. Hormone replacement therapy after menopause and risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers: a case-control study. *Breast Cancer Res Treat* 2016; 155: 365–373.
- [18] Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250: 1684–1689.
- [19] Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994; 265: 2088–2090.
- [20] Hartmann LC, Lindor NM. The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2016; 374: 454–468.
- [21] Toss A, Tomasello C, Razzaboni E, et al. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *BioMed Res Int* 2015; 2015: 341723.
- [22] Dietlein F, Thelen L, Reinhardt HC. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. *Trends Genet TIG* 2014; 30: 326–339.
- [23] Ko HL, Ren EC. Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules* 2012; 2: 524–548.
- [24] Walsh CS. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *Gynecol Oncol* 2015; 137: 343–350.
- [25] Blanco A, de la Hoya M, Osorio A, et al. Analysis of PALB2 gene in BRCA1/BRCA2 negative Spanish hereditary breast/ovarian cancer families with pancreatic cancer cases. *PloS One* 2013; 8: e67538.
- [26] Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer* 2017; 123: 1721–1730.
- [27] Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. *PloS One* 2013; 8: e55681.

- [28] Desmond A, Kurian AW, Gabree M, et al. Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment. *JAMA Oncol* 2015; 1: 943–951.
- [29] Llorc G, Chirivella I, Morales R, et al. SEOM clinical guidelines in Hereditary Breast and ovarian cancer. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex* 2015; 17: 956–961.
- [30] Kottemann MC, Smogorzewska A. Fanconi anemia and the repair of Watson and Crick crosslinks. *Nature* 2013; 493: 356–363.
- [31] Barroso E, Pita G, Arias JI, et al. The Fanconi anemia family of genes and its correlation with breast cancer susceptibility and breast cancer features. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 118: 655–660.
- [32] BRCA1 - Breast cancer type 1 susceptibility protein - Homo sapiens (Human) - BRCA1 gene & protein, <https://www.uniprot.org/uniprot/P38398> (accessed 17 November 2018).
- [33] Wang B. BRCA1 tumor suppressor network: focusing on its tail. *Cell Biosci* 2012; 2: 6.
- [34] Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008; 26: 2568–2581.
- [35] Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med* 2008; 359: 2143–2153.
- [36] Gabaldó Barrios X, Sarabia Meseguer MD, Marín Vera M, et al. Molecular characterization and clinical interpretation of BRCA1/BRCA2 variants in families from Murcia (south-eastern Spain) with hereditary breast and ovarian cancer: clinical-pathological features in BRCA carriers and non-carriers. *Fam Cancer* 2017; 16: 477–489.
- [37] Romagnolo APG, Romagnolo DF, Selmin OI. BRCA1 as target for breast cancer prevention and therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2015; 15: 4–14.
- [38] Ewald IP, Ribeiro PLI, Palmero EI, et al. Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review. *Genet Mol Biol* 2009; 32: 437–446.
- [39] de la Hoya M, Gutiérrez-Enríquez S, Velasco E, et al. Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Clin Chem* 2006; 52: 1480–1485.
- [40] Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 2011; 12: 68–78.
- [41] Al Abo M, Dejsuphong D, Hirota K, et al. Compensatory functions and interdependency of the DNA-binding domain of BRCA2 with the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex. *Cancer Res* 2014; 74: 797–807.

- [42] Buisson R, Masson J-Y. PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 10312–10323.
- [43] Southey MC, Teo ZL, Winship I. PALB2 and breast cancer: ready for clinical translation! *Appl Clin Genet* 2013; 6: 43–52.
- [44] Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med* 2014; 371: 497–506.
- [45] Oussalah A, Avogbe PH, Guyot E, et al. BRIP1 coding variants are associated with a high risk of hepatocellular carcinoma occurrence in patients with HCV- or HBV-related liver disease. *Oncotarget* 2017; 8: 62842–62857.
- [46] Brosh RM, Cantor SB. Molecular and cellular functions of the FANCD1 DNA helicase defective in cancer and in Fanconi anemia. *Front Genet* 2014; 5: 372.
- [47] Norquist BM, Harrell MI, Brady MF, et al. Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol* 2016; 2: 482–490.
- [48] Ramus SJ, Song H, Dicks E, et al. Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*; 107. Epub ahead of print 1 November 2015. DOI: 10.1093/jnci/djv214.
- [49] Boulton SJ. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 633–645.
- [50] Loveday C, Turnbull C, Ruark E, et al. Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet* 2012; 44: 475–476; author reply 476.
- [51] Song H, Dicks E, Ramus SJ, 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; 33: 2901–2907.
- [52] Osorio A, Endt D, Fernández F, et al. Predominance of pathogenic missense variants in the RAD51C gene occurring in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 2889–2898.
- [53] Gutiérrez-Enríquez S, Bonache S, de Garibay GR, et al. About 1% of the breast and ovarian Spanish families testing negative for BRCA1 and BRCA2 are carriers of RAD51D pathogenic variants. *Int J Cancer* 2014; 134: 2088–2097.
- [54] Pelttari LM, Kiiski J, Nurminen R, et al. A Finnish founder mutation in RAD51D: analysis in breast, ovarian, prostate, and colorectal cancer. *J Med Genet* 2012; 49: 429–432.
- [55] Sánchez-Bermúdez AI, Sarabia-Meseguer MD, García-Aliaga Á, et al. Mutational analysis of RAD51C and RAD51D genes in hereditary breast

and ovarian cancer families from Murcia (southeastern Spain). *Eur J Med Genet*. Epub ahead of print 2 February 2018. DOI: 10.1016/j.ejmg.2018.01.015.

- [56] Pfam: Protein: ATM\_HUMAN (Q13315), <https://pfam.xfam.org/protein/Q13315> (accessed 24 August 2018).
- [57] Athanasakis E, Melloni E, Rigolin GM, et al. The p53 transcriptional pathway is preserved in ATMmutated and NOTCH1mutated chronic lymphocytic leukemias. *Oncotarget* 2014; 5: 12635–12645.
- [58] Serine-protein kinase ATM (Q13315) < InterPro < EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/Q13315> (accessed 24 August 2018).
- [59] Tavtigian SV, Chenevix-Trench G. Growing recognition of the role for rare missense substitutions in breast cancer susceptibility. *Biomark Med* 2014; 8: 589–603.
- [60] Boder E, Sedgwick RP. Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* 1958; 21: 526–554.
- [61] McKinnon PJ. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep* 2004; 5: 772–776.
- [62] Brunet J, Gutiérrez-Enríguez S, Torres A, et al. ATM germline mutations in Spanish early-onset breast cancer patients negative for BRCA1/BRCA2 mutations. *Clin Genet* 2008; 73: 465–473.
- [63] Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med* 2015; 372: 2243–2257.
- [64] van Os NJH, Roeleveld N, Weemaes CMR, et al. Health risks for ataxia-telangiectasia mutated heterozygotes: a systematic review, meta-analysis and evidence-based guideline. *Clin Genet* 2016; 90: 105–117.
- [65] Graña B, Fachal L, Darder E, et al. Germline ATM mutational analysis in BRCA1/BRCA2 negative hereditary breast cancer families by MALDI-TOF mass spectrometry. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 128: 573–579.
- [66] Daly MB, Pilarski R, Berry M, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN* 2017; 15: 9–20.
- [67] Tavera-Tapia A, Pérez-Cabornero L, Macías JA, et al. Almost 2% of Spanish breast cancer families are associated to germline pathogenic mutations in the ATM gene. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 161: 597–604.
- [68] Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, et al. CHEK2\*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008; 26: 542–548.

- [69] Cybulski C, Wokołorczyk D, Jakubowska A, et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2011; 29: 3747–3752.
- [70] Schmidt MK, Hogervorst F, van Hien R, et al. Age- and Tumor Subtype-Specific Breast Cancer Risk Estimates for CHEK2\*1100delC Carriers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2016; 34: 2750–2760.
- [71] Correa H. Li-Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet* 2016; 5: 84–88.
- [72] Gonzalez KD, Buzin CH, Noltner KA, et al. High frequency of de novo mutations in Li–Fraumeni syndrome. *J Med Genet* 2009; 46: 689–693.
- [73] Walsh T, Casadei S, Coats KH, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA* 2006; 295: 1379–1388.
- [74] Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003; 63: 6643–6650.
- [75] Evans DGR, Birch JM, Ramsden RT, et al. Malignant transformation and new primary tumours after therapeutic radiation for benign disease: substantial risks in certain tumour prone syndromes. *J Med Genet* 2006; 43: 289–294.
- [76] den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 2016; 37: 564–569.
- [77] Smith SD, Kawash JK, Grigoriev A. Lightning-fast genome variant detection with GROM. *GigaScience* 2017; 6: 1–7.
- [78] Lindor NM, Goldgar DE, Tavtigian SV, et al. BRCA1/2 sequence variants of uncertain significance: a primer for providers to assist in discussions and in medical management. *The Oncologist* 2013; 18: 518–524.
- [79] Thompson BA, Spurdle AB, Plazzer J-P, et al. Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat Genet* 2014; 46: 107–115.
- [80] Bonache S, Esteban I, Moles-Fernández A, et al. Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018; 144: 2495–2513.
- [81] Mayr E. *Systematics and the origin of species from the point of view of a zoologist*. USA: Harvard University Press, 1942.
- [82] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the

- Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2015; 17: 405–424.
- [83] Ellard S, Baple EL, Owens M, et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2017. 2017; 15.
- [84] Mercer TR, Clark MB, Andersen SB, et al. Genome-wide discovery of human splicing branchpoints. *Genome Res* 2015; 25: 290–303.
- [85] Izquierdo J-M, Valcárcel J. A simple principle to explain the evolution of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 2006; 20: 1679–1684.
- [86] Zhong Q, Peng H-L, Zhao X, et al. Effects of BRCA1- and BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2015; 21: 211–220.
- [87] Telli ML, Jensen KC, Vinayak S, et al. Phase II Study of Gemcitabine, Carboplatin, and Iniparib As Neoadjuvant Therapy for Triple-Negative and BRCA1/2 Mutation-Associated Breast Cancer With Assessment of a Tumor-Based Measure of Genomic Instability: PrECOG 0105. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2015; 33: 1895–1901.
- [88] Tan DSP, Kaye SB. Chemotherapy for Patients with BRCA1 and BRCA2-Mutated Ovarian Cancer: Same or Different? *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet* 2015; 114–121.
- [89] Aly A, Ganesan S. BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol* 2011; 3: 66–74.
- [90] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463–5467.
- [91] Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1933133/> (accessed 6 December 2018).
- [92] Ensembl core software resources: storage and programmatic access for DNA sequence and genome annotation | Database | Oxford Academic, <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bax020/3074789> (accessed 27 November 2018).
- [93] Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 1974; 185: 862–864.
- [94] Mathe E, Olivier M, Kato S, et al. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 1317–1325.
- [95] Sim N-L, Kumar P, Hu J, et al. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: W452–W457.

- [96] Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet Editor Board Jonathan Haines AI* 2013; 0 7: Unit7.20.
- [97] Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, et al. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 2010; 7: 575–576.
- [98] Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014; 11: 361–362.
- [99] 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: 377–394.
- [100] Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, et al. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol* 1997; 4: 311–323.
- [101] Zhang MQ. Statistical features of human exons and their flanking regions. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 919–932.
- [102] Pertea M, Lin X, Salzberg SL. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 1185–1190.
- [103] Vreeswijk MPG, Kraan JN, van der Klift HM, et al. Intronic variants in BRCA1 and BRCA2 that affect RNA splicing can be reliably selected by splice-site prediction programs. *Hum Mutat* 2009; 30: 107–114.
- [104] Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinforma Oxf Engl* 2015; 31: 761–763.
- [105] Shihab HA, Rogers MF, Gough J, et al. An integrative approach to predicting the functional effects of non-coding and coding sequence variation. *Bioinforma Oxf Engl* 2015; 31: 1536–1543.
- [106] Kim S, Jhong J-H, Lee J, et al. Meta-analytic support vector machine for integrating multiple omics data. *BioData Min* 2017; 10: 2.
- [107] Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, et al. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res* 2005; 15: 901–913.
- [108] Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, et al. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res* 2010; 20: 110–121.
- [109] Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* 2005; 15: 1034–1050.

- [110] Garber M, Guttman M, Clamp M, et al. Identifying novel constrained elements by exploiting biased substitution patterns. *Bioinformatics* 2009; 25: i54–i62.
- [111] Gulko B, Hubisz MJ, Gronau I, et al. A method for calculating probabilities of fitness consequences for point mutations across the human genome. *Nat Genet* 2015; 47: 276–283.
- [112] Chun S, Fay JC. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res* 2009; 19: 1553–1561.
- [113] Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: e118–e118.
- [114] Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 2015; 31: 2745–2747.
- [115] Jian X, Boerwinkle E, Liu X. In silico prediction of splice-altering single nucleotide variants in the human genome. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 13534–13544.
- [116] López-Ferrando V, Gazzo A, de la Cruz X, et al. PMut: a web-based tool for the annotation of pathological variants on proteins, 2017 update. *Nucleic Acids Res* 2017; 45: W222–W228.
- [117] Manahan ER, Sebastian M, Hughes KS, et al. Consensus Guideline on Genetic Testing for Hereditary Breast Cancer.
- [118] Machado PM, Brandão RD, Cavaco BM, et al. Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2007; 25: 2027–2034.
- [119] Baker KE, Parker R. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 293–299.
- [120] Mitui M, Campbell C, Coutinho G, et al. Independent mutational events are rare in the ATM gene: haplotype prescreening enhances mutation detection rate. *Hum Mutat* 2003; 22: 43–50.
- [121] Coutinho G, Mitui M, Campbell C, et al. Five haplotypes account for fifty-five percent of ATM mutations in Brazilian patients with ataxia telangiectasia: seven new mutations. *Am J Med Genet A* 2004; 126A: 33–40.
- [122] Mangone FR, Miracca EC, Feilotter HE, et al. ATM gene mutations in sporadic breast cancer patients from Brazil. *SpringerPlus* 2015; 4: 23.
- [123] Buzin CH, Gatti RA, Nguyen VQ, et al. Comprehensive scanning of the ATM gene with DOVAM-S. *Hum Mutat* 2003; 21: 123–131.

- [124] Eliade M, Skrzypski J, Baurand A, et al. The transfer of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer to healthcare: What are the implications for the management of patients and families? *Oncotarget* 2017; 8: 1957–1971.
- [125] Carranza D, Vega AK, Torres-Rusillo S, et al. Molecular and Functional Characterization of a Cohort of Spanish Patients with Ataxia-Telangiectasia. *Neuromolecular Med* 2017; 19: 161–174.
- [126] Estiar MA, Mehdipour P. ATM in breast and brain tumors: a comprehensive review. *Cancer Biol Med* 2018; 15: 210–227.
- [127] Termsarasab P, Yang AC, Frucht SJ. Myoclonus in ataxia-telangiectasia. *Tremor Hyperkinetic Mov N Y N* 2015; 5: 298.
- [128] Ellingson MS, Hart SN, Kalari KR, et al. Exome sequencing reveals frequent deleterious germline variants in cancer susceptibility genes in women with invasive breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 153: 435–443.
- [129] Balta G, Patiroglu T, Gumruk F. Fanconi Anemia and Ataxia Telangiectasia in Siblings who Inherited Unique Combinations of Novel FANCA and ATM Null Mutations. *J Pediatr Hematol Oncol* 2019; 41: 243–246.
- [130] Caminsky NG, Mucaki EJ, Perri AM, et al. Prioritizing Variants in Complete Hereditary Breast and Ovarian Cancer Genes in Patients Lacking Known BRCA Mutations. *Hum Mutat* 2016; 37: 640–652.
- [131] Castillo-Guardiola V, Sarabia-Meseguer MD, Marín-Vera M, et al. New insights into the performance of multigene panel testing: Two novel nonsense variants in BRIP1 and TP53 in a young woman with breast cancer. *Cancer Genet* 2018; 228–229: 1–4.
- [132] Paulo P, Maia S, Pinto C, et al. Targeted next generation sequencing identifies functionally deleterious germline mutations in novel genes in early-onset/familial prostate cancer. *PLOS Genet* 2018; 14: e1007355.
- [133] Southey MC, Goldgar DE, Winqvist R, et al. PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS. *J Med Genet* 2016; 53: 800–811.
- [134] Apostolou P, Pappasotiriou I. Current perspectives on CHEK2 mutations in breast cancer. *Breast Cancer Dove Med Press* 2017; 9: 331–335.
- [135] Maxwell KN, Wubbenhorst B, D’Andrea K, et al. Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2015; 17: 630–638.
- [136] Pritzlaff M, Summerour P, McFarland R, et al. Male breast cancer in a multi-gene panel testing cohort: insights and unexpected results. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 161: 575–586.

- [137] Sodha N, Mantoni TS, Tavgigian SV, et al. Rare germ line CHEK2 variants identified in breast cancer families encode proteins that show impaired activation. *Cancer Res* 2006; 66: 8966–8970.
- [138] Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, et al. The ATM–Chk2–Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 2001; 410: 842.
- [139] Falck J, Lukas C, Protopopova M, et al. Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. *Oncogene* 2001; 20: 5503–5510.
- [140] Li J, Williams BL, Haire LF, et al. Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. *Mol Cell* 2002; 9: 1045–1054.
- [141] Kilpivaara O, Vahteristo P, Falck J, et al. CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *Int J Cancer* 2004; 111: 543–547.
- [142] AlDubayan SH, Pyle LC, Gamulin M, et al. Association of Inherited Pathogenic Variants in Checkpoint Kinase 2 (CHEK2) With Susceptibility to Testicular Germ Cell Tumors. *JAMA Oncol*. Epub ahead of print 24 January 2019. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.6477.
- [143] Kilpivaara O, Alhopuro P, Vahteristo P, et al. CHEK2 I157T associates with familial and sporadic colorectal cancer. *J Med Genet* 2006; 43: e34–e34.
- [144] Huszno J, Kołosza Z. Checkpoint Kinase 2 (CHEK2) Mutation in Renal Cell Carcinoma: A Single-Center Experience. *J Kidney Cancer VHL* 2018; 5: 19–23.
- [145] Obazee O, Archibugi L, Andriulli A, et al. Germline BRCA2 K3326X and CHEK2 I157T mutations increase risk for sporadic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. Epub ahead of print 23 January 2019. DOI: 10.1002/ijc.32127.
- [146] Liu C, Wang Y, Wang Q-S, et al. The CHEK2 I157T Variant and Breast Cancer Susceptibility: A Systematic Review and Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 1355–1360.
- [147] Szymanska-Pasternak J, Szymanska A, Medrek K, et al. CHEK2 variants predispose to benign, borderline and low-grade invasive ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 2006; 102: 429–431.
- [148] Li A, Swift M. Mutations at the ataxia-telangiectasia locus and clinical phenotypes of A-T patients. *Am J Med Genet* 2000; 92: 170–177.
- [149] Ding H, Mao C, Li S-M, et al. Lack of association between ATM C.1066-6T > G mutation and breast cancer risk: a meta-analysis of 8,831 cases and 4,957 controls. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 125: 473–477.

- [150] Liang WS, Dardis C, Helland A, et al. Identification of therapeutic targets in chordoma through comprehensive genomic and transcriptomic analyses. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*; 4. Epub ahead of print December 2018. DOI: 10.1101/mcs.a003418.
- [151] Edvardsen H, Tefre T, Jansen L, et al. Linkage disequilibrium pattern of the ATM gene in breast cancer patients and controls; association of SNPs and haplotypes to radio-sensitivity and post-lumpectomy local recurrence. *Radiat Oncol Lond Engl* 2007; 2: 25.
- [152] Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, et al. Contributions of ATM Mutations to Familial Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 3325–3333.
- [153] Yurgelun MB, Allen B, Kaldate RR, et al. Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients With Suspected Lynch Syndrome. *Gastroenterology* 2015; 149: 604-613.e20.
- [154] Stafford JL, Dyson G, Levin NK, et al. Reanalysis of BRCA1/2 negative high risk ovarian cancer patients reveals novel germline risk loci and insights into missing heritability. *PLOS ONE* 2017; 12: e0178450.
- [155] Hajkova N, Hojny J, Nemejcova K, et al. Germline mutation in the TP53 gene in uveal melanoma. *Sci Rep* 2018; 8: 7618.
- [156] Shindo K, Yu J, Suenaga M, et al. Deleterious Germline Mutations in Patients With Apparently Sporadic Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2017; 35: 3382–3390.
- [157] Podralska M, Ziółkowska-Suchanek I, Żurawek M, et al. Genetic variants in ATM, H2AFX and MRE11 genes and susceptibility to breast cancer in the polish population. *BMC Cancer* 2018; 18: 452.
- [158] Goldstein AM, Xiao Y, Sampson J, et al. Rare germline variants in known melanoma susceptibility genes in familial melanoma. *Hum Mol Genet* 2017; 26: 4886–4895.
- [159] Irminger-Finger I, Ratajska M, Pilyugin M. New concepts on BARD1: Regulator of BRCA pathways and beyond. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 72: 1–17.
- [160] Goidescu IG, Caracostea G, Eniu DT, et al. Prevalence of deleterious mutations among patients with breast cancer referred for multigene panel testing in a Romanian population. *Clujul Med* 1957 2018; 91: 157–165.
- [161] Penkert J, Schmidt G, Hofmann W, et al. Breast cancer patients suggestive of Li-Fraumeni syndrome: mutational spectrum, candidate genes, and unexplained heredity. *Breast Cancer Res BCR* 2018; 20: 87.
- [162] Kahn R, Garcia-Soto A, Silva-Smith R, et al. Primary Peritoneal Carcinoma in a BRCA1/2-negative, PALB2-positive patient. *Gynecol Oncol Rep* 2016; 17: 93–95.

- [163] Mucaki EJ, Caminsky NG, Perri AM, et al. A unified analytic framework for prioritization of non-coding variants of uncertain significance in heritable breast and ovarian cancer. *BMC Med Genomics* 2016; 9: 19.
- [164] Decker B, Allen J, Luccarini C, et al. Rare, protein-truncating variants in ATM, CHEK2 and PALB2, but not XRCC2, are associated with increased breast cancer risks. *J Med Genet* 2017; 54: 732–741.
- [165] Castéra L, Krieger S, Rousselin A, et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet EJHG* 2014; 22: 1305–1313.
- [166] Kraus C, Hoyer J, Vasileiou G, et al. Gene panel sequencing in familial breast/ovarian cancer patients identifies multiple novel mutations also in genes others than BRCA1/2. *Int J Cancer* 2017; 140: 95–102.
- [167] Yorczyk A, Robinson LS, Ross TS. Use of panel tests in place of single gene tests in the cancer genetics clinic. *Clin Genet* 2015; 88: 278–282.
- [168] Mohamad S, Isa NM, Muhammad R, et al. Low prevalence of CHEK2 gene mutations in multiethnic cohorts of breast cancer patients in Malaysia. *PLoS One* 2015; 10: e0117104.
- [169] Rashid MU, Muhammad N, Faisal S, et al. Constitutional CHEK2 mutations are infrequent in early-onset and familial breast/ovarian cancer patients from Pakistan. *BMC Cancer* 2013; 13: 312.
- [170] Osorio A, Rodríguez-López R, Díez O, 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* 2004; 108: 54–56.
- [171] Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2017; 35: 1086–1095.
- [172] Roeb W, Higgins J, King M-C. Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 2738–2744.
- [173] Cuny T, Pertuit M, Sahnoun-Fathallah M, et al. Genetic analysis in young patients with sporadic pituitary macroadenomas: besides AIP don't forget MEN1 genetic analysis. *Eur J Endocrinol* 2013; 168: 533–541.
- [174] Rubio-Del-Campo A, Salinas-Sánchez AS, Sánchez-Sánchez F, et al. Implications of mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 in patients with sporadic renal cell carcinoma. *BJU Int* 2008; 102: 504–509.
- [175] Cragun D, Radford C, Dolinsky JS, et al. Panel-based testing for inherited colorectal cancer: a descriptive study of clinical testing performed by a US laboratory. *Clin Genet* 2014; 86: 510–520.

- [176] Jóri B, Kamps R, Xanthoulea S, et al. Germ-line variants identified by next generation sequencing in a panel of estrogen and cancer associated genes correlate with poor clinical outcome in Lynch syndrome patients. *Oncotarget* 2015; 6: 41108–41122.
- [177] Rey J-M, Ducros V, Pujol P, et al. Improving Mutation Screening in Patients with Colorectal Cancer Predisposition Using Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn JMD* 2017; 19: 589–601.
- [178] Karageorgos I, Mizzi C, Giannopoulou E, et al. Identification of cancer predisposition variants in apparently healthy individuals using a next-generation sequencing-based family genomics approach. *Hum Genomics* 2015; 9: 12.
- [179] Gao P, Ma N, Li M, et al. Functional variants in NBS1 and cancer risk: evidence from a meta-analysis of 60 publications with 111 individual studies. *Mutagenesis* 2013; 28: 683–697.
- [180] Desjardins S, Beauparlant JC, Labrie Y, et al. Variations in the NBN/NBS1 gene and the risk of breast cancer in non-BRCA1/2 French Canadian families with high risk of breast cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 181.
- [181] Kuusisto KM, Bebel A, Vihinen M, et al. Screening for BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD50, and CDH1 mutations in high-risk Finnish BRCA1/2-founder mutation-negative breast and/or ovarian cancer individuals. *Breast Cancer Res BCR* 2011; 13: R20.
- [182] Catucci I, Radice P, Milne RL, et al. The PALB2 p.Leu939Trp mutation is not associated with breast cancer risk. *Breast Cancer Res BCR* 2016; 18: 111.
- [183] Myszka A, Nguyen-Dumont T, Karpinski P, et al. Targeted massively parallel sequencing characterises the mutation spectrum of PALB2 in breast and ovarian cancer cases from Poland and Ukraine. *Fam Cancer* 2018; 17: 345–349.
- [184] Park J-Y, Singh TR, Nassar N, et al. Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene* 2014; 33: 4803–4812.
- [185] Yang XR, Rotunno M, Xiao Y, et al. Multiple rare variants in high-risk pancreatic cancer-related genes may increase risk for pancreatic cancer in a subset of patients with and without germline CDKN2A mutations. *Hum Genet* 2016; 135: 1241–1249.
- [186] Kechagioglou P, Papi RM, Provatopoulou X, et al. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Res* 2014; 34: 1387–1400.
- [187] Castellanos E, Gel B, Rosas I, et al. A comprehensive custom panel design for routine hereditary cancer testing: preserving control, improving

- diagnostics and revealing a complex variation landscape. *Sci Rep* 2017; 7: 39348.
- [188] Sopik V, Akbari MR, Narod SA. Genetic testing for RAD51C mutations: in the clinic and community. *Clin Genet* 2015; 88: 303–312.
- [189] Wickramanayake A, Wickramanyake A, Bernier G, et al. Loss of function germline mutations in RAD51D in women with ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2012; 127: 552–555.
- [190] Jalkh N, Chouery E, Haidar Z, et al. Next-generation sequencing in familial breast cancer patients from Lebanon. *BMC Med Genomics* 2017; 10: 8.
- [191] Stjepanovic N, Stockley TL, Bedard PL, et al. Additional germline findings from a tumor profiling program. *BMC Med Genomics* 2018; 11: 65.
- [192] de Andrade KC, Frone MN, Wegman-Ostrosky T, et al. Variable population prevalence estimates of germline TP53 variants: A gnomAD-based analysis. *Hum Mutat* 2019; 40: 97–105.
- [193] de Andrade KC, Mirabello L, Stewart DR, et al. Higher-than-expected population prevalence of potentially pathogenic germline TP53 variants in individuals unselected for cancer history. *Hum Mutat* 2017; 38: 1723–1730.
- [194] Eliade M, Skrzypski J, Baurand A, et al. The transfer of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer to healthcare: What are the implications for the management of patients and families? *Oncotarget* 2017; 8: 1957–1971.
- [195] Castéra L, Harter V, Muller E, et al. Landscape of pathogenic variations in a panel of 34 genes and cancer risk estimation from 5131 HBOC families. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2018; 20: 1677–1686.
- [196] Schroeder C, Faust U, Sturm M, et al. HBOC multi-gene panel testing: comparison of two sequencing centers. *Breast Cancer Res Treat* 2015; 152: 129–136.
- [197] Couch FJ, Shimelis H, Hu C, et al. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol* 2017; 3: 1190–1196.
- [198] Kurian AW, Hughes E, Handorf EA, et al. Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women. *JCO Precis Oncol* 2017; 1–12.
- [199] Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R, et al. Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2016; 18: 823–832.
- [200] Lilyquist J, LaDuca H, Polley E, et al. Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene

- panels compared to reference controls. *Gynecol Oncol* 2017; 147: 375–380.
- [201] Kapoor NS, Curcio LD, Blakemore CA, et al. Multigene Panel Testing Detects Equal Rates of Pathogenic BRCA1/2 Mutations and has a Higher Diagnostic Yield Compared to Limited BRCA1/2 Analysis Alone in Patients at Risk for Hereditary Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 2015; 22: 3282–3288.
- [202] Han F, Guo C, Liu L. The effect of CHEK2 variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *DNA Cell Biol* 2013; 32: 329–335.
- [203] Beitsch PD, Whitworth PW, Hughes K, et al. Underdiagnosis of Hereditary Breast Cancer: Are Genetic Testing Guidelines a Tool or an Obstacle? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2019; 37: 453–460.
- [204] Levy-Lahad E, Lahad A, King M-C. Precision medicine meets public health: population screening for BRCA1 and BRCA2. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107: 420.
- [205] Yang S, Axilbund JE, O’Leary E, et al. Underdiagnosis of Hereditary Breast and Ovarian Cancer in Medicare Patients: Genetic Testing Criteria Miss the Mark. *Ann Surg Oncol* 2018; 25: 2925–2931.
- [206] Espenschied CR, LaDuca H, Li S, et al. Multigene Panel Testing Provides a New Perspective on Lynch Syndrome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2017; 35: 2568–2575.
- [207] Goldgar DE, Healey S, Dowty JG, et al. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res BCR* 2011; 13: R73.
- [208] Balleine RL, Murali R, Bilous AM, et al. Histopathological features of breast cancer in carriers of ATM gene variants. *Histopathology* 2006; 49: 523–532.
- [209] Thompson D, Duedal S, Kirner J, et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 813–822.
- [210] Dombernowsky SL, Weischer M, Allin KH, et al. Risk of cancer by ATM missense mutations in the general population. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2008; 26: 3057–3062.
- [211] Minion LE, Dolinsky JS, Chase DM, et al. Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2. *Gynecol Oncol* 2015; 137: 86–92.
- [212] LaDuca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS, et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2014; 16: 830–837.

- [213] Spoerri L, Brooks K, Chia K, et al. A novel ATM-dependent checkpoint defect distinct from loss of function mutation promotes genomic instability in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2016; 29: 329–339.
- [214] Paglia LL, Laugé A, Weber J, et al. ATM germline mutations in women with familial breast cancer and a relative with haematological malignancy. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119: 443–452.
- [215] Boulton J. Ataxia telangiectasia gene mutations in leukaemia and lymphoma. *J Clin Pathol* 2001; 54: 512–516.
- [216] Rafnar T, Gudbjartsson DF, Sulem P, et al. Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer. *Nat Genet N Y* 2011; 43: 1104–7.
- [217] Lilyquist J, LaDuca H, Polley E, et al. Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls. *Gynecol Oncol* 2017; 147: 375–380.
- [218] Jones MR, Kamara D, Karlan BY, et al. Genetic epidemiology of ovarian cancer and prospects for polygenic risk prediction. *Gynecol Oncol* 2017; 147: 705–713.
- [219] Balmaña J, Domchek SM. BRIP1 as an ovarian cancer susceptibility gene: ready for the clinic? *J Natl Cancer Inst*; 107. Epub ahead of print November 2015. DOI: 10.1093/jnci/djv262.
- [220] Andrews L, Mutch DG. Hereditary Ovarian Cancer and Risk Reduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017; 41: 31–48.
- [221] Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, 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; 20: 764–775.
- [222] Ledermann JA. PARP inhibitors in ovarian cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2016; 27 Suppl 1: i40–i44.
- [223] Pennington KP, Swisher EM. Hereditary ovarian cancer: beyond the usual suspects. *Gynecol Oncol* 2012; 124: 347–353.
- [224] Daly MB, Pilarski R, Berry MP, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian.
- [225] Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman J-M, et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2015; 33: 2345–2352.
- [226] Park DJ, Lesueur F, Nguyen-Dumont T, et al. Rare Mutations in XRCC2 Increase the Risk of Breast Cancer. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 734–739.

- [227] Golmard L, Castéra L, Krieger S, et al. Contribution of germline deleterious variants in the RAD51 paralogs to breast and ovarian cancers. *Eur J Hum Genet* 2017; 25: 1345–1353.
- [228] Pelttari LM, Kiiski JI, Ranta S, et al. RAD51, XRCC3, and XRCC2 mutation screening in Finnish breast cancer families. *SpringerPlus* 2015; 4: 92.
- [229] Hilbers FS, Wijnen JT, Hoogerbrugge N, et al. Rare variants in XRCC2 as breast cancer susceptibility alleles. *J Med Genet* 2012; 49: 618–620.
- [230] Nielsen M, Morreau H, Vasen HFA, et al. MUTYH-associated polyposis (MAP). *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 79: 1–16.
- [231] Fulk K, LaDuca H, Black MH, et al. Monoallelic MUTYH carrier status is not associated with increased breast cancer risk in a multigene panel cohort. *Fam Cancer* 2019; 18: 197–201.
- [232] Win AK, Hopper JL, Jenkins MA. Association between monoallelic MUTYH mutation and colorectal cancer risk: a meta-regression analysis. *Fam Cancer* 2011; 10: 1–9.
- [233] Rennert G, Lejbkowitz F, Cohen I, et al. MutYH mutation carriers have increased breast cancer risk. *Cancer* 2012; 118: 1989–1993.
- [234] Zhu M, Chen X, Zhang H, et al. AluYb8 insertion in the MUTYH gene and risk of early-onset breast and gastric cancers in the Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2011; 12: 1451–1455.
- [235] Beiner ME, Zhang WW, Zhang S, et al. Mutations of the MYH gene do not substantially contribute to the risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 114: 575–578.
- [236] Out AA, Wasielewski M, Huijts PEA, et al. MUTYH gene variants and breast cancer in a Dutch case–control study. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 219–227.
- [237] Singer CF, Balmaña J, Bürki N, et al. Genetic counselling and testing of susceptibility genes for therapeutic decision-making in breast cancer—an European consensus statement and expert recommendations. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* 2019; 106: 54–60.