

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR
AC-GEN READING LIFE S.L.



**“NUEVO ABORDAJE PARA ESTUDIOS
GENÉTICOS EN FAMILIAS CON CÁNCER
DE MAMA HEREDITARIO:
RESUCITANDO A LOS GENES”**

Memoria del Trabajo de Fin de Máster presentada por:

Berta Arias López

Tutora: Dr. Nuria Gómez Fernández

Cotutora: Dr. María José Caloca Roldán

Valladolid, Julio 2017

INDICE

ABREVIATURAS..... 2

INTRODUCCIÓN 3

 CÁNCER DE MAMA: CONCEPTOS GENERALES. 3

 INCIDENCIA DEL CÁNCER DE MAMA..... 3

 ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA 4

CONTRIBUCIÓN GENÉTICA EN EL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO 5

DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN FAMILIAS CON SOSPECHA DE CÁNCER HEREDITARIO 6

TECNOLOGÍA NGS..... 7

IMPACTO CLÍNICO DE LA TENCOLOGÍA NGS EN EL CONSEJO GENÉTICO 8

PANEL HC-GEN TEST 9

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 10

MATERIAL Y MÉTODOS 11

 ORIGEN DE LA MUESTRA E HISTORIA CLÍNICA DE LA PACIENTE..... 11

 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE EN PAPEL..... 11

 VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN Y CUANTIFICACIÓN..... 12

 PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS..... 12

 CUANTIFICACIÓN DE LIBRERÍAS: 13

 PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN EN *ION TORRENT*..... 14

 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS 16

 VALIDACIÓN DE LAS VARIANTES DETECTADAS..... 17

 PCR CONVENCIONAL 17

 REACCIÓN DE SECUENCIA Y SECUENCIACIÓN SANGER 18

RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 20

CONCLUSIONES 26

BIBLIOGRAFÍA..... 27

ANEXOS: 30

 Anexo I: CONSENTIMIENTO INFORMADO..... 30

 Anexo II: TABLA DE GENES DEL PANEL HC-GEN TEST 32

 Anexo III: TABLA DE SNP ASOCIADOS A CM DETECTADOS EN EL ESTUDIO 33

 Anexo IV: TABLA DE VARIANTES NO PATÓGENAS DETECTADAS EN EL ESTUDIO 34

ABREVIATURAS

µL: microlitro.

A: adenina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ATM: gen ataxia telagentacsia

BRCA1: Gen de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1 (*BRCA1* *Cancer susceptibility 1*).

BRCA2: Gen de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 2 (*BRCA2* *Cancer susceptibility 2*).

C: citosina.

CDH1: Gen de la cadherina 1.

CM: Cáncer de mama.

CMF: Cáncer de mama con agregación familiar.

CMH: Cáncer de mama hereditario.

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPS: desoxirribonucleótidos trifosfato.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

FTA: Flinders Technology Associates.

Fw: *Primer forward*.

G: Guanina.

GWAS: Estudios de asociación de genoma completo (*Genome-wide Assotiation Studies*).

HGMD: Human Genome Mutation Database.

ISP: *Ion Sphere Particles*.

Kb: Kilobases.

MIM: *Mendelian Inheritance in Man*.

MLH1: gen homólogo humano 1 de MutL de *E.coli*.

MSH2: gen homólogo humano 2 de MutS de *E.coli*.

MSH6: gen homólogo humano 6 de MutS de *E.coli*.

NGS: *Next Generation Sequencing*.

nt: nucleótico.

PALB2: Gen compañero y colocalizador de *BRCA2* (*Partner and localizer of BRCA2*).

Pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PGM: *Personal Genome Machine*.

pM: picomolar.

PTEN: Gen homólogo de la fosfatasa y tensina

Rv: *Primer reverse*.

SNP: Polimorfismo de una única bas.

T: Timina.

Ta: Temperatura de *anealing*.

TES: *targeted exome sequencing*.

TP53: Gen *Tumor Protein p53*.

Vcf: formato de almacenamiento de variantes obtenidas por NGS (*Variant Calling File*).

WES: *Whole Exome Sequencing*.

Algunos términos en inglés ampliamente utilizados en Biología Molecular y sin clara traducción en castellano se muestran en cursiva.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER DE MAMA: CONCEPTOS GENERALES.

INCIDENCIA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama (CM) (MIM#011448) es el cáncer más frecuente en las mujeres a nivel mundial, con cerca de 1,7 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012 (1). Aunque también puede aparecer en hombres, esta patología tiene una mayor frecuencia en mujeres. En España, el cáncer de mama afecta al 29% de las mujeres y se estima que 1 de cada 8 padecerá CM a lo largo de su vida (2). Su incidencia incrementa año tras año y constituye la primera causa de muerte en mujeres españolas, lo que lo convierte en un problema de salud prioritario. Los avances en prevención, diagnóstico precoz y tratamientos, que se llevan produciendo en los últimos años, han permitido aumentar la supervivencia a los 5 años de los pacientes (40.8%)(1). La supervivencia está directamente relacionado con la fase o estadio tumoral de tal modo que tumores en estadios tempranos (estadio I) tienen una supervivencia superior al 89.2%, mientras que tumores en estadios avanzados (estadio III) reducen drásticamente la supervivencia del paciente hasta valores del 24% a los 5 años. (3)

El CM se produce como consecuencia de un crecimiento anormal y desordenado de las células de tejido mamario y tiene una relación directa con las hormonas sexuales (4). Los mecanismos implicados en la carcinogénesis comprometen importantes funciones biológicas: a) alteración del ciclo celular, mediante el mantenimiento constante de la señal de proliferación: crecimiento descontrolado, resistencia a la muerte celular e inmortalidad replicativa, b) inducción de procesos de angiogénesis, c) activación de la capacidad de invasión y metástasis (5). Cuando la capacidad de proliferación de un grupo de células aumenta da lugar a un tumor benigno, si posteriormente estas células adquieren la capacidad de invadir otros órganos o tejidos se trama de un tumor maligno o cáncer.

Existen diversas clasificaciones del CM, pero la más utilizada es la que la que designa los tipos de cáncer atendiendo al tipo celular que maligniza. De esta manera, hablaremos de dos tipos de cáncer de mama:

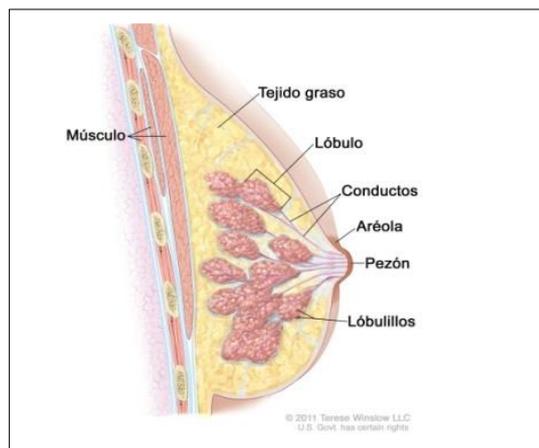


Figura 1. Estructura del tejido mamario
(www.cancer.gov/espanol/tipos/seno)

1. Carcinoma ductal: Este tumor implica a las células de los ductos y constituye el 90% de los casos de CM.
2. Carcinoma lobular, donde las células alteradas son las de los acinos glandulares o células lobulares y supone el 10% de los casos restantes.

ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El CM es una enfermedad compleja y, aunque la mayoría de los casos tienen una etiología desconocida, hay una serie de factores que pueden predisponer la aparición del mismo (6,7) y nos permiten clasificar al cáncer en dos grupos según su etiología:

1. **Factores no genéticos/ ambientales:** Entre los que se encuentran el sexo (mujer), la edad (>50años), la raza y origen étnico, estilo de vida, la dieta, actividad física, el tabaquismo, consumo de alcohol, terapias hormonales orales, antecedentes personales, radiación...etc. (8,9).
2. **Factores genéticos:** El riesgo de padecer cáncer aumenta con el número de familiares de primer grado afecto, lo que también conocemos como historia familiar (10). Existen varios genes implicados en el aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama, así como otros tipos de cáncer. Existen también síndromes hereditarios que pueden predisponer a esta patología como son: Síndrome de Lynch (MIM#120435), Síndrome de Cowden (MIM#158350), Síndrome de Li-Fraumeni (MIM#151623), Síndrome de Peutz-Jeghers (MIM#175200) y Ataxia Telangiectasia (MIM#208900)(11).

El riesgo de desarrollar este tipo de tumor en la población general se sitúa en el 12% pero aumenta exponencialmente con la edad. Se estima que entre un 25% de los casos tendrían una base genética (hereditaria o agrupación familiar), y que alrededor del 75% serían debidos fundamentalmente a factores ambientales (dieta, estilo de vida, etc...). El CM se puede clasificar en tres tipos atendiendo a su forma de transmisión y a la participación de genes y ambiente en su desarrollo:

1. **Cáncer de mama esporádico (CME):** Agrupa la mayor parte de los casos de CM (70-80%) (12). Este grupo de CM parece que surge principalmente como causa de la exposición a factores ambientales, aunque no se descarta que exista una predisposición genética en los individuos que lo padecen.
2. **Cáncer de mama de agregación familiar (CMF):** Se define como la aparición a edades tardías de CM, u otro tipo de tumores asociados, en más miembros de una familia de lo que correspondería por azar sin poder establecerse un patrón de herencia definido, constituye alrededor del 15% de los casos (13). Los estudios poblacionales asocian un riesgo superior al de la población general de desarrollar CM cuando un familiar de primer grado ha padecido esta patología, aunque los factores ambientales probablemente determinan quiénes de los individuos predispuestos genéticamente desarrollarán CM.
3. **Cáncer de mama hereditario (CMH):** se caracteriza por el acumulo casos de CM o de cáncer y ovario en la familia. Se caracteriza por la existencia de un patrón de herencia mendeliana y constituye aproximadamente un 5-10% de los casos (13). Existe mayor frecuencia de afectación bilateral, gran presencia de tumores asociados en individuos afectos y aparecen a edad más temprana.

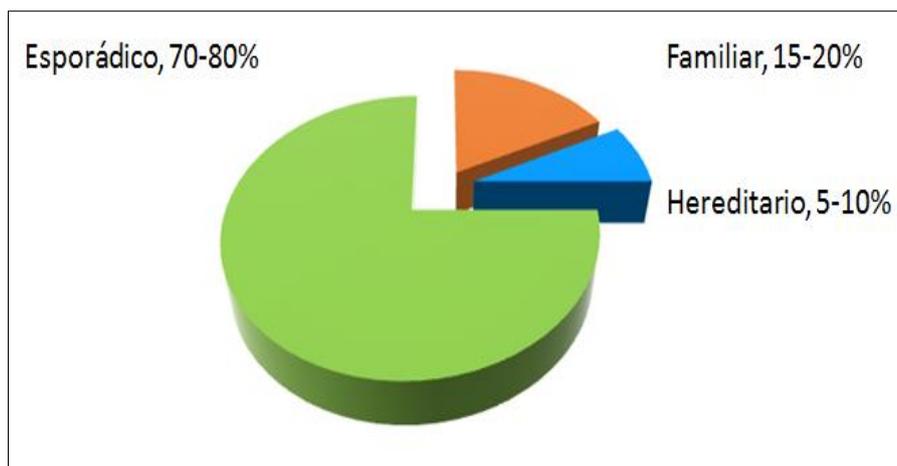


Figura 2. Gráfico donde se muestra el porcentaje de casos de cada uno de los tipos de CM atendiendo a la implicación de factores genéticos.

CONTRIBUCIÓN GENÉTICA EN EL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO

El CMH puede ser explicado, en un 15% de los casos, por mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, localizados en los cromosomas 17 y 13 respectivamente (14). Siendo más frecuentes las mutaciones en *BRCA1* (MIM#113705) que el gen *BRCA2* (MIM#600185). Pero, a fecha de hoy, no todos los casos de CMH pueden explicarse por la presencia de mutaciones en alguno de estos dos genes (85 %), sino que existen muchos más genes implicados en su susceptibilidad (Figura 3).

Se denomina penetrancia de una mutación a la probabilidad de que el portador de dicha mutación exprese el fenotipo asociado. Se han establecido tres categorías de genes de susceptibilidad en función del riesgo que confieren:

1. **Genes de alta penetrancia:** Estos genes confieren alto riesgo relativo de cáncer (mayor a 5%). Las alteraciones genéticas en *BRCA1* y *BRCA2* se asocian con la mayor proporción de cáncer de mama y/u ovario hereditario (CMOH) explicando un 15% de los casos (14). Existen otros genes asociados a patologías hereditarias poco frecuentes que también predisponen al aumento de riesgo a desarrollar CMH, aunque en menor medida: genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* (Síndrome de Lynch), *PTEN* (Síndrome de Cowden), *TP53* (Síndrome de Li-Fraumeni), *SKT11* (Síndrome de Peutz-Jeghers), *ATM* (Ataxia Telangiectasia) o el gen *CDH1* (Cáncer gástrico).
2. **Genes de moderada penetrancia:** Genes identificados mediante estudios de genes candidatos, tanto por su participación en las mismas vías de reparación del ADN como por su interacción con los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Entre ellos se han identificados *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51C* y *RAD51D*. Son alelos poco frecuentes (frecuencia <1%), y que confieren riesgo moderado a padecer la enfermedad (entre el 1.5% y el 5% de riesgo relativo). Se estima que entre el 4% de los CMH pueden ser explicados por mutaciones en dichos genes (14).
3. **Genes de baja penetrancia.** Se trata de polimorfismos (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) que confieren bajo riesgo para el desarrollo de CM y que son relativamente comunes en la población general (frecuencia entre el 5% y el 50%). Han sido identificados mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS). En población europea se han identificado más de 41 *loci* de susceptibilidad al CM que podrían explicar más del 9% de la heredabilidad de la enfermedad (17). Algunos de los *loci* asociados al CM que han sido identificados

INTRODUCCIÓN

son *MAP3K1*, *LSP1*, *TNRC9*, *FGFR2* y *CASP8*. Mutaciones en los genes de baja penetrancia explicarían entre el 5% y el 8% de los casos de CMH.

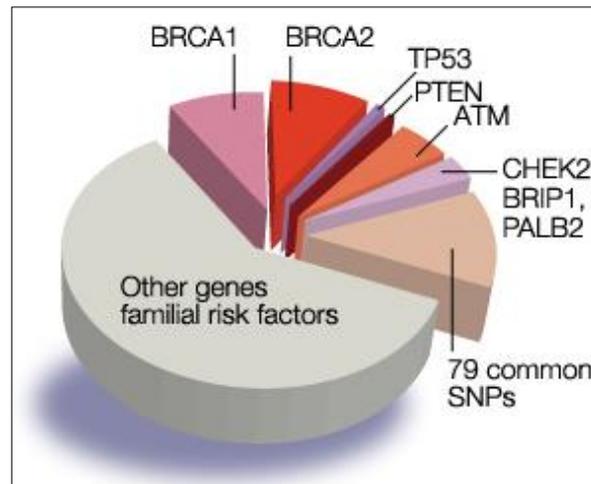


Figura 3. Contribución de genes al CMH.
(discoverysedge.mayo.edu/2015/10/07/breast-cancer-predicting-individual-risk/)

DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN FAMILIAS CON SOSPECHA DE CÁNCER HEREDITARIO

La identificación de los individuos en situación de riesgo de padecer un síndrome hereditario es fundamental para disminuir la morbilidad/mortalidad de CMH. La identificación de estos pacientes, y el diagnóstico genético de este tipo de síndromes, ha de realizarse siempre en el contexto de una unidad de consejo genético.

La base principal para llegar al diagnóstico de un síndrome de predisposición hereditaria al cáncer es la recogida de una completa historia familiar (18). El objetivo es identificar las siguientes características que sugieren un síndrome de predisposición hereditaria al cáncer: edad precoz al diagnóstico, múltiples familiares afectados del mismo tipo de cáncer o asociados entre ellos, transmisión vertical de la enfermedad, presencia de otras anomalías benignas o malignas que se engloban dentro de un síndrome conocido. La identificación de familias con síndromes de predisposición al CM es clínicamente relevante, ya que el riesgo de sus miembros para desarrollar cáncer es muy elevado (familias de alto riesgo)(19). Actualmente existen programas que nos permiten la identificación de los portadores de riesgo basados en el cálculo de la probabilidad de ser portador de una mutación concreta en un determinado gen.

Sin una adecuada historia familiar, muchos síndromes de este tipo pueden no ser identificados y ser catalogados como casos esporádicos. La historia familiar (*pedigree*) es sin duda la herramienta más eficaz para determinar la probabilidad de que una determinada familia tenga alto riesgo de desarrollar CM, ya que en ella podemos identificar las características típicas de los síndromes hereditarios. Cuando una familia cumple los criterios clínicos de sospecha de un síndrome hereditario (familia de alto riesgo) se procede a la realización del análisis genético en el probando (Figura 4).

INTRODUCCIÓN

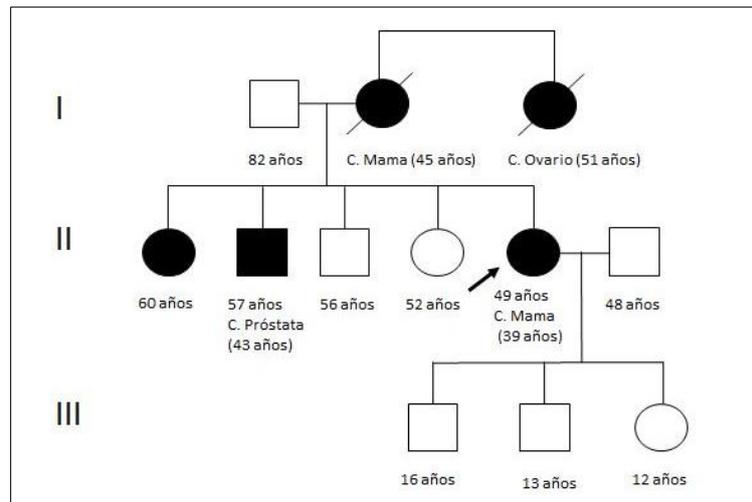


Figura 4. Pedigree de una familia con un patrón de herencia autosómico dominante. Se marca con una flecha el individuo probando.

En general, suele escogerse como probando, o caso índice, a la persona afecta con mayor probabilidad de ser portador y a ser posible, el de mayor afectación y menor edad al diagnóstico:

Tras la realización del análisis se pueden obtener tres tipos de resultados:

1. **Resultado positivo:** Un resultado es positivo cuando tras el análisis molecular se identifica la mutación causal.
2. **Resultado no informativo:** Cuando no se detecta ninguna mutación o cuando se identifica una variante genética cuya implicación en el desarrollo de la enfermedad no está claro. En este caso, no se puede ofrecer test genético predictivo a los familiares.
3. **Resultado verdadero negativo:** Este resultado es consecuencia de la no detección de una mutación previamente identificada en la familia.

TECNOLOGÍA NGS

Recientemente, la secuenciación ha sufrido un gran avance. A pesar de los grandes logros obtenidos mediante el método capilar de Sanger (Secuenciadores de primera generación) y su imprescindible papel durante los últimos 30 años de era genómica, en los últimos años está siendo relevado por los procedimientos denominados de “nueva generación” (NGS). En el año 2005 nacen los secuenciadores de segunda generación, cuyo potencial radica en la realización de múltiples copias clonales en paralelo y al azar de fragmentos 200-300pb que luego son secuenciados mediante distintas tecnologías. Se denomina librería de ADN o genoteca a este conjunto de fragmentos de ADN que contienen secuencias concretas que han sido copiadas clonalmente.

Existen diferentes tipos de plataformas de secuenciación masiva que difieren en sus configuraciones internas y en la química del proceso de secuenciación, capacidad, tamaño lecturas y tiempo. La mayoría de los métodos de secuenciación utilizan una clonación enzimática *in vitro* para producir muchas copias de cada molécula individual, que posteriormente son secuenciadas mediante: Pirosecuenciación (*Roche 454*) ligación (*Solid*), PCR puente y fluorescencia (*Illumina*) o cambios de *pH* (*Ion Torrent*). Estas tecnologías sacrifican la longitud de los fragmentos secuenciados (*reads* de menor tamaño) con el fin de generar una mayor cantidad de lecturas del genoma, que permiten obtener un resultado más sólido, a precios más asequibles y en un menor período de tiempo (20). Estas secuencias requieren el empleo de potentes

INTRODUCCIÓN

herramientas bioinformáticas para su ensamblaje y posterior análisis. Las aplicaciones que está teniendo la secuenciación masiva son la secuenciación completa de genomas (GWAS), la secuenciación de exomas (WES: *Whole Exome Sequencing*), la secuenciación de determinadas regiones (*Targeted Resequencing*), la identificación de marcas epigenéticas y los estudios de transcriptomas de tipos celulares, tejidos u órganos (21).

VENTAJAS

1. Permite abordar el estudio de múltiples genes por tiempo similar al que se empleaba en estudiar uno o dos genes por otras metodologías clásicas (Secuenciación Sanger). Admite chips de distinta capacidad, como los chip 316 y 318 de *Ion Torrent* que tienen una capacidad de 1 y 4-6 millones de *reads*, respectivamente. Esto permite flexibilizar la productividad del trabajo adaptando el número de lecturas al estudio requerido, optimizando así la utilización y coste de fungibles.
2. Permite la utilización de paneles de genes *customizables* (*Target Resequencing*) que se pueden diseñar específicamente atendiendo a los genes implicados en la enfermedad hereditaria a diagnosticar.
3. Supera el enfoque de los *microarrays*, al no estar limitada a mutaciones conocidas de una población concreta.
4. Ofrece la mejor relación coste/beneficio en el diagnóstico de enfermedades de origen genético-hereditario.

LIMITACIONES

1. La interpretación de los resultados está limitada por la información disponible en la actualidad. En un futuro es posible una mejor interpretación a medida que aumentan los datos y el conocimiento sobre genética humana y enfermedades específicas.
2. Uno de los principales problemas que presenta la NGS es el complejo procesamiento de datos que requiere (alineamiento, ensamblaje, anotación e interpretación) para poder transferir los resultados obtenidos al diagnóstico del paciente. Además, para llevar a cabo el análisis clínico las muestras de ADN deben de estar en muy buen estado. Otro de los inconvenientes que presenta son los errores de lectura por un mal alineamiento de las secuencias y errores en las regiones con homopolímeros, que pueden dar lugar a los falsos positivos y falsos negativos. Esto hace que sea, hoy en día, imprescindible la comprobación de las variantes identificadas.

La tecnología que utilizaremos en este Trabajo Fin de Máster es la tecnología *Ion Torrent*. La base de la secuenciación en este caso es la variación de *pH* que se produce en el medio cada vez que se une enzimáticamente un nucleótido. La plataforma *Ion Torrent* es la tecnología de alto rendimiento más utilizada en el sector de la genética clínica, debido a su alta velocidad, precisión, simplicidad del sistema para el análisis de resultados.

IMPACTO CLÍNICO DE LA TECNOLOGÍA NGS EN EL CONSEJO GENÉTICO

La estrategia tradicional de diagnóstico de enfermedades hereditarias heterogéneas consiste en iniciar el estudio del gen más frecuentemente mutado asociado a la enfermedad mediante secuenciación capilar o Sanger. Si se detecta la variante patológica, se confirma el diagnóstico molecular. Si no es así, se continúa

INTRODUCCIÓN

con la secuenciación de los genes más frecuentemente mutados hasta detectar o no la mutación causal, y por tanto el gen asociado. Este protocolo de actuación requiere mucho tiempo y un elevado coste dado el gran número de estudios que se tienen que realizar.

Los avances en NGS y su aplicación en diagnóstico clínico están permitiendo el estudio simultáneo de más de un gen asociados a la misma patología o incluso del genoma completo del individuo a un coste cercano al de la secuenciación capilar. Además estas tecnologías, gracias al multiplexado de muestras, nos dan la capacidad de analizar más de un paciente al mismo tiempo, lo que se traduce en un ahorro muy importante tanto en tiempo como en costes del análisis molecular.

La evolución de las tecnologías de secuenciación también conlleva grandes avances en otros campos, como es el caso de la farmacología. Diversos estudios demuestran que se puede diseñar un tratamiento médico individualizado atendiendo a las dianas terapéuticas asociadas con cada tipo de cáncer (20).

El resultado de los test genéticos en enfermedades hereditarias en general, y en cáncer hereditario en concreto, tienen un impacto psicológico muy importante en las familias. El hecho de poder analizar muchos genes simultáneamente aumenta la probabilidad de detectar pacientes portadores de mutaciones que expliquen los fenotipos clínicos de los pacientes. Esto, unido a la reducción de los tiempos y los costes, resulta fundamental para hacer un consejo genético eficaz y eficiente que va a permitir:

1. Mejorar la estimación del riesgo asociado de desarrollar la enfermedad tanto del paciente como de la familia.
2. Adecuar las estrategias de seguimiento y de reducción del riesgo para la enfermedad mediante detección precoz de la misma.
3. Establecer el tratamiento más adecuado, ya que existen terapias que funcionan mejor dependiendo de la mutación que porte el paciente.

PANEL HC-GEN TEST

Mediante el panel HC-Gen TEST, un panel de secuenciación NGS dirigida basado en metodología de captura y patentado por AC-Gen Reading Life S.L. Este diseño permite analizar de forma simultánea 37 genes y 89 SNP asociados relacionados con la susceptibilidad a padecer cáncer de mama hereditario mediante *Targeted Exome Sequencing* (TES). La composición de este panel se detalla en el Material y Métodos de este trabajo.

Las alteraciones genéticas detectadas por este panel pueden conferir un riesgo entre el 25-80% de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida y, como ya hemos mencionado con anterioridad, algunos de estos genes también se asocian con un mayor riesgo de padecer otros tipos de cánceres. La sensibilidad del método de análisis es del 96-99% para las mutaciones descritas hasta la fecha.

Los SNP son variantes de ADN que afectan a un solo nucleótido y cuya frecuencia en la población es elevada. Diferentes estudios GWAS han descrito 89 SNP que incrementan levemente el riesgo a padecer cáncer de mama hereditario. De forma individual, cada SNP detectado incrementa como mucho un 10% el riesgo a padecer cáncer de mama. El riesgo vital de CM en la población es de aproximadamente el 7%, por lo que la presencia de alelos como los detectados lo eleva de forma individual al 7,7%. Actualmente no existe una herramienta que agrupe en un solo dato el riesgo conjunto inferido por estas variantes.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El diagnóstico precoz de personas con alto riesgo de CMH es fundamental para disminuir la mortalidad de esta enfermedad. La identificación de pacientes de alto riesgo y el diagnóstico genético ha de hacerse en el contexto de una unidad de consejo genético. La herramienta principal para la identificación de familias de alto riesgo es la obtención de una historia familiar completa, lo cual nos permite realizar una contextualización clínica de las familias dentro de un síndrome hereditario, y con ello determinar el test genético más idóneo.

Este Trabajo Fin de Máster muestra un ejemplo del gran potencial y aplicabilidad de las tecnologías NGS en el campo de la biomedicina, concretamente en la genética clínica. Para ello exponemos un caso clínico atípico de CMH abordado mediante la utilización de estas tecnologías. El abordaje de este estudio se realiza a partir de sangre en papel de una paciente fallecida, lo que hace a este proyecto original y genuino, ya que no se ha descrito hasta la fecha ninguna aproximación similar en estudios de cáncer hereditario utilizando la plataforma *Ion Torrent* (PGM).

Los objetivos que se persiguen en este Trabajo de Fin de Máster son los siguientes:

1. Estudio genético molecular mediante tecnología NGS *Ion Torrent* de una paciente fallecida con historia familiar de CMH, *BRCA1* y *BRCA2* negativo de la que no se dispone de ADN ni de sangre ni saliva almacenada.
2. Optimización de los protocolos de extracción de ADN a partir de tarjetas FTA con sangre seca y adaptación de los protocolos de secuenciación masiva *Ion Torrent* a este tipo de muestras.
3. Secuenciación masiva mediante la realización del panel de genes HC-Gen Test constituido por 37 genes y 89 SNP asociados al CMH (AC-Gen Reading Life S.L.).
4. Identificación de variantes genéticas en los genes de susceptibilidad al CMH analizados que expliquen el fenotipo clínico de la paciente y su historia familiar.
5. Confirmación mediante tecnologías clásicas de secuenciación de todas las variantes detectadas con potencial efecto patológico que permitan validar la utilización del HC-Gen Test y de tecnología NGS a partir de sangre seca en papel.
6. Ofrecer la posibilidad de realizar test genéticos en familias con enfermedades hereditarias con algún miembro afecto fallecido mediante la utilización de tarjetas FTA® para proporcionar medidas preventivas y/o de diagnóstico precoz individualizado que eviten la aparición de la enfermedad y que al menos faciliten su identificación en un estadio potencialmente curable.

MATERIAL Y MÉTODOS

ORIGEN DE LA MUESTRA E HISTORIA CLÍNICA DE LA PACIENTE.

Se realizó el estudio de una paciente, mujer de 58 años fallecida como consecuencia de un cáncer de mama, con historia familiar de cáncer de mama *BRCA1* y *BRCA2* negativos (Figura 5). La familia quería hacerse un estudio, dado que la hija estaba sufriendo un tumor en mama altamente invasivo, y el caso índice más adecuado era la madre fallecida. La muestra de partida, en este caso, no fue la habitual (sangre o saliva), ya que al encontrarse la paciente fallecida, no se disponía de este tipo de muestras. Tampoco se disponía de ADN almacenado de anteriores estudios en biobanco, tan solo se disponía de una tarjeta impregnada en sangre.

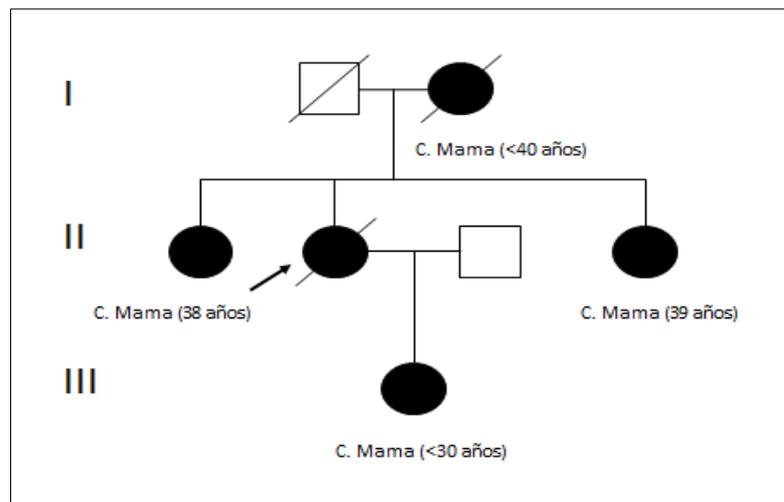


Figura 5. Pedigree de la familia en estudio. Se indica con una flecha la paciente probando, mujer fallecida de 58 años con historia familiar de CM. Hermana con CM bilateral a los 38 años; hermana con CM a los 39 años; madre con CM antes de los 40 años. Su hija menor de 30 años ha desarrollado CM.

El estudio genético molecular se realizó a partir de ADN obtenido de sangre en Tarjeta FTA™ WHATMAN® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. USA). La muestra de partida cumplió todas las exigencias de protección de datos personales que se establecen en el consentimiento informado vinculado al estudio genético (Anexo I) y que firmó la familia de la paciente antes de iniciarse el estudio.

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE EN PAPEL

La extracción de ADN se realizó con el *Danagene Blood Kit* (DanaGen-BioTed S.L., Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del fabricante e incluyendo algunas modificaciones para este tipo de muestra. Las modificaciones no se reflejan en este apartado de Material y Métodos ya que es propiedad de AC-Gen Reading Life S.L.

El protocolo consta de los siguientes pasos:

1. **Lisis celular:** Consiste en una lisis selectiva de eritrocitos seguida de una lisis celular.
2. **Precipitación:**
 - a. Precipitación de proteínas mediante precipitación salina.
 - b. Precipitación de ADN genómico mediante isopropanol.
3. **Lavado:** con Etanol al 70%.
4. **Hidratación:** del ADN obtenido con agua nucleasa *free*.

VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ADN Y CUANTIFICACIÓN

Tras la extracción de ADN, se llevó a cabo un control de calidad del mismo que consistió en cuantificar la concentración y comprobar la integridad de la muestra. De este modo, nos asegurábamos que la muestra de ADN de partida cumplía con los requisitos mínimos para la creación de la librería. Los parámetros mínimos que debía tener la muestra son: 250ng totales.

La concentración del ADN genómico se determinó mediante *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* con el fluorómetro *Qubit® 2.0* (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA) mientras que para valorar la integridad se realizó una electroforesis de muestra en un gel de agarosa 2% *E-Gel™ SizeSelect™* (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA) utilizando *E-Gel™ iBase™ Power System* y *50bp DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA) como marcador de peso molecular.



Figura 6: Métodos utilizados para cuantificación y valoración de integridad del ADN. A) Gel 2% agarosa y equipo E-gel iBase Power System. B) Equipo Qubit 2.0 y recta patrón de los *standars*.

PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS

La creación de la librería se basó en una captura con sondas de los 37 genes y 89SNPs utilizando el diseño *HC-Gen Test kit* patentado por AC-Gen Reading Life S.L. con el nombre comercial de HC-Gen Test. Los genes analizados en este panel se encuentran en el Anexo II de este trabajo. Al igual que en apartados anteriores no ha sido posible detallar el protocolo desarrollado, ya que tiene una patente empresarial, pero a grandes rasgos los pasos a seguir fueron los siguientes (Figura 7):

1. **Fragmentación:** el ADN genómico se fragmenta al azar mediante 16 enzimas de restricción.
2. **Hibridación:** la selección de las regiones de interés se produce mediante hibridación de sondas complementarias, las cuales llevan intercaladas dentro de su secuencia: biotina, una secuencia *barcode* compatible con el sistema *Ion Torrent* y la secuencia del primer de amplificación.
3. **Captura:** la biotinización de las sondas va a permitir su unión con *beads* magnéticas, al contener estas estreptavidina en superficie. Esta unión se realizará solo para los fragmentos capturados, lo que permitirá obtener la genoteca o librería de las regiones de interés.

4. **Enriquecimiento:** mediante una PCR con *primers* universales compatibles con la secuencia insertada en la sonda, se enriquece la librería con las regiones *target*.



Figura 7. Esquema de pasos para la realización de la librería. (Modificado de <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pagelId=3061>)

Tras la obtención de la librería enriquecida, resulta fundamental su purificación para eliminar posibles interferencias en el proceso de secuenciación: exceso de *primers* y dNTPs. Para ello, se realizó una purificación mediante la utilización de esferas magnéticas *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter, Brea, CA. USA). Este método se basa en la unión reversible del ADN a unas esferas sólidas magnéticas mediante un *buffer* selectivo. El protocolo consta de 4 sencillas y rápidas etapas que se muestran en la Figura 8:

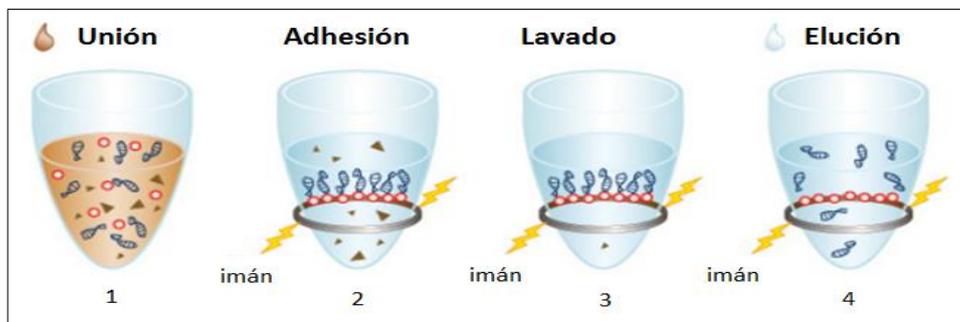


Figura 8. Etapas de la purificación. 1) La unión selectiva del ADN que forma la librería a las esferas magnéticas. 2) Adhesión de las esferas magnéticas a la pared del tubo gracias al imán. 3) Lavado con etanol (70%) para eliminar los contaminantes. 4) Elución de la librería en Low TE *buffer*.

CUANTIFICACIÓN DE LIBRERÍAS:

En NGS resulta crítico, antes de preparar la librería para su secuenciación, determinar la concentración de la misma. Para ello, se cuantificó con el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer* y el *Agilent High Sensitivity DNA Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA) la concentración de la librería creada. Este método de cuantificación consiste en un sistema de microelectroforesis capilar en chip, donde 1 μ L de librería se separa en función de su peso molecular (un único fragmento o varios fragmentos dependiendo de las características de la librería, en nuestro caso fragmentos de entre 200-500pb). La electroforesis se visualiza por la emisión de fluorescencia, la cual se mide y se transforma en un electroferograma mediante

integración de datos con respecto a un patrón de referencia o *ladder*, esto nos proporciona unos valores de concentración y tamaño del fragmento. La cuantificación y asignación de tamaño se realizaron con el propio *software* del equipo (Figura 9).

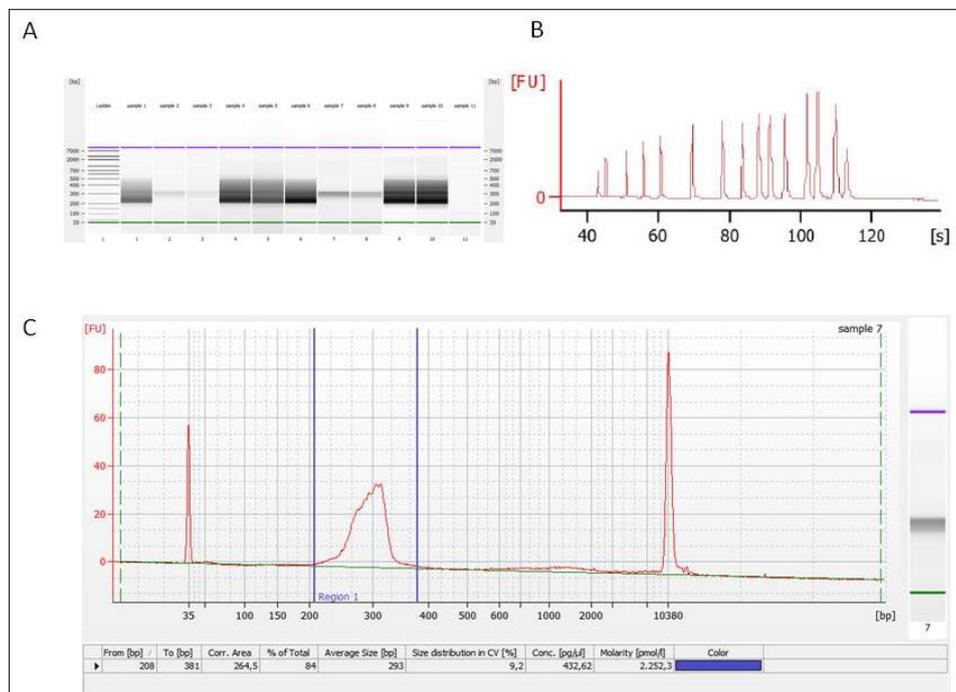


Figura 9. Cuantificación de librerías. A) Gel de librerías obtenido en *Bionalyzer* utilizando el *Agilent High Sensitivity DNA Kit*. B) Electroferograma del *ladder* de 1000pb utilizado como referencia. C) Ejemplo de electroferograma y obtención de las medidas de concentración de la librería (250-300pb) con el *software* del equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

PREPARACIÓN DE LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN EN *ION TORRENT*

La plataforma *Ion Torrent™ Personal Genome Machine®* (PGM) se basa en la tecnología de semiconductores que consiste en chips con sensores de voltaje en cada pocillo que detectan los hidrógenos liberados cada vez que un nucleótido se une a la cadena de ADN que se está formando. Pero antes de cargar las muestras en el chip la librería tuvo que sufrir una preparación que constó de los siguientes pasos:

1. **PCR en emulsión** La PCR en emulsión se realizó mediante la utilización del *Ion OneTouch Machine* y el *Ion PGM Template OT2 200 Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA) según el protocolo del fabricante con algunas modificaciones propiedad de Ac-Gen Reading Life S.L. A partir de la librería se realiza una PCR en emulsión dónde se realizan copias clonales de una única cadena de ADN en la superficie de microesferas denominadas *Ion Sphere Particles* (ISPs). De esta manera, en cada una de las micelas que se formen se encuentra una ISPs amplificando monoclonalmente un fragmento de ADN. Cuando en una misma ISP se amplifica más de un fragmento se habla de ISPs policlonales. Tras este proceso es necesario la realización de un control de calidad con el *Ion Sphere Quality Control Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA). Este *kit* permite medir el porcentaje de ISPs que han sido amplificadas mediante un proceso basado en hibridación de sondas fluorescentes. La fluorescencia de estas sondas se cuantifica con el fluorómetro *Qubit® 2.0* (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA) utilizando su aplicación específica para ION. Esta fluorescencia se transforma en valores de calidad (%) tras una conversión específica incluida en el protocolo del *Ion Sphere Quality Control Kit*. El rango óptimo del control de calidad oscila entre el 10-30% de las ISPs amplificadas.

2. **Enriquecimiento de secuencias:** Como en toda PCR, se realizó una purificación del producto antes de su secuenciación. Esta purificación consistió en un enriquecimiento de todas las ISPs positivas, es decir, todas aquellas que amplificaron sobre su superficie en la PCR en emulsión (10-30%). Este enriquecimiento se realizó mediante la utilización de *beads* magnéticas con Streptavidina en superficie según el protocolo del fabricante para *Ion PGM Template OT2 200 Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA). Las ISPs positivas se unen a la superficie de las *beads* magnéticas y se lavan con diferentes reactivos mientras son inmovilizadas con un imán. Finalmente las ISPs son eluidas de la superficie de las *beads* magnéticas hasta obtener la librería enriquecida y lista para su secuenciación.

3. **Carga del Chip y secuenciación:** Una vez enriquecida la muestra se procedió a la preparación de la reacción de secuenciación con el *Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA) según protocolo del fabricante. La reacción de secuenciación se cargó en el *Ion Chip 316* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA) donde las ISP enriquecidas y listas para ser amplificadas caerían al azar en una matriz de pocillos (Figura 10). El porcentaje de pocillos de la matriz que contenían una ISP nos indicarían la densidad de carga del chip. El número de lecturas depende directamente de este porcentaje de carga, ya que solo se leerán secuencias en los pocillos cargados. Mediante lavados con diferentes *buffers* y la adicción de los diferentes *dNTPs* en los ciclos de secuenciación, el equipo detecta las variaciones de *pH* que se producen en cada pocillo (ya que solo varía el *pH* si la polimerasa añade el *dNTP* complementario a la secuencia). La secuenciación del chip permitirá obtener alrededor de 2-3 millones de secuencias, y 300-Mb a 1Gb de datos en un periodo de tiempo de entre 3-5 horas.

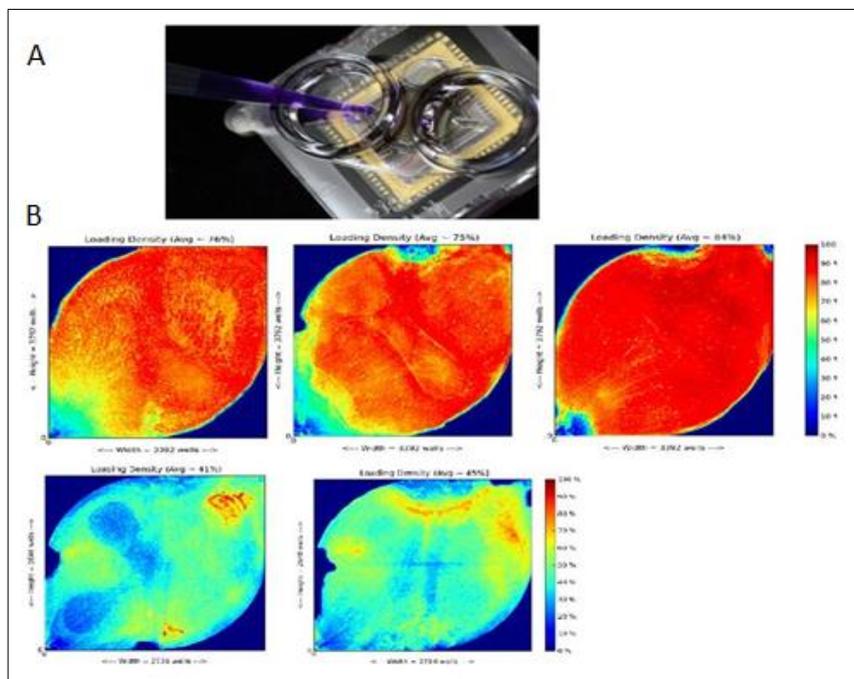


Figura 10. Carga del chip. A) Estructura de un Ion chip 316 y realización de la carga del mismo con la librería. B) Imágenes generadas por el PGM de diferentes chips según su porcentaje de carga. A mayor tono naranja mayor es el porcentaje de carga y por tanto el número de secuencias que se va a obtener.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis de resultados del PGM se realiza mediante el *Torrent Suit Software* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a través de su *interface Torrent Browser*. Con este *interface* podemos planificar, monitorizar y revisar los resultados del *run* de secuenciación, además de exportar los datos en el formato más adecuado (Figura 11).

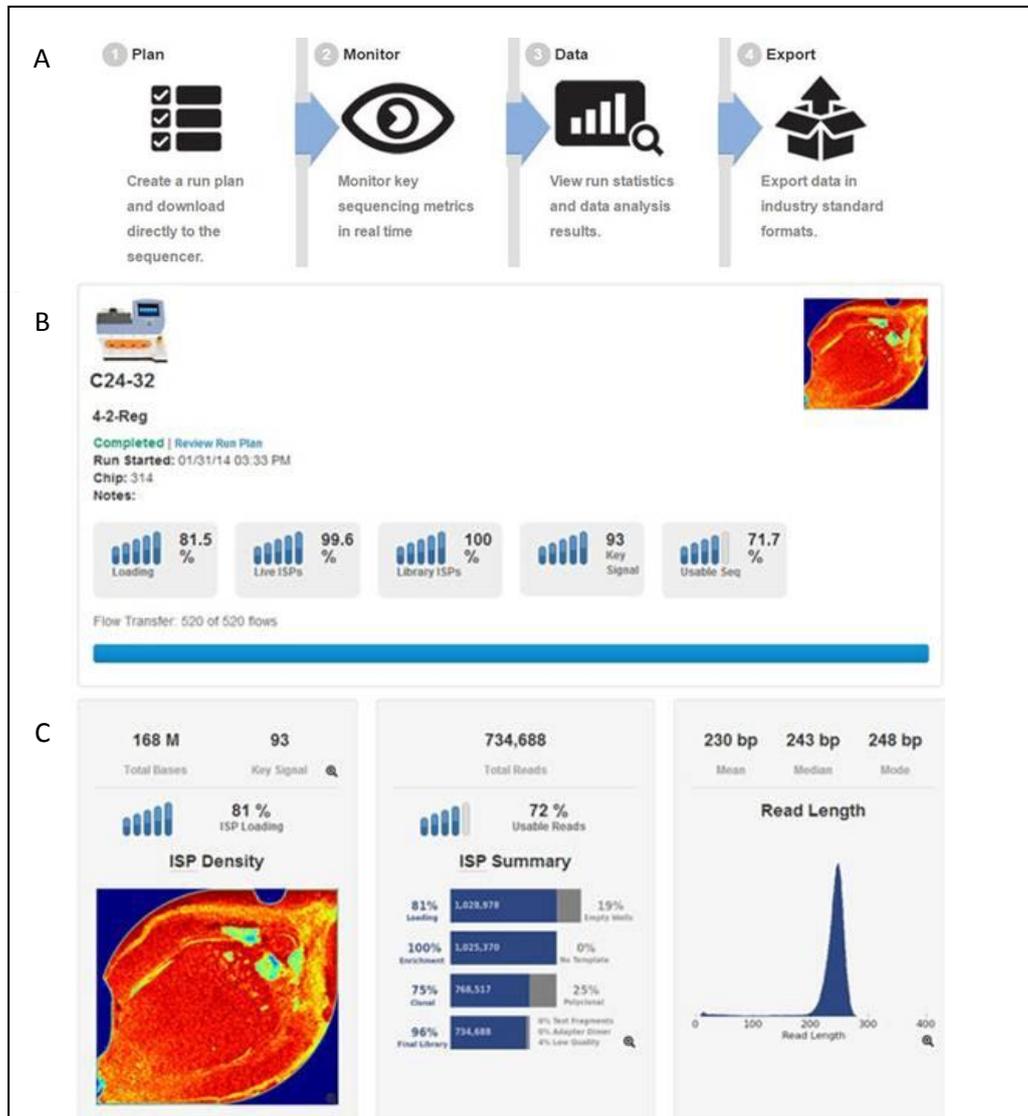


Figura 11. Esquema explicativo de la estructura de Torrent Suit. A) Funciones que permite hacer el Torrent Suit Software a través de su interface Torrent Browser. B) Imagen de los datos que se pueden ver a tiempo real de la carrera del *Ion Torrent*. C) Impresión de pantalla de los datos que se pueden analizar tras la carrera.

Una vez obtenidas las secuencias, el *Torrent Suit* permite realizar su alineamiento con su genoma de referencia (en nuestro caso genoma humano, hg19), lo que permitirá determinar la cobertura en cada una de las bases secuenciadas (*coverage* o veces que se lee una base). El mínimo de cobertura por base requerida es de 100X. Una vez realizado el alineamiento ya se puede proceder a la llamada de variantes detectadas en las secuencias (*Variant calling*). El análisis se completa mediante la utilización del *Ion Reporter Software* (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA. USA), una aplicación integrada dentro de la *Thermo Fisher Cloud* que proporciona un conjunto optimizado de herramientas personalizables y sencillas de análisis de datos que nos permitirán conocer su significado biológico de cada una de las variantes (Figura 12). Este *software*, lo que proporciona flexibilidad y una gestión de datos centralizada y segura.

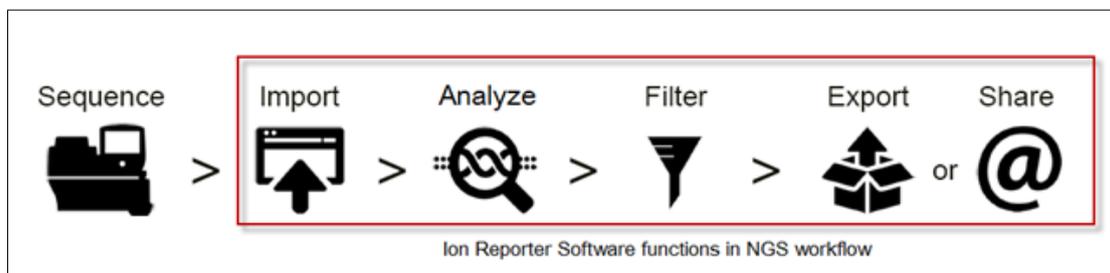


Figura 12. Flujo de trabajo para el análisis de resultados del PGM utilizando el Ion Reporter.

El análisis de los datos asociados a las variantes detectadas y su anotación provienen de la consulta simultánea de más de 20 bases de datos públicas proporcionándonos datos del tipo: posición genómica, genotipo de referencia, nucleótido de referencia, gen, localización en el gen, frecuencia poblacional del cambio, transcrito de referencia (NM_), nombre del cambio según HGVS (22) predicciones *in silico* de patogenicidad (Polyphen, SIFT, Grantham) (23) frecuencia del alelo mayor, frecuencia del alelo menor, su inclusión como UCSC Common SNPs, grado de patogenicidad según *ClinVar* (24) cobertura y heterocigosidad de la variante en la muestra. Toda esta información nos va a permitir rápidamente centrarnos en las variantes de interés mediante un fácil filtrado de los datos. Resultarán de interés todas aquellas variantes codificantes y no codificantes (localizadas en 10pb *upstream* o *downstream* de la región de unión exón-intrón), con baja frecuencia en la población general, predicciones *in silico* con *scores* que comprometan su neutralidad, descritas como patógenas o no descritas en las bases de datos y con una cobertura siempre mayor de 100X.

VALIDACIÓN DE LAS VARIANTES DETECTADAS

PCR CONVENCIONAL

A partir del ADN genómico extraído de la paciente se procedió a la amplificación y posterior secuenciación mediante la tecnología Sanger de las mutaciones c.68-7delT *BRCA2* y c.1565+1G>A *CDH1* para su validación mediante una tecnología alternativa. Los primers utilizados se diseñaron utilizando el programa Primer3 (v.0.4.0)(25). En ambos casos se amplifica la muestra del probando y un control negativo (blanco de PCR, en el que se añade H₂O en lugar de ADN) para verificar que no hay contaminación. Las condiciones de amplificación se indican en la Figura 13. La polimerasa utilizada fue Perpetual Opti Taq (Eurx, Gdansk. Poland) y el termociclador usado fue Verity 96 Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA).

Después de la PCR se comprueba si el tamaño del fragmento es el correcto cargando 5µL de la PCR en un gel de agarosa 2% *E-Gel™ SizeSelect™* (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA) y 5µL del marcador de peso molecular *50bp DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA). Para verificar que no existe contaminación en la PCR el control negativo se analiza con el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer* y el *Agilent High Sensitivity DNA Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA).

A) Exón 3 del gen <i>BRCA2</i>						B) Exón 10 del gen <i>CDH1</i>					
Exón	Primer	Secuencia 5' → 3'	nt	Tamaño fragmento	Tm	Exón	Primer	Secuencia 5' → 3'	nt	Tamaño fragmento	Tm
3	<i>BRCA2-3Fw</i>	TGCCGTAACAAAAGTAATCCATAGTC	26	495	54	10	<i>CDH1-10Fw</i>	TCACAGCCTACACTGCCAG	20	227	62
	<i>BRCA2-3Rv</i>	GGCCAGAGAGACTGAGTTGC	20				<i>CDH1-10Rv</i>	GAAGGGAAGGGAATAGGTGA	20		
Reactivo			Volumen añadido (µl)	Concentraciones finales		Reactivo			Volumen añadido (µl)	Concentraciones finales	
H ₂ O			17,50	-		H ₂ O			18,75	-	
10x Buffer A			2,5	1x		10x Buffer A			2,5	1x	
MgCl ₂ (25 mM)			1	1mM		MgCl ₂ (25 mM)			1	1mM	
dNTPs 10mM			0,5	0,2mM		dNTPs 10mM			0,5	0,2mM	
DMSO 5%			1,25	5%		Primer FW (10µM)			0,5	0,2µM	
Primer FW (10µM)			0,5	0,2µM		Primer RV (10µM)			0,5	0,2µM	
Primer RV (10µM)			0,5	0,2µM		Taq polimerasa (2,5u/uL)			0,25	0,025u/µL	
Taq polimerasa (2,5u/uL)			0,25	0,025u/µL		DNA (~100ng/uL)			1	-	
DNA (~100ng/uL)			1	-		Volumen Final			25	-	
Volumen Final			25	-		Ciclos			Temperatura	Tiempo	
1			95°C	5 min		1			95°C	5 min	
35			95°C	30 s		35			95°C	30 s	
			54°C	30 s					62°C	30 s	
			72°C	1 min					72°C	1 min	
1			72°C	7 min		1			72°C	7 min	
1			12°C	∞		1			12°C	∞	

Figura 13. Protocolo de Amplificación, incluyendo primers y condiciones de PCR. A) Exón 3 del gen *BRCA2*. B) Exón 10 del gen *CDH1*.

REACCIÓN DE SECUENCIA Y SECUENCIACIÓN SANGER

Los productos de PCR obtenidos del exón 3 de *BRCA2* y exón 10 del gen *CDH1* han seguido el siguiente procesado para su secuenciación:

1. **Purificación de productos de PCR:** Antes de la reacción de secuencia se lleva a cabo una purificación enzimática siguiendo el protocolo de EXOSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA), que se compone de dos enzimas hidrolíticas, Exonucleasa I recombinante y Fosfatasa alcalina de camaron. La primera enzima degrada los enlaces los residuos monocatenarios de los primers o de cualquier otro ADN producido en la PCR, y la segunda enzima hidroliza los dNTPs restantes de la solución de PCR. Los volúmenes utilizados para esta reacción fueron: 2,15µL de producto de PCR y 0,85µL de compuesto de purificación. Los 3µL de reacción se incuban a 37°C durante 15 minutos (fase de digestión) y luego a 80°C 15 minutos (fase de incubación).
2. **Reacción de secuencia:** Previamente a la secuenciación automática se lleva a cabo una reacción de secuencia. Esta técnica se fundamenta en el método enzimático de Sanger, en el que los dideoxinucleótidos están marcados con distintos fluorocromos para permitir que el secuenciador automático pueda diferenciarlos y así determinar la secuencia de nucleótidos que constituyen el fragmento secuenciado. El *kit* utilizado fue el *BigDye terminator v.3.1. Cycle Sequencing Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA). La secuenciación se realizó tanto en sentido forward como reverse. Los reactivos y las condiciones del protocolo a seguir se resumen en la Tabla 1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos	Volumen (µL)	Condiciones de la reacción		
Primer	1	1 ciclo	Incubación	96°C - 3 min
Agua nuclease free	5,5	25 ciclos	Desnaturalización	96°C - 3 min
BigDye Terminator V3.1 Sequencing buffer 5x	2,5		Anealing	50°C - 15 s
BigDye Terminator v3.1	0.5		Extensión	60°C - 4 min

Tabla 1. Protocolo para la reacción de secuenciación con BigDye Terminator v.3.1

- 3. Electroforesis capilar:** Los productos de PCR son secuenciados utilizando el secuenciador capilar 3500 Dx Genetic (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA. USA). Este equipo permite separar fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base. Los fragmentos de PCR se inyectan automáticamente en un capilar, que utilizando como matriz el polímero POP7, viajan del cátodo al ánodo separándose por tamaño. Cuando un fragmento pasa por el láser este excita al *ddNTP* marcado que ha producido el truncamiento en la reacción de secuenciación el cual emitirá un color específico: A: verde, T: rojo, C: azul, G: negro.
- 4. Análisis de las secuencias:** El secuenciador integra los datos de fluorescencia de cada uno de los fragmentos de ADN secuenciados en un archivo formato .ab1. El análisis de las secuencias obtenidas se realiza con el *software* Staden Package (2016) que nos va a permitir el alineamiento de las secuencias contra la secuencia de referencia (NM_004360.3 para *CDH1* y NM_000059.3 para *BRCA2*) y el posterior análisis tanto en dirección *forward* como *reverse*, y así determinar la existencia de variaciones nucleotídicas en dichas secuencias. La nomenclatura de las mutaciones siempre se realiza según las recomendaciones de la HGVS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos logrado optimizar un nuevo protocolo de extracción de sangre en papel obteniendo un ADN de buena calidad (Figura 14) y buena concentración (22, ng/μL) que nos permite trabajar con ella en la preparación de librerías para la plataforma *Ion Torrent*.

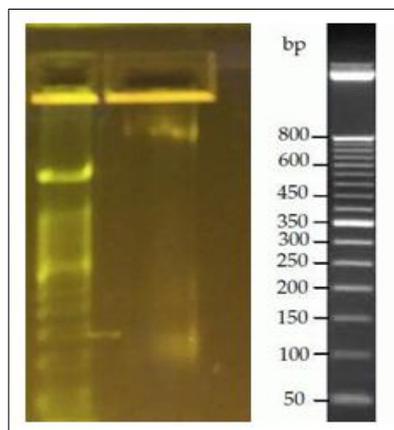


Figura 14. Integridad del ADN genómico resultante de la extracción.

Mediante la preparación de librerías con el *HC-Gen Test kit* hemos obtenido una librería con una concentración de 4112,1pM. El perfil de la librería y la concentración que mostró el análisis en *Bionalyzer* reflejaron la calidad óptima de la misma para seguir con el protocolo técnico habitual para este tipo de estudios. A pesar de que la concentración de nuestra librería se encuentra en rangos inferiores de las librerías obtenidas a partir de ADN procedente de saliva o sangre, los controles de calidad nos indicaron que era adecuada para continuar con el protocolo de secuenciación del *IonTorrent* (Figura 15).

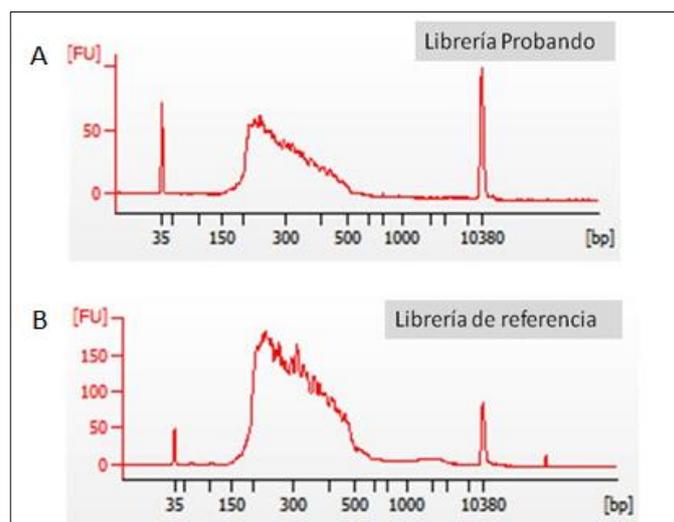


Figura 15. Electroferograma obtenido del *Bionalyzer*. A) Electroferograma de la medición de la librería de la muestra de nuestro probando, con ADN obtenido a partir de sangre en papel o tarjeta FTA. B) Librería estándar obtenida a partir de ADN estriado a partir de sangre.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de secuenciación han sido óptimos para esta muestra. Aunque, sí que es cierto, que el porcentaje de secuencias de baja calidad es mayor que en muestras realizadas a partir de sangre (>14%). Esto se debe al mayor nivel de degradación del ADN obtenido a partir de sangre en papel. El porcentaje de carga del chip ha sido del 83%, obteniéndose 3.325.519 *reads* totales (Figura 16) de las cuales 1.258.560 *reads* se corresponden con la muestra del paciente. La media de longitud de estas lecturas es de 127nt y la profundidad media de lectura ha sido de 603X. Este análisis ha superado la cobertura 100X para el 88.55% de las regiones amplificadas, y las regiones que no han sido adecuadamente cubiertas han sido igualmente analizadas no encontrando variaciones de ADN significativas.

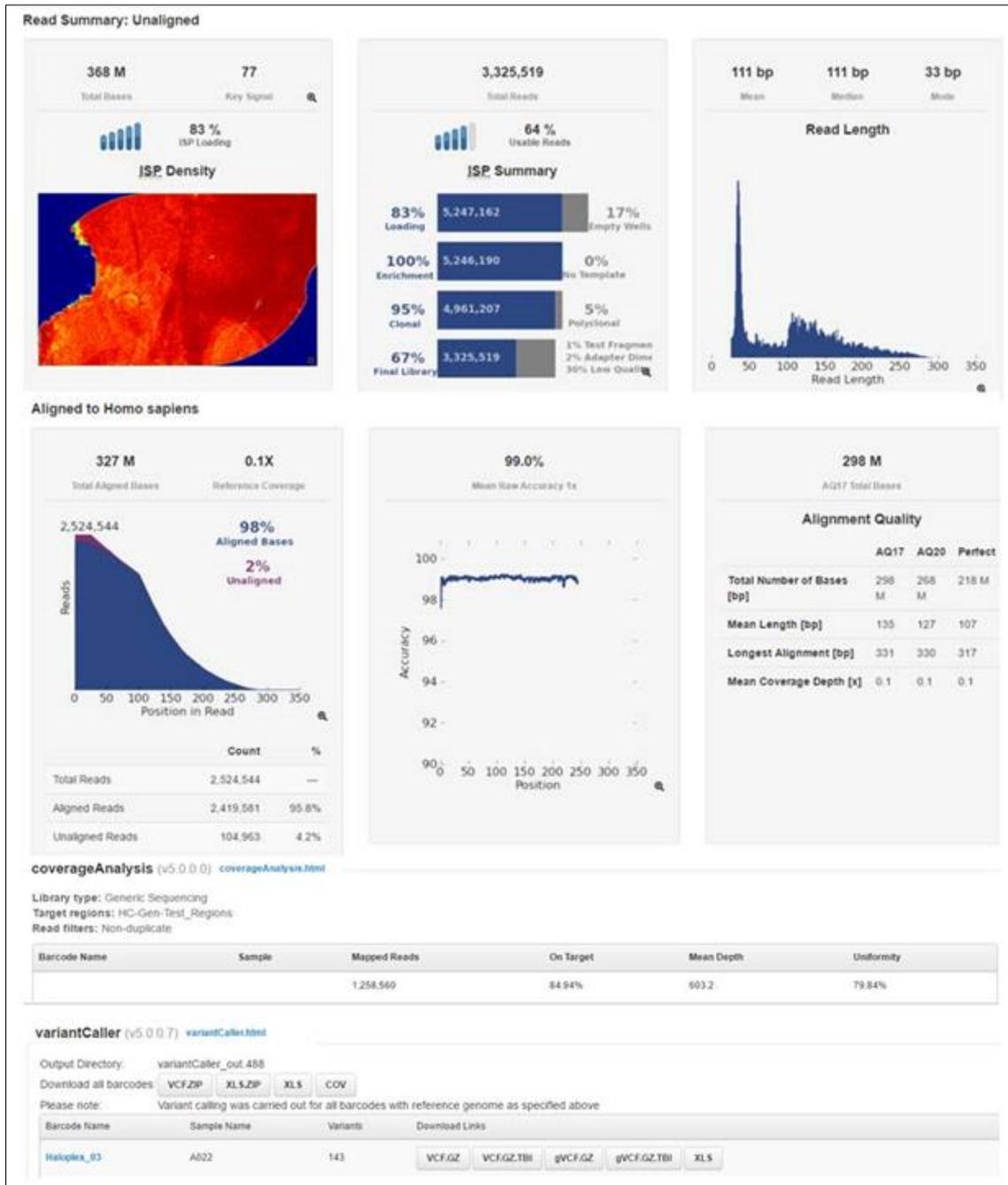


Figura 16. Resultados de la secuenciación de la muestra del paciente obtenidos en el Torren Suit.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el análisis bioinformático de los resultados con el *Ion Reporter* proporcionado por el HC-Gen Test se han detectado la presencia de 112 variantes de ADN distintas en los 37 genes de estudio. Estas variantes se filtraron según variantes de tipo común, polimorfismos o SNP y, finalmente, en función de criterios de patogenicidad. Se han detectado dos posibles alteraciones nucleotídicas con relevancia clínica (c.68-7deIT *BRCA2* y c.1565+1G>A *CDH1*, ambas en heterocigosis), 45 SNPs y 65 variantes no patógenas. Todas las variantes detectadas en el probando se reportan en los Anexos III e IV. La variante c.68-7deIT *BRCA2* cumplía criterios de posible patogenicidad con una cobertura óptima de 123X. El hecho de que se encontraba en un tracto homopolimérico de timinas y de que la paciente había sido reportada como *BRCA1/2* negativo, insinuaba que nos encontrábamos ante un falso positivo consecuencia de la tecnología utilizada. Por el contrario, la mutación en *CDH1* era susceptible de ser la responsable del fenotipo clínico de la paciente. Por este motivo confirmamos mediante PCR (Figura 17A-B) y secuenciación Sanger la presencia de ambas mutaciones antes de dar el resultado definitivo. La paciente resultó ser negativa para la mutación en *BRCA2* y positiva para la mutación en *CDH1* (Figura 17C).

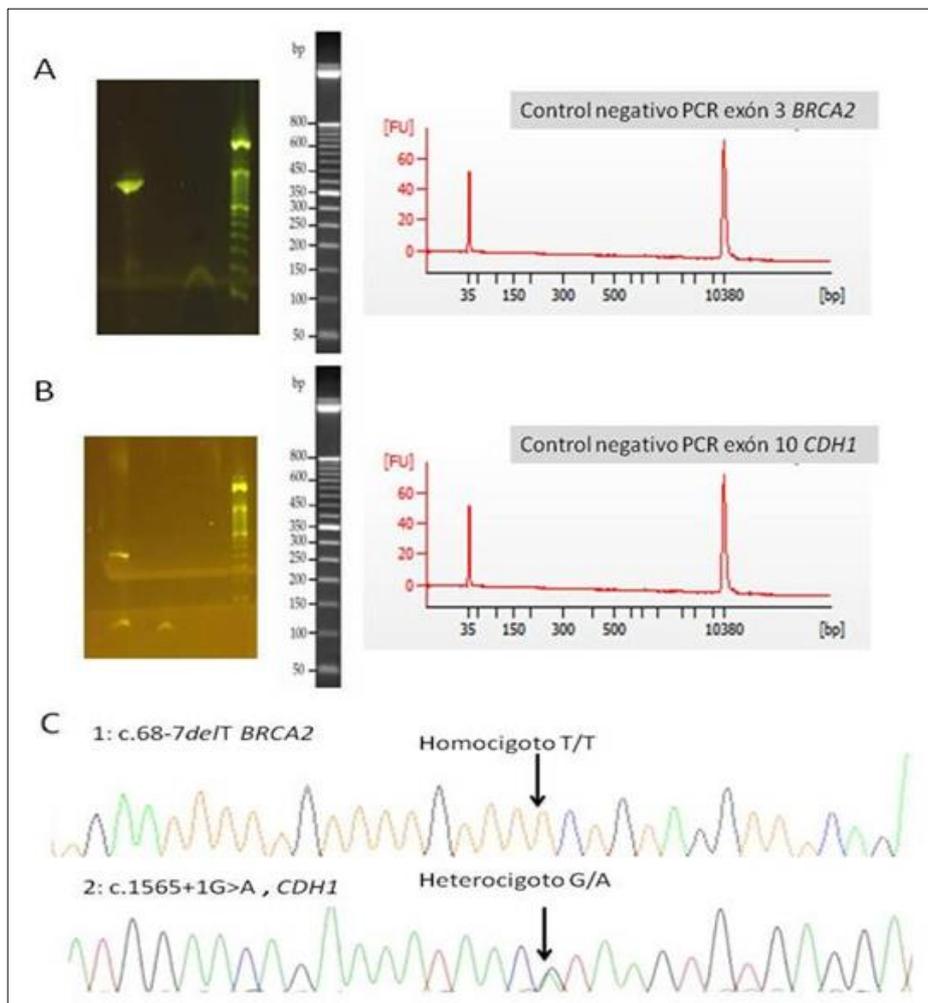


Figura 17. Validación mediante Sanger. A) Comprobación de la amplificación del exón 3 de *BRCA2* en gel de agarosa al 2% y del control negativo de PCR en el *Bionalyzer*. B) Comprobación de la amplificación del exón 3 de *BRCA2* en gel de agarosa al 2% y del control negativo de PCR en el *Bionalyzer*. C) Electroferogramas de las secuencias obtenidas según metodología Sanger. C.1): Homocigoto normal para la presunta mutación c.68-7deIT *BRCA2*. C.2) Heterocigoto para la mutación c.1565+1G>A *CDH1*.

La paciente de nuestro estudio resultó portadora de una mutación de *splicing* en heterocigosis en el gen *CDH1* (MIM#192090). Este gen se localiza en el cromosoma 16q22.1 y está constituido por 16 exones que codifican para una proteína (E-cadherina, CDH1) implicada en la adhesión y arquitectura celular. Es el principal gen de susceptibilidad a cáncer gástrico hereditario, con una herencia autosómica dominante (26). La bibliografía describe que mutaciones en este gen se asocian con tumores de origen epitelial (estómago, mama y próstata) muy invasivos de rápida progresión (27).

La mutación *c.1565+1G>A* está descrita en la bibliografía como una mutación patógena asociada a CMF del tipo lobular (28). Esta mutación se localiza 1nt aguas arriba del final del exón 10 del gen *CDH1* y su aparición afecta a un sitio *donor* del *splicing* (secuencia responsable de la correcta síntesis del ARNm). Como consecuencia de la existencia de esta variante se produce una alteración de la secuencia final de la proteína, originando una proteína disfuncional. La reducción de la actividad de la proteína CDH1 y la reducción de la adhesión intercelular se asocian con alta invasividad y metástasis (29). Estas características tumorales coinciden con la información reportada por la familia con respecto a la progresión tumoral, tanto del probando como de su hija.

Mutaciones germinales en el gen *CDH1* se asocian a fenotipos clínicos de CM de aparición temprana (<50 años) del tipo lobular infiltrante y bilateral lobular *in situ* (30,31). No disponemos de información clínica al respecto de la edad de aparición del primer tumor en la paciente, aunque la edad de fallecimiento indica desarrollo precoz del tumor. El riesgo de desarrollar CM en pacientes portadores de mutaciones en *CDH1* es del ~50%, (32) aunque esta frecuencia se reduce drásticamente en pacientes con historia familiar exclusiva de CM, sin historia familiar de cáncer gástrico (33).

La presencia de mutaciones en genes supresores de tumores (como es el caso del gen *CDH1*) en pacientes con CM tienen importantes implicaciones clínicas:

1. La existencia en línea germinal de mutaciones en *CDH1* proporciona información clave para la realización de consejo genético en familiares, tanto hombres como mujeres. Esto permite identificar parientes portadores de mutación y poder activar tanto los protocolos pertinentes para la detección temprana de la enfermedad como la aplicación de terapias específicas.
2. Se recomienda a los pacientes portadores de mutaciones en *CDH1* asociadas a CM la realización de exámenes de mama cada 6-12 meses a partir de los 25 años, así como una mamografía anual a partir de los 30 años (32).
3. Se recomienda a todos los portadores de mutaciones en el gen *CDH1* realizar revisiones periódicas, debido al alto riesgo a desarrollar otro tipo de tumores principalmente mama y estómago. La bibliografía relaciona exclusivamente esta mutación (*c.1565+1G>A*) a historias familiares con CM. El reducido tamaño muestral de estos estudios y la alta implicación de este gen en el desarrollo de cáncer gástrico y próstata no descarta que esta mutación pueda asociarse con otros fenotipos tumorales (34,35).
4. Compuestos como Troglitazone, ácido linoleico, y S-allylcysteina, pueden ser de interés para el tratamiento de este tipo de tumores de mama, ya que se ha visto inhibe la propagación del cáncer actuando como inhibidores de progresión tumoral (36–38).

El abordaje que presentamos en este Proyecto Fin de Máster muestra una mejora significativamente la estimación del riesgo que tiene un paciente a desarrollar CM. El impacto de este abordaje es mayor en aquellos pacientes que, aun teniendo un fuerte historial familiar, han obtenido un resultado negativo en los genes más frecuentemente mutados (como es el caso de los genes *BRCA*). La detección simultánea de mutaciones, en otros genes de predisposición que confieren un riesgo moderado/alto de desarrollar cáncer, permite a los pacientes y a sus familias beneficiarse de las medidas de prevención adecuadas en tiempos más reducidos.

La particularidad de este caso radica en haber conseguido un diagnóstico clínico positivo en CM a partir de una muestra de sangre en papel. Actualmente, esta metodología se utiliza para otro tipo de estudios como análisis forenses (39) o la detección de fibrosis quística en neonatos (40), pero no se ha encontrado bibliografía en relación al análisis de mutaciones genéticas en cáncer. Hemos podido realizar un análisis genético en una paciente fallecida mediante el uso de tarjetas FTA® como material de partida en la toma de muestra. Esto fue posible debido que este tipo de tarjetas contienen sustancias químicas que protegen el ADN, manteniéndolo estable durante un largo período de tiempo, lo que permite aplicar esta metodología a técnicas de alta sensibilidad, como es el caso de NGS (41).

Aunque la metodología de referencia o *gold standar* para la detección de mutaciones en exones y regiones adyacentes es la secuenciación Sanger, el gran tamaño de estos genes y lo laborioso del método hacen que esta técnica no se pueda aplicar cuando el número de muestras a analizar sea elevado. Eso sumado al hecho de que existe un alto porcentaje de pacientes no portadores de mutaciones en los genes *BRCA* para los que se debería realizar el estudio de un mayor número de genes, hacen que la tecnología NGS se convierta en una metodología capital en el diagnóstico de enfermedades hereditarias multigénicas. La implantación de nuevas técnicas de secuenciación, capaces de secuenciar millones de fragmento de ADN en paralelo, ha logrado la reducción en los costes y el tiempo tanto de trabajo como de análisis de datos gracias al multiplexado de muestras, la optimización de protocolos y la implementación de programas informáticos sofisticados implicados en la interpretación de resultados. Mediante NGS se pueden detectar todos los tipos de variación genómica en un solo análisis, incluyendo: *SNP* o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y traslocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones). Sin embargo, la secuenciación Sanger proporciona la resolución definitiva para detectar variantes genéticas, por lo que ambas tecnologías son necesarias y complementarias en el diagnóstico clínico de enfermedades hereditarias a la hora de proporcionar información veraz y contrastada al paciente.

La posibilidad de diseñar paneles de genes incrementa el rendimiento del diagnóstico genético, tanto en cáncer hereditario como de otras enfermedades de origen multigénico para las que se conocen los genes implicados en su desarrollo (R). El estudio de todos los genes implicados en la susceptibilidad de una patología simultáneamente permite la identificación de mutaciones tanto en genes de alta como baja penetrancia. Esto tiene un alto valor clínico, ya que en el caso de genes de baja penetrancia las variantes genéticas con relevancia clínica hubiesen pasado desapercibidas, o en el mejor de los casos, habrían sido detectadas más tarde empleando otro tipo de metodologías. Identificar mutaciones en genes de moderada o baja penetrancia también es importante para determinar el tratamiento adecuado en cada paciente (42). Esto unido a la drástica reducción en tiempo y costes de los estudios genéticos están haciendo de la secuenciación masiva y de los paneles de genes una herramienta revolucionaria en el campo de la genética médica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Consideramos que los resultados obtenidos en este Proyecto Fin de Master ofrecen nuevas opciones a la hora de realizar consejo genético sobre todo en familias donde el probando más adecuado haya fallecido y no se disponga del tipo de muestra habitual. Los estudios de cáncer hereditario realizado a partir de ADN obtenido de sangre en papel proporcionan una nueva oportunidad para muchas familias.

CONCLUSIONES

1. La extracción de ADN a partir de tarjetas FTA® con sangre seca que permiten perfectamente utilizar este tipo de muestras para estudios de secuenciación masiva *Ion Torrent*, lo que nos proporciona una poderosa herramienta en el campo del diagnóstico genético con secuenciación masiva.
2. La Secuenciación masiva mediante la realización del panel de genes HC-Gen Test constituido por 37 genes y 89 SNP asociados a cáncer hereditario (Ac-Gen Reading Life S.L.) nos ha permitido dar un diagnóstico positivo a la paciente (validado por tecnologías clásicas) detectándose una mutación patógena (c.1565+1G>A) en el gen *CDH1* que explica el fenotipo clínico de la paciente y su historia familiar.
3. Nuestro abordaje mediante la utilización de tarjetas FTA ofrece la posibilidad de realizar test genéticos en familias con enfermedades hereditarias en las que existe algún miembro afecto fallecido. Esto proporciona un nuevo enfoque a la hora de ofrecer medidas preventivas y/o de diagnóstico precoz individualizado, que eviten la aparición de la enfermedad o la detección de la misma en estadios potencialmente curables, y a la realización de consejo genético en familiares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Incidencia del cáncer de mama [Internet]. [citado 13 de junio de 2017]. Disponible en: <https://www.aecc.es/SobreEICancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/incidencia.aspx>
3. Las Cifras del Cáncer en España 2017 [Internet]. [citado 1 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.seom.org/es/prensa/el-cancer-en-espanyacom/105941-las-cifras-del-cancer-en-espana-2017?start=2#content>
4. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet Lond Engl*. 2002 ;360(9328):187-95.
5. Hanahan D., Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 ;144(5):646-74.
6. Singletary SE. Rating the Risk Factors for Breast Cancer. *Ann Surg*. 2003;237(4):474-82.
7. Vidi P-A., Leary J., Lelièvre SA. Building risk-on-a-chip models to improve breast cancer risk assessment and prevention. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro*. 2013;5(9):1110-8.
8. Kuhl H. Breast cancer risk in the WHI study: the problem of obesity. *Maturitas*. 2005;51(1):83-97.
9. Hilakivi-Clarke L., de Assis S., Warri A. Exposures to Synthetic Estrogens at Different Times During the Life, and Their Effect on Breast Cancer Risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2013;18(1):25-42.
10. Hulka BS. Epidemiology of susceptibility to breast cancer. *Prog Clin Biol Res*. 1996;395:159-74.
11. Morrow M., Jordan VC. *Managing Breast Cancer Risk*. PMPH-USA; 2003. 328 p.
12. Honrado E., Benítez J., Palacios J. The Pathology of Hereditary Breast Cancer. *Hered Cancer Clin Pract*. 2004;2(3):131-8.
13. Díez O., Cornet M., Gutiérrez S., Domènech M. et al. Estudio de los genes BRCA y BRCA en 200 familias con cáncer de mama hereditario. *Química Clínica*. 2007; 26 (4) 202-206.
14. Couch FJ., Nathanson KL., Offit K. Two Decades After *BRCA*: Setting Paradigms in Personalized Cancer Care and Prevention. *Science*. 2014;343(6178):1466-70.
15. Walsh T., Casadei S., Coats KH., Swisher E., Stray SM., Higgins J., et al. Spectrum of Mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, and *TP53* in Families at High Risk of Breast Cancer. *JAMA*. 2006;295(12):1379-88.
16. Hirotsu Y., Nakagomi H., Sakamoto I., Amemiya K., Oyama T., Mochizuki H., et al. Multigene panel analysis identified germline mutations of DNA repair genes in breast and ovarian cancer. *Mol Genet Genomic Med*. 2015;3(5):459-66.
17. Michailidou K., Hall P., Gonzalez-Neira A., Ghoussaini M., Dennis J., Milne RL., et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet*. 2013;45(4):353-61, 361e1-2.

BIBLIOGRAFÍA

18. Collins LC., Baer HJ., Tamimi RM., Connolly JL., Colditz GA., Schnitt SJ.. The influence of family history on breast cancer risk in women with biopsy-confirmed benign breast disease. *Cancer*. 2006;107(6):1240-7.
19. Pharoah PD., Day NE., Duffy S., Easton DF., Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 1997;71(5):800-9.
20. Guan Y-F., Li G-R., Wang R-J., Yi Y-T, Yang L., Jiang D., et al. Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chin J Cancer*. 2012;31(10):463-70.
21. Heather JM., Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107(1):1-8.
22. Den Dunnen JT., Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*. 2000;15(1):7-12.
23. Adzhubei I., Jordan DM., Sunyaev SR.. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 7:Unit7.20.
24. Landrum MJ., Lee JM., Benson M., Brown G., Chao C., Chitipiralla S., et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D862-868.
25. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth BC., Remm M., et al. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(15):e115.
26. Becker KF., Atkinson MJ., Reich U., Becker I., Nekarda H., Siewert JR, et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res*. 1994;54(14):3845-52.
27. Perl AK., Wilgenbus P, Dahl U., Semb H., Christofori G.. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998;392(6672):190-3.
28. Schrader KA., Masciari S., Boyd N., Wiyrick S., Kaurah P., Senz J, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: association with lobular breast cancer. *Fam Cancer*. 2008;7(1):73-82.
29. Wang P-S., Chou F-S., Porchia L., Saji M., Pinzone JJ. Troglitazone inhibits cell migration, adhesion, and spreading by modulating cytoskeletal rearrangement in human breast cancer cells. *Mol Carcinog*. 2008;47(12):905-15.
30. Sarrió D., Moreno-Bueno G., Hardisson D., Sánchez-Estévez C, Guo M., Herman JG., et al. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *Int J Cancer*. 20 de agosto de 2003;106(2):208-15.
31. Schrader KA., Masciari S., Boyd N., Salamanca C., Senz J., Saunders DN., et al. Germline mutations in CDH1 are infrequent in women with early-onset or familial lobular breast cancers. *J Med Genet*. 2011;48(1):64-8.
32. Hirohashi S., Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*. 2003;94(7):575-81.
33. Dossus L., Benusiglio PR. Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Res*. 2015;17:37.
34. Suriano G., Yew S., Ferreira P., Senz J., Kaurah P., Ford JM., et al. Characterization of a recurrent germ line mutation of the E-cadherin gene: implications for genetic testing and clinical management. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005;11(15):5401-9.

BIBLIOGRAFÍA

35. Deng Q-W., He B-S., Pan Y-Q., Sun H-L., Xu Y-Q., Gao T-Y., et al. Roles of E-cadherin (CDH1) genetic variations in cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2014;15(8):3705-13.
36. Bocca C., Bozzo F., Francica S., Colombatto S., Miglietta A. Involvement of PPAR gamma and E-cadherin/beta-catenin pathway in the antiproliferative effect of conjugated linoleic acid in MCF-7 cells. *Int J Cancer*. 2007;121(2):248-56.
37. Gapter LA., Yuin OZ., Ng K-Y. S-Allylcysteine reduces breast tumor cell adhesion and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;367(2):446-51.
38. Cho O., Hwang H-S., Lee B-S., Oh Y-T., Kim C-H., Chun M. Met inactivation by S-allylcysteine suppresses the migration and invasion of nasopharyngeal cancer cells induced by hepatocyte growth factor. *Radiat Oncol J*. 2015;33(4):328-36.
39. Hedman J., Albinsson L., Ansell C., Tapper H., Hansson O., Holgersson S., et al. A fast analysis system for forensic DNA reference samples. *Forensic Sci Int Genet*. junio de 2008;2(3):184-9.
40. Hendrix MM., Foster SL., Cordovado SK. Newborn Screening Quality Assurance Program for CFTR Mutation Detection and Gene Sequencing to Identify Cystic Fibrosis. *Journal of inborn errors of metabolism and screening*. 2016;4:1-11.
41. Rahikainen A-L., Palo JU., Leeuw W. de, Budowle B., Sajantila A. DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. *Forensic Sci Int*. 2016;261:148-53.
42. Graffeo R., Livraghi L., Pagani O., Goldhirsch A., Partridge AH., Garber JE. Time to incorporate germline multigene panel testing into breast and ovarian cancer patient care. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;160(3):393-410.

ANEXOS:

Anexo I: CONSENTIMIENTO INFORMADO



“Genética al servicio de la Salud”

AC-Gen Reading Life S.L.
c/ Paseo de Belén nº9A - 2ª planta
47011 Valladolid
B-47690482

Consentimiento Informado del paciente para la realización de estudios genéticos

El consentimiento informado es necesario para la realización de pruebas genéticas. El paciente (el padre o tutor en caso de menores o incapacitados) debe firmar el siguiente consentimiento. En caso de muestras anónimas, se aceptará una declaración del médico responsable del paciente, indicando que se ha obtenido el consentimiento informado apropiado.

Título del estudio genético que se le va a realizar:

El propósito de este estudio genético molecular es determinar si usted es portador de una mutación (o más que sea/n la causa o incremente/n la susceptibilidad a padecer una enfermedad de tipo genético-hereditario. Este estudio incluirá la lectura y el análisis del gen o genes relacionados con la enfermedad para la que se solicita este estudio. Su médico le puede proporcionar más información sobre la enfermedad específica asociada al gen/es incluidos en la prueba seleccionada.

La muestra biológica (sangre, fluido corporal o tejido enviados) es necesaria para el aislamiento y purificación del ADN a partir del cual se realizará el análisis genético molecular.

Entiendo esta información acerca del propósito de la prueba y la metodología.

Debido a la complejidad de las pruebas basadas en ADN y las implicaciones de los resultados de las pruebas, estos resultados se comunicarán a su médico. Para conocer los resultados, deberá usted ponerse en contacto con él.

Adicionalmente, los resultados de la prueba podrían entregarse a todos los que, por ley, puedan tener acceso a dichos datos.

Entiendo la información respecto a la política de divulgación de los resultados de AC-Gen Reading Life.

Los resultados de las pruebas genéticas tienen implicaciones para los miembros de su familia. Si una vez hecha la prueba, se detecta que usted es portador de una mutación en el gen o genes analizados, esto puede tener implicaciones para los miembros de su familia. Las implicaciones y el alcance de los resultados del estudio para usted y su familia deberían ser explicados por su médico.

Es recomendable que cualquier persona que vaya a someterse a una prueba genética solicite un consejo genético previo a la realización de las pruebas y a la recepción de los resultados. Este procedimiento debe ser realizado por un especialista cualificado, como un consejero genético o genetista médico.

Entiendo la información relativa a las consecuencias y riesgos de las pruebas.

Aunque los métodos utilizados para realizar esta prueba son altamente sensibles y específicos existe la posibilidad de que éstos no sean concluyentes. Existen tres tipos diferentes de resultados que pueden ser generados mediante pruebas genéticas:

Positivo: En este caso se identifica una mutación en un gen asociado con una enfermedad. En este caso el diagnóstico se confirma o bien implica que tiene un mayor riesgo de padecer la enfermedad. Su médico hará las recomendaciones adecuadas de prevención, seguimiento y en su caso tratamiento en base al conocimiento acerca del gen en el que se detectó la mutación.

Negativo: No se identifican mutaciones en ninguno de los genes analizados. Este resultado reduce la probabilidad de que tenga mutaciones en los genes estudiados (vea limitaciones de las pruebas). Su médico realizará las medidas de control y recomendaciones para el tratamiento médico en base a la



“Genética al servicio de la Salud”

AC-Gen Reading Life S.L.
c/ Paseo de Belén nº9A - 2ª planta
47011 Valladolid
B-47690482

historia clínica y antecedentes familiares.

Variante: Se han identificado alteraciones en uno o más genes, sin embargo no hay suficiente información para determinar si dicha alteración se asocia con el diagnóstico clínico o con un mayor riesgo de padecer la enfermedad. En este caso se podrán realizar estudios bibliográficos, bioinformáticos y funcionales que determinen la patogenicidad o no de la alteración. Aun así puede que el resultado no sea concluyente.

Entiendo la información relativa a las limitaciones técnicas de la prueba.

Pueden producirse resultados inexactos debidos entre otros a los siguientes motivos:

- Intercambio/cruce de muestras.
- Muestras de familiares críticos no disponibles.
- Información médica inexacta o engañosa sobre su condición clínica o la de sus familiares.
- Problemas técnicos.

Entiendo la información relativa a las limitaciones del laboratorio.

Una vez concluida la prueba, su ADN puede eliminarse o ser guardado indefinidamente para la investigación, validación de pruebas o formación en AC Gen Reading Life siempre que esté asegurada su privacidad. No recibirá ninguna compensación por los resultados de la I+D que se pudiera desarrollar con el uso de sus muestras. Usted puede negarse a ceder su muestra para el uso descrito y puede retirar su consentimiento en cualquier momento poniéndose en contacto con su médico. Su negativa a consentir la cesión de su muestra para la investigación médica no afectará a sus resultados.

- Doy mi consentimiento para el uso de mi muestra de ADN con fines de investigación.
 No doy mi consentimiento para el uso de mi muestra de ADN con fines de investigación.

AC Gen Reading Life podrá proponer pruebas genéticas adicionales si es de ayuda para resolver su caso diagnóstico. También puede rechazar la realización de la prueba, si alguna de las condiciones de este consentimiento informado no se cumple.

Usted tiene derecho a cambiar de parecer en cualquier momento y denegar la autorización para el estudio genético contenida en este documento y revocar su decisión de continuar con el análisis. Si la solicitud de cancelación de la prueba se recibe antes de su inicio, no se realizará cargo alguno, en caso contrario se abonará íntegramente el cargo de la misma.

He leído o se me han leído todas las declaraciones anteriores y entiendo la información en relación a las pruebas genéticas. También he tenido la oportunidad de realizar las preguntas que pueda tener acerca de la prueba, el procedimiento, sus riesgos y las alternativas antes de dar mi consentimiento informado.

Estoy de acuerdo en que me realicen la prueba genética.

Si procede, autorizo la extracción de muestras biológicas y el estudio genético de mis hijos menores de edad para ser utilizadas en los términos anteriormente descritos en el estudio genético de la enfermedad arriba mencionada.

Firma del Paciente (o padre/tutor si el Paciente es menor de edad)

Fecha:

Nombre del Paciente:

Nombre y relación (padre/tutor si el paciente es un menor de edad)

Anexo II: TABLA DE GENES DEL PANEL HC-GEN TEST

GENES
89 SNPs
<i>APC</i>
<i>ATM</i>
<i>AXIN2</i>
<i>BARD1</i>
<i>BLM</i>
<i>BMPR1A</i>
<i>BR1P1</i>
<i>BRCA1</i>
<i>BRCA2</i>
<i>CDH1</i>
<i>CHEK2</i>
<i>ENG</i>
<i>EPCAM</i>
<i>FAM175A</i>
<i>KIT</i>
<i>MLH1</i>
<i>MLH3</i>
<i>MRE11A</i>
<i>MSH2</i>
<i>MSH3</i>
<i>MSH6</i>
<i>MUTYH</i>
<i>NBN</i>
<i>PALB2</i>
<i>PDGFRA</i>
<i>PIK3CA</i>
<i>PMS1</i>
<i>PMS2</i>
<i>PTEN</i>
<i>RAD50</i>
<i>RAD51C</i>
<i>RAD51D</i>
<i>SCG5</i>
<i>SMAD4</i>
<i>STK11</i>
<i>TP53</i>
<i>XRCC2</i>

Anexo III: TABLA DE SNP ASOCIADOS A CM DETECTADOS EN EL ESTUDIO

SNP	OR*	95% IC*	GEN
rs711830	1,12	1.08–1.15	<i>HOXD3</i>
rs4691139	1,20	1.17–1.38	<i>TRIM61</i>
rs11782652	1,19	1.12–1.26	<i>CHMP4C</i>
rs7084454	1,10	1.06–1.14	<i>MLLT10</i>
rs7405776	1,12	1.08–1.17	<i>HNF1B</i>
rs11651755	1,29	1.19–1.43	<i>HNF1B</i>
rs2077606	1,15	1.12–1.19	<i>PLEKHM1</i>
rs7218345	1,12	1.08–1.16	<i>SKAP1</i>
rs616488	1,06	1.09–1.04	<i>PEX14</i>
rs6678914	1,08	1.04–1.13	<i>LGR6</i>
rs12710696	1,11	1.06–1.15	<i>OSR1</i>
rs2016394	1,05	1.08–1.03	<i>DLX2</i>
rs13387042	1,14	1.16–1.16	<i>TNP1</i>
rs16857609	1,08	1.06–1.10	<i>TNS1</i>
rs4973768	1,10	1.08–1.12	<i>SLC4A7</i>
rs10069690	1,06	1.04–1.08	<i>TERT</i>
rs7734992	1,05	1.03–1.07	<i>TERT</i>
rs889312	1,12	1.10–1.15	<i>MAP3K1</i>
rs10472076	1,05	1.03–1.07	<i>RAB3C</i>
rs9348512	1,18	1.11–1.25	<i>TFAP2A</i>
rs2046210	1,08	1.06–1.10	<i>C6orf97</i>
rs9693444	1,07	1.05–1.09	<i>DUSP4</i>
rs6472903	1,10	1.12–1.08	<i>HNF4G</i>
rs13281615	1,09	1.07–1.12	<i>POU5F1B</i>
rs11780156	1,07	1.04–1.10	<i>MYC</i>
rs10759243	1,06	1.03–1.08	<i>KLF4</i>
rs865686	1,12	1.10–1.14	<i>KLF4</i>
rs7072776	1,07	1.05–1.09	<i>MLLT10</i>
rs704010	1,08	1.06–1.10	<i>ZMIZ1</i>
rs7904519	1,06	1.04–1.08	<i>TCF7L2</i>
rs11199914	1,05	1.08–1.03	<i>FGFR2</i>
rs3903072	1,05	1.08–1.04	<i>SNX32</i>
rs494406	1,07	1.05–1.11	<i>CCND1</i>
rs11820646	1,05	1.08–1.03	<i>BARX2</i>
rs2588809	1,08	1.05–1.11	<i>RAD51B</i>
rs941764	1,06	1.04–1.09	<i>CCDC88C</i>
rs3803662	1,24	1.21–1.27	<i>TOX3</i>
rs11075995	1,10	1.05–1.15	<i>FTO</i>
rs13329835	1,08	1.05–1.10	<i>CDYL2</i>
rs527616	1,05	1.08–1.03	<i>AQP4</i>
rs1436904	1,04	1.02–1.06	<i>CHST9</i>
rs4808801	1,08	1.05–1.10	<i>ELL</i>
rs3760982	1,06	1.04–1.08	<i>KCNN4</i>
rs2823093	1,09	1.11–1.06	<i>NRIP1</i>
rs132390	1,12	1.07–1.18	<i>EMID1</i>

*OR (Odds Ratio o razón de probabilidad): Relación entre el índice de frecuencia de cáncer de mama (rojo) o ovario (verde) y los portadores del alelo entre el índice de frecuencia de los no portadores. CI (intervalo de confianza).

Anexo IV: TABLA DE VARIANTES NO PATÓGENAS DETECTADAS EN EL ESTUDIO

Gen	Cambio en el ADN	Efecto en la proteína	Estado	Tipo de mutación	Valoración
APC	c.5465T>A	p.Val1822Asp	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
ATM	c.3285-10delT	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
ATM	c.5948A>G	p.Asn1983Ser	Homocigoto	<i>missense</i>	Benigna
AXIN2	c.1386C>T	p.Pro462Pro	Heterocigoto	sinónima	Benigna
AXIN2	c.1365A>G	p.Pro455Pro	Heterocigoto	sinónima	Benigna
AXIN2	c.148C>T	p.Pro50Ser	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BARD1	c.70C>T	p.Pro24Ser	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BARD1	c.1518T>C	p.Val507Met	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BARD1	c.1904-413G>A	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
BARD1	c.1568+14C>T	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
BARD1	c.1315-19G>A	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
BARD1	c.1134G>C	p.Arg378Ser	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BLM	c.2555+7T>C	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
BMPR1A	c.1343-11T>C	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
BMPR1A	c.4C>A	p.Pro2Thr	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BRCA1	c.4308T>C	p.Ser333Ser	Heterocigoto	sinónima	Benigna
BRCA1	c.2311T>C	p.Leu771Leu	Heterocigoto	sinónima	Benigna
BRCA1	c.2082C>T	p.Ser694Ser	Heterocigoto	sinónima	Benigna
BRCA1	c.4900A>G	p.Ser1634Gly	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BRCA1	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BRCA1	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BRCA1	c.2612C>T	p.Pro871Leu	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BRCA2	c.1365A>G	p.Ser455Ser	Heterocigoto	sinónima	Benigna
BRCA2	c.2229T>C	p.His743His	Heterocigoto	sinónima	Benigna
BRCA2	c.3396A>G	p.Lys1132Lys	Heterocigoto	sinónima	Benigna
BRCA2	c.4563A>G	p.Leu1521Leu	Homocigoto	sinónima	Benigna
BRCA2	c.6513G>C	p.Val2171Val	Homocigoto	sinónima	Benigna
BRCA2	c.865A>C	p.Asn289His	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BRCA2	c.2971A>G	p.Asn991Asp	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BRCA2	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BRCA2	c.7397T>C	p.Val2466Ala	Homocigoto	<i>missense</i>	Benigna
BRIP1	c.3411T>C	p.Tyr1137Tyr	Heterocigoto	sinónima	Benigna
BRIP1	c.2755T>C	p.Ser919Pro	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
CDH1	c.2076T>C	p.Ala692Ala	Homocigoto	sinónima	Benigna
CDH1	c.48+6C>T	-	Homocigoto	intrónica	Benigna
EPCAM	c.76+133_76+134insG	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
EPCAM	c.344T>C	p.Met115Thr	Homocigoto	<i>missense</i>	Benigna
FAM175A	c.1042G>A	p.Ala348Thr	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
KIT	c.1638A>G	p.Lys546Lys	Heterocigoto	sinónima	Benigna
MLH1	c.1668-19A>G	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
MLH3	c.4335A>G	p.Gln1445Gln	Heterocigoto	sinónima	Benigna

ANEXOS

<i>MRE11A</i>	c.1225+19T>C	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
<i>MRE11A</i>	c.403-6G>A	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
<i>MRE11A</i>	c.20+141G>A	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
<i>MSH3</i>	c.2846A>G	p.Gln949Arg	Homocigoto	<i>missense</i>	Benigna
<i>MSH3</i>	c.3133G>A	p.Ala1045Thr	Homocigoto	<i>missense</i>	Benigna
<i>MSH6</i>	c.186C>A	p.Arg62Arg	Heterocigoto	sinónima	Benigna
<i>MSH6</i>	c.276A>G	p.Pro92Pro	Heterocigoto	sinónima	Benigna
<i>MSH6</i>	c.540T>C	p.Asp180Asp	Heterocigoto	sinónima	Benigna
<i>MSH6</i>	c.3438+14A>T	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
<i>MUTYH</i>	c.36+325C>G	-	Homocigoto	intrónica	Benigna
<i>PALB2</i>	c.1676A>G	p.Gln559Arg	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
<i>PDGFRA</i>	c.1701A>G	p.Val567Val	Homocigoto	sinónima	Benigna
<i>PDGFRA</i>	c.3222T>C	p.Asp107Asp	Homocigoto	sinónima	Benigna
<i>PIK3CA</i>	c.1060-17C>A	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
<i>PMS2</i>	c.780C>G	p.Ser260Ser	Homocigoto	sinónima	Benigna
<i>PMS2</i>	c.705+17A>G	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
<i>PMS2</i>	c.1621A>G	p.Lys541Glu	Homocigoto	<i>missense</i>	Benigna
<i>PMS2</i>	c.1531A>G	p.Thr511Ala	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
<i>PMS2</i>	c.1408C>T	p.Pro470Ser	Heterocigoto	<i>missense</i>	Benigna
<i>SMAD4</i>	c.454+2088G>C	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
<i>SMAD4</i>	c.*11C>T	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
<i>STK11</i>	c.374+24G>T	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
<i>STK11</i>	c.920+7G>C	-	Heterocigoto	intrónica	Benigna
<i>TP53</i>	c.672+62A>G	-	Homocigoto	intrónica	Benigna