



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina



ABORDAJE DEL CÁNCER DE MAMA FAMILIAR MEDIANTE NGS. DEL GENOTIPO AL FENOTIPO

Autora: Ana Isabel García Aguilera

Tutora: Dra. Mercedes Durán Domínguez

Trabajo de Fin de Grado

Curso 2021-2022

ÍNDICE

1. Resumen

2. Introducción

2.1. Qué es el cáncer. Cáncer como enfermedad

2.2. Cáncer de mama. Tipos

2.3. Cáncer hereditario. Cáncer de mama hereditario

2.4. Programas de prevención en cáncer hereditario

2.5. Análisis de detección de mutaciones. Estudios genéticos

2.6. Secuenciación masiva o NGS. Plataforma Ion S5 de Thermo Fisher Scientific

2.7. Paneles genéticos. Clasificación de las variantes

3. Objetivos

4. Material y métodos

4.1. Material: número de muestras, procedencia, criterio de inclusión.

4.2. Métodos:

4.2.1. Extracción de DNA

4.2.2. Cuantificación de la muestra

4.2.3. Protocolo de secuenciación masiva Ion S5

4.2.4. Análisis de los datos Ion Reporter

4.3. Recogida de datos

5. Resultados y discusión

5.1. Mutaciones detectadas

5.2. Relación genotipo-fenotipo

5.3. Del diagnóstico genético al tratamiento

6. Conclusiones

7. Bibliografía

1. Resumen

Introducción: El cáncer de mama hereditario representa un 10-15% de los cánceres de mama. Con el desarrollo de la NGS, ahora se detectan mutaciones en genes más allá de BRCA1 y BRCA2. El objetivo de este trabajo es evaluar la utilidad de los paneles multigénicos empleados para la detección de estos genes, así como establecer, si existen, relaciones genotipo-fenotipo.

Material y métodos: Base de muestras del laboratorio de cáncer hereditario del IBGM. Se evaluaron aquellas muestras de pacientes con cáncer que presentaban mutación en genes diferentes de BRCA y que a su vez fueron analizadas mediante la plataforma de NGS Ion S5.

Resultados: 17 variantes en 8 genes diferentes: ATM, BLM, BRIP1, FANCM, PALB2, POLE, RAD51D y TP53. Mediante revisión bibliográfica y el análisis de los antecedentes personales y familiares, se encontró relación entre las variantes patogénicas de estos genes y el desarrollo de cáncer en los portadores de estas mutaciones. Se detectó la necesidad de nuevas guías que indiquen el manejo de estos casos.

Conclusiones: El uso de paneles genéticos mejora el diagnóstico del cáncer de mama hereditario, permitiendo identificar mutaciones en genes que anteriormente no se estudiaban. Gracias al desarrollo de la NGS, se puede llevar a cabo un manejo precoz de los portadores de estas variantes y su inclusión en programas de consejo genético. No obstante, se necesitan más investigaciones que permitan establecer relaciones genotipo-fenotipo más precisas y así poder establecer pautas para el manejo de estos pacientes.

2. Introducción

2.1. Qué es el cáncer. Cáncer como enfermedad

“Cáncer” es el término utilizado para englobar a un conjunto de enfermedades cuyo nexo común es la proliferación descontrolada de células, que posteriormente llegan a invadir y dañar tejidos y órganos, pudiendo llegar en último término a provocar la muerte. En España, los tumores constituyen la segunda causa de mortalidad, solo por detrás de las enfermedades cardiovasculares (1).

El desarrollo del cáncer tiene su base en una acumulación de cambios genéticos y epigenéticos en los genes encargados de la regulación del ciclo celular. La alteración en la expresión de estos genes, denominados protooncogenes y genes supresores de tumores, lleva al crecimiento descontrolado y la proliferación indiscriminada de las

células, escapando éstas a los mecanismos de control del ciclo celular y perdiéndose el equilibrio entre división y muerte celular (2,3).

Los protooncogenes son los encargados de promover el crecimiento celular y controlar la proliferación y supervivencia de la célula (3). Las mutaciones en estos genes, que pasan a denominarse oncogenes una vez mutados, son generalmente dominantes (4). De esta manera, la mutación de un solo alelo de un protooncogén es suficiente para que éste pierda su función y la célula se divida de forma descontrolada, alterándose el equilibrio entre proliferación y muerte celular.

Los genes supresores de tumores son aquellos implicados en la reparación del ADN dañado, la inhibición de la división celular y la inducción de la apoptosis (4). Es necesaria la mutación de ambos alelos para que se pierda la función de este tipo de genes, produciéndose así la proliferación de células cancerosas (3). Esto implica que aquellos individuos que nacen con un alelo mutado tienen más riesgo de desarrollar un cáncer, pues únicamente sería necesaria la mutación del segundo alelo del gen para que éste pierda su funcionalidad.

Por todo ello, podemos considerar al cáncer como una enfermedad genética, puesto que su desarrollo radica en cambios en la secuencia del ADN y cambios epigenéticos que afectan a la expresión de genes (2).

2.2. Cáncer de mama. Tipos

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente de la mujer en España, ocupando la primera posición en cuanto a mortalidad por cáncer en mujeres. Se estima que en 2022 será el segundo cáncer más diagnosticado en España, siendo el primero en mujeres (1). 1 de cada 8 mujeres tendrá cáncer de mama a lo largo de su vida (5). Sin embargo, la supervivencia neta a 5 años en mujeres con cáncer de mama alcanza un 86% (1), muy por encima de la media en mujeres.

El cáncer de mama se clasifica por su origen anatómico en lobulillar o ductal. Hasta el 80% de los cánceres de mama invasivos son carcinomas ductales infiltrantes. El carcinoma lobulillar invasivo es el segundo tipo más común. De los carcinomas in situ no invasivos, más del 80% son ductales y alrededor del 10% son lobulillares (6).

Según criterios tanto moleculares como histológicos, el cáncer de mama se puede clasificar en base a la expresión de receptores hormonales, la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y el marcador de proliferación Ki67. El enfoque terapéutico del cáncer de mama debe realizarse en base a estos criterios

moleculares. Así, atendiendo a estas características, se distinguen cuatro subtipos de cáncer de mama: luminal A, luminal B, HER2 positivo y triple negativo (5).

El cáncer de mama luminal A se caracteriza por ser el subtipo más frecuente, el de mejor pronóstico (7) y presentar receptores de estrógeno y/o de progesterona positivo, sin expresión de HER2 y un Ki67 menor de 14%, similar al luminal B, pero presentando éste último un Ki67 mayor de 14% (8), lo cual hace que su pronóstico sea menos favorable que el luminal A.

En el subtipo HER2 positivo, se expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2. Este subtipo se beneficia del tratamiento adyuvante con trastuzumab (anticuerpo recombinante monoclonal contra el receptor de HER2), reduciendo la recurrencia y la mortalidad en pacientes con este tipo de cáncer (9).

El subtipo triple negativo no presenta receptores hormonales ni expresa el receptor de HER2, siendo este el subtipo con pronóstico más sombrío, así como con mayor frecuencia de enfermedad metastásica junto al subtipo HER2 (10).

2.3. Cáncer hereditario. Cáncer de mama hereditario

El cáncer hereditario representa aproximadamente entre el 5-10% del total de los cánceres diagnosticados (2). Es aquel en el que se puede identificar un patrón de herencia mendeliano y/o se han identificado mutaciones en línea germinal de genes que confieren un alto riesgo de padecer dicho cáncer (11).

Sin embargo, en ciertos casos se puede observar una agregación familiar de determinados tipos de cáncer, pero sin la existencia de un patrón de herencia tan claro como en los casos de cáncer hereditario. Esta agregación familiar se debe a la combinación de variaciones genéticas en genes de media o baja penetrancia y factores ambientales compartidos (2); estos casos se engloban bajo el concepto de cáncer familiar.

La hipótesis de Knudson es la más aceptada para explicar el desarrollo de los cánceres familiares y hereditarios. Este modelo se basa en que el individuo nace con una mutación en uno de los alelos del gen en cuestión (primer hit), desarrollándose el cáncer tras un segundo evento (segundo hit) de mutación, esta vez en el otro alelo del gen, a lo largo de la vida, generalmente a una edad más temprana que los cánceres esporádicos, debido a la pérdida prematura de la funcionalidad del primer alelo (12).

La mayoría de los cánceres de mama son esporádicos, mientras que un 10-15% de las neoplasias son hereditarias, siendo los genes de alta penetrancia BRCA1 y BRCA2 los

principales implicados en su desarrollo (13). Estos genes supresores de tumores están involucrados en el mantenimiento de la integridad del genoma mediante la reparación del daño del ADN, el control del ciclo celular, la regulación de la transcripción génica y la apoptosis (14). Entre las portadoras de la mutación BRCA, el riesgo acumulado de desarrollar cáncer de mama a la edad de 80 años es del 72% en las portadoras de BRCA1 y del 69% en las portadoras de BRCA2 (15).

Los cánceres asociados con mutaciones en BRCA1 suelen ser más agresivos, con un alto grado histológico y con frecuencia son de fenotipo triple negativo. Por otro lado, los cánceres asociados con mutaciones en BRCA2 resultan ser similares a los cánceres no asociados a mutaciones en línea germinal (16).

La presencia de mutaciones patogénicas en BRCA1 y BRCA2, a pesar de su importancia y alta penetrancia, representa solo el 25% del riesgo de cáncer familiar (17).

En los últimos años, los avances logrados en el campo de la genética del cáncer han permitido identificar otros genes que confieren un grado variable de riesgo de desarrollar cáncer de mama (13).

El descubrimiento de estos genes de diferente penetrancia permite estudiar de forma más minuciosa a aquellas pacientes con cáncer de mama y antecedentes familiares de cáncer, pudiendo determinar una predisposición genética antes no identificada. Esto hace posible identificar también a familiares portadores de dichas mutaciones y así poder ofrecer su inclusión en programas de consejo genético.

2.4. Programas de prevención en cáncer hereditario

A través de la identificación de portadores de mutaciones, se puede llevar a cabo diferentes medidas para reducir en gran medida el riesgo de padecer cáncer. Se han elaborado diferentes programas de prevención de cáncer hereditario con la intención de identificar a aquellos pacientes que, por su historia familiar entre otros criterios, tengan una probabilidad más elevada de desarrollar cáncer.

En el caso del cáncer de mama, en España, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) ha elaborado unas guías clínicas, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO), para la selección de pacientes a ser evaluados genéticamente para la detección de mutaciones en línea germinal (13).

Tabla 1. Criterios de la SEOM para realizar evaluación genética en línea germinal en cáncer de mama y ovario hereditario (13).

n	Características Clínico-Patológicas
1 afecta en la familia	Cáncer de mama y cáncer de ovario sincrónico o metacrónico Cáncer de mama diagnosticado antes de los 35 años Cáncer de mama bilateral, uno de ellos diagnosticado antes de los 40 años Cáncer de mama triple negativo diagnosticado antes de los 50 años Carcinoma de ovario de alto grado no mucinoso Mutación somática en gen <i>BRCA</i> detectada en tumor
2 afectos en la familia, familiares de 1º grado	Cáncer de mama bilateral + cáncer de mama diagnosticado antes de los 50 años Cáncer de mama en hombre + un cáncer de mama en mujer Cáncer de mama + cáncer de ovario 2 casos de cáncer de mama diagnosticados antes de los 50 años
≥3 afectos en la familia, al menos dos familiares de 1º grado	≥3 casos de cáncer de mama y/o cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata (Gleason >6), independiente de la edad

La mayoría de las guías y criterios de selección de pacientes para la realización de la evaluación genética se basan en la probabilidad de portar mutaciones patogénicas en *BRCA1* o *BRCA2*. Por tanto, la sensibilidad de estos criterios para identificar mutaciones patogénicas en otros genes es limitada (13).

El análisis de las mutaciones en línea germinal tradicionalmente se ha limitado al estudio de *BRCA1* y *BRCA2*, resultando negativo el cribado de mutaciones en el 80% de los casos analizados (17).

Con los recientes avances en cuanto a técnicas de secuenciación masiva, se ha impulsado el desarrollo de diferentes paneles genéticos, que permiten el estudio de múltiples genes a la vez (18). Debido a ello, están surgiendo nuevos criterios para las pruebas de línea germinal, independientemente de los antecedentes familiares (13).

2.5. Análisis de detección de mutaciones. Estudios genéticos

El término “mutación” se utiliza para describir un cambio demostrable en la secuencia de nucleótidos que luego puede calificarse según su persistencia, función y relevancia (19). Pueden provocar la activación o desactivación de proteínas y la desregulación de una variedad de procesos celulares (20).

Las técnicas de secuenciación son aquellas tecnologías diseñadas con la finalidad de determinar el orden de los nucleótidos en una molécula de ácidos nucleicos (21).

La secuenciación de Sanger, descrita en 1977, se considera desde hace décadas, y todavía hoy en día, el estándar de oro para identificar mutaciones (22).

Esta técnica se basa en el empleo de dideoxinucleótidos (ddNTP) fluorescentes que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3' (21). La ADN polimerasa incorpora estos nucleótidos modificados a la cadena de ADN que, al carecer del grupo hidroxilo necesario para su elongación (23), no puede seguir incorporando más nucleótidos, por lo que su terminación ocurre en las posiciones en las que se incorporan los ddNTP (24). Este proceso se repite múltiples veces, obteniendo fragmentos de diferentes longitudes terminados en un ddNTP fluorescente, que serán separados mediante electroforesis capilar, revelando qué nucleótido ha sido incorporado en cada uno de ellos (21). El uso de marcaje fluorescente para visualizar las bandas permite determinar la secuencia del ADN, siguiendo el orden de migración de fragmentos sucesivamente más grandes en el gel (25).

Aunque es un método efectivo en muchos aspectos, solo puede leer hasta aproximadamente 900 pares de bases (25) en cada reacción, y el proceso requiere mucho tiempo, lo que limita su uso en la secuenciación de fragmentos grandes (26).

La mayoría de los genes relacionados con el cáncer hereditario son genes con un gran número de exones sin puntos calientes de mutaciones (hot spots) (27), por lo que se deben realizar multitud de PCRs y reacciones de secuenciación para cubrir toda la secuencia de codificación. Todo ello, junto a la imposibilidad de detección de deleciones o duplicaciones de exones amplios (27), hacen que sea una técnica poco eficiente para la detección de mutaciones de genes que predisponen a padecer cáncer hereditario. Estos obstáculos han llevado al desarrollo de nuevos métodos de secuenciación de mayor rendimiento.

2.6. Secuenciación masiva. Plataforma Ion S5 de Thermo Fisher Scientific

Desde que se completó el Proyecto Genoma Humano en 2003 (28) con la técnica de Sanger, tras más de una década desde su comienzo y unos costes que ascendieron a más de 2000 millones de euros (21), se ha producido un gran progreso de las tecnologías de secuenciación, que han logrado reducir los costes monetarios por megabase y se ha producido un incremento del número y diversidad de genomas secuenciados (28).

El lanzamiento de la primera plataforma de pirosecuenciación masiva en paralelo en 2005 (29) marcó el comienzo de la era de la secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés, *Next-Generation Sequencing*).

La secuenciación masiva agrupa diferentes tecnologías de secuenciación muy recientes. Las plataformas de NGS realizan la secuenciación de gran cantidad de

segmentos de ADN de forma masiva y en paralelo (30), con diferencias de funcionamiento entre las diferentes plataformas existentes, que radican en las diferentes fases de la NGS: preparación de las librerías, amplificación monoclonal y secuenciación (31), pero obteniendo un resultado similar: la generación de cientos de megabases o incluso gigabases de secuencias de nucleótidos en una sola ejecución de la plataforma (29). Posteriormente, se analizan las secuencias generadas mediante análisis bioinformáticos, cuya misión es unir los fragmentos mediante mapeo o asociación de las lecturas individuales a su lugar correspondiente en base a su posición en el genoma humano de referencia (32).

El sistema Ion S5 de Thermo Fisher Scientific es la plataforma empleada en el laboratorio de cáncer hereditario del Instituto de Biología y Genética Molecular de Valladolid (IBGM).

La tecnología empleada se basa en la utilización de PCR de emulsión para la amplificación monoclonal, y la secuenciación mediante iones semiconductores (21). La plataforma identifica los nucleótidos mediante la detección de los protones que liberan éstos al ser incorporados en la cadena de ADN (33). Esto provoca un cambio en el pH de la solución, que se detecta en un sistema semiconductor de óxido metálico (CMOS, *Complementary Metal Oxide Semiconductor*), tras lo cual un chip con un sensor electroquímico mide dicha variación (21). La magnitud del cambio de pH se relaciona con el número de moléculas de la base incorporada (34). De este modo, la señal eléctrica se transforma en una secuencia de ADN, sin necesidad de emplear productos químicos, fluorescentes o medidas ópticas (35).

2.7. Paneles genéticos. Clasificación de las variantes

Junto con el avance de la NGS, se han desarrollado paneles genéticos para el análisis de genes previamente determinados, diseñados para la entidad en cuestión. En el caso del cáncer hereditario, se encuentran comercializados diversos paneles de genes asociados a cada tipo de cáncer (21), facilitando así el estudio de mutaciones de los genes más relevantes implicados en su desarrollo.

Los paneles multigénicos suelen incluir genes de alta y moderada penetrancia, pudiendo incluir además otros genes de penetrancia más baja o que confieren un riesgo aún no determinado (36).

En el caso concreto del cáncer de mama, existen paneles diseñados para la identificación de mutaciones en BRCA1 y BRCA2, y paneles multigénicos que también incluyen otros genes asociados al cáncer de mama de diferente penetrancia. La

inclusión del estudio de nuevos genes de alta o moderada penetrancia alta ha permitido incrementar en un 50% el diagnóstico genético de familias con cáncer de mama y ovario hereditario (13).

Cada vez más familias están siendo analizadas mediante paneles multigénicos, lo que permite obtener más información sobre genes aún no tan estudiados, permitiendo una estratificación de penetrancia más precisa y proporcionando datos sobre su contribución al riesgo de cáncer (36).

Por otro lado, la utilización de paneles multigénicos plantea nuevos retos. La posibilidad de analizar múltiples regiones genómicas mediante el estudio de múltiples genes diana ha traído consigo la identificación de un número cada vez mayor de variantes de importancia funcional y clínica desconocida (VUS por sus siglas en inglés, Variant of Unknown/Uncertain Significance) tanto en regiones codificantes como no codificantes. Por tanto, es necesario establecer su nivel de riesgo en pacientes portadores para un consejo genético más eficaz (17).

Para clasificar las variantes, el American College of Medical Genetics (ACMG) ha desarrollado un sistema de clasificación de cinco niveles en el que se recomienda el uso de una terminología específica para describir una variante: 'patogénica', 'probablemente patogénica', 'significado incierto', 'probablemente benigna' y 'benigna'. Esta clasificación se debe basar en los datos existentes sobre las variantes (por ejemplo, datos de población, datos computacionales, datos funcionales, datos de segregación, etc.) (37).

Se debe tener en cuenta que, en la actualidad, la mayoría de las variantes no tienen datos que respalden una asignación cuantitativa de la certeza de la variante a ninguna de las cinco categorías, dada la naturaleza heterogénea de la mayoría de las enfermedades. Se espera que, con el tiempo, se desarrollen nuevos enfoques experimentales y estadísticos para asignar de manera objetiva la confianza en la patogenicidad a las variantes (37).

3. Objetivos

- Evaluar la utilidad del empleo de paneles multigénicos en pacientes con antecedentes personales y/o familiares de cáncer de mama y/o ovario.
- Identificar aquellos genes diferentes a BRCA que puedan tener relevancia en el desarrollo de cáncer de mama y ovario.
- Establecer la relación genotipo-fenotipo mediante una revisión bibliográfica que relacione la evidencia existente sobre los genes mutados con los datos obtenidos en este trabajo.

4. Material y métodos

4.1. Material

El presente trabajo se ha elaborado a partir de una base de datos anonimizados formada por 5973 muestras para estudio de cáncer de mama y ovario hereditario del laboratorio de cáncer hereditario del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM). Dichas muestras han sido derivadas del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid y del Hospital Universitario de Burgos para su estudio.

Para poder realizar el estudio genético, los pacientes han de cumplir los criterios de inclusión para el programa de consejo genético de cáncer de mama y ovario hereditario de Castilla y León.

Los pacientes que cumplen con los criterios de inclusión, descritos en la tabla 2, son seleccionados para realizar un estudio genético a partir de una muestra de sangre, tras haber obtenido el correspondiente consentimiento informado.

Tabla 2. Criterios de inclusión en el programa de consejo genético en cáncer de mama y ovario hereditario de Castilla y León (38).

UN CASO INDEPENDIEMENTE DE LA HISTORIA FAMILIAR	DOS FAMILIARES DE PRIMER GRADO [†] CON ALGUNA DE ESTAS COMBINACIONES
A. Cáncer de mama (CM) y cáncer de ovario (CO) epitelial no mucinoso de alto grado sincrónico o metacrónico (o trompa de Falopio o peritoneal primario).	F. CM bilateral + otro caso de CM <50 años.
B. CM ≤ 35 años (o CM ≤ 40 años y familia no informativa [‡]).	G. CM en varón.
C. CM bilateral (el primero diagnosticado ≤ 40 años).	H. CM + CO epitelial no mucinoso de alto grado (o trompa de Falopio o peritoneal primario).
D. CM triple negativo ≤50 años.	I. 2 casos de CM diagnosticados <50 años.
E. CO epitelial no mucinoso de alto grado (o trompa de Falopio o peritoneal primario).	
TRES O MÁS FAMILIARES DIRECTOS (‡) CON CM Y/O CO	OTROS CASOS
J. ≥3 CM ± CO epitelial no mucinoso de alto grado (o trompa de Falopio o peritoneal primario).	K. Consultar con la UCG.
	L. Sujetos sanos pertenecientes a familias con mutación conocida en la familia.

[†] Menos de 2 mujeres que hayan vivido hasta los 45 años o más en cada rama familiar.

[‡] En la misma rama familiar (uno familiar de primer grado de los otros 2).

De las muestras incluidas en el programa de consejo genético, para este trabajo se seleccionaron aquellas que habían sido analizadas mediante secuenciación masiva con la plataforma Ion S5 disponible en el laboratorio de cáncer hereditario del IBGM.

4.2. Métodos

4.2.1. Extracción de DNA

Para realizar el estudio de mutaciones de cada paciente, se partió de una muestra de 10mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA-3K. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo utilizando el sistema MagNA Pure® Compact (Roche), utilizando el kit

“MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I” (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN se extrajo de linfocitos de sangre periférica utilizando el kit de purificación de ARN de sangre humana GeneMATRIX (EURx). Se estudió el ARN para la detección de alteraciones a nivel de splicing.

4.2.2. Cuantificación de la muestra

La integridad del material genético de cada muestra se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Para realizar la cuantificación del ADN, se utilizó el fluorómetro Qubit® 3.0 mediante el kit Qubit™ dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.3. Protocolo de secuenciación masiva Ion S5

Todas las muestras de ADN se analizaron en busca de mutaciones de la línea germinal mediante el sistema Ion S5 (Thermo Fisher Scientific).

La preparación de las librerías y el templado se realizaron con el sistema Ion Chef automatizado; luego se secuenciaron en Ion S5 con Ion 520 Chip (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se empleó un panel Ion AmpliSeq On-Demand de 35 genes, diseñado previamente por el laboratorio, para llevar a cabo el estudio de mutaciones. Se detallan los genes incluidos en este panel en la tabla 3.

Tabla 3. Genes incluidos en el panel Ion AmpliSeq On-Demand.

Penetrancia	Síndrome	Gen (secuencia de referencia)
Alta	CMOH	BRCA1 (NM_007294.3) BRCA2 (NM_000059.3)
Alta	LYNCH	MLH1 (NM_000249.3) MSH2 (NM_000251.2) MSH6 (NM_000179.2) PMS2 (NM_000535.5) EPCAM (NM_002354.2)
Alta	Otros	APC (NM_000038.5) BMPR1A (NM_004329.2) CDH1 (NM_004360.3) CDK4 (NM_000075.3) KRAS (NM_004985.3) MUTYH (NM_001128425.1) PTEN (NM_000314.4) SMAD4 (NM_005359.5) STK11 (NM_000455.4) TP53 (NM_000546.5)
Moderada y baja	Múltiples	ATM (NM_000051.3) ATR (NM_001184.3) BLM (NM_000057.2) BARD1 (NM_000465.2) BRIP1 (NM_032043.2) CHEK2 (NM_007194.3) FAM175A (NM_139076.2) FANCM (NM_020937.2) MEN1 (NM_000244.3) MRE11A (NM_005591.3) NBN (NM_002485.4) PALB2 (NM_024675.3) PRKAR1A (NM_002734.4) RAD50 (NM_005732.3) RAD51C (NM_058216.1) RAD51D (NM_002878.3) POLD1 (NM_001256849.1) POLE (NM_006231.2)

4.2.4. Análisis de los datos Ion Reporter

Los resultados de la secuenciación se alinearon con el genoma de referencia humano hg19 y se analizaron con el software Ion Reporter (Thermo Fisher Scientific).

Se utilizó secuenciación de Sanger automatizada directa para confirmar los resultados detectados por secuenciación paralela masiva. Para este fin, se utilizó el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) en un secuenciador de ADN ABI 3100 (Applied Biosystems).

4.3. Recogida de datos

Para la elaboración del presente trabajo, se ha partido de la base de datos de muestras para estudio de cáncer de mama y ovario hereditario del laboratorio de Cáncer Hereditario del IBGM.

Se seleccionaron aquellas muestras que fueron analizadas con la plataforma Ion S5, habiendo empleado para ello el panel multigénico Ion AmpliSeq On-Demand.

Tras realizar la distinción según el método de secuenciación, se llevó a cabo una búsqueda de aquellas familias en las que al menos hubiera un miembro de la familia que hubiera desarrollado cáncer y se hubiese encontrado mutación.

A partir de dichos datos, se seleccionaron aquellas muestras con mutación en genes distintos de BRCA1 y BRCA2 y se revisaron los antecedentes personales y familiares de cáncer de cada una de ellas, realizando una búsqueda bibliográfica para comprobar la relación entre el gen mutado y el fenotipo al que da lugar.

5. Resultados y discusión

5.1. Mutaciones detectadas

La base de datos está compuesta por 5973 muestras pertenecientes a 3717 familias, de las cuales 202 tenían mutación en BRCA1 y 306 en BRCA2; en total, se encontraron 508 familias portadoras de mutación en BRCA (13'67%). 42 familias son portadoras de mutaciones en genes diferentes de BRCA (1'13%).

Desde su introducción en 2018 en el laboratorio de cáncer hereditario del IBGM, 194 familias han sido analizadas mediante paneles multigénicos.

87 casos con cáncer y mutación fueron estudiados mediante paneles multigénicos, y se encontraron 23 casos con mutación en BRCA1 (26'44%), 48 casos con mutación en

BRCA2 (55'17%) y 16 casos con otros genes mutados (18'39%). Las variantes encontradas en genes diferentes de BRCA1 y BRCA2 se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Variantes genéticas halladas en genes distintos de BRCA1 y BRCA2 mediante paneles multigénicos.

Muestra	CR	Historia familiar	EA	Gen	Función	Exón	Proteína	cDNA	ClinVar ID
3352	D	Hna: CM	40	ATM	Nonsense	7	p.Arg248Ter	c.742C>T	P 181913
4688	H	CM+CO, Madre:CM, Hno:CCR, Tio.mat:CCR	68-73	ATM	Nonsense	10	p.Arg447Ter	c.1339C>T	P 127337
3947	J	O. Madre:CO, Hna:CO	59	ATM	Frameshift	40	p.Ser1993fs	c.5979_5983 delTAAAG	P 233016
5201	A	CM+CO	53-64	ATM	Nonsense	44	p.Glu2118Ter	c.6352G>T	NEW
4783	J	Madre:CG, Tia.mat:CM	45	ATM	Frameshift	56	p.Tyr2755fs	c.8264_8268 delATAAG	P 181865
4781	J	Hna:CM, Tia.mat:CM	47	ATM	Nonsense	62	p.Arg2993Ter	c.8977C>T	P 186330
4987	J	CM Hna:CM	52	ATM	Nonsense	62	p.Arg2993Ter	c.8977C>T	P 186330
2367	D	Hna:CM, M:CCR, Tia.mat:CE Tia.mat:CCR	41	BLM	Nonsense	7	p.Gln548Ter	c.1642C>T	P 127478
4233	J	Hna:CM, Sobrina:CO, Sobrina:CE	51	BRIP1	Splicing	I-3	-	c.206-2A>G	LP 187396
4265	D	Padre:CCR, 3tios.pat:CCR	41	BRIP1	Splicing	I-8	-	c.1140+1G>C	LP 491401
5085	J	2Hnas:CM, 1Hno:Me	65	FANCM	Nonsense	22	p.Arg1931Ter	c.5791C>T	P 526381
5114	H	Prima.mat:CO	56	PALB2	Splicing	I-7	-	c.2748+1G>T	P/LP 186035
4465	E	Padre:CP, tia.pat:CM, Tia.pat:CE	43	PALB2	Missense	4	p.Leu337Ser	c.1010T>C	B 126582
5542	J	3Tias.pat:CM, Madre:CM	53	PALB2	Frameshift	4	p.Asn450fs	c.1349delA	P 818920
4465	E	Padre:CP, tia.pat:CM, tia.pat:CE	43	POLE	Missense	19	p.Pro697Arg	c.2090C>G	UV 240423
4123	J	Hna:CO, 2Tias.pat:CO	47	RAD51D	Frameshift	2	p.Val32fs	c.94_95delGT	P/LP 86680
5197	D	Triple Neg, Hija:CM, Hna:CM	48	TP53	Missense	4	p.Thr125Met	c.374C>T	LP 183748

CR: Criterio de Inclusión; EA: Edad de Aparición del Tumor

CM: Cáncer de Mama; CO: Cáncer de Ovario; CCR: Cáncer Colorrectal; CG: Cáncer Ginecológico; CE: Cáncer de Endometrio; Me: Melanoma; CP: Cáncer de Próstata.

Hno/a: Hermano/hermana; mat: materno; pat: paterno

ClinVar: P=Patogénica, LP=Probablemente Patogénica, UV=Variante de significado incierto, B=Benigna

ClinVar ID: Número de Identificación de la mutación

Los resultados de la tabla muestran 17 variantes en 8 genes diferentes. Para su clasificación, se usó la base de datos de variantes ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

15 de las variantes están clasificadas como patogénicas o probablemente patogénicas. 10 de estos pacientes portadores han desarrollado cáncer antes de los 55 años. Estos

genes son de moderada penetrancia, a excepción del gen BLM, que es de baja penetrancia, pese a lo cual la muestra 2367 ha desarrollado cáncer de mama triple negativo a los 41 años y presenta historia familiar de cáncer. Los genes FANCM y POLE están implicados en otros tipos tumorales, y en los casos estudiados para la realización de este trabajo aparecen tumores como melanoma, cáncer de próstata y cáncer de endometrio.

La mayoría de los casos, 12 en total, cumplen criterio de inclusión como caso de cáncer de mama triple negativo o con historia familiar de tres o más casos.

De las 17 variantes, 4 son de tipo frameshift, que rompen la pauta de lectura debido a deleciones de nucleótidos y provocan una proteína truncada. Las mutaciones mayoritarias detectadas son de tipo nonsense o sin sentido, provocando un codón de parada de la transcripción prematuro y, por tanto, una proteína aberrante no funcional. Hay 3 variantes de tipo splicing, que afectan al procesamiento del ARN mensajero provocando un exon skipping (pérdida del exón). Las 3 variantes restantes son de tipo missense o de cambio de aminoácido, siendo una de ellas clasificada como benigna, otra de significado incierto y otra probablemente patológica.

5.2. Relación genotipo-fenotipo

En cuanto a los genes afectados, el gen mutado con mayor frecuencia fue ATM, encontrándose mutado en 7 muestras, siendo un total de 6 variantes diferentes, hallándose la variante repetida en dos casos de cáncer de la misma familia.

El gen ataxia telangiectasia mutado (ATM) es un gen supresor de tumores. La proteína ATM participa en la reparación del ADN y activa las vías de respuesta al daño del ADN (39).

Las mutaciones de ATM causan ataxia telangiectasia (AT), un trastorno neurodegenerativo autosómico recesivo que produce ataxia cerebelosa, anomalías oculomotoras, telangiectasias, inmunodeficiencia, infecciones sinopulmonares, radiosensibilidad y un riesgo elevado de cáncer. Dado que la ATM se asocia con un patrón de herencia autosómico recesivo, solo los individuos con 2 copias defectuosas se ven afectados por esta enfermedad (39,40).

Estudios epidemiológicos basados en familiares afectados tanto por AT como por cáncer de mama han encontrado que los portadores heterocigóticos de mutaciones ATM tienen un riesgo entre dos y tres veces mayor de desarrollar cáncer de mama, con un riesgo relativo mayor por debajo de los 50 años (39).

En la tabla 4, se observa que varios de los casos fueron incluidos para estudio genético debido a su historia familiar de cáncer de mama y/o ovario (criterio J). En dos casos, las pacientes desarrollaron tanto cáncer de mama como ovario, y uno de los casos desarrolló cáncer de mama triple negativo.

Tres de las pacientes desarrollaron cáncer de mama antes de los 50 años.

El caso de la paciente 3947, portadora de una mutación frameshift de ATM, muestra una historia familiar de cáncer de ovario. Fue incluida en el programa de consejo genético de CMOH debido a que 3 familiares y ella misma presentaron cáncer de ovario, en su caso concretamente un carcinoma seroso de alto grado. Se ha visto que la mutación de ATM confiere un riesgo tres veces mayor de padecer cáncer de ovario (41), lo cual explicaría los antecedentes personales y familiares de este caso. En la figura 1, se representa la historia familiar de esta paciente.

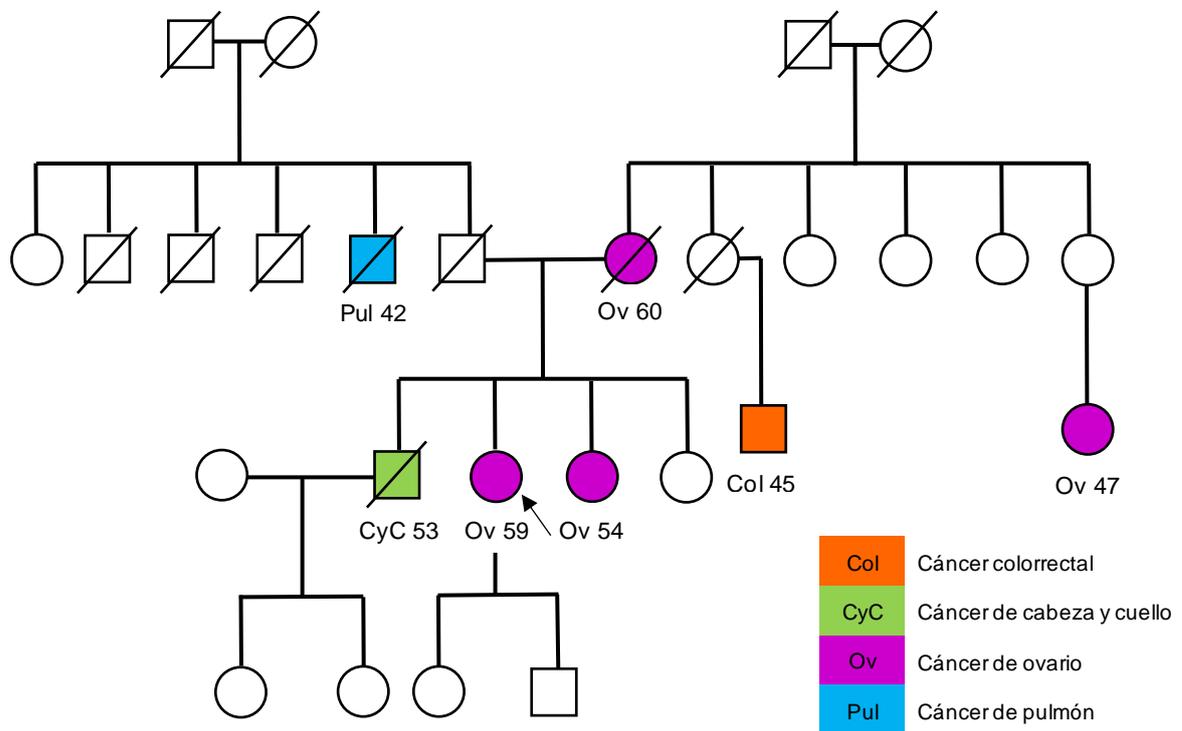


Figura 1. Árbol familiar de la portadora de la variante patológica c.5979_5983del en el gen ATM. Se detalla el tipo de cáncer y la edad de diagnóstico de cada persona. La flecha señala el caso índice.

PALB2 ocupa el segundo lugar en frecuencia de mutaciones halladas, habiéndose encontrado 3 variantes diferentes, una de ellas benigna.

El gen PALB2 interactúa con BRCA2. La mutación bialélica de PALB2, conocido también como FANCN, da lugar a la anemia de Fanconi. Los resultados obtenidos en un estudio de 2007 muestran que PALB2 es un gen de susceptibilidad al cáncer de mama y demuestran además la estrecha relación entre la vía FA (*Fanconi anemia*) de reparación del ADN y la predisposición al cáncer de mama (42). Algunos estudios también señalan una posible asociación entre las mutaciones de PALB2 y el cáncer de ovario (43).

La muestra 5114 muestra una historia familiar de diferentes tipos de cáncer, representada en la figura 2. La paciente desarrolló cáncer de mama derecha a los 43 años y cáncer de mama izquierda a los 56. Se ha observado que el riesgo de cáncer de mama para las mujeres portadoras de la mutación PALB2, en comparación con la población general, es de ocho a nueve veces mayor entre las menores de 40 años, de seis a ocho veces mayor entre las de 40 a 60 años, y cinco veces mayor entre los mayores de 60 años (44); esto se ve reflejado en la historia personal de cáncer de esta paciente. También se diagnosticó un cáncer de ovario en esta familia.

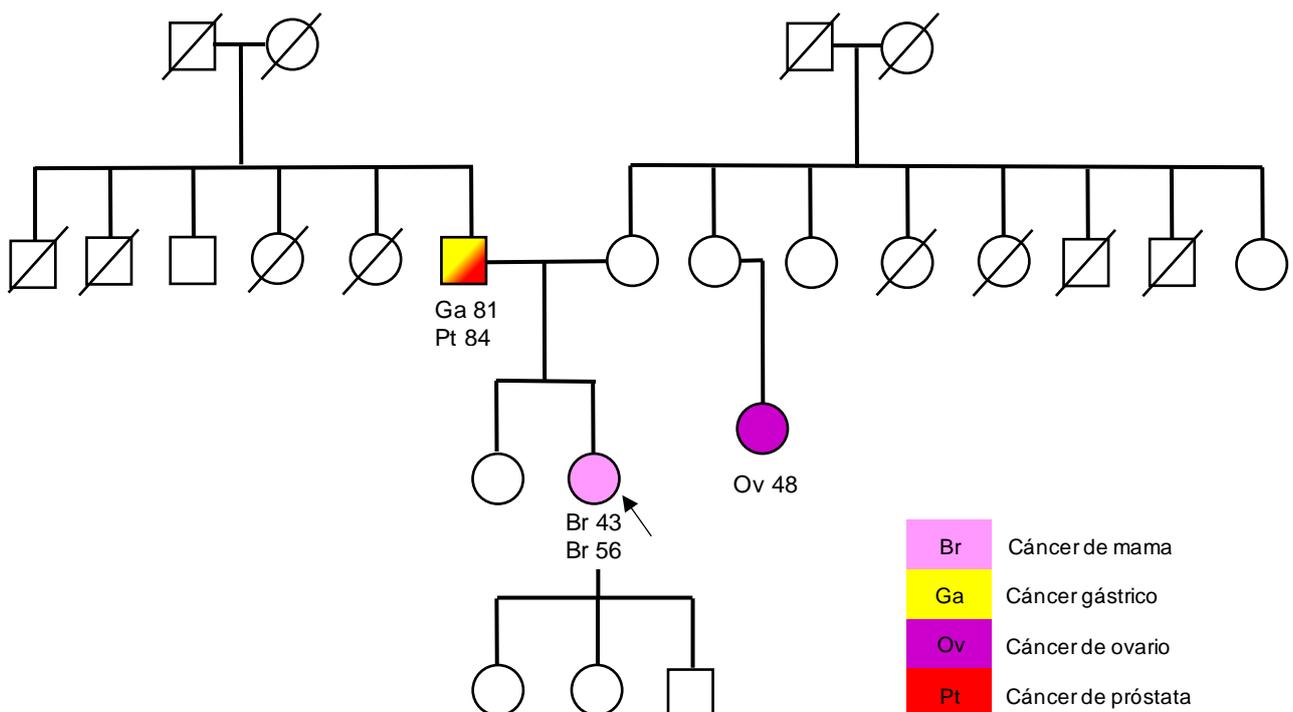


Figura 2. Árbol familiar de la portadora de la variante patológica c.2748+1G>T en el gen PALB2. Se detalla el tipo de cáncer y la edad de diagnóstico de cada persona. La flecha señala el caso índice.

En el caso de la paciente 5542, que desarrolló cáncer de mama a los 53 años, se observa una historia familiar de cáncer de mama. El riesgo de cáncer de mama durante la vida para PALB2 alcanza un 53%, modificado por antecedentes familiares (41), lo cual se refleja en el caso de esta paciente, que fue estudiada debido a que más de 3 familiares también lo desarrollaron.

En el caso de la muestra 4465, probablemente su historia familiar y personal de cáncer esté influenciada por la mutación en POLE, puesto que la variante que presenta en PALB2 es benigna.

BRIP1 se encuentra mutado en dos de las muestras, siendo ambas variantes probablemente patogénicas y de tipo splicing.

El gen BRIP1 es un gen supresor de tumores que interactúa con BRCA1 para reparar el ADN dañado. La mutación que ocurre en una copia del gen conduce a la producción de una versión anormalmente corta y no funcional de la proteína BRIP1. Cuando esta proteína es defectuosa o falta, no puede interactuar con la proteína BRCA1 y no repara eficazmente el ADN dañado (45).

En cuanto a los datos recogidos en este trabajo, la paciente 4265 desarrolló un cáncer de mama triple negativo de aparición a los 41 años, cuya aparición motivó el estudio genético, y presenta una historia familiar de cáncer colorrectal. Las variantes patogénicas de BRIP1 pueden tener un papel causal en el cáncer colorrectal como alelos de susceptibilidad al cáncer de penetrancia moderada y estar asociadas con la predisposición hereditaria al cáncer colorrectal (46), lo que coincide con los antecedentes familiares de esta paciente.

La paciente de la muestra 4233 desarrolló cáncer de mama a los 51 años. Destacan antecedentes familiares de cáncer de mama, ovario y endometrio. Aunque las mutaciones BRIP1 no se asocian con el riesgo de cáncer de mama en algunos estudios (47), otros sugieren que estas mutaciones pueden estar asociadas con un alto riesgo de cáncer de mama en pacientes con un cáncer de mama de inicio temprano o antecedentes familiares importantes de CM (48,49), lo que concordaría con la historia familiar de esta paciente.

En cuanto el resto de genes (BLM, FANCM, RAD51D y TP53), se encontró una variante de cada uno de ellos.

El síndrome de Bloom, causado por mutaciones homocigotas en BLM, es un trastorno hereditario que se caracteriza por baja estatura, cambios en la piel sensibles al sol y un mayor riesgo de cáncer. Las personas afectadas pueden desarrollar cualquiera de los cánceres que se encuentran en la población general, pero surgen inusualmente temprano en la vida y desarrollan más de un tipo. Las mutaciones de BLM en un estado homocigoto predisponen al cáncer de mama de aparición temprana con una edad media de diagnóstico de unos 33 años (50,51).

Algunos estudios no han obtenido una relación clara entre las mutaciones heterocigotas de BLM y cáncer de mama, y sugieren que este gen no debe incluirse en los paneles para uso clínico, desaconsejando la intensificación de la vigilancia en estas mujeres (52).

Sin embargo, en este trabajo, el caso de mutación nonsense c.1642C>T en BLM (muestra 2367) sí refleja una historia familiar de cáncer. La hermana de la paciente desarrolló cáncer de mama, así como la propia paciente a la que pertenece la muestra, siendo además un cáncer de mama triple negativo desarrollado a los 41 años, motivo por el que fue incluida para estudio de mutaciones. Otros dos familiares maternos desarrollaron cáncer de endometrio y cáncer colorrectal. Este resultado coincide con un estudio realizado en Rusia, publicado en 2012, en el que se estudió la misma variante que presenta la paciente de este trabajo. Dicha investigación calculó, para mutaciones heterocigotas de BLM, una odds ratio de 6'28 de padecer cáncer de mama, lo cual probablemente sea una sobreestimación debido al riesgo relativo real conferido por el cambio de proteína p.Gln548Ter (50).

FANCM es un gen supresor de tumores que codifica un translocasa de ADN conservada y de estructura específica. A diferencia del gen PALB2 (FANCN), la mutación bialélica no provoca la clínica propia de la anemia de Fanconi, pero sí predispone a la aparición de diversos tipos de cáncer y es causa de infertilidad (53).

Se han identificado portadores de mutaciones en FANCM entre pacientes con cáncer de mama y de ovario en diversas poblaciones. Estos hallazgos sugieren que la FANCM debería incluirse en pruebas de panel de genes de diagnóstico para la susceptibilidad al cáncer de mama y de ovario (53).

En este trabajo, el caso 5085, portadora de una mutación en FANCM, tenía dos hermanas afectas de cáncer de mama y un hermano con melanoma. Se trata de una mutación nonsense, lo cual coincide con la alta prevalencia de variantes nonsense monoalélicas encontradas en pacientes con cáncer de mama en estudios recientes (54).

En un estudio se observaron frecuencias de mutación en FANCM más altas en casos de cáncer de mama triple negativo frente a casos de cáncer de mama no seleccionados por fenotipo tumoral. Esto coincide con la asociación, estudiada en otra investigación, entre mutaciones de FANCM en línea germinal que provocan una proteína truncada y cáncer de mama triple negativo y de aparición temprana (54,55). Sin embargo, el cáncer de mama de la paciente 5085 no se corresponde con este fenotipo, habiéndolo desarrollado además a una edad más tardía (65 años).

POLE está involucrado en la replicación del ADN y recientemente ha sido reconocido como un gen de predisposición al cáncer hereditario, debido a que sus alteraciones están asociadas con el cáncer colorrectal y otros tumores (56).

Las investigaciones realizadas sobre este gen apuntan a un fenotipo asociado caracterizado por poliposis colorrectal atenuada u oligoadenomatosa, cáncer colorrectal, y probablemente tumores cerebrales (57). Existen dos familias descritas en la literatura en las que se informó de un astrocitoma y tumores de uréter, ovario y mama en portadores de mutación, así como de tumores colorrectales adicionales (58). Esto concordaría con el caso de la muestra 4465, que fue incluida en el programa de consejo genético debido a que desarrolló un carcinoma de ovario de alto grado. Entre sus antecedentes familiares, se encontró cáncer de próstata, de mama y endometrial. Destaca el hecho de que se trata de una variante de significado incierto según ClinVar, si bien el cambio p.Pro697Arg se halló anteriormente en dos individuos BRCA1/BRCA2 negativos con antecedentes personales de cáncer de mama (59).

RAD51D forma parte del complejo RAD51, que juega un papel esencial en las reacciones de reparación del ADN por recombinación homóloga. Las mutaciones en línea germinal de este gen se han asociado al síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, con un aumento del riesgo para cáncer de ovario, pero con una contribución más modesta al riesgo de cáncer de mama. En un estudio de 2011, el riesgo relativo de cáncer de ovario para las portadoras de la mutación RAD51D se estimó en 6'30. Los resultados de otro estudio realizado en 2015 fueron similares. En cambio, el riesgo relativo de cáncer de mama se estimó en 1'32, mientras que en otro estudio de 2020 se apuntó que el riesgo acumulado durante la vida de portadoras de variantes patogénicas podría llegar hasta al 46% (60–63).

El caso 4123 fue incluido en el programa de consejo genético debido a su historia familiar de cáncer de ovario. Esta paciente desarrolló cáncer de ovario a los 47 años,

habiéndolo desarrollado también otras 3 familiares suyas. En una investigación española publicada en 2018, se encontraron dos casos con la misma variante (c.94_95delGT) en dos pacientes con cáncer de ovario (64). Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en los estudios descritos anteriormente, confiriendo las mutaciones en RAD51D un riesgo relativo considerable de cáncer de ovario.

El gen TP53 es un gen supresor de tumores crucial, denominado comúnmente "el guardián del genoma". La proteína p53 del antígeno tumoral celular actúa en los puntos de control del ciclo celular deteniéndolo tras reconocer daños en el ADN. Las mutaciones en línea germinal de este gen causan una predisposición familiar al cáncer. Este síndrome fue observado por primera vez en 1969 por Li y Fraumeni, quienes describieron cuatro familias de niños con sarcomas de tejidos blandos (65).

Los pacientes que presentan mutaciones en el gen TP53 presentan un mayor riesgo de desarrollar diversas neoplasias malignas, incluido el cáncer de mama (66). El riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres con mutación de TP53 es muy alto, con una incidencia acumulada del 85% a la edad de 60 años en la cohorte del síndrome de Li-Fraumeni del National Cancer Institute (NCI; Instituto Nacional del Cáncer de EEUU). El riesgo alcanza su punto máximo aproximadamente a los 40 años (65).

Varias alteraciones en el gen p53 se han implicado en la patogenia del cáncer de mama. Se ha informado que ciertos codones del exón 4 y el intrón 3 están frecuentemente alterados entre varios grupos étnicos (66).

La variante de TP53 estudiada en este trabajo presentó un cáncer de mama triple negativo a los 48 años y antecedentes familiares de cáncer de mama. Se trata de una mutación de tipo missense. Algunos estudios muestran que las personas con mutaciones missense en la región de unión al ADN tenían tasas generales más altas de cáncer, con tasas significativamente más altas de cáncer de mama y tumores del sistema nervioso central en comparación con las personas con mutaciones missense en otras partes del gen o mutaciones que causan una proteína truncada (65).

5.3. Del diagnóstico al tratamiento

Hay una escasez de pautas que proporcionen recomendaciones de vigilancia y manejo de familiares portadoras de mutaciones en genes diferentes de BRCA1 y BRCA2. Existe una revisión bibliográfica publicada a finales de 2021 que reúne las guías existentes en

Europa sobre manejo de síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. En esta investigación, se recoge que, en portadoras de ATM, se recomienda iniciar la vigilancia principalmente a partir de los 40 años, así como realizar una resonancia magnética mamaria entre los 25 y 40 años. Para las portadoras de PALB2, se recomienda iniciar vigilancia mamaria mediante resonancia magnética entre los 25 y los 30 años. Para las portadoras de TP53, todas las guías recomiendan la resonancia magnética a partir de los 20 o 25 años, y ninguna recomienda la mamografía de mama (67).

Respecto a la prevención de la aparición de cáncer de mama, en el caso de mutaciones en TP53 se debe discutir la opción de una mastectomía profiláctica. En cambio, en el caso de otros genes asociados con el cáncer de mama y de ovario, no hay evidencia suficiente con respecto al beneficio de la cirugía de reducción de riesgo para recomendar la consideración de una mastectomía profiláctica y el manejo debe adaptarse en función de los antecedentes familiares (68).

En cuanto al tratamiento, los pacientes con síndromes tumorales asociados a POLE podrían mostrar respuestas favorables a la terapia con ICI (inhibidores de puntos de control inmunitarios). Sin embargo, la baja frecuencia de alteraciones en este gen y la falta de un enfoque estandarizado para las pruebas genéticas dificultan el diagnóstico de estos síndromes tumorales y por tanto un manejo más personalizado (56).

Los pacientes con cáncer de mama y mutaciones en PALB2 y RAD51D podrían beneficiarse de terapias específicas, como los inhibidores de la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), que han demostrado eficacia en pacientes con deterioro de la recombinación homóloga debido a mutaciones en BRCA1 o BRCA2 (61,69). Por otro lado, la ASCO considera que para pacientes con cáncer de mama con mutaciones en genes de penetrancia moderada, actualmente no hay datos sólidos que respalden el uso de inhibidores de PARP (70).

Dado que la implementación de los paneles multigénicos es muy reciente, surgen ciertas dificultades a la hora de realizar el manejo de los pacientes. Con el aumento del número de genes estudiados, aumentan las posibilidades de encontrar VUS. Esto añade complejidad al consejo genético y dificulta la interpretación de los datos. Además de ello, la falta de guías y recomendaciones sobre el manejo de portadores de genes de moderada y baja penetrancia dificulta las tareas de prevención y el manejo clínico de estos pacientes.

6. Conclusiones

- 1) Los resultados de este trabajo muestran cómo el uso de paneles genéticos mejora el diagnóstico del cáncer de mama hereditario y, por tanto, el manejo de las familias y su consejo genético. Las familias aquí identificadas hubieran tenido un resultado no concluyente si no se hubiera empleado un panel genético.
- 2) La detección de mutaciones en genes no sólo de alta penetrancia, como los genes BRCA1 y BRCA2, sino también de moderada y baja penetrancia, permite identificar el perfil molecular de los tumores y por tanto ajustar el tratamiento de los pacientes.
- 3) La identificación de mutaciones patogénicas en un mayor número de genes implicados en cáncer hereditario permite la detección precoz de familiares y su inclusión en programas de prevención.
- 4) Son necesarias nuevas investigaciones sobre genes diferentes de BRCA1 y BRCA2, puesto que un mayor conocimiento de los genes implicados en el desarrollo de cáncer de mama permitirá desarrollar nuevos protocolos para el manejo de pacientes portadores de estas mutaciones, llevar a cabo una adecuada profilaxis y la posibilidad de ofrecer un tratamiento más personalizado.

7. Bibliografía

1. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del cáncer en España 2022 [Internet]. [citado 22 de marzo de 2022]. Disponible en: https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.pdf
2. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Cáncer hereditario [Internet]. 3ª ed. 2019. [citado 17 de noviembre de 2021]. Disponible en: https://seom.org/images/Libro_Cancer_hereditario_2019.pdf
3. Nenclares P, Harrington KJ. The biology of cancer. *Medicine*. 2020 Feb;48(2):67–72.
4. Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N, Shin YK. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(6):2647–93.
5. Alcaide M, Rodríguez C, de Reyes S, Gallart R, Sánchez M, García J, et al. Molecular classification of breast cancer. Treatment and prognosis implications. *Cir Andal*. 2021 May 7;32(2):155–9.
6. Watkins EJ. Overview of breast cancer. *JAAPA*. 2019 Oct;32(10):13–7.
7. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. *JCO*. 2010 Apr 1;28(10):1684–91.
8. Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *The Breast*. 2012 Feb;21(1):50–7.
9. Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, Procter M, Goldhirsch A, de Azambuja E, et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early

- breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *The Lancet*. 2017 Mar;389(10075):1195–205.
10. Kast K, Link T, Friedrich K, Petzold A, Niedostatek A, Schoffer O, et al. Impact of breast cancer subtypes and patterns of metastasis on outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Apr;150(3):621–9.
 11. Hemminki K, Sundquist K, Sundquist J, Försti A, Hemminki A, Li X. Familial Risks and Proportions Describing Population Landscape of Familial Cancer. *Cancers*. 2021 Aug 30;13(17):4385.
 12. Haddad CF. Hereditary breast cancer: review and current approach. *Mastology*. 2020;30:e20200042.
 13. González-Santiago S, Ramón y Cajal T, Aguirre E, Alés-Martínez JE, Andrés R, et al. SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer (2019). *Clin Transl Oncol*. 2020 Feb;22(2):193–200.
 14. Chavarría GF, Blanco EG, Garita YM. Cáncer de mama asociado a mutación en genes BRCA-1 y BRCA-2. *Rev.méd.sinerg*. 2021 Mar 1;6(3):e650.
 15. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. *JAMA*. 2017 Jun 20;317(23):2402.
 16. Narod SA, Rodríguez AA. Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. *Salud pública de México*. 2011;53(5):10.
 17. Guglielmi C, Scarpitta R, Gambino G, Conti E, Bellè F, Tancredi M, et al. Detection of Germline Variants in 450 Breast/Ovarian Cancer Families with a Multi-Gene Panel Including Coding and Regulatory Regions. *IJMS*. 2021 Jul 19;22(14):7693.
 18. Feliubadaló L, López-Fernández A, Pineda M, Díez O, Valle J, Gutiérrez-Enríquez S, et al. Opportunistic testing of *BRCA1*, *BRCA2* and mismatch repair genes improves the yield of phenotype driven hereditary cancer gene panels. *Int J Cancer*. 2019 Nov 15;145(10):2682–91.
 19. Dawkins RL, Williamson JF, Lester S, Dawkins ST. Mutation versus polymorphism in evolution. *Genomics*. 2013 Apr;101(4):211–2.
 20. Brown AL, Li M, Goncarenco A, Panchenko AR. Finding driver mutations in cancer: Elucidating the role of background mutational processes. Nussinov R, editor. *PLoS Comput Biol*. 2019 Apr 29;15(4):e1006981.
 21. Colàs-Campàs L, Blanco-Silvente L, Espallargues M. Secuenciación de nueva generación (NGS) para el diagnóstico molecular y selección de dianas terapéuticas en enfermedades oncológicas. Madrid: Ministerio de Sanidad. Barcelona: Agència de Qualitat i Avaluació Sanitàries de Catalunya; 2021.
 22. Zanella I, Merola F, Biasiotto G, Archetti S, Spinelli E, Di Lorenzo D. Evaluation of the Ion Torrent PGM sequencing workflow for the routine rapid detection of *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations. *Experimental and Molecular Pathology*. 2017 Apr;102(2):314–20.
 23. Mardis ER. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Rev Anal Chem*. 2013 Jun 12;6(1):287–303.
 24. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977 Dec;74(12):5463–7.

25. Stranneheim H, Lundeberg J. Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnology Journal*. 2012 Sep;7(9):1063–73.
26. Long K, Cai L, He L. DNA Sequencing Data Analysis. *Methods Mol Biol*. 2018;1754:1-13.
27. Guan Y, Hu H, Peng Y, Gong Y, Yi Y, Shao L, et al. Detection of inherited mutations for hereditary cancer using target enrichment and next generation sequencing. *Familial Cancer*. 2015 Mar;14(1):9–18.
28. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016 Jun;17(6):333–51.
29. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clinical Chemistry*. 2009 Apr 1;55(4):641–58.
30. Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Milena A, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Univ. Med*. 2020 Jun; 61(2):49-63.
31. Velázquez C. Detección, análisis y clasificación de variantes genéticas en el diagnóstico molecular del cáncer hereditario [Internet]. Universidad de Valladolid; 2019. [citado 27 de abril de 2022]. Disponible en: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/35138>
32. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013 Dec;98(6):236–8.
33. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann Lab Med*. 2021 Jan;41(1):25–43.
34. Moorthie S, Mattocks CJ, Wright CF. Review of massively parallel DNA sequencing technologies. *HUGO J*. 2011 Dec;5(1–4):1–12.
35. Su Z, Ning B, Fang H, Hong H, Perkins R, Tong W, et al. Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2011 Apr;11(3):333–43.
36. Tsaousis GN, Papadopoulou E, Apeiros A, Agiannitopoulos K, Pepe G, Kampouri S, et al. Analysis of hereditary cancer syndromes by using a panel of genes: novel and multiple pathogenic mutations. *BMC Cancer*. 2019 Jun 3;19:535.
37. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015 May;17(5):405–24.
38. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad. Criterios de inclusión para acceder a las Unidades de Consejo Genético [Internet]. [citado 6 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/programas-guias-clinicas/programas-salud/programa-consejo-genetico-cancer-hereditario/criterios-inclusion-acceder-unidades-consejo-genetico.ficheros/773774-tabla%20resumen.pdf>
39. Stucci LS, Internò V, Tucci M, Perrone M, Mannavola F, Palmirota R, et al. The ATM Gene in Breast Cancer: Its Relevance in Clinical Practice. *Genes*. 2021 May 13;12(5):727.
40. Jerzak KJ, Mancuso T, Eisen A. Ataxia–Telangiectasia Gene (ATM) Mutation Heterozygosity in Breast Cancer: A Narrative Review. *Current Oncology*. 2018 Apr 1;25(2):176–80.

41. Cragun D, Weidner A, Tezak A, Clouse K, Pal T. Cancer risk management among female BRCA1/2, PALB2, CHEK2, and ATM carriers. *Breast Cancer Res Treat.* 2020 Jul;182(2):421–8.
42. Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):165–7.
43. Piombino C, Cortesi L, Lambertini M, Punie K, Grandi G, Toss A. Secondary Prevention in Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer Syndromes Other Than BRCA. *Journal of Oncology.* 2020 Jul 14;2020:1–10.
44. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkäs K, Roberts J, et al. Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in *PALB2*. *N Engl J Med.* 2014 Aug 7;371(6):497–506.
45. Sheikh A, Hussain SA, Ghorri Q, Naeem N, Fazil A, Giri S, et al. The Spectrum of Genetic Mutations in Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2015 Apr 3;16(6):2177–85.
46. Martín-Morales L, Garre P, Lorca V, Cazorla M, Llovet P, Bando I, et al. *BRIP1*, a Gene Potentially Implicated in Familial Colorectal Cancer Type X. *Cancer Prevention Research.* 2021 Feb 1;14(2):185–94.
47. Suszynska M, Klonowska K, Jasinska AJ, Kozłowski P. Large-scale meta-analysis of mutations identified in panels of breast/ovarian cancer-related genes — Providing evidence of cancer predisposition genes. *Gynecologic Oncology.* 2019 May;153(2):452–62.
48. Byrnes GB, Southey MC, Hopper JL. Are the so-called low penetrance breast cancer genes, ATM, BRIP1, PALB2 and CHEK2, high risk for women with strong family histories? *Breast Cancer Res.* 2008 Jun;10(3):208.
49. Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet.* 2006 Nov;38(11):1239–41.
50. Sokolenko AP, Iyevleva AG, Preobrazhenskaya EV, Mitiushkina NV, Abysheva SN, Suspitsin EN, et al. High prevalence and breast cancer predisposing role of the BLM c.1642 C>T (Q548X) mutation in Russia. *Int J Cancer.* 2012 Jun 15;130(12):2867–73.
51. Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Front Biosci.* 2013;18(4):1358.
52. Kluźniak W, Wokołorczyk D, Rusak B, Huzarski T, Kashyap A, Stempa K, et al. Inherited Variants in BLM and the Risk and Clinical Characteristics of Breast Cancer. *Cancers.* 2019 Oct 13;11(10):1548.
53. Basbous J, Constantinou A. A tumor suppressive DNA translocase named FANCM. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2019 Jan 2;54(1):27–40.
54. Schubert S, Luttikhuisen JL, Auber B, Schmidt G, Hofmann W, Penkert J, et al. The identification of pathogenic variants in *BRCA1/2* negative, high risk, hereditary breast and/or ovarian cancer patients: High frequency of *FANCM* pathogenic variants. *Int J Cancer.* 2019 Jun;144(11):2683–94.
55. Hahnen E, Hauke J, Engel C, Neidhardt G, Rhiem K, Schmutzler RK. Germline Mutations in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care.* 2017;12(1):15–9.
56. Magrin L, Fanale D, Brando C, Fiorino A, Corsini LR, Sciacchitano R, et al. *POLE*, *POLD1*, and *NTHL1*: the last but not the least hereditary cancer-predisposing genes. *Oncogene.* 2021 Oct 7;40(40):5893–901.

57. Bellido F, Pineda M, Aiza G, Valdés-Mas R, Navarro M, Puente DA, et al. POLE and POLD1 mutations in 529 kindred with familial colorectal cancer and/or polyposis: review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance. *Genetics in Medicine*. 2016 Apr;18(4):325–32.
58. Valle L, Hernández-Illán E, Bellido F, Aiza G, Castillejo A, Castillejo MI, et al. New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis. *Human Molecular Genetics*. 2014 Jul 1;23(13):3506–12.
59. Dutil J, Teer JK, Golubeva V, Yoder S, Tong WL, Arroyo N, et al. Germline variants in cancer genes in high-risk non-BRCA patients from Puerto Rico. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1):17769.
60. Madariaga L A, Sanabria S DE, Gutiérrez C LD. Mutaciones del gen RAD51 en el cáncer familiar de ovario: revisión de la literatura. *Rev chil obstet ginecol*. 2015 Apr;80(2):166–74.
61. Loveday C, Turnbull C, Ramsay E, Hughes D, Ruark E, et al. Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet*. 2011 Sep;43(9):879–82.
62. Song H, Dicks E, Ramus SJ, Tyrer JP, Intermaggio MP, Hayward J, et al. Contribution of Germline Mutations in the *RAD51B*, *RAD51C*, and *RAD51D* Genes to Ovarian Cancer in the Population. *JCO*. 2015 Sep 10;33(26):2901–7.
63. Yang X, Song H, Leslie G, Engel C, Hahnen E, Auber B, et al. Ovarian and Breast Cancer Risks Associated With Pathogenic Variants in *RAD51C* and *RAD51D*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2020 Dec 14;112(12):1242–50.
64. Bonache S, Esteban I, Moles-Fernández A, Tenés A, Duran-Lozano L, Montalban G, et al. Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Dec;144(12):2495–513.
65. Schon K, Tischkowitz M. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Jan;167(2):417–23.
66. Kaur RP, Vasudeva K, Kumar R, Munshi A. Role of p53 Gene in Breast Cancer: Focus on Mutation Spectrum and Therapeutic Strategies. *CPD*. 2018 Dec 8;24(30):3566–75.
67. Marmolejo DH, Wong MYZ, Bajalica-Lagercrantz S, Tischkowitz M, Balmaña J, Patócs AB, et al. Overview of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) guidelines across Europe. *European Journal of Medical Genetics*. 2021 Dec;64(12):104350.
68. Krontiras H, Farmer M, Whatley J. Breast Cancer Genetics and Indications for Prophylactic Mastectomy. *Surgical Clinics of North America*. 2018 Aug;98(4):677–85.
69. Domchek SM. Reversion Mutations with Clinical Use of PARP Inhibitors: Many Genes, Many Versions. *Cancer Discovery*. 2017 Sep 1;7(9):937–9.
70. Tung NM, Boughey JC, Pierce LJ, Robson ME, Bedrosian I, Dietz JR, et al. Management of Hereditary Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology, American Society for Radiation Oncology, and Society of Surgical Oncology Guideline. *JCO*. 2020 Jun 20;38(18):2080–106.



Abordaje del cáncer de mama familiar mediante NGS. Del genotipo al fenotipo

Autora: Ana Isabel García Aguilera
Tutora: Dra. Mercedes Durán Domínguez

Introducción

El cáncer de mama hereditario representa un 10-15% de los cánceres de mama. Con el desarrollo de la NGS, es posible estudiar genes distintos de BRCA1 y BRCA2. Para este fin, se emplean paneles multigénicos, que detectan variantes de genes de alta, moderada y baja penetrancia.

Objetivos

- Evaluar la utilidad del empleo de paneles multigénicos.
- Identificar genes diferentes a BRCA que aumenten el riesgo de cáncer de mama y ovario.
- Establecer relaciones genotipo-fenotipo.

Materiales y métodos

Base de muestras del laboratorio de cáncer hereditario del IBGM. Se estudiaron las muestras de pacientes con cáncer que presentaban mutación en genes diferentes de BRCA y que habían sido analizadas mediante la plataforma de NGS Ion S5.

Resultados

17 variantes en 8 genes diferentes: ATM, BLM, BRIP1, FANCM, PALB2, POLE, RAD51D y TP53. Se trata de genes de moderada penetrancia, a excepción de BLM, que es de baja penetrancia.

Conclusiones

Los paneles genéticos mejoran el diagnóstico del cáncer de mama hereditario gracias a la detección de mutaciones en genes de moderada y baja penetrancia, lo que permite la detección precoz de familiares y su inclusión en programas de prevención. Son necesarias nuevas investigaciones para la elaboración de nuevas pautas para su manejo.

Bibliografía

1. González-Santiago S, Ramón y Cajal T, Aguirre E, Alés-Martínez JE, Andrés R, et al. SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer (2019). Clin Transl Oncol. 2020 Feb;22(2):193–200.
2. Suszynska M, Klonowska K, Jasinska AJ, Kozlowski P. Large-scale meta-analysis of mutations identified in panels of breast/ovarian cancer-related genes — Providing evidence of cancer predisposition genes. Gynecologic Oncology. 2019 May;153(2):452–62.

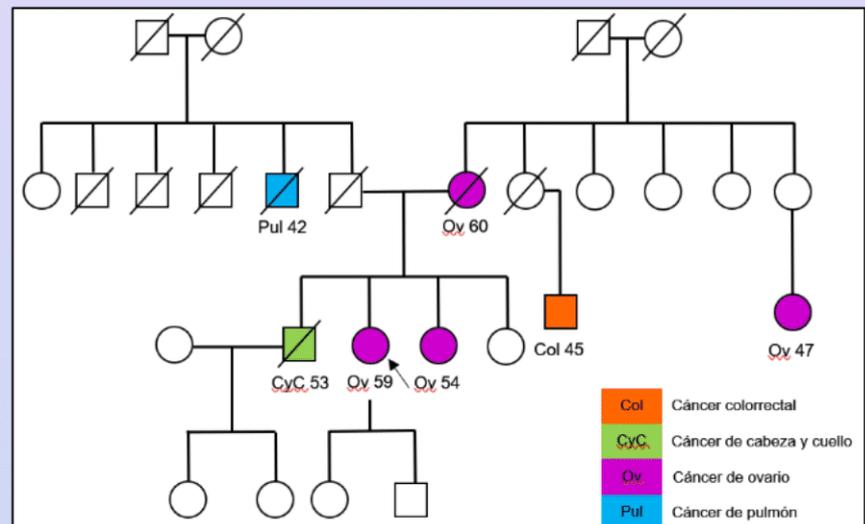


Figura 1. Árbol familiar de la portadora de la variante patológica c.5979_5983del en el gen ATM.

Tabla 1. Variantes halladas mediante paneles multigénicos.

Gen	Variantes	Cáncer encontrado
ATM	6 P, 1 no descrita	Mama, ovario, colon
BLM	1 P	Mama, endometrio, colon
BRIP1	2 LP	Mama, ovario, endometrio, colon
FANCM	1 P	Mama, melanoma
PALB2	2 P/LP, 1 B	Mama, ovario, endometrio, próstata
POLE	1 VUS	Mama, endometrio, próstata
RAD51D	1 P	Ovario
TP53	1 LP	Mama