

---

# ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN FAMILIAS CON HISTORIA DE CÁNCER DE PRÓSTATA.

---



**Autor:** Alonso Capellán Sanjuán

**Directoras:** Dra. Mercedes Durán y Dra. María del Mar Infante

**Fecha:** junio de 2023

Trabajo Fin de Máster | Máster en Investigación Biomédica





## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS .....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Genética del cáncer .....	1
2. Cáncer hereditario: Factores de susceptibilidad .....	2
3. Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (CMOH).....	2
3.1. CMOH y su relación con otros cánceres.....	3
4. Cáncer de próstata (CaP).....	4
4.1. Historia del CaPH .....	4
4.2. Genética del CaPH.....	5
5. Programas de prevención del cáncer hereditario.....	6
6. Técnicas de diagnóstico genético-molecular .....	6
7. Paneles genéticos.....	7
8. Clasificación de las variantes genéticas .....	7
9. Fenotipos tumorales .....	8
9.1. Consideraciones anatómicas de la próstata .....	8
9.2. Cáncer de próstata primario y multifocal:.....	9
9.3. Cáncer de próstata metastásico .....	9
9.4. Mutaciones troncales.....	9
OBJETIVOS.....	9
MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
1. Selección de Muestras.....	10
2. Procesamiento de muestras.....	10
2.1. Extracción de ácidos nucleicos .....	10
2.2. Extracción de DNA y pellet de DNA.....	10
3. Análisis de las muestras por secuenciación masiva NGS: panel <i>BRCA</i> <i>extendido ONCOMINE de 17 genes</i> mediante tecnología <i>Ion AmpliSeq™</i> .....	10
3.1. Evaluación y cuantificación de las muestras .....	11
3.2. Preparación de las bibliotecas genómicas .....	11
3.3. Templado .....	11
3.4. Secuenciación .....	11
3.5. Análisis de resultados.....	11
4. Confirmación de las variantes identificadas .....	12
4.1. Amplificación, purificación y cuantificación de la región DNA de interés	12
4.2. Reacción de secuenciación, purificación, electroforesis capilar y análisis de resultados .....	12
5. Caracterización de las variantes identificadas .....	12
RESULTADOS .....	13
1. Análisis panel <i>BRCA</i> extendido ONCOMINE de 17 genes.....	13
2. Familias con mutaciones Patogénicas o Probablemente patogénicas.....	13
DISCUSIÓN.....	16
1. Utilidad del análisis de paneles genéticos en familias con antecedentes de cáncer de próstata .....	16
2. Contribución de las variantes patogénicas detectadas al cáncer de próstata hereditario.....	16
2.1. <i>BRCA2</i> .....	16
2.2. <i>ATM</i> .....	17
2.3. <i>BARD1</i> .....	18
2.4. <i>CHEK2</i> .....	18
CONCLUSIONES.....	19
BIBLIOGRAFÍA.....	19

## RESUMEN

El cáncer de próstata hereditario (CaPH) representa el 5-15% de los casos de cáncer de próstata diagnosticados. Este subtipo de cáncer está asociado a variantes patogénicas en genes supresores de tumores de la línea germinal, incluyendo otros genes más allá de los BRCA1/2. En este trabajo se ha evaluado la implementación de un panel de 17 genes mediante tecnología Ion *AmpliSeq* en 48 pacientes seleccionados por Criterios de inclusión en el programa de Consejo Genético en Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (CMOH) de Castilla y León, y con historial familiar de cáncer de próstata (CaP), identificando variantes patogénicas y probablemente patogénicas en el 17% de los casos (8,5% en el gen *BRCA2* y 8,5% en otros genes). Los resultados reflejan la contribución de variantes patogénicas comunes entre distintos tipos de cáncer, especialmente el CMOH y el CaPH de fenotipos característicos. Los resultados aportados pueden mejorar el Consejo Genético y el manejo de familiares a riesgo en estos casos.

## ABREVIATURAS

- TSG (*Tumor Supressing Gene*): gen supresor de tumores.
- ASIR (*Average Standarized Incidence Rate*): razón de incidencia estandarizada media.
- ASMR (*Average Standardized Mortality Rate*): razón de mortalidad estandarizada media.
- mCRPC (*Metastatic castration-resistant prostate cancer*): cáncer de próstata resistente a castración.
- CaPH: cáncer de próstata hereditario.
- CMOH: síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario
- HRR (*Homologous Recombination Response gene*): genes de reparación homóloga
- RR (*Relative Risk*): riesgo relativo de una enfermedad.
- MMR (*MisMatch Repair gene*): genes de reparación de los errores de emparejamiento.
- CNV (*Copy Number Variation*): variación en el número de copias.
- NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*): Red Nacional Integral del Cáncer.
- NMD (*Nonsense mRNA Decay pathway*): ruta de degradación de mRNA sin sentido.
- IDC (*Invasive Ductal Carcinoma*): carcinoma ductal invasivo.
- ER+ (*Estrogen Receptor positive*): positivo a receptor de estrógenos.
- HER2- (Human Epidermal growth factor Receptor 2 negative): negativo al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

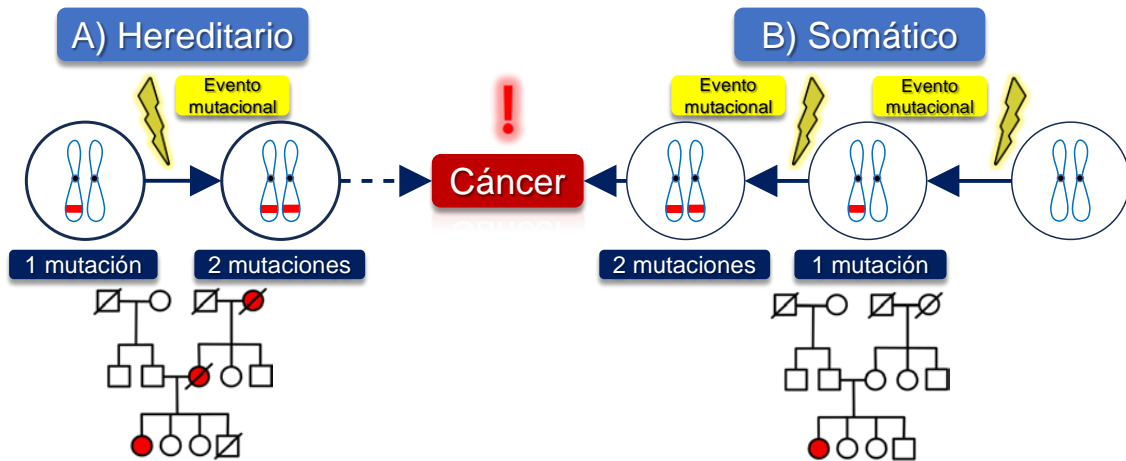
## INTRODUCCIÓN

### 1. Genética del cáncer

El cáncer engloba un grupo de enfermedades cuyo origen común es el crecimiento y multiplicación descontrolada de las células del organismo debido a mutaciones en genes que controlan el ciclo celular y la estabilidad genómica. Los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores (TSG) son dos tipos de genes importantes en la etiología del cáncer. Los proto-oncogenes son genes que inducen el crecimiento y diferenciación celular, estos genes al adquirir una única mutación de ganancia de función en uno de sus alelos pueden transformarse en oncogenes que se caracterizan por permanecer activos de manera constante promoviendo el crecimiento y la división celular descontrolada (1), fenómeno que conduce de forma irremediable al cáncer. Por otro lado, si hay mutaciones que provocan pérdida funcional en ambos alelos de un TSG pueden inactivar o disminuir su actividad, permitiendo que las células crezcan y se dividan de manera descontrolada, lo que puede conducir a cáncer (Figura1) (2).

## 2. Cáncer hereditario: Factores de susceptibilidad

Las mutaciones pueden ser adquiridas o heredadas (4,3); la diferencia entre ambas es que las segundas han transmitido a la línea celular germinal, por lo tanto, se encuentran en todas las células del individuo y se pueden transmitir a la descendencia mediante los gametos (4).



**Figura 1.** Hipótesis "Two-Hit" de Knudson (5). Ejemplo de árboles genealógicos de casos de cáncer en cada uno de los casos (a y b) a la derecha.

Las mutaciones heredadas relacionadas con la aparición del cáncer suelen contenerse en los TSG (6) y aquellos individuos portadores necesitarían de un solo evento mutagénico en el alelo inalterado para producir patogénesis; este mecanismo (Figura 1) se explica mediante la hipótesis "Two-Hit" de Knudson (5).

El 5-10% de todos los casos de cáncer se deben a mutaciones en línea germinal y se incluyen en síndromes de predisposición al cáncer hereditario (7, 28). Estas mutaciones no solo aumentan el riesgo de desarrollar cáncer, sino que también determinan el tipo de tumor según el gen alterado (6). Los síndromes de predisposición hereditaria al cáncer tienen herencia autosómica dominante por norma general, y se caracterizan por alta presencia de cáncer en la historia familiar con afectación en varias generaciones y además de una aparición temprana de tumor (7,6).

## 3. Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (CMOH)

El cáncer de mama (CM) es el tipo de cáncer más común en mujeres después del cáncer de piel no melanoma, afectando alrededor del 12% de ellas (8). Aunque la mayoría de los casos son esporádicos, aproximadamente el 10-15% tiene un componente hereditario debido a mutaciones genéticas transmitidas de padres a hijos (8). Sin embargo, existe otra categoría llamada cáncer familiar, que abarca aproximadamente el 15-20% de los casos, donde no se han encontrado mutaciones claras que expliquen el aumento de la incidencia en ciertas familias. Si bien en algunos casos se han identificado mutaciones relacionadas con el cáncer familiar, no siempre se encuentran explicaciones genéticas claras para todos los casos, esto sugiere que factores genéticos compartidos y otros factores ambientales o socioeconómicos podrían desempeñar un papel en estos casos de cáncer familiar (8).

El cáncer de mama hereditario (CMH) es un síndrome que aumenta la predisposición al cáncer de mama, y aproximadamente el 25-28% de los casos se deben a mutaciones heredadas en *BRCA1* y *BRCA2* que son genes de reparación homóloga (9). Estas mutaciones también se relacionan con un mayor riesgo de cáncer de ovario (CO), por lo que se agrupan como el síndrome de CMOH (10). La frecuencia de mutaciones en *BRCA1/2* varía en diferentes poblaciones, siendo más comunes en personas de ascendencia judía askenazi (11). Ambos genes son de alta penetrancia en el contexto

de esta enfermedad, el riesgo de cáncer de mama a lo largo de la vida es del 72% para *BRCA1* y del 69% para *BRCA2* (12). *BRCA1* se asocia principalmente con TNBC (cáncer de mama triple negativo), mientras que *BRCA2* está más relacionado con cánceres hormonales (12) y además con el cáncer de mama en hombres (13).

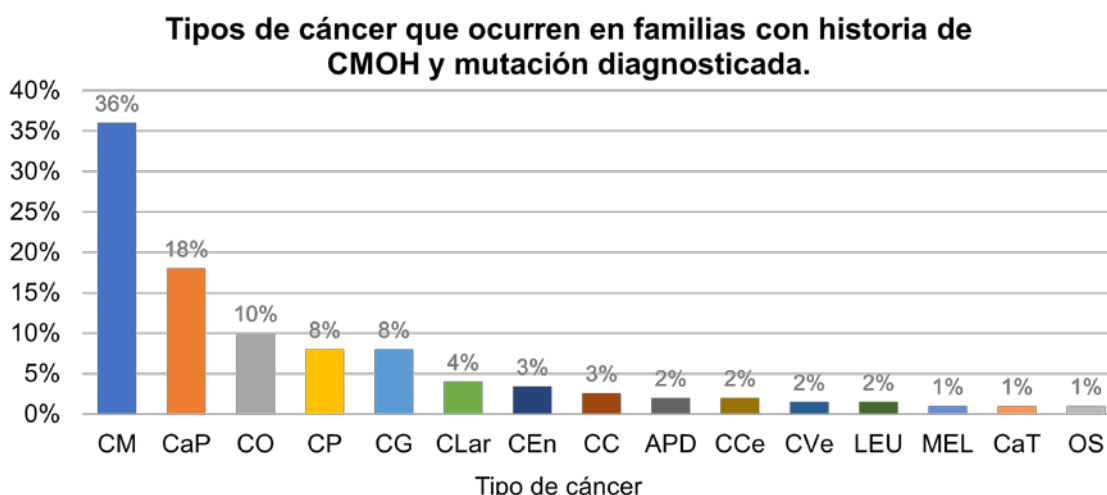
**Tabla 1.** Genes relacionados con el CMH, acompañado del nivel de penetrancia, riesgo y edad de aparición.

GEN	PENETRANCIA	RIESGO	EDAD DE APARICIÓN
<i>BRCA1</i>	ALTA	41-90%	25-30
<i>BRCA2</i>	ALTA	41-90%	25-30
<i>TP53</i>	ALTA	≈ 54%	20-30
<i>PTEN</i>	ALTA	≈ 25-80%	30-35
<i>CDH1</i>	MODERADA	39-52%	30
<i>NF1</i>	MODERADA	≈ 40%	30
<i>PALB2</i>	MODERADA	≈ 33-58%	30
<i>STK11</i>	MODERADA	32-54%	30
<i>ATM</i>	MODERADA	33-69%	40
<i>BARD1</i>	MODERADA	DESCONOCIDO	40
<i>CHEK2</i>	MODERADA	28-37%	40

El CMOH presenta un patrón de herencia autosómico dominante y se caracteriza por una fuerte historia familiar de CM y CO, con aparición temprana y bilateralidad (14). En comparación con el cáncer de mama esporádico, el CMOH tiene un diagnóstico más temprano, una mayor agresividad y tasas de supervivencia más bajas (15). Existen mutaciones en otros genes (Tabla 1) de alta penetrancia relacionados con el CMH como *TP53* y *PTEN*; mientras que *CDH1*, *NF1*, *STK11*, *ATM*, *BARD1* y *CHEK2* son de penetrancia moderada. Hay mutaciones en *PTEN* consideradas de penetrancia moderada tanto para el CM como el CO, por lo que muchos autores lo incluyen también entre los causantes del CMOH junto con *BRCA1/2* (8).

### 3.1. CMOH y su relación con otros cánceres

El historial familiar de casos de CM y/o CO es uno de los factores de riesgo más importantes en comparación con la edad, raza, etnia y factores ambientales para el desarrollo de cáncer de próstata (CaP), y este riesgo se estima en un 40%–50% (16); un estudio realizado por D'Elia et al. en 2022 (17) demostró que el CaP está presente en segundo lugar entre familias con historia de CMOH y variantes patogénicas ya diagnosticadas (Figura 2), incluso por encima del CO. Por otra parte, un estudio encontró que existe un riesgo aumentado (*OR*: 4) de padecer cáncer de pulmón (CP) de origen primario al pertenecer a una familia con historial de CMOH y portadoras de variantes patogénicas en la línea germinal del gen *ATM* (18), por lo tanto, también existe un componente genético y hereditario común entre estas 2 enfermedades. También se conoce que algunas mutaciones de pérdida de función en la línea germinal del gen *CDH1* están relacionadas con CMOH y el cáncer gástrico (CG) difuso (19), es por ello por lo que las pautas de la NCCN recomiendan que las mujeres con mutaciones en *CDH1* se sometan a exámenes regulares de mama con mamografía anual y resonancia magnética de mama, así como a gastrectomía total profiláctica o a esofagogastroduodenoscopia regular con múltiples biopsias aleatorias (19).



**Figura 2.** Tipos de cáncer más comunes, que ocurren en familias con historia de CMOH y alguna variante patogénica diagnosticada. *BC: Cáncer de mama; CaP: Cáncer de próstata; CO: Cáncer de ovario; CP: Cáncer de pulmón; CG: Cáncer gástrico; CLar: Cáncer de laringe; CEn: Cáncer de endometrio; CC: Cáncer de colon; APD: Adenocarcinoma pancreático ductal; CCe: Cáncer cerebral; CVe: Cáncer de vejiga; LEU: Leucemia; MEL: Melanoma; CaT: Cáncer de tiroides; OS: Osteosarcoma.* Gráfico generado por datos provenientes de D'Elia et al (17).

#### 4. Cáncer de próstata (CaP)

El CaP representa a nivel global el segundo tipo de cáncer más común diagnosticado entre hombres y además es la quinta causa de muertes en este grupo (21, 20). Desde el año 2000 hasta 2019, los valores de razón de incidencia estandarizada media (ASIR) han aumentado en la mayoría de los países industrializados, mientras que los valores de razón de mortalidad estandarizada media (ASMR) han ido disminuyendo (21). Los factores de riesgo más comunes son la edad avanzada (>65 años), la raza negra (afroamericana) y los antecedentes familiares. (22, 20, 23) Generalmente la enfermedad es asintomática al inicio, pero los síntomas como el dolor de espalda y la retención urinaria comienzan a agravarse al progresar (20). Se sabe que, de todos los casos de CaP, probablemente el 8% son causados por factores heredables (23).

La próstata es un órgano principalmente secretor y formado por distintos tejidos; de entre estos destaca el tejido epitelial glandular, siendo este el más importante en el desarrollo de los tumores más comunes (24). El tumor de próstata más común es el adenocarcinoma acinar (88-92%) (24), seguido del adenocarcinoma ductal (3%) (24). El procedimiento recomendado para la detección del CaP se realiza mediante la comprobación de altas concentraciones en plasma sanguíneo del antígeno específico de próstata (PSA), seguido de la realización de una biopsia; aun así, se han encontrado pacientes positivos sin elevado PSA (20).

##### 4.1. Historia del CaPH

En 1853, J. Adams describió el primer caso de CaP mediante un examen histológico. En 1930, Ethel Gutman y Alexander Gutman descubrieron que los niveles de fosfatasa ácida en suero aumentaban en pacientes con CaP metastásico. Charles Huggins demostró el efecto de la castración y la administración de estrógenos en la atrofia glandular reversible, y recibió el Premio Nobel en 1966. Durante los años 1970-1980 se desarrollaron nuevos enfoques para bloquear la producción de andrógenos o inhibir su interacción en el tejido objetivo mediante tratamientos hormonales (25). Las primeras evidencias sobre la relación del CaP y su transmisión familiar fue en varios estudios realizados sobre la población mormona de Utah entre 1958 y 1981, mostrando un mayor riesgo en las familias de hombres afectados (26). A diferencia del CM, los genes de susceptibilidad al CaP han sido difíciles de identificar. Estudios recientes han encontrado

alelos de alto riesgo en varios loci genéticos, pero la asociación con el gen *ELAC2* de forma general ha sido cuestionada (27).

#### 4.2. Genética del CaPH

De todas las neoplasias que afectan a hombres, el CaP tiene la heredabilidad más alta de todas (0,42) (16, 30, 23). Estudios en Escandinavia, estiman que hasta el 57% de la variación individual en el riesgo de CaP se debe a factores genéticos (36). Los loci susceptibles al CaPH se encuentran en todos los cromosomas a excepción del 15, 16, 21 y 23 (16). Se sabe que el cromosoma X está también implicado en la transmisión del CaPH debido a que contiene el receptor de andrógenos (AR) (20). El CaPH se suele presentar en familias con casos de síndromes hereditarios; incluyendo el CMOH y el Síndrome de Lynch (SL) (17, 28). Además, en familias con una predisposición alta al CMOH, el riesgo de CaP se duplica, y si hay casos de CaP y mama/ovario, el riesgo se eleva hasta 5.8 (23). Estudios familiares muestran que aquellos hombres con un familiar de primer grado afectado por CaP tienen el doble de riesgo de desarrollar la enfermedad comparado con aquellos sin antecedentes familiares (3.1 veces más si es un hermano y 2.4 veces más si es el padre), el riesgo también aumenta con la cantidad de parientes afectados en la familia y si el diagnóstico se realiza a una edad temprana (17, 23).

Se conoce que la proporción de casos de CaP atribuible al CaPH suele estar entre un 5-15% (29), y aproximadamente el 5% de los pacientes con CaP localizado de alto riesgo tienen mutaciones germinales en genes de reparación del ADN (28). Se conoce que entre el 8-12% de los pacientes con CaP metastásico tienen mutaciones de la línea germinal en muchos HRR como son: *BRCA2*, *CHEK2*, *ATM*, *BRIP1*, *HOXB13*, *RAD51*, *BRCA1* y *PALB2*, estos son por frecuencia los más comunes en orden decreciente (31, 36, 23). *BRCA2* es un gen localizado en el cromosoma 17q21 y sus mutaciones confieren un riesgo del 35-40% de desarrollar CaP, por otra parte, *BRCA1* es un gen localizado en el cromosoma 13q12 y sus mutaciones tienen una incidencia del 3-8% antes de los 65 años (35, 30). Ciertas mutaciones como c.5946delT en *BRCA2* son ya marcadores reconocidos por su relación con mal pronóstico en el progreso de la enfermedad (31, 16) ya que los portadores suelen presentar un fenotipo más agresivo y mayor tasa de mortalidad en comparación con los no portadores. Por otra parte, mutaciones en los genes de tipo MMR (genes de reparación de los errores de emparejamiento) como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* también se relacionan con la aparición y desarrollo de la enfermedad, aunque en menor medida, incrementando entre 2.5 a 8.6 veces el riesgo relativo (RR) de CaPr a los 65 años (17).

Es importante destacar que esta enfermedad mata a 7,5 millones de personas cada año desde 2012 (32) y la su detección temprana es fundamental para prevenir y tratar esta enfermedad de manera efectiva. La secuenciación genética se ha convertido en una herramienta vital en la prevención del cáncer, siendo la secuenciación masiva mediante técnicas NGS (*Next Generation Sequencing*) una de las más efectivas para detectar estas mutaciones (33). Las pruebas para detectar mutaciones en la línea germinal son importantes para el tratamiento del CaPH y la evaluación del cáncer hereditario. Los paneles genéticos incluyen genes con diferentes niveles de riesgo para el CaPH y otros tipos de cáncer. Algunos centros han elaborado recomendaciones para la selección del panel genético y los genes prioritarios en hombres con CaPH, y en aquellos con alto riesgo de padecerlo (34, 28). Un estudio interno del proyecto IMPACT en 2019 demostró que, la tasa de incidencia de CaP por cada 1,000 personas-año fue de 19 en hombres con mutaciones y 12 en aquellos sin mutaciones, lo cual es significativamente diferente (35). En comparación con los casos esporádicos, el CaPH muestra una edad temprana de aparición (17), una progresión agresiva de la enfermedad y un estadio localmente avanzado, con un mayor riesgo de recurrencia después de la cirugía (17).



## 5. Programas de prevención del cáncer hereditario

Las directrices de la NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) recomiendan considerar el asesoramiento y las pruebas genéticas para pacientes con antecedentes familiares de numerosos casos de cáncer. Las características histopatológicas del tumor también pueden ser importantes para derivar a los pacientes. La presencia de carcinoma intraductal se considera un criterio para el asesoramiento genético y las pruebas de detección de mutaciones, ya que se sabe que las mutaciones en hombres con CaP son un factor pronóstico adverso. Las guías NCCN también sugieren realizar pruebas genéticas en pacientes de alto riesgo con CaP localizado o metastásico. Desde la versión de NCCN (v4.2018), se recomienda considerar pruebas genéticas en hombres con historia familiar sugestiva de CMOH o SL (36).

En España, la *Sociedad española de Oncología Médica* (SEOM), agrupa una sección de cáncer hereditario que se encarga de redactar guías clínicas de carácter nacional, siguiendo los principios de la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) (14), en cada CC.AA. los criterios pueden verse modificados.

**Tabla 2.** Criterios seleccionados por la SEOM para realizar evaluación genética en línea germinal en CaPH (14).

<b>I. Independientemente de la historia familiar</b>	
Mujer con CM y CO sincrónico o metacrónico	CM $\leq$ 40 años
CM bilateral (el primero diagnosticado $\leq$ 50 años)	CMTN $\leq$ 60 años
CO epitelial no mucinoso de alto grado	CM metastásico HER2-negativo
Mutaciones somáticas en BRCA con frecuencia alélica (> 30%)	Mutaciones fundadoras en familiares
<b>II. Dos o más familiares de primer grado con alguna de las combinaciones</b>	
CM bilateral + otro CM < 60 años	CM masculino
CM y CO	Dos casos de CM < 50 años
<b>III. Tres o más familiares con CM (al menos uno pre-menopáusico) y/o CO y/o Cáncer de páncreas o cáncer de próstata de alto Gleason (<math>\geq</math> 7)</b>	

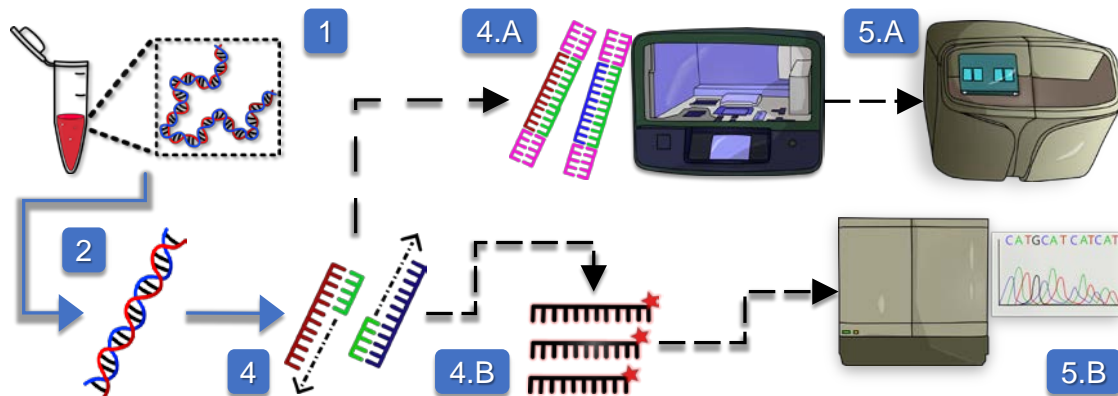
Los servicios de salud pública de varios países han implementado programas de prevención de CaPH, siguiendo las recomendaciones de las sociedades médicas (Tabla 2). La extensión y el alcance de estos programas varían según los recursos económicos disponibles. Los programas de prevención buscan identificar candidatos para pruebas genéticas en base a criterios establecidos. En caso de detectar variantes patogénicas, se amplía el estudio a familiares para identificar portadores sanos. Estas estrategias de prevención ayudan a prevenir la aparición del cáncer y reducir su gravedad.

## 6. Técnicas de diagnóstico genético-molecular

El análisis de mutaciones en línea germinal utiliza DNA genómico que abarca regiones codificantes y no codificantes. Los estudios genéticos tradicionales se basan en técnicas de secuenciación con el método de Sanger, que es costoso y se requiere bastante tiempo para secuenciar genes aislados; sin embargo, muchos genes relacionados con cáncer hereditario son grandes, no tienen *hotspots* o puntos calientes de mutaciones y, por lo tanto, requieren numerosas PCRs y reacciones de secuenciación (37). Por otra parte, este método no detecta CNV (variaciones del número de copias) que son mutaciones que implican alteraciones en el número de copias de un gen. Además, la baja frecuencia de mutaciones de alta penetrancia limita la eficacia de este método.

Las tecnologías de secuenciación masiva permiten analizar un mayor número de genes en comparación con las técnicas convencionales. Estas tecnologías, como la NGS, mejoran la eficiencia y reducen el tiempo de diagnóstico al detectar simultáneamente variantes en múltiples genes (33). Existen diversas plataformas de NGS con estrategias técnicas similares, como la creación de bibliotecas genómicas, amplificación y secuenciación. La diferencia principal entre las plataformas radica en el templado y la

química de la secuenciación utilizada (38). Tanto la secuenciación con el método de Sanger, como la NGS, se pueden combinar en un mismo laboratorio aprovechando las ventajas ofrecidas por cada plataforma para poder hacer un diagnóstico más preciso (Figura 3).



**Figura 3.** Workflow general para secuenciación de DNA genómico en NGS (arriba) y Sanger (abajo). 1) Extracción del DNA de la muestra. 2) Purificación del DNA de la muestra. 3) Amplificación de las regiones de interés. 4.A) Unión a adaptadores y creación de librerías. 5.A) Carga y secuenciación masiva de las muestras. 4.B) Amplificación con dNTPs marcados. 5.B) Carga en el secuenciador capilar y visualización de resultados.

La tecnología de secuenciación basada en semiconductores *Ion Torrent de Life Technologies*, utiliza PCR de emulsión y un ion semiconductor para detectar nucleótidos incorporados durante la reacción (38). Los cambios de pH causados por la incorporación de nucleótidos se traducen en cambios de voltaje que permiten la lectura de la secuencia. Aunque esta tecnología ofrece muchas ventajas, presenta desafíos en la interpretación y análisis de la gran cantidad de información generada. Es recomendable garantizar la calidad de los resultados, lo cual se logra mediante parámetros como la cobertura de secuencia y su comparación con bases de datos existentes.

## 7. Paneles genéticos

La utilización de paneles multigénicos mediante técnicas NGS en el ámbito clínico permite evaluar varios genes simultáneamente, aumentando la detección de variantes en comparación con el análisis de un único gen. Estos paneles ofrecen información más manejable, ahorran tiempo y reducen costos en los análisis genéticos. Su aplicación se ha integrado en el flujo de trabajo rutinario de los laboratorios para mejorar el diagnóstico de síndromes de cáncer hereditario, ya que muchos de estos síndromes tienen fenotipos superpuestos. Existen paneles comerciales y la opción de diseñar paneles personalizados que se utilizan ampliamente. Estos paneles permiten analizar genes de alta, moderada y baja penetrancia que antes no eran evaluados, y se ha demostrado que aumentan la capacidad de detectar variantes patogénicas en comparación con el análisis de genes de alta penetrancia de forma individual. Un estudio mostró la eficacia de un panel personalizado en pacientes con predisposición aparente a cáncer próstata hereditario (34).

## 8. Clasificación de las variantes genéticas

La base de datos *ClinVar* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) es una herramienta valiosa para asignar variantes genéticas a diferentes categorías. Esta base de datos reúne interpretaciones sobre las variantes en función de las evidencias experimentales disponibles, así como resúmenes de las predicciones realizadas por diversas herramientas bioinformáticas (39). La información en *ClinVar* es revisada y validada por un panel de expertos, lo que aumenta su confiabilidad y utilidad en la interpretación de las variantes genéticas.

Las variantes genéticas pueden clasificarse en diferentes categorías según su efecto en la proteína y su relación con la enfermedad. Las variantes patogénicas (P) o probablemente patogénicas (LP) alteran la funcionalidad de la proteína y tienen un efecto perjudicial (39). Estas variantes pueden incluir inserciones o deleciones que cambian la pauta de lectura (*frameshift*), mutaciones puntuales que generan un codón de parada de la transcripción (*nonsense*) o alteraciones en las regiones de procesamiento del mRNA (variantes de *splicing*).

Por otro lado, existen variantes de significado incierto (VUS) cuyo efecto y fenotipo asociado aún no se conocen (40). Estas variantes suelen ser mutaciones puntuales de tipo *missense* (provocan la sustitución de un aminoácido por otro) donde no está claro si el cambio de aminoácido afecta negativamente o no a la funcionalidad de la proteína. También se consideran VUS las mutaciones *in-frame*, que implican la pérdida o ganancia de tripletes completos sin alterar la pauta de lectura. Estas variantes requieren más investigación, como análisis bioinformáticos y estudios funcionales, para poder ser reclasificadas y entender mejor su significado.

Las variantes genéticas pueden clasificarse como benignas (B) o probablemente benignas (LB) cuando no afectan la funcionalidad de la proteína. Estas variantes suelen ser sustituciones de un solo nucleótido, que pueden ser sinónimas (codifican el mismo aminoácido debido a la redundancia del código genético) o de tipo *missense* sin tener consecuencias negativas en la funcionalidad de la proteína (41).

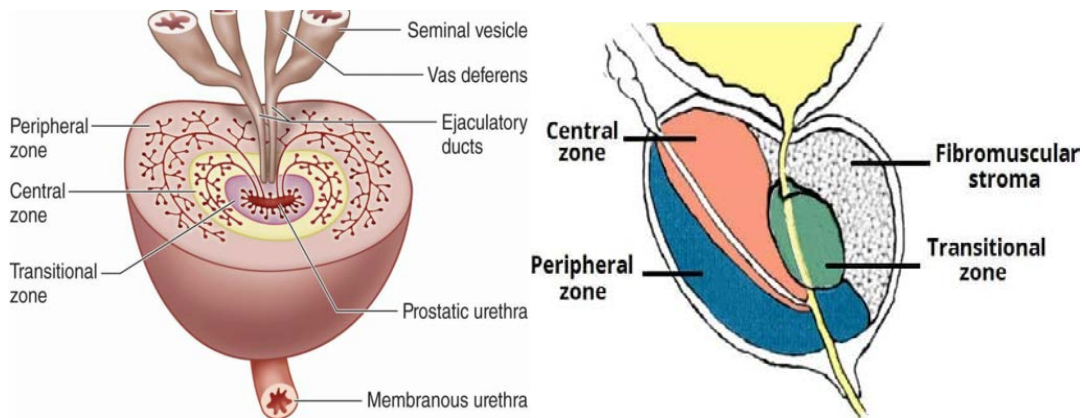
## **9. Fenotipos tumorales**

Las células cancerígenas tienen diferencias en características clave, como proliferación, capacidad metastásica y resistencia a tratamientos. Estas diferencias se deben a cambios genéticos y epigenéticos heredables. Cada tumor presenta una alta heterogeneidad genética y fenotípica, lo que resalta la complejidad del cáncer. Las herramientas de secuenciación han revelado que existen diferencias genómicas entre tumores de próstata primarios y aquellos de comportamiento metastásico (42).

El CaP primario se caracteriza por presentar múltiples focos tumorales separados dentro de la glándula prostática enferma, a diferencia de otros tumores sólidos. Esta característica de multifocalidad es distintiva en la mayoría de los casos de CaP primario. El 80% de los pacientes con CaP primario albergan más de un tumor genómico y morfológicamente distinto (43). Esta heterogeneidad tumoral complica el diagnóstico y el tratamiento del CaP, ya que cada foco tumoral puede requerir enfoques terapéuticos diferentes.

### **9.1. Consideraciones anatómicas de la próstata**

La próstata se puede dividir en zonas distintas (Figura 4). La zona periférica, que constituye la mayoría del tejido glandular de la próstata, alberga la mayoría de los tumores, mientras que las zonas centrales y de transición tienen una tasa mucho menor de incidencia de cáncer. Estas zonas anatómicamente definidas muestran perfiles de expresión génica distintos, y las lesiones que surgen en diferentes zonas muestran diferentes propensiones a ciertas alteraciones genómicas. Por ejemplo, las translocaciones de ERG son comunes en los tumores de la zona periférica (44), pero raramente se observan en las lesiones que surgen de la zona de transición.



**Figura 4.** Anatomía histológica de la próstata. Corte transversal [izquierda] y corte longitudinal [derecha].

### 9.2. Cáncer de próstata primario y multifocal:

El 76% de pacientes con CaP primario tiene múltiples focos tumorales con perfiles de mutación no superpuestos (45), además, algunos estudios han demostrado que existen diferencias notables en los perfiles de metilación (46); esto destaca la complejidad y heterogeneidad de los cambios genéticos y epigenéticos que revela el origen clonal independiente de cada foco.

### 9.3. Cáncer de próstata metastásico

Estudios moleculares han demostrado que tumores primarios de muy pequeño tamaño pueden originar metástasis de carácter agresivo, se ha demostrado que mutaciones en los genes *TP53*, *PTEN* y *SPOP* son característicos de este tipo de tumores (47).

El cáncer neuroendocrino de próstata (NEPC) afecta al 15-20% de pacientes con CaP metastásico (48) y se caracteriza por la presencia de mutaciones en los genes *RB1* y *TP53* (49). Estas mutaciones genéticas se asocian a la pérdida de la actividad del receptor de andrógenos (AR) y la expresión de marcadores neuroendocrinos. Además de las alteraciones genómicas, el NEPC también muestra cambios epigenéticos significativos, lo que sugiere que la enfermedad puede evolucionar a través de cambios en la regulación de la expresión génica (49).

### 9.4. Mutaciones troncales

Las mutaciones troncales son mutaciones presentes en el tronco del árbol evolutivo del cáncer y la naturaleza de la primera mutación en un cáncer es importante (50). Estas mutaciones iniciales tienen un papel fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer, ya que pueden determinar las características y la trayectoria evolutiva de la enfermedad. Se ha demostrado que algunos tumores metastásicos de origen prostático comparten mutaciones troncales en *BRCA2*, *ATM* y algunos del tipo MMR (51).

## OBJETIVOS

Durante la elaboración y desarrollo de este trabajo, se han planteado los siguientes objetivos.

- 1- Selección de casos con historia familiar de CaP.
- 2- Analizar las muestras seleccionadas mediante panel multigénico en plataforma de secuenciación masiva (NGS).
- 3- Determinar que genes resultan relevantes en antecedentes de CaPH.
- 4- Establecer posibles relaciones genotipo-fenotipo.
- 5- Mejorar el consejo genético, mediante la aplicación de las estrategias de prevención pertinentes a los familiares portadores de mutación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Selección de Muestras

El programa de *Consejo Genético en Cáncer Hereditario de la Junta de Castilla y León* busca identificar a portadores de mutaciones en genes relacionados con el CMOH. Los pacientes que cumplen con los criterios establecidos (Tabla 3) son seleccionados para someterse a un estudio genético utilizando una muestra de sangre, previo consentimiento informado.

**Tabla 3.** Criterios de inclusión en el programa de Consejo genético en CMOH de Castilla y León.

Casos	Tipo	Criterio
Un caso	A	CM y CO epitelial no mucinoso de alto grado sincrónico o metacrónico
	B	CM $\leq$ 35 años o CM $\leq$ 40 años y familia no informativa
	C	CM bilateral (el primero diagnosticado $\leq$ 40 años)
	D	CM triple negativo (CMTN) $\leq$ 50 años
	E	CO epitelial no mucinoso de alto grado
Dos casos, con alguna de las siguientes combinaciones	F	CM bilateral y CM $\leq$ 50 años
	G	CM en varón
	H	CM + CO epitelial no mucinoso de alto grado
	I	2 CM $\leq$ 50 años
Tres o más casos	J	$\geq$ 3 CM o CO epitelial no mucinoso de alto grado
Otros casos	K	Consultar con la UCG

De todas muestras las que han llegado, se han seleccionado 48 de pacientes con historial familiar de CaP, estas muestras han llegado a nuestro laboratorio de referencia para las muestras procedentes de Valladolid, Segovia, Burgos, Palencia y Soria, porque cumplen cualquiera de estos criterios de inclusión (Tabla 3) que derivan de una consulta de consejo genético junto con un árbol de historial familiar de cáncer. Tras un asesoramiento genético, si los pacientes están dispuestos a realizarse un estudio genético deben firmar el consentimiento informado.

### 2. Procesamiento de muestras

#### 2.1. Extracción de ácidos nucleicos

A partir de una muestra de sangre periférica de 10 mL anticoagulada con EDTA-3K, se realizó la extracción de ADN y se preparó un pellet de células para su almacenamiento. Esto permite la posibilidad de extraer ADN nuevamente en caso de ser necesario.

#### 2.2. Extracción de DNA y pellet de DNA

Se realizó la extracción automatizada de ADN genómico a partir de 400  $\mu$ L de sangre utilizando el sistema *MagNA pure® compact* de Roche y el kit "*MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I*" de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se preparó un pellet de ADN utilizando 8 mL de sangre a los que se añadió 7 mL de una solución llamada Buffer de lisis de glóbulos rojos y 120  $\mu$ L de *IGEPAL® CA-630*. La mezcla se agitó enérgicamente y se mantuvo en un balancín durante toda la noche hasta que el *IGEPAL® CA-630* se disolvió por completo. Después, se realizó una centrifugación de 15 minutos a 3000 rpm y se eliminó el líquido sobrante, dejando un volumen de 1 mL. El pellet de ADN resultante se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3. Análisis de las muestras por secuenciación masiva NGS: panel *BRCA extendido ONCOMINE* de 17 genes mediante tecnología *Ion AmpliSeq™*

La tecnología *Ion Torrent* de *Thermo Fisher Scientific* se utilizó para secuenciar las muestras utilizando un panel de 17 genes relacionados (Tabla 4) con predisposición genética al cáncer, está compuesto de los siguientes: *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDK12*, *CHEK2*, *FANCD2*, *ATM*, *MRE11*, *NBN*, *PALB2*, *PPP2R2A*, *RAD51B*, *RAD54L*, *TP53*, *RAD51C* y *RAD51D*. Este panel fue diseñado por el propio laboratorio

de cáncer hereditario y se implementó para su uso en casos de sospecha de cáncer de mama/ovario hereditario. Se utilizó como secuencia de referencia la que se muestra a continuación:

**Tabla 4.** Panel de genes utilizados. Nombre del gen seguido de su secuencia de referencia.

Gen	Referencia	Gen	Referencia	Gen	Referencia
<i>ATM</i>	NM_000051.3	<i>CHEK2</i>	NM_007194.3	<i>RAD51B</i>	NM_133509.3
<i>BARD1</i>	NM_000465.2	<i>FANCD2</i>	NM_001018115.1	<i>RAD51C</i>	NM_058216.1
<i>BRCA1</i>	NM_007294.3	<i>MRE11</i>	NM_005591.3	<i>RAD51D</i>	NM_002878.3
<i>BRCA2</i>	NM_000059.3	<i>NBN</i>	NM_002485.4	<i>RAD54L</i>	NM_003579.3
<i>BRIP1</i>	NM_032043.2	<i>PALB2</i>	NM_024675.3	<i>TP53</i>	NM_000546.5
<i>CDK12</i>	NM_016507.2	<i>PPP2R2A</i>	NM_002717.3		

### 3.1. Evaluación y cuantificación de las muestras

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para evaluar la integridad del material genético de cada muestra. La cuantificación del ADN se realizó utilizando el fluorómetro *Qubit® 3.0* y el kit *Qubit™ dsDNA HS Assay* de *Thermo Fisher Scientific*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.2. Preparación de las bibliotecas genómicas

Se generaron bibliotecas genómicas de forma automatizada utilizando el instrumento *Ion Chef™* de *Thermo Fisher Scientific* y el kit "*Ion AmpliSeq™ kit for Chef DL8*". Se utilizaron 10 ng de ADN de cada muestra para la preparación de las bibliotecas genómicas. Se realizaron 18 ciclos de amplificación y 4 minutos de extensión en un proceso de "*High Multiplex PCR*". Durante este proceso, las muestras se marcaron con adaptadores "*Ion Xpress Barcoded Adapters*" para su identificación durante la secuenciación posterior. Se prepararon 6 bibliotecas genómicas, cada una con 8 muestras y una concentración de 100 pM, que se almacenaron a 4°C hasta el templado.

### 3.3. Templado

Para el templado, se mezclaron manualmente las dos bibliotecas genómicas almacenadas en cada *Chip 530™* a una concentración final de 50 pM. El proceso se realizó de manera automatizada en el instrumento *Ion Chef™* de *Thermo Fisher Scientific* siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emulsionaron los amplicones de las bibliotecas genómicas con bolas magnéticas para unir cada amplicón a la superficie de estas. Luego, se realizó una amplificación monoclonal y se cargaron los micropocillos de cada ion chip 530™ con las 32 muestras a secuenciar. Una vez completado el templado, se obtuvieron dos chips cargados con las bibliotecas genómicas que contienen 32 muestras cada uno, listos finalmente para la secuenciación en *Ion S5™* de *Thermo Fisher Scientific*.

### 3.4. Secuenciación

El secuenciador *Ion S5™* de *Thermo Fisher Scientific* se utilizó para llevar a cabo la secuenciación por conducción. Se realizó la inicialización del secuenciador antes de la reacción de secuenciación siguiendo las instrucciones del fabricante. Un primer chip se insertó en el secuenciador para secuenciar simultáneamente 32 muestras durante 2,5 horas; mientras que el segundo chip se mantuvo refrigerado a 4°C en una caja de metacrilato. Alrededor de 15 minutos antes de que finalizara la secuenciación del primer chip, se preparó el segundo chip para su secuenciación posterior.

### 3.5. Análisis de resultados

Las lecturas generadas durante la secuenciación fueron alineadas con el genoma de referencia *hg19* ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_000001405.13/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000001405.13/)). Posteriormente, se realizó el análisis de los datos utilizando el software *Ion Reporter* de

*Thermo Fisher Scientific*. Todo el procedimiento realizado se encuentra ilustrado en la Figura 3 y la Figura 5.



**Figura 5.** Ilustración de la secuencia de todo el flujo de trabajo llevado a cabo respecto a la secuenciación masiva por tecnología *Ion Torrent*.

#### 4. Confirmación de las variantes identificadas

Se confirmaron las variantes patogénicas identificadas mediante secuenciación masiva utilizando el método de secuenciación Sanger para el diagnóstico definitivo de mutaciones.

##### 4.1. Amplificación, purificación y cuantificación de la región DNA de interés

La región genómica de interés se amplificó mediante PCR en un termociclador *Verity 96-well* de *Applied Biosystems*, utilizando primers y condiciones específicas. Posteriormente, los productos de PCR fueron filtrados utilizando placas de purificación "*MultiScreen® PCR96 Filter Plate*" de *Merck Millipore* para eliminar restos de reactivos que pudieran interferir en la reacción de secuenciación. Finalmente, los productos purificados se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop* de *ThermoFisher Scientific*.

##### 4.2. Reacción de secuenciación, purificación, electroforesis capilar y análisis de resultados

La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando el kit "*BrightDye® Terminator Cycle Sequencing*" (*MCLAB*). Se utilizó un volumen de reacción total de 10  $\mu$ L con los siguientes reactivos: 0,5  $\mu$ L de *BrightDye® Terminator*, 0,4  $\mu$ L de primer a concentración 3.2 pmol, 1,75  $\mu$ L de tampón de secuenciación *5X Sequencing buffer*, producto de PCR purificado previamente calculado para cada fragmento y  $H_2O$  *miliQ* hasta completar los 10  $\mu$ L. La secuencia se realizó en un termociclador *Verity 96-well* (*Applied Biosystems*) con una temperatura inicial de 96°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 150 segundos. Los productos de secuenciación se purificaron utilizando el kit "*Montage® SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup Kit 8*" (*Merck*) y se realizaron las carreras en el secuenciador automático capilar *ABI3130XL* (*Applied Biosystems*) utilizando un polímero *POP7* y buffer *1X 3730-EDTA*. Finalmente, las secuencias obtenidas se analizaron mediante el software *Sequencing Analysis v5.1* (*Applied Biosystems*), *Chromas* (*Technelysium*; QLD, Australia) y *FintchTV 1.5* (*Geospiza, Inc.*; Seattle, WA, USA).

#### 5. Caracterización de las variantes identificadas

Las variantes identificadas se nombraron en base a las secuencias de referencia de *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y según la normativa de Human

Genome Variation Society (<https://www.hgvs.org>). Para clasificarlas, se realizaron búsquedas en bases de datos de variantes como *ClinVar* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) y *Leiden Open Variation Database* (LOVD) (<https://www.lovd.nl>). Las variantes se clasificaron como patogénicas (P) o probablemente patogénicas (LP), benignas (B) o probablemente benignas (LB), y variantes de significado incierto (VUS), según su efecto en la proteína y la evidencia disponible.

## RESULTADOS

### 1. Análisis panel BRCA extendido ONCOMINE de 17 genes

Los resultados de las dos carreras de secuenciación para analizar las 48 muestras se analizaron mediante la plataforma *IonReporter* (apartado 2.5 de métodos) y después de filtrar las variantes identificadas según su ubicación y su naturaleza no sinónima, se encontraron un total de 8 mutaciones (17%) que se clasificaron como patogénicas (75%) o probablemente patogénicas (25%). Como se muestra en la Tabla 5, la mitad de estas variantes aparecen en genes distintos a *BRCA2*.

**Tabla 5.** Variantes identificadas mediante el panel de 17 genes de susceptibilidad.

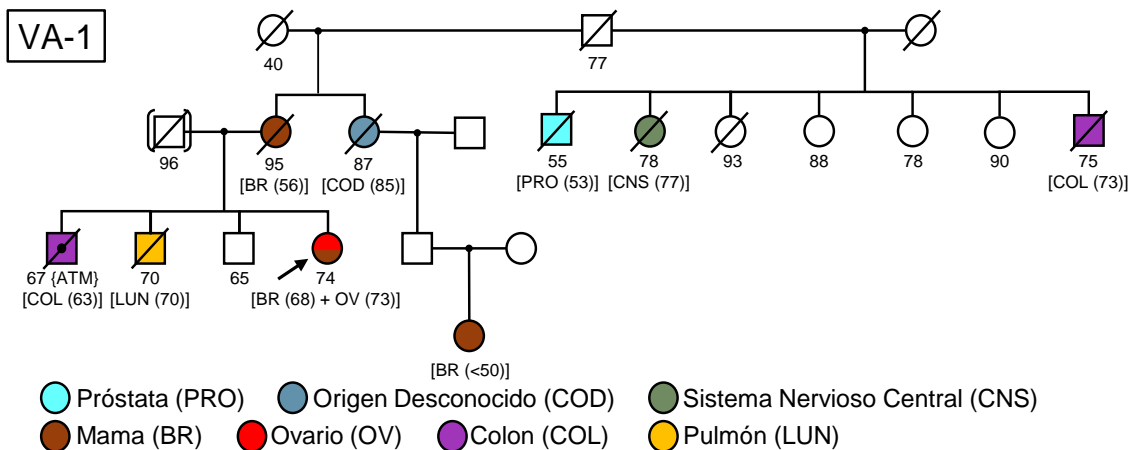
Familia	Gen	Exón	Mutación	Proteína	ClinVar ID	Tipo	Efecto
VA-1	<i>ATM</i>	Exón 10	c.1339C>T	p.Arg447Ter	127337	<i>Nonsense</i>	P
VA-2	<i>ATM</i>	Exón 7	c.802C>T	p.Gln268Ter	188961	<i>Nonsense</i>	P
VA-3	<i>BARD1</i>	Exón 11	c.2129_2132delACAG	p.Asp710fs	847596	<i>Frameshift</i>	LP
VA-4	<i>CHEK2</i>	Exón 3	c.433C>T	p.Arg145Trp	5592	<i>Missense</i>	LP
VA-5	<i>BRCA2</i>	Exón 11	c.3922G>T	p.Glu1308Ter	37867	<i>Nonsense</i>	P
VA-6	<i>BRCA2</i>	Exón 11	c.2808_2811delACAA	p.Ala938Profs	9322	<i>Frameshift</i>	P
VA-7	<i>BRCA2</i>	Exón 26	c.9026_9030delATCAT	p.Tyr3009fs	38204	<i>Frameshift</i>	P
VA-8	<i>BRCA2</i>	Intrón 9	c.793+1G>A	-	52437	<i>Splicing</i>	P

En cuanto al tipo de mutación de las variantes patogénicas (P) identificadas, tres de ellas son de tipo *nonsense*, dos son de tipo *frameshift* y una de ellas afecta al *splicing*. No se ha encontrado ninguna de significado incierto o VUS.

### 2. Familias con mutaciones Patogénicas o Probablemente patogénicas

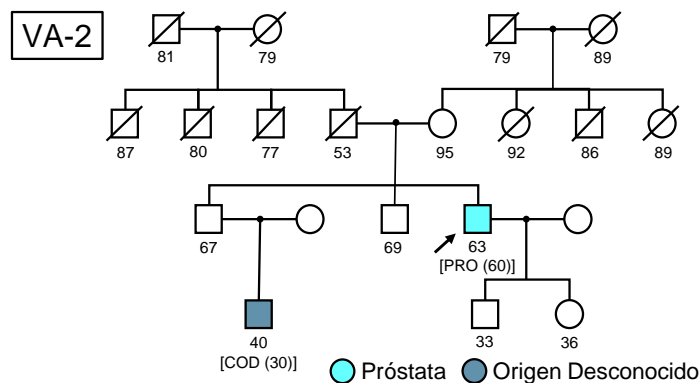
**Familia VA-1:** variante patogénica *ATM*: c.1339C>T (p.Arg447Ter), de tipo *nonsense* localizada en el exón 10, resulta en un codón de terminación prematuro (Tabla 5) y se predice que causa truncamiento de la proteína o vaya por la ruta de degradación de mRNA sin sentido (NMD). Las muestras de la paciente con esta mutación que llegó a nuestro laboratorio son de una mujer de 74 años que ya tenía un cáncer de mama diagnosticado de aparición a los 68 años y otro de ovario de aparición reciente, a los 73 años (Figura 4). Todos los hermanos de la paciente fallecieron con cáncer de distinta naturaleza sobre los 70 años, a excepción de uno que sigue vivo de 65. Un hermano fallecido de 67 años ya tuvo esta mutación diagnosticada. La madre de la paciente y su hermana también padecieron cáncer.





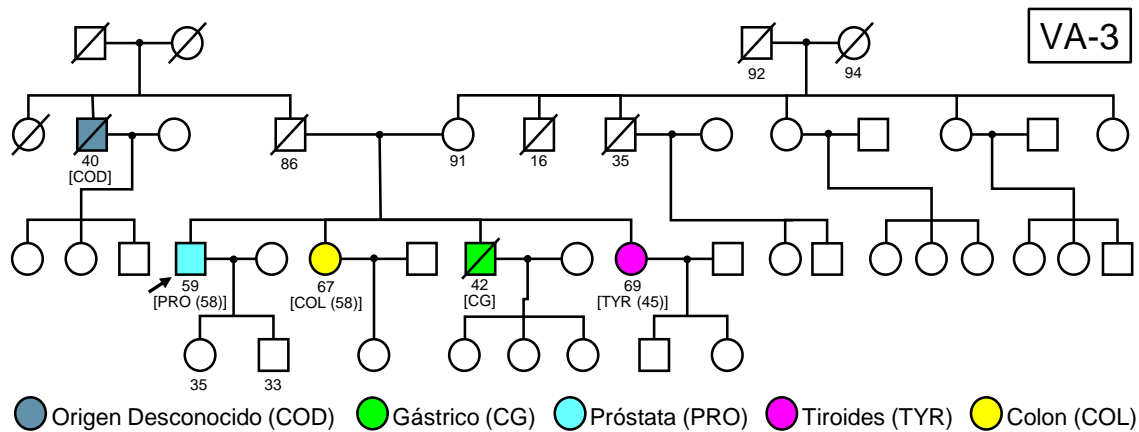
**Figura 6. Árbol familiar del caso VA-1.** Los diferentes tipos de cáncer se representan con un código de color y letras, junto a las que se indica la edad de diagnóstico entre paréntesis. La flecha señala el caso índice.

**Familia VA-2:** variante patogénica *ATM*: c.802C>T (p.Gln268Ter), de tipo *nonsense* localizada en el exón 7, resulta en un codón de terminación prematuro (Tabla 5) y se predice que causa truncamiento de la proteína o vaya por la ruta NMD. El paciente índice es un varón de 63 años, diagnosticado de CaP a los 60 y con un historial familiar limitado de cáncer, solo un sobrino de 40 años ha sido diagnosticado con cáncer dentro de su familia cercana. No hay otros casos de CaP cercanos, y no hay casos de CM o CO en la familia. Las muestras de este paciente llegaron a nuestro laboratorio cumpliendo el *Criterio K* de inclusión en el programa de *Consejo genético de Castilla y León* (Tabla 3).



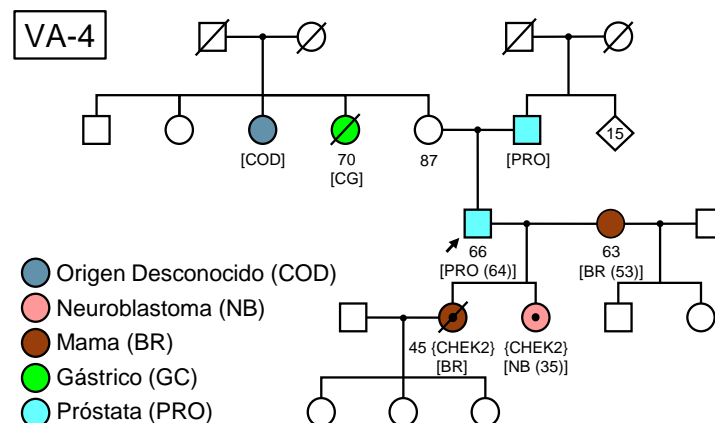
**Figura 7. Árbol familiar del caso VA-2.** Los diferentes tipos de cáncer se representan con un código de color y letras, junto a las que se indica la edad de diagnóstico entre paréntesis. La flecha señala el caso índice.

**Familia VA-3:** variante probablemente patogénica *BARD1*: c.2129\_2132delACAG (p.Asp710Vfs\*3), de tipo *frameshift* y provocada por una eliminación de 4 nucleótidos en el exón 11 (Tabla 5), causa un cambio en el marco de lectura con un codón de parada prematuro. El caso índice es un varón de 59 años que tuvo un CaP diagnosticado a los 58, tanto el hermano como las 2 hermanas de este están afectados por cáncer de distinta naturaleza; el hermano falleció a los 42 años de un CG, no hay ningún caso de cáncer de mama u ovario en la familia.



**Figura 8. Árbol familiar del caso VA-3.** Los diferentes tipos de cáncer se representan con un código de color y letras, junto a las que se indica la edad de diagnóstico entre paréntesis. La flecha señala el caso índice.

**Familia VA-4:** variante probablemente patogénica *CHEK2*: c.433C>T (p.Arg145Trp) de tipo *missense* y localizada en el exón 3 (Tabla 5), se predice que causa truncamiento de la proteína o vaya por la ruta NMD. El caso índice es un varón de 66 años que ya tenía un CaP diagnosticado de aparición a los 64 años. Este paciente tiene un amplio historial familiar de presencia de cáncer en la familia; su padre también tiene un CaP y tanto su hermana como una de sus hijas está afectada por cáncer de mama, esta última y su hermana con neuroblastoma ya tenían previamente diagnosticada la mutación.



**Figura 9. Árbol familiar del caso VA-4.** Los diferentes tipos de cáncer se representan con un código de color y letras, junto a las que se indica la edad de diagnóstico entre paréntesis. La flecha señala el caso índice.

**Familia VA-5:** variante patogénica *BRCA2*: c.3922G>T (p.Glu1308Ter) de tipo *nonsense* y localizada en el exón 11 (Tabla 5), se predice que causa truncamiento de la proteína o vaya por la ruta NMD. En la historia familiar de este paciente hay antecedentes personales y/o familiares de cáncer de mama, ovario y/o próstata y también de CG y del SNS.

**Familia VA-6:** variante patogénica *BRCA2*: c.2808\_2811delACAA (p.Ala938Profs) de tipo *frameshift* y provocada por la eliminación de 4 nucleótidos en el exón 11 (Tabla 5), se predice que causa truncamiento de la proteína o vaya por la ruta NMD. En la historia familiar del caso índice aparecen numerosos casos afectados por CM y/o CO, así como en CaP.

**Familia VA-7:** variante patogénica *BRCA2*: c.9026\_9030delATCAT (p.Tyr3009fs) de tipo *frameshift* y provocada por la eliminación de 5 nucleótidos en el exón 26 (Tabla 5), se predice que causa truncamiento de la proteína o vaya por la ruta NMD.

**Familia VA-8:** variante patogénica de tipo *splicing*, *BRCA2*: c.793+1G>A, localizada en el intrón 9 (Tabla 5), provoca *exon skipping*. El paciente portador padecía de CaP.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir del análisis de 48 muestras de pacientes con antecedentes de CaP, mediante el panel multigénico *BRCA extendido ONCOMINE de 17 genes*, respaldan la sospecha de que otros genes diferentes a *BRCA1/2* predisponen al desarrollo de cáncer y, por tanto, en este tipo de familias sería conveniente realizar un estudio genético más amplio. Gracias al desarrollo de las técnicas NGS, la implementación de paneles multigénicos en los estudios genéticos de la línea germinal podría mejorar la supervivencia de los pacientes al permitir la administración de tratamientos más personalizados, y, además, podría mejorar la prevención de cáncer en familiares cercanos a estos pacientes.

### 1. Utilidad del análisis de paneles genéticos en familias con antecedentes de cáncer de próstata

Se ha detectado mutación patogénica (P) en el 16,6% de las familias analizadas, de las 8 familias portadoras de mutación causal, el 50% presentan alteración en genes diferentes de *BRCA1* y *BRCA2* (Tabla 5). Estos datos nos sugieren que la mitad de los casos de familias con historial de CaP puedan provenir de mutaciones en genes distintos de *BRCA1/2*, aunque para confirmar esta hipótesis habría que seleccionar muchos más casos índices de distintas familias. Es de señalar que el panel utilizado en este trabajo está expresamente diseñado para la detección de variantes en genes relacionados con CMOH, esto es debido a que los pacientes fueron seleccionados cumpliendo con los criterios detallados en la Tabla 3, por lo tanto, este panel no está enfocado para el CaP de forma explícita.

Cuando hablamos propiamente de la elaboración de los paneles genéticos a la hora de tener en cuenta la detección de mutaciones germinales que sí están implicadas en el CaPH, varias organizaciones entre las que se incluye la *Conferencia de Filadelfia para el Consenso del Cáncer de Próstata de 2019* y los protocolos del NCCN aconsejan que los paneles tengan los genes *BRCA1/2*, *ATM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM* y *HOXB13* (28, 52, 53). Cuando esto lo comparamos con nuestro panel, podemos decir que faltarían los 6 últimos para cumplir con este estándar, aun así, incluso faltando estos genes, el 50% de los casos encontrados en nuestro estudio carecen de variantes en éstos, aunque, solamente hemos encontrado variantes de tipo P o LP en el 17% de nuestras muestras. Cuando comparamos nuestro panel de 17 genes con un panel de 27 genes que sí incluyen los recomendados (a excepción de *HOXB13*) utilizado por otro laboratorio (44) enfocado en síndromes de cáncer hereditario múltiples, observamos que la proporción de detección de variantes patogénicas en pacientes con historia familiar de cáncer es del 44% (54). Por lo tanto, sería recomendable tener en cuenta estos últimos 6 genes en la elaboración de futuros paneles para la detección de variantes patogénicas de líneas germinales relacionadas con el CaPH.

### 2. Contribución de las variantes patogénicas detectadas al cáncer de próstata hereditario

Las familias analizadas han llegado al laboratorio por cumplir criterios de alto riesgo para cáncer de mama/ovario hereditario, este síndrome está incluido en el programa de prevención del cáncer hereditario de la Comunidad de Castilla y León. Estas familias además cuentan entre sus antecedentes con casos de CaP y este ha sido el motivo de nuestro estudio, intentar dilucidar el perfil genético de familias con estos antecedentes.

#### 2.1. *BRCA2*

Entre los resultados que obtuvimos, 4 de las mutaciones patogénicas son en *BRCA2* y provocan la pérdida de su función: la mutación *BRCA2*:c.3922G>T (también conocida como E1308X) de la familia VA-5, está relacionada con personas con antecedentes

personales y/o familiares de cáncer de mama, ovario y/o CaP (55) y además, cáncer de mama en hombres (58); es detectada en muchos casos de CMOH en familias de Puerto Rico y España (56, 58, 57) y con aparición en mujeres menores de 50 (58).

La mutación c.2808\_2811delACAA de la familia VA-6, es una de las mutaciones más comunes en el mundo relacionadas con el CMOH (59), está relacionada con casos de cáncer de mama en hombres con historia familiar de CMOH en España (60), aunque también se ha encontrado en familias australianas, chinas y afroamericanas (61).

La variante c.9026\_9030delATCAT (p.Tyr3009Serfs\*7) de la familia VA-7, se relaciona con individuos afectados por CMOH y es bastante recurrente en la población española (62, 63), representando el 7,6% de las variantes patogénicas en la línea germinal de *BRCA2* en Castilla y León (63).

Por último, la variante de tipo *splicing* c.793+1G>A de la familia VA-8 está relacionada con pacientes con historial familiar de CMOH y cáncer pancreático en poblaciones de Sudamérica (64); esta mutación provoca un *skipping* eliminando el exón 9, generando una proteína aberrante completamente disfuncional (65).

En todos los casos mencionados es necesario hacer un seguimiento rutinario de los casos índice debido a que las variantes patogénicas de *BRCA2* se relacionan con CaP metastásico, peor pronóstico y una supervivencia de hasta 4 años menos en comparación con pacientes no portadores según nuevos datos publicados en *European Urology* (66, 36, 28). En cuanto a los familiares cercanos, sería recomendable hacer un estudio a posibles portadores independientemente del sexo en todas las familias de nuestros resultados, ya que las variantes patogénicas del gen *BRCA2* confieren un riesgo general en mujeres del 25-55% de desarrollar CM (67), y de hasta el 35-40% de desarrollar CaP en hombres a lo largo de su vida en comparación con la población general (35); además, los hombres portadores menores de 60 años tienen un riesgo aumentado de hasta 23 veces de desarrollar CaP (35, 30, 36, 13); en varios estudios se ha demostrado que los pacientes con CaPH de inicio temprano suelen tener mutaciones de la línea germinal en *BRCA2* (35, 30, 66). Por otra parte, un estudio demostró que las variantes patogénicas de *BRCA2* se asociaron con un riesgo altísimo (OR: 44) de cáncer de mama en hombres (13), esto concuerda con la variante encontrada en la familia VA-6; por lo tanto, sería recomendable sugerir a todos los varones sospechosos de ser portadores en esta familia de incluirse en un programa de prevención de cáncer de mama hereditario. En *BRCA2*, la mayoría de las variantes patogénicas se encuentran en el exón 11, lo que sugiere que esta región está relacionada con el riesgo de CaPH (17, 59).

## 2.2. *ATM*

El gen *ATM* está comúnmente mutado en la línea germinal y desempeña un papel clave en la reparación del ADN y la detención del ciclo celular (64). Entre nuestros resultados, la variante patogénica *ATM* c.1339C>T encontrada en la familia VA-1 (Figura. 6) se ha informado en varios individuos con ataxia-telangiectasia clásica, incluidas tres familias drusas, lo que sugiere que es una mutación fundadora en esta población (68). La otra mutación, *ATM* c.802C>T encontrada en la familia VA-2 (Figura. 7), ha sido también reportada en pacientes afectados con ataxia-telangiectasia (69); además, se sospecha que esta variante provoca una alteración del *splicing* en el exón 7 de *ATM* con pérdida de función (69) y se ha relacionado con el CaP y CM (70). El caso índice de la familia VA-1 es una mujer diagnosticada con CM y CO, además de otros 2 casos de CM mencionados, uno en la madre y otro en la sobrina segunda; todas fueron diagnosticadas en edades inferiores a los 70 y estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Renault, A.L. et al. en 2018 (71) que relaciona las mutaciones de pérdida de función de *ATM* con un diagnóstico de CM en mujeres menores de 70; por otra parte, se puede decir que hay altas probabilidades de que el abuelo materno sea el portador original de la mutación ya que los hijos de este en las 2 familias sucesoras

tienen múltiples casos de cáncer de distinta naturaleza, predominantemente de CM en mujeres y de cáncer de colon en hombres, esto concuerda con otros estudios que relacionan variantes patogénicas en *ATM* con ambos tipos de cáncer (16); solo hay un caso de CaP diagnosticado a los 53 y fallecido a los 55 años. El caso índice de la familia VA-2 es un varón diagnosticado a los 60 años de CaP, y, solo existe un caso de cáncer (de origen desconocido) diagnosticado a los 30 años en un sobrino, dato destacable ya que es una edad muy prematura para un diagnóstico de cáncer. Entre las 2 familias observadas, podemos atribuir un fenotipo de CaP diagnosticado en edades inferiores o iguales a los 60 años para este tipo de mutaciones de pérdida de función del gen *ATM*, algunos estudios confirman esta característica (72), que es coincidente con nuestros resultados. Sería conveniente informar a los individuos presentes y no presentes de la familia VA-1 para su inclusión en un programa de prevención de cáncer hereditario ya que es muy probable que todos los casos en esta familia puedan ser originados a causa de la mutación respectiva. En el caso de la familia VA-2 también se recomendaría informar a los hermanos del caso índice ya que tienen de a 2 a 4 veces más riesgo de padecer CaP que la población normal (16). Si comparamos nuestros resultados con otros estudios clínicos (73) en los que detectaron mutaciones de *ATM* en casos índice de CaP de dos familias en las que familiares cercanos con CM y CO previamente habían sido sometidos a pruebas de detección de variantes patogénicas germinales en *ATM* (73), se puede decir que existe cierta relación entre el CMOH y el CaPH a nivel de este gen.

### 2.3. *BARD1*

El gen *BARD1* se considera de penetrancia variable para el CaPH y moderada para el de CMH (74, 75). En nuestro estudio hemos encontrado la mutación de *BARD1* c.2129\_2132delACAG (p.Asp710fs) en la familia VA-3 (Figura. 8), está relacionada con cáncer de mama en hombres y CMOH en familias de España (76) con tumores de fenotipos tipo IDC (Carcinoma Ductal Invasivo), ER+ (receptor de estrógenos positivo) y HER2- (HER2 negativo) (76). Esta alteración ocurre en el extremo 3' del gen *BARD1*, no se espera que active NMD y solo afecta los últimos 67 aminoácidos de la proteína, pero, esta última región afecta el dominio BRCT de *BARD1*, que se ha demostrado que es crítica para la reparación de ADN (77). En nuestro caso, todos los hermanos y hermanas del caso índice tienen distintos tipos de cáncer diagnosticados en edades inferiores a 60 años, esta edad de aparición concuerda con otro estudio donde hay informados casos de CMOH diagnosticados en menores de 60 para variantes patogénicas de *BARD1* (76). Por otra parte, el hermano del padre del caso índice tuvo un cáncer de origen desconocido y murió muy joven a los 40 años. No existen reportes que relacionen esta variante con otros tipos de cáncer más allá del CMOH y de mama en hombres, como se ha mencionado anteriormente, se conoce que las mutaciones patogénicas en *BARD1* están asociadas a un incremento de padecer cáncer de forma general (78). Muchos especialistas de consejo genético consideran informar a pacientes con historial de CaP sobre las mutaciones en *BARD1* (89), otros no lo aconsejan (79); aun así, teniendo en cuenta que las mutaciones en este gen aportan un riesgo estimado de hasta 4 veces más de padecer CaP para los hombres mayores de 65 años (79); y de 2 a 3 veces para el CM (79), sería recomendable informar tanto a los hijos del caso índice, como a los de su hermano y hermanas para incluirlos en un programa de prevención de cáncer hereditario y hacerse las pruebas de diagnóstico genéticas que tengan en cuenta este gen, además, parece que esta mutación también puede estar relacionada con cánceres de distinta naturaleza y tiene un efecto mucho más agresivo en varones.

### 2.4. *CHEK2*

*CHEK2* es un gen supresor de tumores que codifica una proteína involucrada en la reparación del ADN, la detención del ciclo celular o la apoptosis en respuesta al daño del ADN (52), además, es un gen de penetrancia moderada para el cáncer de mama y

de próstata (13, 52, 73, 66). La mutación de *CHEK2* c.433C>T (llamada también R145W) encontrada en la familia VA-4 (Figura. 9) provoca una reducción en la actividad quinasa de la proteína de forma drástica (80). Estudios funcionales en líneas de levadura han demostrado que esta variante tiene una vida media reducida en comparación con el tipo *wild* y no se activa en respuesta al daño del ADN (81). En nuestros resultados, esta familia es un caso bastante llamativo debido a que tanto la línea materna como la paterna del caso índice están afectadas por distintos casos de cáncer, además este paciente tuvo 2 hijas afectadas por distintos casos de cáncer diagnosticados antes de los 40 años, y su madre afectada de cáncer de mama. Sabemos que una de las hijas de este paciente está diagnosticada con neuroblastoma, esta neoplasia de carácter generalmente metastásico y agresivo está relacionada con esta mutación de forma directa (82), además se sabe de la existencia de otras variantes patogénicas de la línea germinal en *CHEK2* relacionadas con esta enfermedad (83, 84); por otra parte, ya se tiene conocimiento de que esta mutación está relacionada con el CM y el SL (80, 85), también se tiene constancia de otras mutaciones encontradas en el exón 3 de *CHEK2* en distintas familias de España y Brasil relacionadas con casos de CMOH agresivo en pacientes jóvenes (86, 87), estos datos concuerdan con el cáncer de mama reportado en la hija fallecida del caso índice; por otra parte, esta mutación también está asociada al CaPH (88, 89), esto coincide con los resultados obtenidos respecto al caso índice. Sería recomendable informar a todos los individuos descendientes del caso índice independientemente del sexo, ya que se trata de una variante que puede dar la cara de forma prematura de muchas formas, específicamente como neuroblastoma. También sería de ayuda tener más información respecto a la historia familiar tanto de la pareja de nuestro caso índice como de los hermanos del padre de este, para poder descartar que otros genes distintos a *CHEK2* estén afectados.

## CONCLUSIONES

1. Los resultados de nuestro trabajo sugieren que el panel genético utilizado es eficaz en familias con sospecha de cáncer hereditario.
2. Las familias con antecedentes de cáncer de próstata pueden presentar un perfil genético diferente a *BRCA*.
3. Los genes *ATM*, *CHEK2* y *BARD1* se postulan como candidatos a estudio en casos de sospecha de cáncer de próstata hereditario.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Todd, R. y Wong, D. T. (1999). *Oncogenes*. Anticancer research. 19(6A): 4729–4746.  
Lipsick J. (2020). *A history of cancer research: Tumor suppressor genes*. Cold Spring Harb Perspect. Biol. 2020. 12(2):1–12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035907>
- 2- Oota, S. (2020). *Somatic mutations – Evolution within the individual*. Methods. 176:91-98. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.11.002>
- 3- Diccionarios del NCI. (acceso el 3 de mayo de 2023 a las 12:24). *Síndrome de cáncer familiar*. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/sindrome-de-cancer-familiar>
- 4- Knudson, A. (1971). *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci USA. 68 (4): 820–823. <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.68.4.820>
- 5- Frank, T.S. (2001). *Hereditary Cancer Syndromes*. Arch Pathol Lab Med; 125 (1): 85–90. <https://doi.org/10.5858/2001-125-0085-HCS>
- 6- Van Cott, C. (2020). Cancer Genetics. The Surgical clinics of North America. 100(3):483–498. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2020.02.012>
- 7- Huber-Keener K. J. (2022). *Cancer genetics and breast cancer. Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*. 82: 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2022.01.007>

- 8- Pallonen, T.A.S., Lempiäinen, S.M.M., Joutsiniemi, T.K. et al. (2022). *Genetic, clinic and histopathologic characterization of BRCA-associated hereditary breast and ovarian cancer in southwestern Finland*. Sci Rep. 12, 6704. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10519-y>
- 9- Anglian Breast Cancer Study Group. (2000). *Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases*. Anglian Breast Cancer Study Group. British journal of cancer. 83(10): 1301–1308. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1407>
- 10- Hartge, P., Struewing, J. P., Wacholder, S., Brody, L. C. y Tucker, M. A. (1999). *The prevalence of common BRCA1 and BRCA2 mutations among Ashkenazi Jews*. American journal of human genetics. 64(4): 963–970. <https://doi.org/10.1086/302320>
- 11- Haffner, M.C., Zwart, W., Roudier, M.P. et al. (2021). *Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer*. Nat Rev Urol 18, 79–92. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00400-w>
- 12- Li, S., Silvestri, V., Leslie, G., Rebbeck, T. R. et al. (2022). *Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants*. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology, 40(14):1529–1541. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02112>
- 13- González-Santiago, S., Ramón Y Cajal, T., Aguirre, E., Alés-Martínez, J. E. et al. y el SEOM Hereditary Cancer Working Group. (2020). *SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer*. Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico, 22(2), 193–200. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02262-0>
- 14- Arpino, G., Pensabene, M., Condello, C., Ruocco, R. et al. (2016). *Tumor characteristics and prognosis in familial breast cancer*. BMC cancer. 16(1): 924. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2962-1>
- 15- Vietri, M. T., D'Elia, G., Caliendo, G., Resse, M. et al. (2021). *Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention*. International journal of molecular sciences, 22(7):3753. <https://doi.org/10.3390/ijms22073753>
- 16- D'Elia, G., Caliendo, G., Tzoni, M. M., Albanese, L. et al. (2022). *Increased Risk of Hereditary Prostate Cancer in Italian Families with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome Harboring Mutations in BRCA and in Other Susceptibility Genes*. Genes, 13(10):1692. <https://doi.org/10.3390/genes13101692>
- 17- Benusiglio, P. R., Fallet, V., Sanchis-Borja, M., Coulet, F. y Cadranet, J. (2021). *Lung cancer is also a hereditary disease*. European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society, 30(162), 210045. <https://doi.org/10.1183/16000617.0045-2021>
- 18- Shin, H. C., Lee, H. B., Yoo, T. K., Lee, E. S. et al. (2020). *Detection of Germline Mutations in Breast Cancer Patients with Clinical Features of Hereditary Cancer Syndrome Using a Multi-Gene Panel Test*. Cancer research and treatment, 52(3), 697–713. <https://doi.org/10.4143/crt.2019.559>
- 19- Rawla P. (2019). *Epidemiology of Prostate Cancer*. World journal of oncology, 10(2):63–89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>
- 20- Wang L., Lu B., He M., Wang Y., Wang Z. y Du L. (2022). *Prostate Cancer Incidence and Mortality: Global Status and Temporal Trends in 89 Countries From 2000 to 2019*. Front. Public Health 10:811044. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.811044>
- 21- Center M.M., Jemal A., Lortet-Tieulent J., Ward E. et al. (2012). *International variation in prostate cancer incidence and mortality rates*. Eur Urol. 61:1079–92. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.02.054>
- 22- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2019). *CÁNCER HEREDITARIO*. (3ª ed.). GoNext Producciones S.L. ISBN: 978-84-09-10462-8

- 23- Inamura, K. (2018). Prostatic cancers: understanding their molecular pathology and the 2016 WHO classification. *Oncotarget*. 9(18):14723–14737. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24515>
- 24- Denmeade, S. R. y Isaacs, J. T. (2002). *A history of prostate cancer treatment*. *Nature reviews. Cancer*, 2(5), 389–396. <https://doi.org/10.1038/nrc801>
- 25- Giri, V. N. y Beebe-Dimmer, J. L. (2016). *Familial prostate cancer*. *Seminars in oncology*, 43(5), 560–565. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.08.001>
- 26- Rubin, M. y De Marzo, A. (2004). *Molecular genetics of human prostate cancer*. *Mod Pathol* 17, 380–388. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800051>
- 27- Khan, H. M. y Cheng, H. H. (2022). *Germline genetics of prostate cancer*. *The Prostate*, 82 Suppl 1(Suppl 1): S3–S12. <https://doi.org/10.1002/pros.24340>
- 28- Vietri, M. T., D'Elia, G., Caliendo, G., Resse, M. et al. (2021). *Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention*. *International journal of molecular sciences*. 22(7):3753. <https://doi.org/10.3390/ijms22073753>
- 29- Bambury, R. M. y Gallagher, D. J. (2012). *Prostate cancer: germline prediction for a commonly variable malignancy*. *BJU international*, 110(11 Pt C): E809–E818. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11450.x>
- 30- Castro, E., Romero-Laorden, N. et al. (2019). *PROREPAIR-B: A Prospective Cohort Study of the Impact of Germline DNA Repair Mutations on the Outcomes of Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer*. *Journal of Clinical Oncology*. 37:6, 490-503. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00358>
- 31- Gilbertson R. J. (2011). *Mapping cancer origins*. *Cell*. 145(1): 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.019>
- 32- Ramírez-Calvo, M., García-Casado, Z., Fernández-Serra, A., de Juan, I. et al. (2019). *Implementation of massive sequencing in the genetic diagnosis of hereditary cancer syndromes: diagnostic performance in the Hereditary Cancer Programme of the Valencia Community (FamCan-NGS)*. *Hereditary cancer in clinical practice*, 17, 3. <https://doi.org/10.1186/s13053-019-0104-x>
- 33- Giri, V. N., Obeid, E., Gross, L., Bealin, L. et al. (2017). *Inherited Mutations in Men Undergoing Multigene Panel Testing for Prostate Cancer: Emerging Implications for Personalized Prostate Cancer Genetic Evaluation*. *JCO precision oncology*, 1, PO.16.00039. <https://doi.org/10.1200/PO.16.00039>
- 34- Stone, L. (2019). *The IMPACT of BRCA2 in prostate cancer*. *Nat Rev Urol* 16:639. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0249-4>
- 35- Pilarski R. (2019). *The Role of BRCA Testing in Hereditary Pancreatic and Prostate Cancer Families*. *American Society of Clinical Oncology educational book*. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 39:79–86. [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_238977](https://doi.org/10.1200/EDBK_238977)
- 36- Guan Y, Hu H, Peng Y, Gong Y, Yi Y, Shao L, et al. (2015). *Detection of inherited mutations for hereditary cancer using target enrichment and next generation sequencing*. *Fam Cancer*. 14(1): 9–18. <https://doi.org/10.1007/s10689-014-9749-9>
- 37- Su, Z., Ning, B., Fang, H., Hong, H., Perkins, R., Tong, W., & Shi, L. (2011). *Next-generation sequencing and its applications in molecular diagnostics. Expert review of molecular diagnostics*. 11(3): 333–343. <https://doi.org/10.1586/erm.11.3>
- 38- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. et al. (2016). *ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants*. *Nucleic acids research*, 44(D1), D862–D868. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1222>
- 39- Wright, M., Menon, V., Taylor, L., Shashidharan, M. et al. (2018). *Factors predicting reclassification of variants of unknown significance*. *American journal of surgery*, 216(6), 1148–1154. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2018.08.008>
- 40- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D. y el ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (2015). *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: official journal of the American College of Medical Genetics, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/qim.2015.30>
- 41- Haffner, M.C., Zwart, W., Roudier, M.P. et al. (2021). *Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer*. *Nat Rev Urol* 18, 79–92. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-00400-w>
- 42- Andreoiu, M. y Cheng, L. (2010). *Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications*. *Human pathology*, 41(6), 781–793. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.02.011>
- 43- Guo, C. C., Zuo, G., Cao, D., Troncoso, P., & Czerniak, B. A. (2009). *Prostate cancer of transition zone origin lacks TMPRSS2-ERG gene fusion*. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 22(7): 866–871. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.57>
- 44- Løvf, M., Zhao, S., Axcrona, U., Johannessen, B. et al. (2019). *Multifocal Primary Prostate Cancer Exhibits High Degree of Genomic Heterogeneity*. *European urology*, 75(3), 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.009>
- 45- Mundbjerg, K., Chopra, S., Alemozaffar, M., Duymich, C. et al. (2017). *Identifying aggressive prostate cancer foci using a DNA methylation classifier*. *Genome biology*. 18(1): 3. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1129-3>
- 46- Valerio, M., Cerantola, Y., Eggenner, S. E., Lepor, H. et al. (2017). *New and Established Technology in Focal Ablation of the Prostate: A Systematic Review*. *European urology*, 71(1), 17–34. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.044>
- 47- Bluemn, E. G., Coleman, I. M., Lucas, J. M., Coleman, R. T. et al. (2017). *Androgen Receptor Pathway-Independent Prostate Cancer Is Sustained through FGF Signaling*. *Cancer cell*. 32(4): 474–489.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.09.003>
- 48- Beltran, H., Prandi, D., Mosquera, J. M., Benelli, M. et al. (2016). *Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer*. *Nature medicine*. 22(3): 298–305. <https://doi.org/10.1038/nm.4045>
- 49- Levine, A. J., Jenkins, N. A. y Copeland, N. G. (2019). *The Roles of Initiating Truncal Mutations in Human Cancers: The Order of Mutations and Tumor Cell Type Matters*. *Cancer cell*, 35(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.009>
- 50- Wedge, D. C., Gudem, G., Mitchell, T., Woodcock, D. J. et al. (2018). *Sequencing of prostate cancers identifies new cancer genes, routes of progression and drug targets*. *Nature genetics*, 50(5), 682–692. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0086-z>
- 51- Graffeo, R., Rana, H. Q., Conforti, F., Bonanni, B. et al. (2022). *Moderate penetrance genes complicate genetic testing for breast cancer diagnosis: ATM, CHEK2, BARD1 and RAD51D*. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 65:32–40. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.06.003>
- 52- Russo, J., y Giri, V. N. (2022). *Germline testing and genetic counselling in prostate cancer*. *Nature reviews. Urology*. 19(6): 331–343. <https://doi.org/10.1038/s41585-022-00580-7>
- 53- Gardner, S. A., Weymouth, K. S., Kelly, W. S., Bogdanova, E. et al. (2018). *Evaluation of a 27-gene inherited cancer panel across 630 consecutive patients referred for testing in a clinical diagnostic laboratory*. *Hereditary cancer in clinical practice*. 16: 1. <https://doi.org/10.1186/s13053-017-0083-8>
- 54- Pritchard, C. C., Mateo, J., Walsh, M. F., De Sarkar, N. et al. (2016). *Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer*. *The New England journal of medicine*. 375(5): 443–453. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1603144>
- 55- Dutil, J., Teer, J. K., Golubeva, V., Yoder, S. et al. (2019). *Germline variants in cancer genes in high-risk non-BRCA patients from Puerto Rico*. *Scientific reports*, 9(1), 17769. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54170-6>

- 56- Duran, M., Esteban-Cardenosa, E., Velasco, E., Infante, M. y Miner, C. (2003). *Mutational analysis of BRCA2 in Spanish breast cancer patients from Castilla-Leon: identification of four novel truncating mutations*. Human mutation, 21(4), 448. <https://doi.org/10.1002/humu.9126>
- 57- Diaz-Zabala, H. J., Ortiz, A. P., Garland, L., Jones, K. et al. (2018). *A Recurrent BRCA2 Mutation Explains the Majority of Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome Cases in Puerto Rico*. Cancers, 10(11), 419. <https://doi.org/10.3390/cancers10110419>
- 58- Infante, M., Durán, M., Acedo, A., Sánchez-Tapia, E. M. et al. (2013). *The highly prevalent BRCA2 mutation c.2808\_2811del (3036delACAA) is located in a mutational hotspot and has multiple origins*. Carcinogenesis, 34(11), 2505–2511. <https://doi.org/10.1093/carcin/bqt272>
- 59- de Juan, I., Palanca, S., Domenech, A., Feliubadaló, L. et al. (2015). *BRCA1 and BRCA2 mutations in males with familial breast and ovarian cancer syndrome*. Results of a Spanish multicenter study. Familial cancer, 14(4), 505–513. <https://doi.org/10.1007/s10689-015-9814-z>
- 60- Kwong, A., Ng, E. K., Wong, C. L., Law, F. B. et al. (2012). *Identification of BRCA1/2 founder mutations in Southern Chinese breast cancer patients using gene sequencing and high resolution DNA melting analysis*. PloS one, 7(9), e43994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043994>
- 61- Gabaldó Barrios, X., Sarabia Meseguer, M. D., Marín Vera, M., Sánchez Bermúdez, A. I. et al. (2017). *Molecular characterization and clinical interpretation of BRCA1/BRCA2 variants in families from Murcia (south-eastern Spain) with hereditary breast and ovarian cancer: clinical-pathological features in BRCA carriers and non-carriers*. Familial cancer. 16(4): 477–489. <https://doi.org/10.1007/s10689-017-9985-x>
- 62- Infante, M., Durán, M., Acedo, A., Pérez-Cabornero, L. et al. (2010). *BRCA1 5272-1G>A and BRCA2 5374delTATG are founder mutations of high relevance for genetic counselling in breast/ovarian cancer families of Spanish origin*. Clinical genetics, 77(1), 60–69. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01272.x>
- 63- Liu, Y., Jin, B., Shen, C., Gao, X. et al. (2023). *Somatic and germline aberrations in homologous recombination repair genes in Chinese prostate cancer patients*. Frontiers in oncology, 13, 1086517.
- 64- Fraile-Bethencourt, E., Valenzuela-Palomo, A., Díez-Gómez, B., Goina, E., Acedo, A., Buratti, E. y Velasco, E. A. (2019). *Mis-splicing in breast cancer: identification of pathogenic BRCA2 variants by systematic minigene assays*. The Journal of pathology, 248(4), 409–420. <https://doi.org/10.1002/path.5268>
- 65- Stolarova, L., Kleiblova, P., Janatova, M., Soukupova, J. et al. (2020). *CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate*. Cells, 9(12):2675. <https://doi.org/10.3390/cells9122675>
- 66- Pajares, B., Porta, J., Porta, J. M., Sousa, C. F. et al. (2018). *Hereditary breast and ovarian cancer in Andalusian families: a genetic population study*. BMC cancer, 18(1), 647. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4537-9>
- 67- Fares, F., Axelord Ran, S., David, M., Zelnik, N. et al. (2004). *Identification of two mutations for ataxia telangiectasia among the Druze community*. Prenatal diagnosis, 24(5), 358–362. <https://doi.org/10.1002/pd.874>
- 68- Teraoka, S. N., Telatar, M., Becker-Catania, S., Liang, T. et al. (1999). *Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences*. American journal of human genetics. 64(6):1617–1631. <https://doi.org/10.1086/302418>
- 69- Yukiko, F., Kelly, S., Lopes, G., Luiz, C. et al. (2022). *Thyroid and Breast Cancer in 2 Sisters With Monoallelic Mutations in the Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Gene*. Journal of the Endocrine Society. 6:1–4. <https://doi.org/10.1210/jeendo/bvac026>

- 70- Renault, A. L., Mebirouk, N., Fuhrmann, L., Bataillon, G. et al. (2018). Morphology and genomic hallmarks of breast tumours developed by ATM deleterious variant carriers. *Breast cancer research: BCR*, 20(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0951-9>
- 71- Kaur, H., Salles, D. C., Murali, S., Hicks, J. L. et al. (2020). Genomic and Clinicopathologic Characterization of ATM-deficient Prostate Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 26(18), 4869–4881. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0764>
- 72- Mondschein, R., Bolton, D., Clouston, D., Dowty, J. et al. (2022). Novel Germline Mutations in a Cohort of Men with Familial Prostate Cancer. *Cancers*, 14(15):3623. <https://doi.org/10.3390/cancers14153623>
- 73- Hawsawi, Y. M., Shams, A., Theyab, A., Abdali, W. A. et al. (2022). BARD1 mystery: tumor suppressors are cancer susceptibility genes. *BMC cancer*, 22(1):599. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09567-4n>
- 74- Su, Y., Yao, Q., Xu, Y., Yu, C. et al. (2021). Characteristics of Germline Non-BRCA Mutation Status of High-Risk Breast Cancer Patients in China and Correlation with High-Risk Factors and Multigene Testing Suggestions. *Frontiers in genetics*, 12, 674094. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.674094>
- 75- Rofes, P., Del Valle, J., Torres-Esquius, S., Feliubadaló, L. et al. (2021). BARD1 Pathogenic Variants are Associated with Triple-Negative Breast Cancer in a Spanish Hereditary Breast and Ovarian Cancer Cohort. *Genes*, 12(2): 150. <https://doi.org/10.3390/genes12020150>
- 76- Minami, A., Nakanishi, A., Ogura, Y., Kitagishi, Y. y Matsuda, S. (2014). Connection between Tumor Suppressor BRCA1 and PTEN in Damaged DNA Repair. *Frontiers in oncology*, 4, 318. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00318>
- 77- Couch, F. J., Shimelis, H., Hu, C., Hart, S. N. et al. (2017). Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA oncology*, 3(9), 1190–1196. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0424>
- 78- Stempa, K., Wokołarczyk, D., Kluźniak, W., Rogoża-Janiszewska, E. et al. (2021). Do BARD1 Mutations Confer an Elevated Risk of Prostate Cancer? On Behalf Of The Polish Hereditary Prostate Cancer Consortium. *Cancers*, 13(21):5464. <https://doi.org/10.3390/cancers13215464>
- 79- Lee, S. B., Kim, S. H., Bell, D. W., Wahrer, D. C. et al. (2001). Destabilization of CHK2 by a missense mutation associated with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer research*, 61(22), 8062–8067.
- 80- Roeb, W., Higgins, J., & King, M. C. (2012). Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer. *Human molecular genetics*. 21(12), 2738–2744. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds101>
- 81- Cao, Y., Jin, Y., Yu, J., Wang, J., Yan, J. y Zhao, Q. (2017). Research progress of neuroblastoma related gene variations. *Oncotarget*, 8(11), 18444–18455. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14408>
- 82- Pugh, T. J., Morozova, O., Attiyeh, E. F., Asgharzadeh, S. et al. (2013). The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nature genetics*, 45(3), 279–284. <https://doi.org/10.1038/ng.2529>
- 83- Lasorsa, V. A., Formicola, D., Pignataro, P., Cimmino, F. et al. (2016). Exome and deep sequencing of clinically aggressive neuroblastoma reveal somatic mutations that affect key pathways involved in cancer progression. *Oncotarget*, 7(16), 21840–21852. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8187>
- 84- Desrichard, A., Bidet, Y., Uhrhammer, N. y Bignon, Y. J. (2011). CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families. *Breast cancer research: BCR*, 13(6), R119. <https://doi.org/10.1186/bcr3062>
- 85- Molina-Zayas, M., Garrido-Navas, C., García-Puche, J. L., Barwell, J. et al. (2022). Identification of hereditary breast and ovarian cancer germline variants in Granada (Spain): NGS perspective. *Molecular genetics and genomics: MGG*, 297(3), 859–871. <https://doi.org/10.1007/s00438-022-01891-5>

- 86- Cipriano, N. M., Jr, de Brito, A. M., de Oliveira, E. S., de Faria, F. C. et al. (2019). *Mutation screening of TP53, CHEK2 and BRCA genes in patients at high risk for hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) in Brazil*. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, 26(3), 397–405. <https://doi.org/10.1007/s12282-018-00938-z>
- 87- Abou Alaiwi, S., Nassar, A. H., Adib, E., Groha, S. M. et al. (2021). *Trans-ethnic variation in germline variants of patients with renal cell carcinoma*. *Cell reports*, 34(13), 108926. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108926>
- 88- Momozawa, Y., Iwasaki, Y., Hirata, M., Liu, X. et al. (2020). *Germline Pathogenic Variants in 7636 Japanese Patients With Prostate Cancer and 12 366 Controls*. *Journal of the National Cancer Institute*, 112(4), 369–376. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz124>
- 89- Giri, V. N., Morgan, T. M., Morris, D. S., Berchuck, J. E., Hyatt, C., & Taplin, M. E. (2022). *Genetic testing in prostate cancer management: Considerations informing primary care*. *CA: a cancer journal for clinicians*, 72(4), 360–371. <https://doi.org/10.3322/caac.21720>

# **ANEXOS**









571 bases in 7865 scans

ClinVar ID: 188961

