

“ESTUDIO MOLECULAR DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO EN FAMILIAS CON SOSPECHA DE SÍNDROME DE LYNCH”

Trabajo de Fin de Grado
Curso 2023-2024



AUTORA: Carlota Rojo del Río

TUTORA: Dra. Mercedes Durán Domínguez

INSTITUCIÓN: Instituto de Biomedicina y Genética Molecular

Grado en Medicina | Universidad de Valladolid

ÍNDICE:

Resumen	2
1. Introducción	2
1.1. Qué es el cáncer. Cáncer como enfermedad	2
1.2. Cáncer Colorrectal	3
1.3. Cáncer hereditario. Cáncer Colorrectal hereditario	4
1.4. Síndrome de Lynch	5
1.5. Programas de prevención en cáncer hereditario	6
1.6. Técnicas de detección de mutaciones	7
1.7. Clasificación de las variantes	8
2. Objetivos	8
3. Material y métodos	9
3.1. Material: número de muestras, procedencia, criterios de inclusión	10
3.2. Métodos:	
3.2.1. Extracción de ADN	10
3.2.2. Cuantificación de la muestra	10
3.2.3. Protocolo de secuenciación masiva Ion S5	10
3.2.4. Análisis de los datos Ion Reporter	11
3.2.5. Secuenciación Sanger	11
3.3. Recogida de datos clínicos	11
4. Resultados y discusión	
4.1. Resultados moleculares	11
4.2. Relación genotipo-fenotipo	12
5. Conclusiones	17
6. Bibliografía	18
7. ANEXOS	
7.1. Índice de tablas y figuras	22
7.2. Cromatogramas de mutaciones patogénicas	22

1. Resumen

El Síndrome de Lynch es el síndrome de cáncer colorrectal hereditario más frecuente. Se caracteriza por cáncer colorrectal no polipósico de edad temprana de aparición, causado por mutaciones heredadas en la línea germinal y que puede provocar tumores extracolónicos como: gástrico, páncreas, intestino delgado y endometrio. Es el cáncer de endometrio en mujeres en el que nos hemos fijado para seleccionar familias con sospecha de síndrome de Lynch y antecedentes personales o familiares de cáncer de endometrio. La presencia de cáncer de endometrio en estas familias, clásicamente se ha asociado con mutaciones heredadas en los genes de reparación del ADN: MSH2 y MSH6.

La experiencia del laboratorio de cáncer hereditario del IBGM, tras más de 1700 familias analizadas, es que hay muchos casos sin resolver de familias con estas características y que quizás podrían ser explicadas mediante los estudios de secuenciación masiva (NGS).

Así, en este trabajo, se han seleccionado 32 casos de familias con cáncer de endometrio y sospecha de síndrome de Lynch y se han secuenciado mediante un panel multigénico de 40 genes, implicados en síndromes hereditarios de cáncer.

Los resultados de la NGS han revelado 6 casos con mutación patogénica en genes de alta-moderada penetrancia, 3 casos presentaban mutación en el gen MSH2 y otros tres, mutación en los genes: ATM, BRCA1 y BLM. Estos estudios de paneles ampliados, aumentan el porcentaje de familias con resultado positivo.

Se ha podido entablar una relación genotipo-fenotipo en estas familias y se ha determinado que, aunque sería imprescindible aumentar el número de casos analizados mediante este panel, hay más genes, además de los habituales, que podrían ser postulados como candidatos a explicar los casos de cánceres extracolónicos y por consiguiente, el síndrome de Lynch. Serían los genes supresores tumorales.

Este tipo de resultados ayudarán al nuevo manejo de las familias y a la modificación de las guías clínicas en Síndromes de Cáncer Hereditario.

2. Introducción

2.1 Qué es el cáncer. Cáncer como enfermedad

El cáncer abarca un extenso y variado grupo de enfermedades que comparten un rasgo común: un desequilibrio en la relación entre la multiplicación y la muerte celular, inclinándose a favor de la primera [1]. Esto lleva a que se produzca una pérdida de control sobre el ciclo celular y con ello un crecimiento descontrolado de un clon que conlleva la invasión de tejidos y órganos, y en última instancia la muerte.

El proceso de carcinogénesis sucede por acumulación de modificaciones genéticas en tres clases de genes que controlan el ciclo celular: protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN [2].

Mutaciones en los primeros implican ganancia de función. Dan lugar a los oncogenes [3], que promueven y aceleran la división celular. De este modo, una sola mutación en un alelo basta para que la célula prolifere de forma descontrolada, y por ello decimos que la mutación se comporta de forma dominante.

Los segundos, son los encargados de frenar el crecimiento celular, por lo que mutaciones en estos producirán una reducción o pérdida de dicho freno. Y los terceros controlan los mecanismos de reparación del ADN durante el ciclo celular por lo que, si aparecen mutados, aumentará la velocidad de acumulación de mutaciones en otros genes críticos [4].

Sin embargo, para que una célula se transforme en cancerígena a causa de alteraciones en genes supresores o en genes de reparación, es necesario que se produzcan dos eventos mutacionales que inactiven a los dos alelos del gen, comportándose de forma recesiva.

Debido a todo lo anterior, podemos asegurar que el cáncer es una enfermedad genética, ya que siempre existen alteraciones en la secuencia del ADN y/o cambios epigenéticos que influyen en la expresión de genes (1).

Uno de los tumores mejor estudiados y que sirve como modelo de carcinogénesis es el cáncer colorrectal.

2.2 Cáncer Colorrectal.

Sin duda el modelo de carcinogénesis por excelencia es el cáncer colorrectal, en el que se ha podido correlacionar cada estadio (adenoma-carcinoma) con los eventos moleculares y genéticos.

El Cáncer Colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más comunes a nivel mundial y la más frecuente en España si se tienen en cuenta ambos sexos, con 42.721 nuevos casos al año [5]. La mayor parte de casos son diagnosticados entre los 65 y los 75 años y afecta a hombres y mujeres prácticamente por igual.

Tanto el colon como el recto están compuestos por diversas capas de tejido, de más interna a más externa: mucosa, submucosa, muscular y serosa [6]. En la mucosa es donde se localizan las glándulas que producen moco, y es aquí donde los tumores malignos se desarrollan con mayor frecuencia.

El proceso de carcinogénesis implica una cascada de alteraciones en los genes de modo que, las células que adquieren ventajas de crecimiento van siendo seleccionadas y podrán proliferar. Fearon y Vogelstein [7] propusieron en 1990 una secuencia

adenoma-carcinoma, por la que se necesitan mínimo siete alteraciones para que se desarrolle un tumor maligno, requiriéndose de entre 10 y 15 años. Se distinguen principalmente tres vías en la carcinogénesis colorrectal [8]: la vía del fenotipo supresor y la vía del fenotipo mutador. Cada una exhibe una inestabilidad genómica particular.

La primera o vía de la inestabilidad cromosómica (CIN) funciona bloqueando genes supresores mediante una mutación o delección, entre los que se encuentran: *K-Ras*, *APC* y *p53*. A este grupo pertenecen el 85% de los cánceres esporádicos y el 100% de los casos de carácter hereditario vinculados a la poliposis adenomatosa familiar.

La ruta del fenotipo mutador o de la inestabilidad de microsatélites (IMS) surge debido a la incapacidad del sistema de reparación para corregir los errores que ocurren durante el proceso de replicación del ADN. Implica a los genes *MMR* y se encuentra presente en el 90-95% de HNPCC y en un 15% de los tumores esporádicos.

En 1999 Toyota introduce una tercera vía, posible modificación de la secuencia adenoma-carcinoma, conocida como vía del fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) [9]. En ella se produce una metilación anormal de citosina en 5'CpGs que conduce a la inactivación epigenética de varios genes supresores de tumores, como *p16*, *RB*, *MLH1* y *BRCA1*.

2.3 Cáncer hereditario. Cáncer Colorrectal hereditario.

El 100% de los cánceres se origina como consecuencia de variantes patogénicas (VP) en genes que controlan el ciclo celular, pero no todas las variantes se heredan de un progenitor (1). Solo el 5-10% del total de cánceres pertenecen a cánceres hereditarios, aunque ello supone 1,4 millones de casos nuevos cada año. La mayoría de estos cánceres sucede en genes de alta penetrancia, los cuales se heredan de acuerdo a un patrón mendeliano autosómico dominante, y en los que se acorta el modelo de carcinogénesis, debido a que el individuo hereda una primera mutación germinal. La hipótesis de Knudson [10] es considerada la explicación más validada que define el modelo de desarrollo de tumores hereditarios y familiares. Según dicha hipótesis, a esta primera mutación se le denomina primer hit, y se produce en vía germinal (presente por tanto en todas las células del individuo y transmitible a la siguiente generación). No obstante, se necesita otra mutación (conocida como second hit) producida en el segundo alelo del gen para el desarrollo del cáncer [4], que en este caso se producirá en vía somática, es decir, de novo en el tejido. Por lo que, si anteriormente veíamos que se necesitaba de la acumulación de 6-7 eventos requiriéndose de entre 10 y 20 años, en los cánceres hereditarios es suficiente con 2 o 3 años (en consecuencia, los tumores aparecen a edades más tempranas).

No obstante, en ciertas familias se ha descrito una mayor frecuencia de algunos tipos de cáncer sin que exista un patrón de herencia definido, denominándose síndrome de cáncer familiar [11]. Se debe a alteraciones en genes de media o baja penetrancia junto con la presencia de factores ambientales.

En cáncer colorrectal hay varios síndromes hereditarios, siendo tres de ellos los más prevalentes [12]: síndrome de Lynch o colorrectal hereditario no polipósico (asociado a inestabilidad de microsatélites), poliposis adenomatosa familiar (producida por una mutación en el gen *APC*, con más de 100 pólipos) y poliposis atenuada (entre 10 y 100 pólipos, por mutaciones en ambos alelos del gen *MUTYH*).

Aproximadamente el 10-20% de los cánceres de colon y 15-25% de los de endometrio contienen inestabilidad de microsatélites [13]. Suelen producirse en mujeres, en colon derecho, habitualmente tienen un mejor pronóstico y se benefician mayoritariamente de inmunoterapia (anti PD-1, anti CTLA-4) en lugar de beneficiarse de 5-fluorouracilo [13]. Presentan mayor nivel de metilación del ADN, baja frecuencia de mutaciones en *APC* y *TP53*, y no contienen mutación en *KRAS*, aunque sí en *BRAF* [11]. De estos, un 10-20% son hereditarios.

La importancia del cáncer hereditario radica en que se trata de una enfermedad familiar, que abarca a sucesivas generaciones dentro de una misma familia y que, conociendo la mutación causal, podemos prevenirlo mediante Asesoramiento genético. Asimismo, identificar dicha mutación puede ser de gran importancia de cara a realizar un diagnóstico prenatal y preimplantacional [13].

2.4 Síndrome de Lynch

El síndrome de Lynch es el síndrome hereditario de cáncer colorrectal más frecuente, por delante de la poliposis adenomatosa familiar (1). Supone entre 5-7% de todos los casos de cáncer colorrectal [14]. Se hereda de manera autosómica dominante y está asociado con una mayor probabilidad de padecer cáncer colorrectal, de endometrio y otros tipos de tumores como los de ovario, tracto urinario superior, estómago, intestino delgado, páncreas, vías biliares, gliomas y tumores de glándulas sebáceas.

Es producido por mutaciones en la línea germinal de genes que intervienen en el mecanismo de reparación de errores de emparejamiento de nucleótidos (mismatch repair: *MMR*) que ocurren durante la replicación del ADN: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* [13].

No obstante, hay dos ocasiones en las que dichos genes no aparecen mutados, aunque se bloquea su función de forma indirecta. Es el caso de la epimutación en *MLH1*, en la que se inactiva tras la hipermetilación producida en su promotor, o por las grandes

deleciones producidas en el gen *EPCAM* (muy próximo a *MSH2*, causando el silenciamiento de este).

En condiciones normales, los genes implicados en el mecanismo MMR codifican para proteínas que forman complejos de heterodímeros (1): *MSH2-MSH6 (MutSa)* y *MLH1-PMS2(MutLa)* que se enlaza con el anterior y, junto a cofactores, reclutan exonucleasa-1, la cual que corta el fragmento de ADN que contiene el error.

2.5 Programas de prevención en cáncer hereditario.

Gracias a la detección precoz de pacientes que portan mutaciones podemos implementar diversas medidas para disminuir el riesgo de desarrollar cáncer. Para ello surgen los diferentes programas de prevención de cáncer hereditario, que buscan detectar a aquellos individuos con alta susceptibilidad de padecer cáncer basándonos en una historia familiar de riesgo.

En 1990 la Sociedad Internacional de Tumores Gastrointestinales Hereditarios (International Society of Gastrointestinal Hereditary Tumours-INSIGHT) estableció unos criterios clínicos para el diagnóstico y la selección de pacientes en el síndrome de Lynch, los criterios de Ámsterdam I (1) (Tabla 1). Años más tarde, en 1999, se publicaron los criterios de Ámsterdam II (Tabla 1), puesto que los anteriores no consideraban los cánceres extracólicos.

Tabla 1. Se muestran los Criterios de Ámsterdam I y Ámsterdam II. Tabla creada a partir de los criterios publicizados por el Colegio Americano de Gastroenterología (ACG) en las guías clínicas de 2015 [15].

Criterios de Ámsterdam I/II
Debe haber por lo menos tres parientes con CCR o tumores asociados al síndrome de Lynch (endometrio, intestino delgado, uréter / renal, cáncer de la pelvis. Además, han de cumplirse TODOS los criterios siguientes:
<ul style="list-style-type: none">• Uno de los familiares debe de ser de primer grado de los otros dos• Al menos dos generaciones consecutivas afectas• Mínimo un caso diagnosticado antes de los 50 años• Exclusión del diagnóstico de poliposis adenomatosa familiar• Confirmación de los diagnósticos con informes anatomopatológicos

Para aquellas familias en las que el tamaño o la información era insuficiente como para considerar dichos criterios, surgieron los de Bethesda [16] (tabla 2).

Tabla 2. *Criterios de Bethesda revisados. Tabla basada en la última revisión de 2004 [16]. *Cánceres relacionados con el Síndrome de Lynch: CCR, endometrio, estómago, ovario, páncreas, uréter y pelvis renal, tracto biliar, cerebro, glándula sebácea y carcinoma de intestino delgado. ** Infiltración linfocitaria del tumor, reacción de los linfocitos tipo Crohn, tumor mucinoso y diferenciación en anillo de sello o patrón de crecimiento medular.*

Criterios de Bethesda revisados

Tiene que cumplir alguno de los siguientes criterios:

- Cáncer colorrectal < 50 años
- Presencia de cáncer colorrectal sincrónico/ metacrónico o de un tumor asociado a CCHNP *, independientemente de la edad
- Cáncer colorrectal con histología de tumor* * de IMS-alta < 60 años
- Cáncer colorrectal y uno o más familiares de primer grado con un tumor asociado a CCHNP

De acuerdo con dichos criterios clínicos de sospecha se decide a qué pacientes derivar a la Unidad de Consejo Genético, debiendo derivar a todos aquellos pacientes o familias que cumplan todos los criterios de Ámsterdam o alguno de los criterios de Bethesda modificados. Existen además una serie de modelos matemáticos, como MMRpredict, MMRpro y PREMM5, que estiman la probabilidad de encontrar una mutación en los genes asociados al Síndrome de Lynch. Sin embargo, el análisis del tumor sigue siendo el método diagnóstico fundamental. [17].

Una vez que el paciente recibe un resultado positivo en la prueba, se incluyen diferentes opciones de prevención (1): vigilancia clínica periódica (principalmente mediante colonoscopia completa cada 1-2 años desde los 20-25 años), protocolos de quimio e inmunoprevención y cirugía profiláctica. Todas las opciones se discuten con el paciente portador de la mutación en la Unidad de Consejo Genético.

2.6 Técnicas de detección de mutaciones.

Las técnicas de detección de mutaciones se fundamentan en el análisis de la secuencia de los ácidos nucleicos. Son las mismas para todos los tipos de tejidos, sin importar el protocolo de extracción utilizado [18].

Para detectar cambios en unas pocas bases se emplea la técnica de secuenciación Sanger, también denominada secuenciación directa o clásica [19]. Se basa en una síntesis enzimática a partir de un primer de secuencia complementaria al ADN objeto de estudio, en el que la ADN polimerasa va incorporando al extremo 3' dNTPs (2'-desoxinucleótidos) y ddNTPs (2',3'-didesoxinucleótidos). La diferencia radica en que los ddNTPs carecen del grupo hidroxilo del carbono 3, por lo que, al incorporarlo, se detiene

la síntesis de dicha cadena. Con ello, se producen de manera aleatoria segmentos de ADN de diversas longitudes de manera controlada en posiciones determinadas, que se identificarán gracias a que el último nucleótido de cada fragmento lleva ligada un fluorocromo en función de si es A, T, G o C [20]. Los fragmentos sufren una separación mediante electroforesis y posteriormente el secuenciador excita las moléculas fluorescentes gracias a un láser, que se detectan gracias a una cámara. Los datos obtenidos se transmiten a un software que lo muestra en forma de electroferogramas.

Sin embargo, la secuenciación Sanger requiere mucho tiempo, ya que en cada reacción solo es capaz de leer aproximadamente 900 pares de bases [18]. Por ello, y para reducir el coste y el tiempo, apareció en 2005, después del Proyecto Genoma Humano, la NGS, también conocida como secuenciación masiva o en paralelo (1). Se trata de una única reacción que utiliza al mismo tiempo una gran cantidad de secuencias de ADN diferentes [21], a partir de paneles multigénicos preformados, diseñados para la entidad en cuestión. Existen diferentes plataformas de NGS, que se diferencian en las distintas fases: creación de las librerías, amplificación del clon y secuenciación. Aunque todas arrojan un resultado parecido, que es la producción de cientos de megabases de cadenas de nucleótidos en una sola ejecución de secuenciación masiva [22].

2.7 Clasificación de las variantes

La detección de mutaciones patogénicas en genes con susceptibilidad para padecer cáncer posibilita el diagnóstico clínico de los síndromes de cáncer hereditario. Se trata de una clasificación compleja basada en múltiples líneas de evidencia: la secuencia del ADN, la correlación con diversas variables clínicas y patológicas, y conclusiones resultantes de la evidencia experimental.

Según el impacto clínico, la International Agency for Research on Cancer (IARC) ha clasificado las variantes en distintas clases [23]. En el año 2015 el American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) junto con la Association for Molecular Pathology (AMP) establecieron ciertas normas para la evaluación clínica de las variantes, basándose en 28 criterios que evalúan el nivel de evidencia [24], que han sido mejorados gracias al sistema Sherlock. De esta forma, podemos clasificar las variantes en: patogénicas (clase 5), probablemente patogénicas (clase 4), de significado desconocido (clase 3), probablemente benignas (clase 2) y benignas (clase 1).

Se recomiendan estudios de seguimiento [25] en portadores de variantes de alto riesgo (clases 4 y 5); valoración individualizada en función de los antecedentes familiares y diversos factores de riesgo para la clase 3; y no se recomienda seguimiento para las clases 1 y 2.

3. Objetivos

El propósito principal de esta investigación es examinar el espectro mutacional del cáncer de endometrio relacionado con el Síndrome de Lynch.

Los objetivos concretos que nos hemos marcado son:

1. Seleccionar casos de sospecha de Síndrome de Lynch con antecedentes personales o familiares de cáncer de endometrio.
2. Analizar mediante un panel multigénico y plataforma de nueva generación (NGS) las muestras seleccionadas.
3. Establecer una correlación entre los datos genómicos obtenidos y los fenotipos de las familias seleccionadas.
4. Plantear nuevas perspectivas en el manejo de los tumores de endometrio en el marco del Síndrome de Lynch.

4. Material y métodos

a. Material: número de muestras, procedencia, criterios de inclusión.

Para este trabajo se han seleccionado 32 muestras, seleccionadas de una base de datos anonimizada de casos referidos desde las Unidades de Consejo Genético de Cáncer Hereditario del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid y del Hospital Universitario de Burgos, para su estudio en el laboratorio de cáncer hereditario del Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM).

Se han seleccionado 32 casos con indicios de síndrome de Lynch y casos de cáncer de endometrio en la familia. Los casos cumplían los criterios del programa de Consejo Genético de la Junta de Castilla y León (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios de inclusión en el programa de Consejo Genético de cáncer colorrectal de la Junta de Castilla y León.

POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR (PAF):
A. Persona con antecedentes familiares de Polipomatosis Adenomatosa.
B. Presencia de más de 100 pólipos en la misma persona, independientemente de su historia familiar.
CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSICO (CCHNP) O SÍNDROME DE LYNCH (SL).
C. Se remitirá a la UCG para valoración de Síndrome de Lynch (SL) con déficit de expresión de alguna proteína del sistema de reparación del ADN: MLH1, MSH2, MSH6 o PMS2, en su cáncer colorrectal analizado mediante inmunohistoquímica (IHQ). Si éste hubiera fallecido, serían enviados a la UCG sus familiares de primer grado. El estudio de IHQ de proteínas reparadoras se solicitará al Servicio de Anatomía Patológica correspondiente: <ol style="list-style-type: none">1. De forma universal, siempre en todo cáncer colorrectal incidente diagnosticado antes de los 70 años de edad.2. En cáncer colorrectal incidente diagnosticado después de los 70 años de edad, solamente si se cumple alguno de los criterios de Bethesda siguientes:<ol style="list-style-type: none">A. Presencia de CCR sincrónico o metacrónico con otros tumores asociados al SL[†], independientemente de la edad.B. Paciente con CCR y un familiar de primer grado con un tumor relacionado con SL[†], diagnosticado antes de los 50 años.C. Paciente con CCR y dos o más familiares de primer o segundo grado con un tumor relacionado con SL[†], independientemente de la edad.
POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR ATENUADA (PAFA):
D. Presencia de más de 10 pólipos adenomatosos en la misma persona, independientemente de su historia familiar.
E. Pacientes con adenomas colorrectales antes de los 40-45 años.
OTROS (A CONSULTAR PREVIAMENTE CON LA UCGC)
F. Otros casos (a valorar por la UCGC).
H. Personas (sanas o no) pertenecientes a familias con mutación conocida en la familia.

[†] Tumores relacionados con SL: colorrectal, endometrial, gástrico, ovárico, pancreático, ureteral, de pelvis renal, de vía biliar, cerebral (de estirpe glial como en el síndrome de Turcot), adenomas de glándulas sebáceas y queratoacantomas como en el síndrome de Muir-Torre, y carcinomas de intestino delgado.

Todas las muestras han pasado por Consejo Genético, han recibido la información pertinente y se han firmado los correspondientes consentimientos informados.

b. Métodos:

i. Extracción de ADN

Se ha extraído ADN a partir de 200ul de sangre periférica, se utilizó el kit de extracción manual de la empresa ROCHE: High Pure PCR Template Preparation kit, siguiendo las recomendaciones y protocolo del fabricante, se obtuvo un volumen final de 50ul de ADN genómico.

ii. Cuantificación de la muestra

Se analizó la integridad de las muestras de ADN mediante una técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para medir la cantidad de ADN presente, se empleó el fluorómetro Qubit® 3.0 junto con el kit Qubit™ dsDNA HS Assay de Thermo Fisher Scientific, según las indicaciones del fabricante.

iii. Protocolo de secuenciación masiva mediante NGS

Para el análisis de las muestras se ha utilizado un panel multigénico de 40 genes: EasyNGS HCPanel de la marca HoopBio (Tabla 4)

Tabla 4. Panel de 40 genes EasyNGS HCPanel de la marca HoopBio.

CÁNCER				Lynch	Poliposis Anomala Familiar	Feocromocitoma Paraganglioma	Otros Genes a analizar según criterios clínicos
Mama + Ovario	Mama	Ovario					
ATM	MLH1	ATM	BRCA1	MLH1	APC	FH	PTEN
BRCA 1	MSH2	BRCA1	BRCA2	MLH2	MUTYH	MAX	STK11
BRCA 2	MSH6	BRCA2	BRIPI	MLH6	BMPRI	MET	TP53
CHEK2	RAD50	CHEK2	MLH1	PMS2	SMAD4	NF1	NF1
NBN	RAD15C	NBN	MLH2	EPCAM	POLE	RET	CDH1
PALB2	RAD15D	PALB2	MSH6	POLE	POLD1	VHL	
BRIPI	EPCAM	RAD50	EPCAM	POL1		SDHD	
			RAD51C			SDHC	
			RAD51D			SDHB	
						SDHA	
						TMEM127	
						ADHAF2	
COWDEN	VON HI PPEL - LINDAU	RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	FRITZ JEGHERS	NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO 1	NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO 2	GÁSTRICO DIFUSO	MELANOMA FAMILIAR
PTEN	VHL	RB1	STK11	MEN1	RET	CDH1	CDKN2A

La creación de las bibliotecas y el templado fueron llevadas a cabo de manera mecanizada empleando el sistema Ion Chef de Thermo Fisher. Posteriormente, las muestras fueron secuenciadas en la plataforma Ion S5 utilizando un Ion 530 Chip, siguiendo las indicaciones del fabricante. La capacidad de este Chip es de 16 muestras, por lo que usando dos Chips 530, en una única carrera NGS podremos analizar las 32 muestras, 16 en cada Chip.

iv. Análisis de los datos

Los resultados obtenidos con la secuenciación fueron comparados con el genoma humano de referencia hg19 y evaluados mediante el software Ion Reporter (Thermo Fisher Scientific). Todos los resultados de variantes genéticas fueron analizados y clasificados atendiendo a su clasificación en la base de datos ClinVar.

v. Secuenciación Sanger

Las mutaciones patogénicas halladas en las muestras, así como el estudio directo de familiares se confirmaron mediante secuenciación tipo Sanger, en un analizador automático ABI3130XL, en array de 16 capilares y el uso de terminadores marcados o BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

c. Recogida de datos clínicos

Para elaborar el actual estudio, tras realizar la secuenciación, se realizó una relación del genotipo encontrado con el fenotipo de los casos positivos para intentar establecer una relación genotipo-fenotipo.

5. Resultados y discusión

5.1 Resultados moleculares

Se han obtenido los resultados de secuenciación de 32 muestras mediante panel multigénico y NGS. Del total de muestras analizadas, 5 ya tenían estudio previo, con otras técnicas, con resultado no concluyente y 27 fueron de nuevo estudio. En 20 muestras se disponía de estudio de Inmunohistoquímica (IHQ). El déficit de expresión de las proteínas *MSH2* y *MSH6* está relacionado con cáncer de endometrio.

Se han detectado 6 muestras con mutación patogénica o resultado positivo: 3 con mutación en el gen *MSH2* y otras 3, en otros genes distintos: 1 *BLM*, 1 *ATM* y 1 en *BRCA1*. Las mutaciones halladas se definen en la tabla 5.

Tabla 5. Variantes genéticas encontradas mediante paneles multigénicos. EA: Edad a la que apareció el tumor. ClinVar: Base de datos de clasificación de patogenicidad de mutaciones. P: Patogénica. Nueva: variante no descrita en la base de datos ClinVar.

Muestra	Familia	EA	Gen	Función	Exón	Proteína	cDNA	ClinVar ID
C-1041	1	46	MSH2	Frameshift	7	p.Gln409ArgfsX7	c.1226_1227delAG	P 90577
C-1922	2	51	MSH2	Frameshift	11	p.Asp575GlyfsX5	c.1723_1724dupG	Nueva
C-2120	3	47	MSH2	Nonsense	13	p.Asn568TrpfsX9	c.2131 C>T	P90903
C-2097	4	83	BLM	Frameshift	2	p.Ala18CysfsX6	C53_56delCCAG	Nueva
C-2388	5	41	ATM	Nonsense	5	p.Phe2958X	c.8873_8874delTT	P 220831
C-1950	6	68	BRCA1	Nonsense	11	p.Gln563X	c.1687C>T	P 37426

La clasificación de las variantes tuvo lugar empleando la base de datos ClinVar. De las variantes, 3 han sido clasificadas como patogénicas o probablemente patogénicas y 2 no han sido registradas aún. Las variantes se localizan en 4 genes, siendo todos de alta penetrancia excepto *BLM*, que es el único descrito como de moderada penetrancia.

De las seis variantes, 3 son de tipo frameshift, rompiendo la secuencia de lectura y provocando una proteína truncada con un codón de parada de la transcripción alternativo. Las otras tres, pertenecen al tipo nonsense o sin sentido, dando lugar a un codón de parada prematuro que conlleva la producción de una proteína aberrante carente de funcionalidad [24].

5.2 Relación genotipo-fenotipo

El 18,75% de las muestras analizadas resultaron positivas. En las series estudiadas, en el laboratorio de cáncer hereditario, anteriores a estudio de panel multigénico, el porcentaje de detección positiva de mutación rondaba el 15%. Con lo que el rendimiento de detección se ha incrementado con el panel ampliado de 40 genes.

El gen mutado con mayor frecuencia fue *MSH2*, como era lo esperado, encontrándose mutado en tres muestras y con un total de 3 variantes diferentes.

Se trata de un gen que participa en el sistema de reparación MMR. El daño de proteínas *MSH2* se asocia con inestabilidad del ADN de microsatélite, dando lugar a nucleótidos desajustados del tipo lazos de inserción (IDL) [26]. Aparece frecuentemente mutado en cáncer de colon hereditario no polipósico, síndrome de Muir-Torre, y en gran cantidad de tejidos tumorales.

Investigaciones recientes han descubierto que el incremento de expresión y reducción de la metilación de *MSH2* se ha relacionado con un pronóstico desfavorable en tumores de endometrio, pudiéndose utilizar como biomarcador diagnóstico y pronóstico [27].

Tanto la mutación causada en el exón 7 (muestra 1041) como la causada en el 13 (muestra 2120), aparecen descritas en la literatura como patogénicas y causantes ampliamente conocidas del Síndrome de Lynch [28] [29].

Ambas producen codones de parada alternativos que dan lugar a una proteína anómala, tanto por variación en la pauta de lectura como por introducción de un codón de terminación. Este mismo mecanismo se produce en la mutación del exón 11 (muestra 1922) que, pese a no estar descrita en ClinVar, podemos predecir que será patogénica. Siguiendo este razonamiento, es lógico pensar que las historias familiares de las muestras analizadas en el presente trabajo desarrollasen tumores de endometrio y otros relacionados con la esfera Lynch.

En el caso de la primera paciente (Figura1), con un cáncer de endometrio a los 46 años, observamos 3 casos de cáncer colorrectal en la familia, apareciendo dos de ellos por debajo de los 36 años.

FAMILIA 1

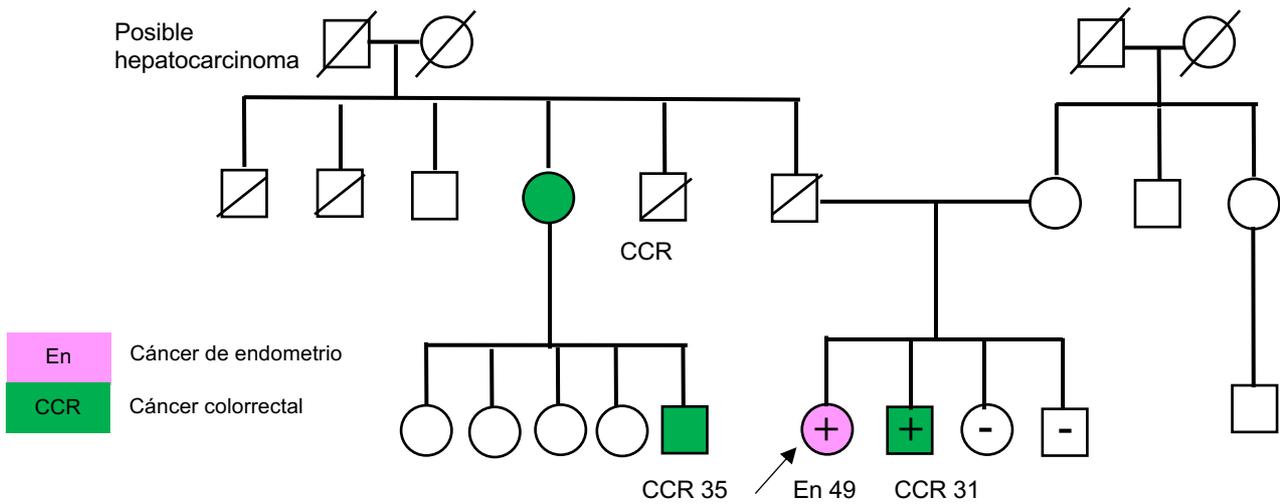


Figura 1. Genograma perteneciente a la familia 1, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen MSH2. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación. En (-), los analizados con resultado negativo para la mutación.

En el paciente 1922 (Figura 2), se observa una historia familiar de cánceres de la esfera Lynch: 1 CCR, 1 cáncer gástrico, 1 cáncer de próstata, 2 cánceres de mama y 1 de endometrio; como era de esperar teniendo en cuenta la relación genotipo-fenotipo mencionada anteriormente. Tanto el caso índice como la hermana con carcinoma de endometrio fueron confirmados para mutación en MSH2.

FAMILIA 2:

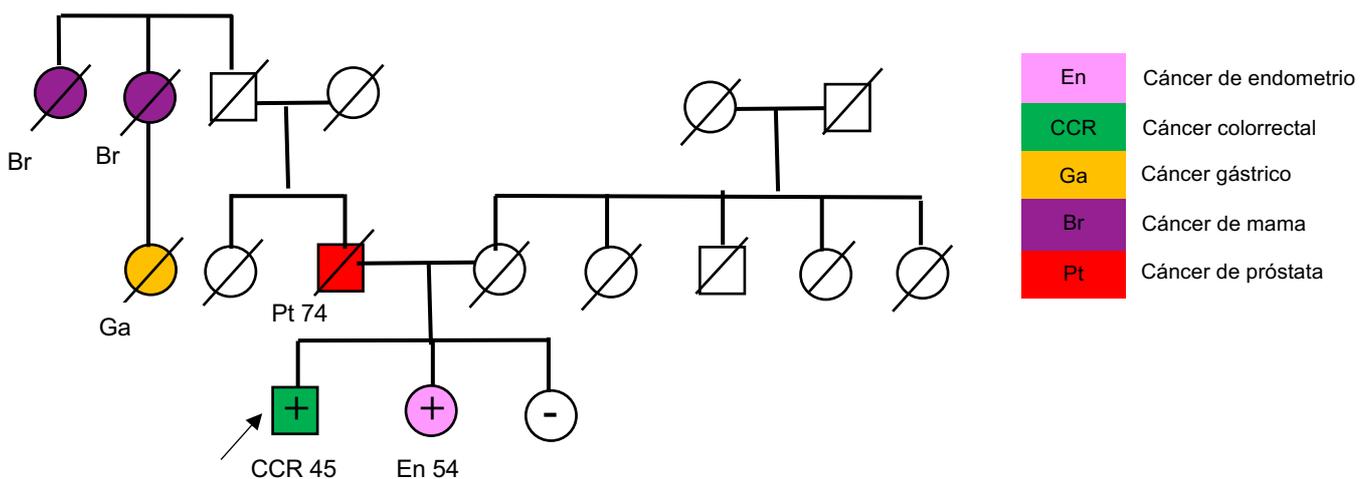


Figura 2. Genograma perteneciente a la familia 2, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen MSH2. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación. En (-), los analizados con resultado negativo para la mutación.

Por último, en la muestra 2120, perteneciente a la familia 3 (Figura 3), podemos apreciar de igual modo una historia familiar de cánceres de la esfera Lynch, tres de ellos por debajo de los 50 años.

FAMILIA 3:

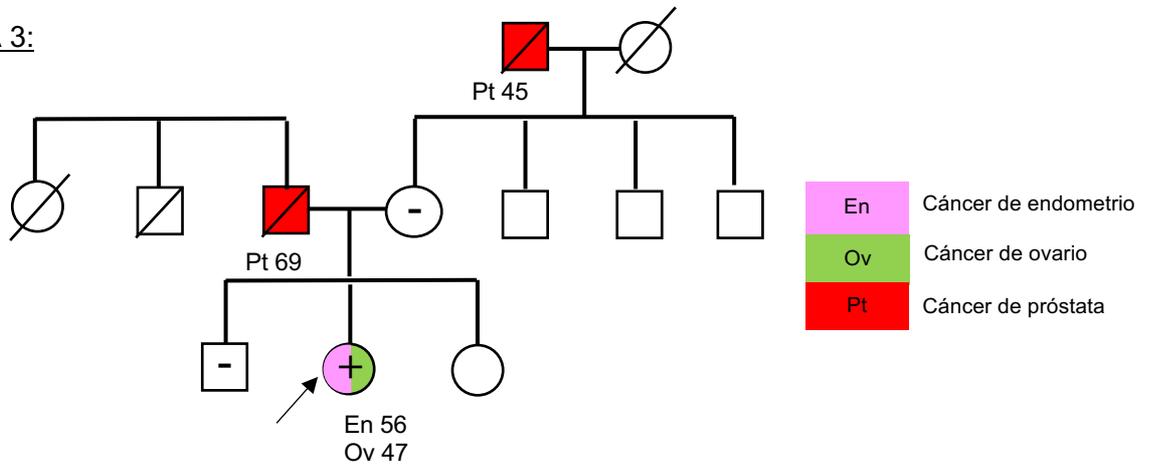


Figura 3. Genograma perteneciente a la familia 3, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen MSH2. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación. En (-), los analizados con resultado negativo para la mutación.

Por otro lado, el gen *BLM* se encuentra mutado en una muestra, no descrita previamente en ClinVar pero probablemente patogénica por tratarse de una mutación frameshift.

Codifica para una helicasa de ADN que participa en un complejo de proteínas asociadas a *BRCA1* (BASC) y en un complejo denominado BRAFT, que contiene cinco de las proteínas del grupo de complementación de la Anemia de Fanconi.

Se asocia principalmente al síndrome de Bloom. Los individuos con esta afección tienen un aumento en la probabilidad de desarrollar cáncer a una edad temprana, en especial cáncer de piel de células escamosas, leucemia, linfoma y cáncer de tracto gastrointestinal [30].

Se ha descrito una tasa más alta de mutación heterocigota del gen *BLM* en mujeres con cáncer de endometrio y colorrectal al contrastarlo con la población general, diagnosticándose estos a una edad más joven [31].

La muestra c2097 (Familia 4, Figura 4) refleja una historia familiar de CCR, con al menos 5 casos de CCR en la familia. Además, se desarrollaron dos casos de cáncer de ovario y uno de próstata. La paciente desarrolló, además, cáncer de endometrio años después al de colon, motivo por el que fue incluida en el estudio.

FAMILIA 4:

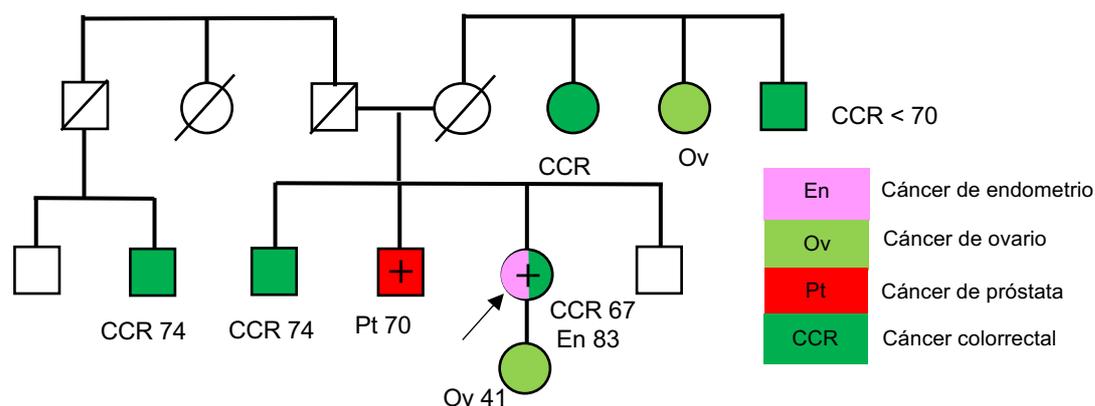


Figura 4. Genograma perteneciente a la familia 3, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen BLM. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación.

Por otra parte, el gen ATM, también conocido como el gen de la ataxia telangiectasia, aparece localizado en el brazo largo del cromosoma 11. Es responsable de codificar la proteína ATM serina/treonina quinasa, la cual desempeña un papel crucial en el control de los mecanismos de división celular y en la reparación de daños del ADN (CHEK1 y 2). Funciona como regulador de proteínas que incluyen las supresoras tumorales *p53* y *BRCA1*. Mutaciones en este gen se asocian con ataxia telangiectasia, un trastorno autosómico recesivo, y síndromes hereditarios de susceptibilidad al cáncer, entre los que destacan casos de cánceres de endometrio [32].

En el caso de nuestra paciente (muestra 2388), la variante cambia un nucleótido en el exón 62, creando una señal de parada de traducción y dando lugar a un producto de proteína no funcional. Dicha variante se ha reportado en individuo afectado de ataxia-telangiectasia [33] y un afectado de cáncer de mama bilateral [34].

Esta variante ha sido identificada en cromosomas 1/251380 en la población general por la Base de Datos de Agregación del Genoma (gnomAD).

La historia familiar de la muestra 2388 (Figura 3) revela historia de dos CCR y otros dos cánceres gástricos, que han sido asociados a mutaciones nonsense en *ATM* junto a cánceres de próstata y pulmón (en el individuo III.1 se confirmó la mutación con Sanger) [35]

La edad de aparición de los tumores gástricos fue en ambos casos de 67 años.

FAMILIA 5:

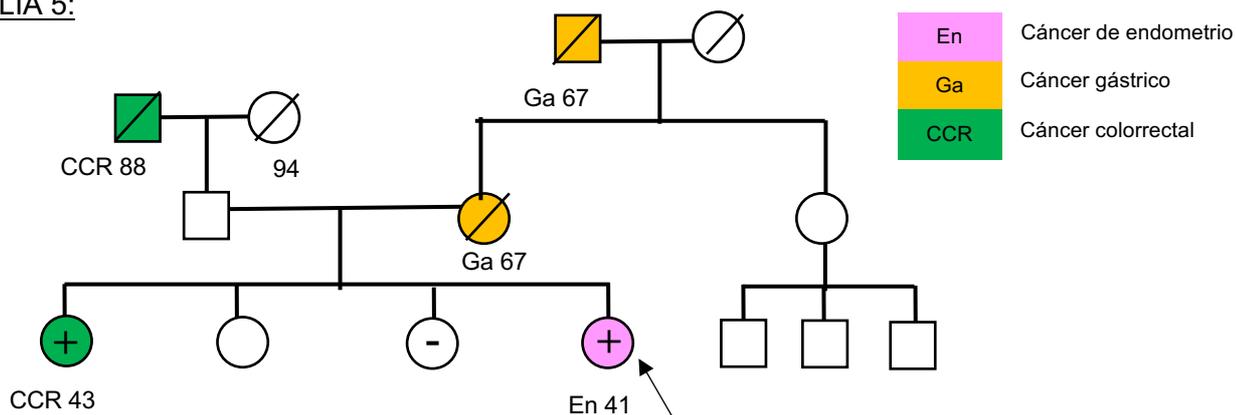


Figura 5. Genograma perteneciente a la familia 5, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen *ATM*. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación. En (-), los analizados con resultado negativo para la mutación.

BRCA1 es un gen supresor de tumores: codifica para una proteína implicada en el complejo de vigilancia del genoma relacionado con *BRCA1* (BASC). Alrededor del 40% de los cánceres de mama con carácter hereditario y más del 80% de los de mama y ovario, se deben a mutaciones en dicho gen [36]. Especialmente, mutaciones con pérdida de función (nonsense, frameshift, splice site, exonic deletions) y deleciones del gen. Se ha observado un aumento de riesgo de dos a tres veces de cáncer de endometrio en mujeres con *BRCA1* mutado y una mayor prevalencia de desarrollar la forma serosa, característicamente más agresiva [36].

Nuestra paciente (muestra 1950) es portadora de la variante c.1687C-T en el exón 11 de *BRCA1*, resultando en un codón de parada prematuro que da lugar a una proteína truncada. El exón 11, es el mayor exón de *BRCA1*, abarcando el 63% de la secuencia de codificación y la mayoría de los dominios funcionales con papel en la reparación del ADN. Dichos dominios incluyen: interacción con *MSH2*, *Chk2*, *ATR* y *ATM*. Por ello es de esperar que se relacione con un amplio espectro de tejidos.

En la historia familiar de nuestra muestra (Figura), encontramos dos cánceres de mama a las edades de 50 y 85 años, y ningún cáncer de ovario, lo cual concuerda si tenemos en cuenta que la mayor relación de *BRCA1* con cáncer de ovario y mama se relaciona con mutaciones entre los nucleótidos 2401-4191 [37].

Por otro lado, en la historia familiar destacan dos casos de tumores cerebrales a los 60 años y uno de CCR a los 90, aunque los estudios realizados hasta ahora no relacionan mutaciones en el exón 11 de *BRCA1* con tumores de SNC.

FAMILIA 6:

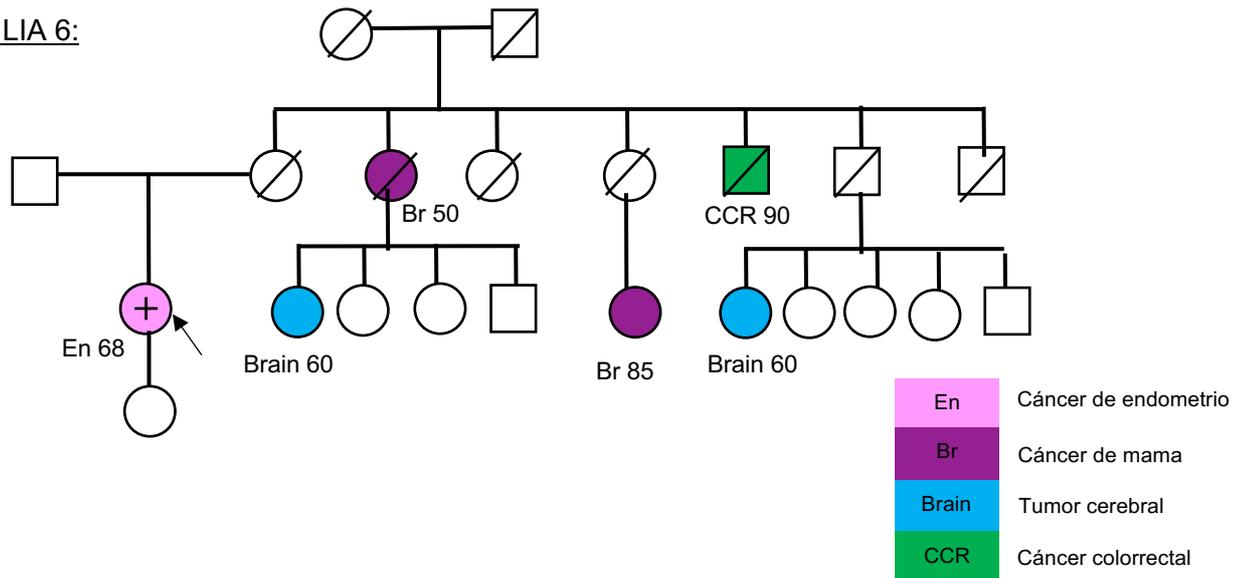


Figura 6. Genograma perteneciente a la familia 5, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen BRCA1. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación.

Como hemos podido exponer a lo largo del presente trabajo, gracias a los métodos de secuenciación masiva hemos podido establecer la relación entre los genotipos del pool de las 32 familias y los fenotipos. Encontramos que en un 50% de las familias con tumores de endometrio y criterios clínicos de Síndrome de Lynch con mutaciones patogénicas, se identifican mutaciones en genes distintos a MMR, razón que justificaría el empleo de dichos paneles en el manejo de Síndromes de Cáncer Hereditario.

6. Conclusiones.

1. El uso de paneles multigénicos mediante Secuenciación Masiva (NGS) mejora notablemente el diagnóstico molecular en Síndrome de Lynch.
2. Los tumores de endometrio asociados a Síndrome de Lynch pueden estar asociados a mutaciones en genes distintos a MSH2 y MSH6.
3. Los genes ATM, BRCA1 y BLM de alta y moderada penetrancia pueden ser candidatos como responsables de tumores de endometrio hereditarios.
4. Se necesita aumentar el número muestral en el estudio multigénico para corroborar estos resultados, pero los obtenidos abren una nueva línea de investigación en nuevos genes responsables.
5. Se ha podido establecer una correlación genotipo-fenotipo en nuestros casos, observándose cómo los genes supresores tumorales además de los reparadores del ADN, pueden ser la causa de síndrome de Lynch y provocar tumores endometriales en las mujeres de las familias afectadas

BIBLIOGRAFÍA:

1. Cáncer hereditario. Madrid: Sociedad Española de Oncología Médica; 2019.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
3. Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am* 1996;275:62-70.
4. Lipsick J. A History of Cancer Research: Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2020;12:a035907.
5. Las cifras del cáncer en España 2023. Sociedad Española de Oncología Médica;
6. J. Mayer R, Loscalzo J, Fauci AS, Jameson JL, Kasper DL, Hauser SL, et al. Cánceres del tubo digestivo bajo [Internet]. En: Harrison. Principios de Medicina Interna, 21e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2022 [citado 2024 may 21]. Available from: accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1161966511
7. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
8. García-Foncillas J, Honorato B, García F, Bandrés E, Zabalegui N, Zárata R, et al. Carcinogénesis colónica: proceso de transformación neoplásica. *revista-de-medicina* 2017;15-9.
9. Xicola RM, Llor X. Defectos de la metilación del ADN en el cáncer colorrectal esporádico y hereditario. *Gastroenterol. hepatol. (Ed. impr.)* 2012;35:480-7.
10. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:157-62.
11. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50:113-30.
12. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023;73:17-48.
13. Idos G, Valle L. Lynch Syndrome [Internet]. En: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., editores. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [citado 2024 may 22]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/>
14. Fundación Española del Aparato Digestivo CGP y MJMG 1Unidad de CFamiliarS de OM, Guillen Poncel C, Molina Garrido MJ. Cáncer colorrectal hereditario no polipósico. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 2011;103:434.
15. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW, et al. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol* 2015;110:223-62; quiz 263.
16. Trujillo-Rojas MA, Ayala-Madrigal M de la L, Gutiérrez-Angulo M, González-Mercado A, Moreno-Ortiz JM. Diagnosis of patients with Lynch syndrome lacking the Amsterdam II or Bethesda criteria. *Hered Cancer Clin Pract* 2023;21:21.
17. González-Santiago S, Ramón Y Cajal T, Aguirre E, Alés-Martínez JE, Andrés R, Balmaña J, et al. SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer (2019). *Clin Transl Oncol* 2020;22:193-200.
18. Green MR, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 4th ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor laboratory press; 2012.

19. National Human Genome Research Institute Home, NHGRI. Secuanciación del ADN [Internet]. National Human Genome Research Institute [citado 2024 may 22];Available from: <https://www.genome.gov/>
20. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-7.
21. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
22. Staaf J, Törngren T, Rambech E, Johansson U, Persson C, Sellberg G, et al. Detection and precise mapping of germline rearrangements in BRCA1, BRCA2, MSH2, and MLH1 using zoom-in array comparative genomic hybridization (aCGH). *Hum Mutat* 2008;29:555-64.
23. Jarvik GP, Browning BL. Consideration of Cosegregation in the Pathogenicity Classification of Genomic Variants. *Am J Hum Genet* 2016;98:1077-81.
24. 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. *Genet Med* 2015;17:405-24.
25. Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho YY, et al. Correction: Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med* 2020;22:240.
26. Fishel R, Ewel A, Lee S, Lescoe MK, Griffith J. Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human MSH2 protein. *Science* 1994;266:1403-5.
27. Lu X, Ying Y, Zhang W, Li R, Zhang J. High MutS homolog 2 expression predicts poor prognosis and is related to immune infiltration in endometrial carcinoma. *Cell Biol Int* 2023;47:201-15.
28. National Center for Biotechnology Information (NCBI). ClinVar - VCV000090577.36 - Variation ID: 90577 [Internet]. [citado 2024 may 22];Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/90577/>
29. Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, Mathiak M, Buettner R, Engel C, et al. Spectrum and frequencies of mutations in MSH2 and MLH1 identified in 1,721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2005;116:692-702.
30. Eladad S, Tian-Zhang Ye, Peng Hu, Margaret Leversha, Sergey Beresten, Michael J Matunis. Intra-nuclear trafficking of the BLM helicase to DNA damage-induced foci is regulated by SUMO modification - PubMed [Internet]. [citado 2024 may 22];Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15829507/>
31. Schayek H, Laitman Y, Katz LH, Pras E, Ries-Levavi L, Barak F, et al. Colorectal and Endometrial Cancer Risk and Age at Diagnosis in BLMash Mutation Carriers. *Isr Med Assoc J* 2017;19:365-7.
32. Ring KL, Bruegl AS, Allen BA, Elkin EP, Singh N, Hartman AR, et al. Germline multi-gene hereditary cancer panel testing in an unselected endometrial cancer cohort. *Mod Pathol* 2016;29:1381-9.
33. Carranza D, Vega AK, Torres-Rusillo S, Montero E, Martinez LJ, Santamaría M, et al. Molecular and Functional Characterization of a Cohort of Spanish Patients with Ataxia-Telangiectasia. *Neuromolecular Med* 2017;19:161-74.
34. Buben V, Bonnet F, Dupiot-Chiron J, Barouk-Simonet E, Jones N, de Reynies A, et al.

Combined tumor genomic profiling and exome sequencing in a breast cancer family implicates ATM in tumorigenesis: A proof of principle study. *Genes Chromosomes Cancer* 2017;56:788-99.

35. Lu C, Xie M, Wendl MC, Wang J, McLellan MD, Leiserson MDM, et al. Patterns and functional implications of rare germline variants across 12 cancer types. *Nat Commun* 2015;6:10086.

36. de Jonge MM, de Kroon CD, Jenner DJ, Oosting J, de Hullu JA, Mourits MJE, et al. Endometrial Cancer Risk in Women With Germline BRCA1 or BRCA2 Mutations: Multicenter Cohort Study. *J Natl Cancer Inst* 2021;113:1203-11.

37. Hohenstein P, Fodde R. Of mice and (wo)men: genotype-phenotype correlations in BRCA1. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 2:R271-277.

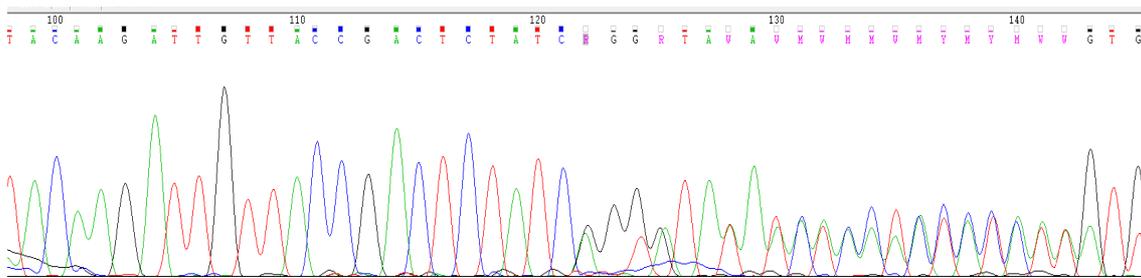
ANEXOS:

8.1. Índice de tablas y figuras

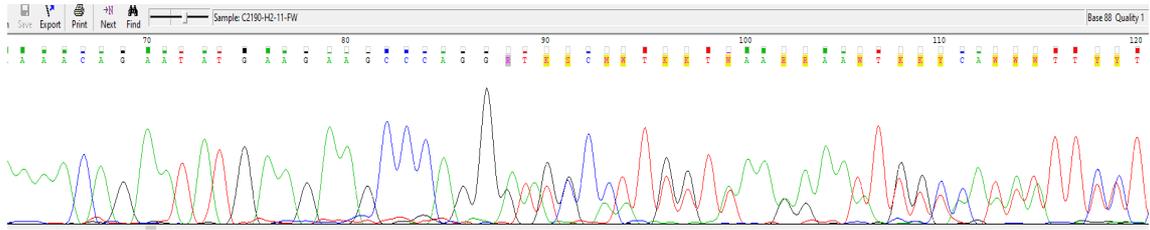
Tabla 1. Se muestran los Criterios de Ámsterdam I y Ámsterdam II. Tabla creada a partir de los criterios publiczados por el Colegio Americano de Gastroenterología (ACG) en las guías clínicas de 2015 [15].	6
Tabla 2. Criterios de Bethesda revisados. Tabla basada en la última revisión de 2004 [16]. *Cánceres relacionados con el Síndrome de Lynch: CCR, endometrio, estómago, ovario, páncreas, uréter y pelvis renal, tracto biliar, cerebro, glándula sebácea y carcinoma de intestino delgado. ** Infiltración linfocitaria del tumor, reacción de los linfocitos tipo Crohn, tumor mucinoso y diferenciación en anillo de sello o patrón de crecimiento medular.	7
Tabla 3. Criterios de inclusión en el programa de Consejo Genético de cáncer colorrectal de la Junta de Castilla y León.	9
Tabla 4. Panel de 40 genes EasyNGS HCPanel de la marca HoopBio.	10
Tabla 5. Variantes genéticas encontradas mediante paneles multigénicos. EA: Edad a la que apareció el tumor. ClinVar: Base de datos de clasificación de patogenicidad de mutaciones. P: Patogénica. Nueva: variante no descrita en la base de datos ClinVar.	11

Figura 1. Genograma perteneciente a la familia 1, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen MSH2. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación. En (-), los analizados con resultado negativo para la mutación.	13
Figura 2. Genograma perteneciente a la familia 2, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen MSH2. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación. En (-), los analizados con resultado negativo para la mutación.	13
Figura 3. Genograma perteneciente a la familia 3, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen MSH2. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación. En (-), los analizados con resultado negativo para la mutación.	14
Figura 4. Genograma perteneciente a la familia 3, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen BLM. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación.	15
Figura 5. Genograma perteneciente a la familia 5, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen ATM. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta al caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación. En (-), los analizados con resultado negativo para la mutación.	16
Figura 6. Genograma perteneciente a la familia 5, en el que aparece la portadora de la mutación en el gen BRCA1. Junto con el tipo tumoral se señala la edad de aparición del tumor. La flecha apunta all caso índice. Se detallan en (+) los portadores de la mutación.	17

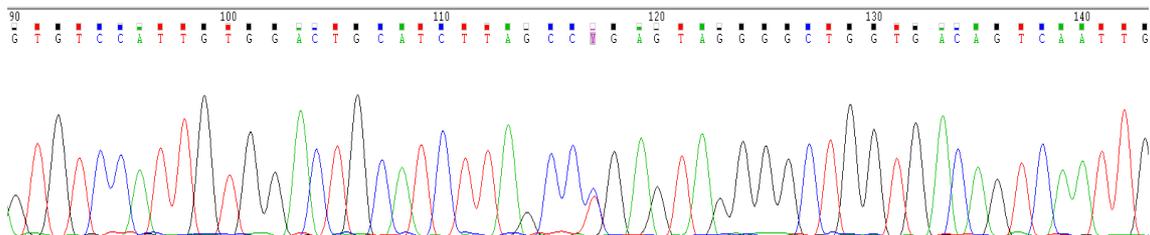
8.2. Cromatogramas de mutaciones patogénicas



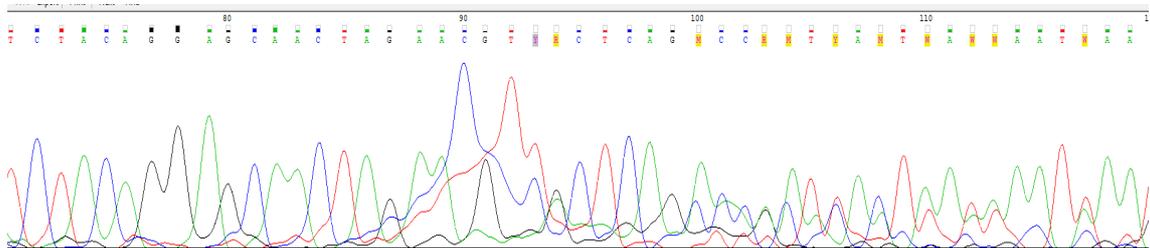
Cromatograma perteneciente a la familia 1: mutación *MSH2-7* c.1226_1227delAG; p.Gln409ArgfsX7; *MSH2_00323*



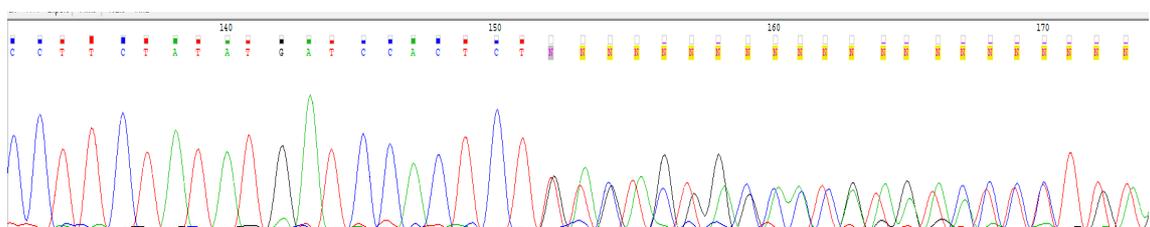
Cromatograma perteneciente a la familia 2: mutación *MSH2-11* c.1723_1724dupG;
p.Asp575GlyfsX5STOP580



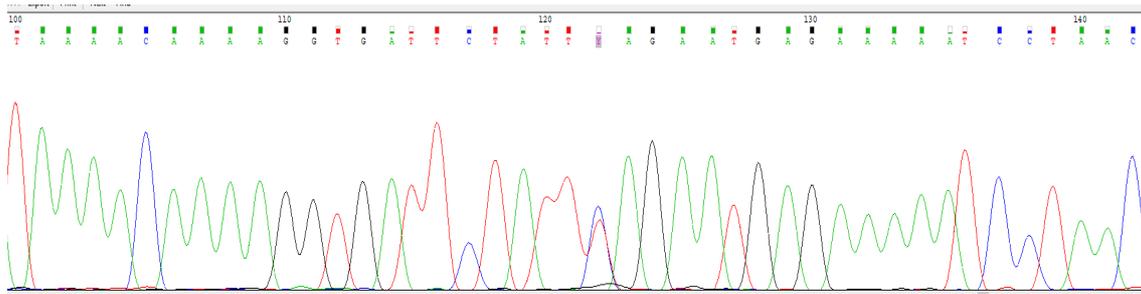
Cromatograma perteneciente a la familia 3: mutación *MSH2-13* c.2131C>T; p.Arg711X.
ClinVar: 90903



Cromatograma perteneciente a la familia 4: mutación *BLM-2* c.53_56delCCAG;
p.Ala18fsSTOP24



Cromatograma perteneciente a la familia 5: mutación *ATM-62* c.8873_8874del;
p.Phe2958X; Fam. de 7249. ClinVar: 220831



Cromatograma perteneciente a la familia 6: mutación *BRCA1-11E1* c.1687C>T; Q563X.
ClinVar: 37426.

“ESTUDIO MOLECULAR DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO EN FAMILIAS CON SOSPECHA DE SÍNDROME DE LYNCH”



Autora: Carlota Rojo del Río
Tutora: Dra. Mercedes Durán Domínguez



1 INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Lynch es el síndrome de cáncer colorrectal hereditario más frecuente. El cáncer de endometrio en el marco de este síndrome se ha asociado clásicamente a *MSH2* y *MSH6*. Sin embargo, como se muestra en la figura 1, los genes de reparación del ADN se solapan con la ruta de los genes de la anemia de Fanconi.

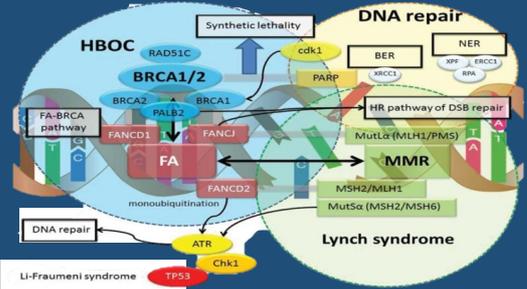


Figura 1. Representación de las vías MMRFA- BRCA

2 OBJETIVOS

Tras analizar gran cantidad de familias durante años en el IBGM, hay múltiples casos sin resolver que podrían ser explicados mediante NGS. Por eso, nos planteamos los siguientes objetivos.

- Seleccionar casos con sospecha de Síndrome de Lynch e historia de cáncer de endometrio.
- Análisis mediante un panel multigénico y NGS.
- Establecer correlación genotipo-fenotipo.
- Plantear nuevas perspectivas en el manejo de los tumores de endometrio en el marco del Síndrome de Lynch

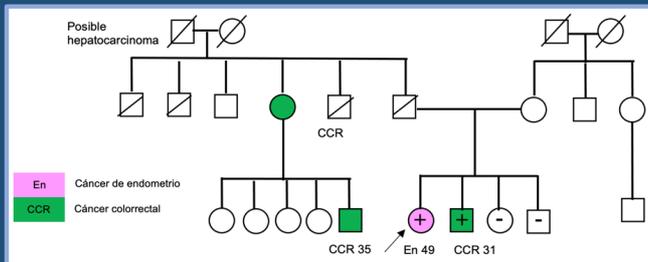
3 MATERIAL Y MÉTODOS

32 muestras anonimizadas remitidas desde la Unidad de Consejo Genético:

- 1) Extracción y cuantificación del ADN
- 2) Análisis de 40 genes mediante NGS:
 - 2.1) Creación de librerías y templado: IonChef
 - 2.2) Creación de Ion 530 chip y secuenciación: Ion S5
- 3) Análisis de resultados mediante software Ion Reporter
- 4) Confirmación de resultados y análisis de familiares: Sanger

4 RESULTADOS

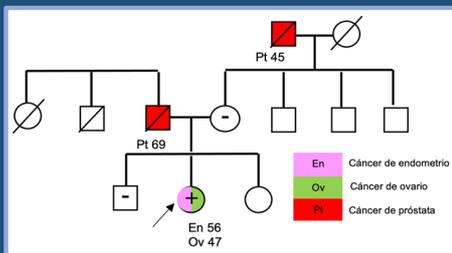
El 18% de las familias analizadas resultaron portadoras de mutaciones patogénicas, lo cual se refleja en la tabla 1. En las diferentes figuras se reflejan los árboles familiares, reflejando el caso índice con una flecha y el estudio de portadores



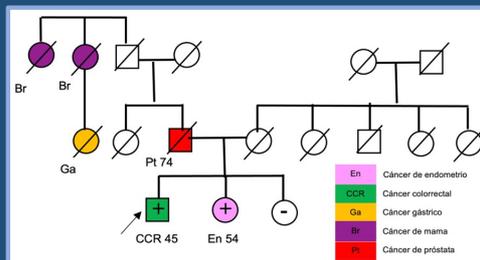
Árbol de la familia 1.

Tabla 1. Variantes halladas mediante paneles multigénicos

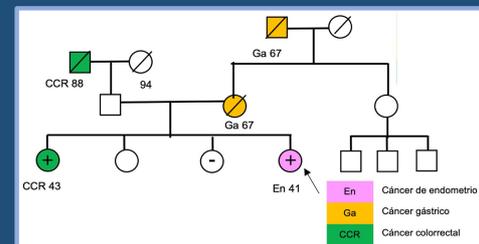
Familia	Edad Aparición	Gen	Función	ClinVar ID
1	46	MSH2	Frameshift	P 90577
2	51	MSH2	Frameshift	Nueva
3	47	MSH2	Nonsense	P90903
4	83	BLM	Frameshift	Nueva
5	41	ATM	Nonsense	P 220831
6	68	BRCA1	Nonsense	P 37426



Árbol de la familia 2.



Árbol de la familia 3



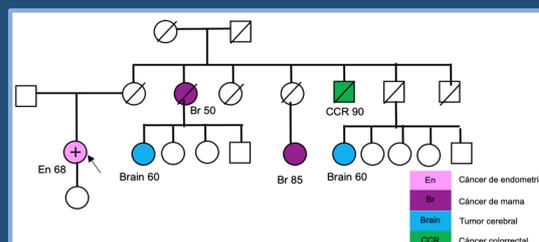
Árbol de la familia 4

6 BIBLIOGRAFÍA

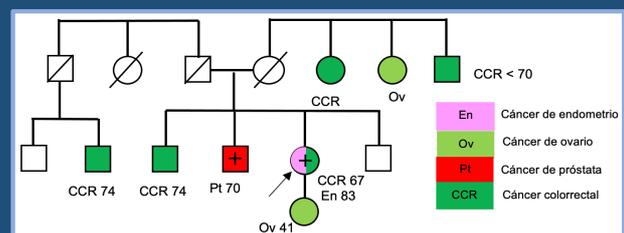


5 CONCLUSIONES

El uso de paneles genéticos mediante NGS permite detectar mutaciones en genes distintos a *MSH2* y *MSH6* que podrían justificar casos de tumores de endometrio asociados a Síndrome de Lynch no resueltos. Durante el estudio hemos podido establecer una relación genotipo-fenotipo que respalda ampliar nuevas líneas de investigación en otros genes de moderada y alta penetrancia.



Árbol de la familia 5



Árbol de la familia 6