



# PERFIL GENÉTICO DEL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO EN MUJERES JÓVENES

Autora: Cristina Pérez Reguero

Tutora: Dra. Mercedes Durán Domínguez

Trabajo de Fin de Grado

2023-2024.

# Índice.

<b>1.Resumen</b>	<b>2</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>2</b>
2.1 El Cáncer como enfermedad	2
2.2. Cáncer de mama	3
2.3 Cáncer hereditario	4
2.4 Cáncer de mama hereditario	4
2.5 Prevención en cáncer hereditario	5
2.6 Técnicas moleculares de detección de mutaciones	6
2.7 Distribución de las mutaciones	7
<b>3.Objetivos</b>	<b>7</b>
<b>4.Material y métodos</b>	<b>7</b>
4.1 Material: muestras, procedencia, criterios de inclusión	7
4.2 Métodos:	8
4.2.1 Extracción de ADN de sangre periférica	8
4.2.2. Cuantificación de la concentración de la muestra	8
4.2.3. Secuenciación masiva NGS en plataforma Ion Torrent	8
4.2.4 Análisis bioinformático de resultados.	9
4.2.5 Secuenciación Sanger	9
4.3 Fenotipo de las muestras estudiadas	9
<b>5.Resultados y discusión</b>	<b>11</b>
5.1. Familia 1473.Resultados, discusión y relación genotipo-fenotipo	11
5.2 Familia 1799.Resultados, discusión y relación genotipo-fenotipo	12
5.3. Familia 6204.Resultados, discusión y relación genotipo-fenotipo	14
5.4. Familia 6593.Resultados, discusión y relación genotipo-fenotipo	15
5.5. Familia 6908.Resultados, discusión y relación genotipo-fenotipo	16
<b>6.Conclusiones</b>	<b>17</b>
<b>7.Bibliografía</b>	<b>18</b>
<b>8.Anexos</b>	<b>20</b>
8.1 Índice de tablas y figuras	20
8.2 Imágenes cromatogramas de mutaciones por secuenciación Sanger	21

## **1. Resumen.**

Entre el 5-10% de los casos de cáncer de mama son de origen hereditario. Hasta hace unos años, los principales genes responsables eran *BRCA1* y *BRCA2*. Aproximadamente el 80% de los casos seleccionados para estudio genético obtenían resultado no informativo.

Gracias a la implementación de tecnología de secuenciación de nueva generación o NGS, se ha podido ampliar el estudio a través de paneles multigénicos. Esto ha revelado a otros genes de moderada/baja penetrancia como candidatos a estudio, ya que podrían explicar otro porcentaje de familias de sospecha.

Existe un criterio de sospecha de cáncer hereditario que es la presencia de un caso de cáncer de mama menor de 35 años, sin antecedentes familiares. Estos casos son preocupantes, ya que habitualmente los antecedentes familiares marcan el concepto de tumor hereditario.

El cáncer hereditario se sospecha por varias generaciones afectadas y edad de aparición temprana de tumores iguales o relacionados; el hecho de que en una familia no haya antecedentes familiares y aparezca un cáncer de mama a edad tan precoz, es motivo suficiente para realizar proyectos de investigación.

En este trabajo se han seleccionado 32 muestras con las características planteadas y se ha realizado estudio con panel de cuarenta genes. Nuestros resultados muestran un 15,6% de familias positivas, pero lo llamativo es que la causalidad en tres de ellas sea en genes diferentes de *BRCA1* y *BRCA2*.

Son necesarios series más extensas de estos tipos tumorales y criterio de caso único a edad temprana para perfilar la causa genética. Si la conocemos y establecemos el fenotipo asociado, podremos usarlo en la prevención mediante la inclusión de los resultados en las guías clínicas.

## **2. Introducción.**

### **1. El Cáncer como enfermedad.**

El “cáncer” es un grupo de alteraciones en las que existe un crecimiento celular incontrolado. La acumulación de células de una forma anormal se produce debido a un desequilibrio entre procesos normales de proliferación y de muerte celular. Para que un tumor se pueda denominar cáncer es necesario que sea maligno para ello su crecimiento tiene que ser descontrolado y capaz de invadir los tejidos que lo rodean, conocido como diseminarse o metastatizar. Si el tumor no cumple estos requisitos se considerará

benigno, a pesar de que su función anormal, su tamaño o localización puedan causar problemas a la paciente.[1]

La condición patológica del cáncer resulta de la desactivación de los patrones normales de crecimiento celular sobre sus mecanismos reguladores. Siendo por lo tanto el cáncer una condición médica con una base molecular. Siendo los protooncogenes los primeros factores reguladores de este proceso biológico. Actúan en la transmisión de señales, resultando como factores de crecimiento [2]. Sin embargo, al producirse una mutación en ellos se da una transformación neoplásica. Este cambio de protooncogén a oncogén se denomina activación [3]. Esta activación se puede producir a través de la translocación cromosómica, mutación puntual y la amplificación genética. [2]

Los otros genes implicados son los genes supresores de tumores. En el cáncer la pérdida de los genes supresores de tumores se produce por la inactivación de dos alelos, según la hipótesis del modelo de dos impactos de Knudson. Las mutaciones en estos genes son recesivas a nivel individual y con una única mutación no es suficiente para provocar la carcinogénesis. Siendo la gran diferencia con los oncogenes ya que estos son dominantes.[4]

Por lo tanto, podemos concluir que el cáncer, principalmente, es la consecuencia de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos en estos dos tipos de genes.[4]

## **2. Cáncer de Mama.**

Se trata de la neoplasia maligna más frecuente y la principal causa de muerte dentro de las mujeres. Se prevé un aumento en la incidencia en un 2% para 2035. [5] Hay diferencias significativas en la mortalidad dependiendo del acceso diagnóstico y al tratamiento. En países desarrollados la mortalidad se reduce un 2% anual, sin embargo, los países de bajos ingresos la mortalidad se encuentra con un ligero aumento. Remarcando la importancia de una detección precoz de este tipo de cáncer.[6]

A nivel anatómico, el cáncer de mama se distingue en lobulillar o ductal dependiendo a que estructuras afecte. Pudiendo a su vez dividirse en in situ si el tumor no invade más allá de la membrana basal o invasivo. La mayoría de los cánceres de mama invasivos surgen en la unidad lobulillar del conducto terminal, independiente del tipo que sean. El tipo histológico más frecuente es el carcinoma ductal invasivo o infiltrante.[7]

Existen cuatro grupos moleculares siendo los tumores positivos para receptores de estrógenos y progestágenos (luminales) los más frecuentes (65%). El segundo grupo son los tumores con amplificación en el oncogén HER2 y por último el denominado triple negativo, no presenta positividad ni en receptores hormonales ni amplifican HER2, siendo los de peor pronóstico y menor frecuencia.[8]

### **3. Cáncer hereditario.**

El cáncer se considera una enfermedad genética siendo mayoritariamente esporádica y de forma excepcional presentan una base hereditaria, únicamente un 10%. Existen dos conjuntos de alteraciones genéticas: cambios en la secuencia del ADN y cambios epigenéticos que afectan a la expresión de los genes. El primer grupo puede tratarse de deleciones de regiones cromosómicas o activaciones o inactivaciones de genes o amplificación de ellos. En el segundo grupo, las alteraciones epigenéticas tienen su base en el silenciamiento de genes por la hipermetilación de las islas CpG localizadas en sus promotores.

La arquitectura genética se asocia a la heredabilidad del cáncer. Se explica por el número total de loci asociados al riesgo de desarrollar la enfermedad, la frecuencia poblacional de los alelos de riesgo, la asociación al riesgo para cada uno de los alelos individuales y la existencia o no de interacciones genéticas entre los diferentes loci. Cuanto mayor sea la magnitud de la asociación con el riesgo atribuido a un locus individual y mayor sea la frecuencia de dicho locus dentro de la población, mayor será la contribución individual de dicho locus a la heredabilidad. [9]

### **4. Cáncer de mama hereditario.**

En nuestro país el riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida de una mujer es del 12%. El 5-10% de las pacientes con cáncer de mama presentan una distribución monogénica. Gracias a los estudios que se realizaron durante los años 90 se identificaron dos genes de alta prevalencia: *BRCA1* Y *BRCA2*. Sin embargo, solo el 25% del cáncer de mama hereditario se puede atribuir a dichos genes. Actualmente, al ampliarse el estudio de posibles genes implicados, se sabe que hay 25 genes relacionados con esta enfermedad.[9]

Las mutaciones en el gen *BRCA1* son responsable del 35% del cáncer de mama hereditario, a diferencia del 25 % atribuible a mutaciones en el gen *BRCA2*, teniendo

estas últimas un mayor porcentaje de cáncer de mama masculino atribuible. Los portadores de *BRCA1* tienen una supervivencia global más baja que los pacientes con *BRCA2*. [10]

El cáncer asociado a *BRCA1* con una mayor frecuencia se trata de un tumor con mayor agresividad, mayor grado histológico y se relaciona en un mayor número de paciente con el subtipo triple negativo. Por el lado contrario, los cánceres relacionados con mutaciones en *BRCA2* presentan una mayor similitud con aquellos que se producen de forma esporádica, en células no germinales. [11]

### 5. Prevención en cáncer hereditario.

La búsqueda de los genes de alta penetrancia *BRCA1* y *BRCA2* junto con otros genes también de alta y moderada penetrancia, todos ellos relacionados con el cáncer de mama y ovario hereditario ha aumentado el diagnóstico en un 50%. Los paneles de cáncer multigénico presentan nuevos desafíos en gran medida relacionado con la mayor investigación sobre las variantes de significado incierto, nuevas evaluaciones de riesgo de cáncer específicas de genes y recomendaciones clínicas para portadoras de mutaciones de nuevos genes. [12]

Para el cáncer de mama, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) ha creado unas guías clínicas destinadas a seleccionar a los pacientes que deben ser evaluados genéticamente con el fin de identificar mutaciones en línea germinal. [12]

**Tabla 1.** Criterios SEOM. Evaluación genética de cáncer de mama y ovario hereditario [12]

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

Las técnicas de secuenciación masiva impulsan una mayor identificación de mutaciones en línea germinal. Dando una mayor rapidez a la hora de analizar, permitiendo llegar a un mayor porcentaje de la población. En las unidades de consejo genético se proporciona información a los pacientes y a los familiares sobre lo que supone la presencia de dichas mutaciones. Permitiendo una mejor toma de decisiones tanto personales como a nivel médico.[13]

## **6. Técnicas moleculares de detección de mutaciones.**

El origen de las técnicas moleculares fue un artículo histórico publicado por Frederick Sanger en 1977, el cual presento la primera técnica de secuenciación que sería el método estándar en los próximos 30 años. Las mejoras tecnológicas fueron gracias al Proyecto Genoma Humano, en 1990. Gracias al apoyo internacional después de 13 años se secuencio el primer genoma humano completo. [14]

La principal aplicación de Sanger es la verificación de mutaciones identificadas por NGS. Para estos casos, sigue siendo la mejor opción ya que es económica y ofrece resultados en un tiempo optimo.[15] Sin embargo, fue reemplazada por la secuenciación NGS (secuenciación de próxima generación) o secuenciación masiva en paralelo. Los principales beneficios de la NGS son una mayor capacidad a la hora de secuenciar, una mayor capacidad de muestras y un beneficio monetario al realizar mayor número de muestras en menor tiempo.[16]

Desde 2006, la secuenciación masiva está disponible comercialmente, lo que abrió una etapa genómica de investigación y tratamiento del cáncer al poder secuenciar muchas más muestras en menos tiempo ofreciendo una mayor rentabilidad permite descubrir mecanismos de resistencia, cuantificación de la carga mutacional de la línea germinal o detectar mutaciones en líneas somáticas.[17]

Existen en el mercado diferentes plataformas de NGS, las más importantes son: Illumina, Ion Torrent y Nanopore. Los métodos de secuenciación tienen puntos en común como la fragmentación del ADN, la preparación de las librerías, la amplificación y la secuenciación. Nanopore presenta una característica excepcional, secuencia una única molécula de ADN sin necesidad de amplificación previa. Las dos grandes diferencias entre Illumina e IonTorrent son el método de detección: la primera fluorescente y la segunda cambios de pH; y el lugar donde ocurre la amplificación: por puente en base sólida la primera, y en emulsión mediante perlas la segunda.[18]

## **7. Distribución de las mutaciones.**

La detección de mutaciones implicadas en cáncer y que se detectan a nivel molecular, son clasificadas en cinco categorías: Benignas, Probablemente Benignas, De significado incierto o UV, Probablemente Patogénicas y Patogénicas. También se les denomina: Clase 1, 2, 3, 4 y 5. Respectivamente.[19]

Esta clasificación de patogenicidad es la referenciada en la base de datos ClinVar. Esta base de datos es un archivo público de libre acceso de informes de variaciones humanas clasificadas por enfermedades.[20]

## **3. Objetivos.**

En este trabajo planteamos un objetivo general que es el conocimiento molecular de los tumores de mama con edad de aparición muy temprana.

Uno de los criterios de inclusión para estudio genético en los programas de cáncer hereditario es que los casos de aparición sean precoces, así con estas premisas, describimos unos objetivos específicos:

- Revisar los casos de familias de criterio de un único caso de cáncer de mama en la familia a una edad de aparición menor de 35 años.
- Seleccionar 32 casos que cumplan la premisa anterior y analizarlos mediante un panel de 40 genes y secuenciación de nueva generación (NGS).
- Analizar los resultados genéticos de variantes genómicas en genes de alta y moderada penetrancia y relacionarlas con las características fenotípicas de los casos. Cuyo fin es el uso en guías clínicas y prevención de cáncer hereditario.

## **4. Material y métodos**

### **1. Material: muestras, procedencia, criterios de inclusión.**

Este estudio se ha desarrollado utilizando una base de datos de información anonimizada, de la que se han seleccionado 32 muestras de mujeres con Cáncer de Mama a una edad temprana de aparición, menores de 35 años. Dichas muestras han sido derivadas al Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid, a partir de un programa de cribado de cáncer hereditario de la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León, de las Unidades de Consejo Genético del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid y del Hospital Universitario de Burgos.

Para llevar a cabo el estudio genético, los pacientes deben cumplir con los criterios de inclusión establecidos por el programa de asesoramiento genético para cáncer de mama y ovario hereditario en Castilla y León, los cuales se detallan en la siguiente tabla :

**Tabla 2.** Criterios de inclusión. Programa de consejo genético de Cáncer de mama y ovario hereditario de Castilla y León.[21]

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

Las 32 muestras seleccionadas para este trabajo, cumplían el criterio B.

## 2. Métodos:

### i. Extracción de ADN de sangre periférica.

Para poder llevar a cabo la detección de las mutaciones se obtuvo sangre periférica de cada una de las pacientes. A partir de 200 ul 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 50 ul de ADN genómico.

### ii. Cuantificación de la concentración de la muestra.

Utilizando una electroforesis en gel de agarosa al 2% se comprobó la integridad (que no esté degradado) del material genético de cada muestra.

Para cuantificar el ADN, se empleó el fluorómetro Qubit® 3.0 con el kit Qubit™ dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### iii. Secuenciación masiva NGS en plataforma Ion Torrent

Las muestras de ADN recibidas se analizaron para identificar mutaciones en la línea germinal utilizando el sistema Ion S5 (Thermo Fisher Scientific).

La preparación de las librerías y el templado se realizaron con el sistema Ion Chef automatizado; posteriormente se secuenció en Ion S5 con Ion 530 Chip (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el estudio de dichas mutaciones, se empleó un panel multigénico: EasyNGS HCPanel de la marca HoopBio, que incluye 40 genes. Este panel abarca genes asociados con el síndrome de mama/ovario hereditario, el síndrome colorrectal hereditario, entre otros. Los genes incluidos en este panel se detallan en la siguiente ilustración:

CÁNCER				Lynch	Poliposis Adenomatosa 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	BRIP1	MLH6	BMPR1	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	
BRIP1	EPCAM	RAD50	EPCAM	POL1		SDHD	
			RAD51C			SDHC	
			RAD51D			SDHB	
						SDHA	
						TMEM127	
						ADHAF2	
COWDEN	VON HIPPEL-LINDAU	RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA	FRIZZLED3	NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO 1	NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO 2	GÁSTRICO DIFUSO	MELANOMA FAMILIAR
PTEN	VHL	RB1	STK11	MEN1	RET	CDH1	CDKN2A

**Ilustración 1.** Panel multigénico: EasyNGS HCPanel de la marca HoopBio. Se analizan 40 genes.

#### iv. Análisis bioinformático de resultados

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

Los resultados positivos obtenidos se confirmaron mediante secuenciación Sanger.

#### v. Secuenciación Sanger

La secuenciación tipo Sanger se realizó mediante el uso de terminadores marcados BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y un secuenciador automático capilar ABI 3130XL (Applied Biosystems) usando un array de 16 capilares para la electroforesis.

Se utilizó este método tanto para la confirmación de resultados positivos en NGS como para el estudio directo de familiares.

### 3. Fenotipo de las muestras estudiadas

Las 32 muestras seleccionadas cumplen el criterio B de los criterios de inclusión para estudio genético, en el programa de prevención del cáncer hereditario. Este criterio se trata de caso único en la familia y edad de aparición del tumor menor o igual a 35 años. De las 32 muestras seleccionadas: 10 de ellas eran casos jóvenes menores o igual a 30 años y 22 casos mayores de 30 años y menores de 35. Según los datos obtenidos, 5 casos sí que presentaban algún antecedente familiar de cáncer: madre cáncer de

endometrio, tía cáncer de mama a edad tardía, padre cáncer de testículo; pero la mayoría eran sin antecedentes familiares de tumor.

## 5. Resultados y discusión

El 14% de las familias recibidas a través del proyecto de prevención del cáncer hereditario de la Consejería de Castilla y León, al laboratorio del IBGM, cumplen el criterio de caso único con cáncer de mama menor de 35 años. Según los datos del laboratorio, sólo el 6% de estas muestras muestran una mutación patogénica en los genes de alta predisposición (*BRCA1* y *BRCA2*) asociados con el cáncer de mama hereditario; pero con la implementación de los análisis genéticos con las nuevas tecnologías de NGS, se prevé que ese porcentaje aumente.

Para analizar el perfil genético de este grupo muestral anónimo, se han seleccionado 32 casos (1 carrera de NGS) de mujeres con CM menores o igual a 35 años.

Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

- De las 32 muestras seleccionadas, se detectó mutación patogénica en 5 casos: 1 *BRCA1*, 1 *BRCA2*, 1 *PALB2*, 1 *BRIP1* y 1 en *CHEK2*. Esto representa un 15,6% de detección de mutación en las muestras analizadas. Aunque el número de muestras analizadas es bajo, sólo 32, lo que abarca una carrera de NGS.

Podemos concluir que cuando aumentemos el número de muestras analizadas aumentará el porcentaje de detección en relación al 6% que se venía detectando con el análisis de dos genes. El uso de paneles genéticos mediante NGS, ha mejorado notablemente el diagnóstico genético del cáncer hereditario y también en los casos de temprana aparición, aún sin historia familiar.

Los resultados de mutación patogénica obtenidos se muestran en la tabla 3, donde se observa el gen causal: *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2* y *PALB2*. El tipo de mutación: 2 de tipo Frameshift o cambio de la pauta de lectura, en este caso, una es por delección de dos nucleótidos y otra por una duplicación; 2 variantes de tipo missense o cambio de aminoácido y otra variante de tipo Nonsense o cambio puntual que da lugar a un codón de para o codon STOP. Las mutaciones de tipo Frameshift y Nonsense suelen ser patogénicas y las mutaciones de tipo missense las hay benignas y las hay patogénicas.

**Tabla 3.** Características de las mutaciones encontradas en las muestras seleccionadas.

Muestra	CI	Historia familiar	EAT	Gen	Función	Exón	Proteína	cADN	ClinVar ID
1473	B	Abuelo pat: CCR.	23	BRCA1	Missense	5	p.Arg71Glu	c.211A>G	P 17693
1799	B	P: TP Tío pat: CPAN	32	CHEK2	Missense	1	p.Glu64Lys	c.190G>A	P 128068
6204	B	M: CCR Tío mat:CV Abuelo mat:CPAN.	28	BRCA2	Frameshift	9	p.Ser239LysfsX6	c.715dup	P 266988
6593	B	Hna, M:CM Padre: TV	35	PALB2	Nonsense	5	p.Arg753X	c.2257C>T	P 142403
6908	B	Padre:TT Tío pat: TTI	34	BRIP1	Frameshift	12	p.Asn568TrpfsX9	c.1702_1703delAA	P 221621

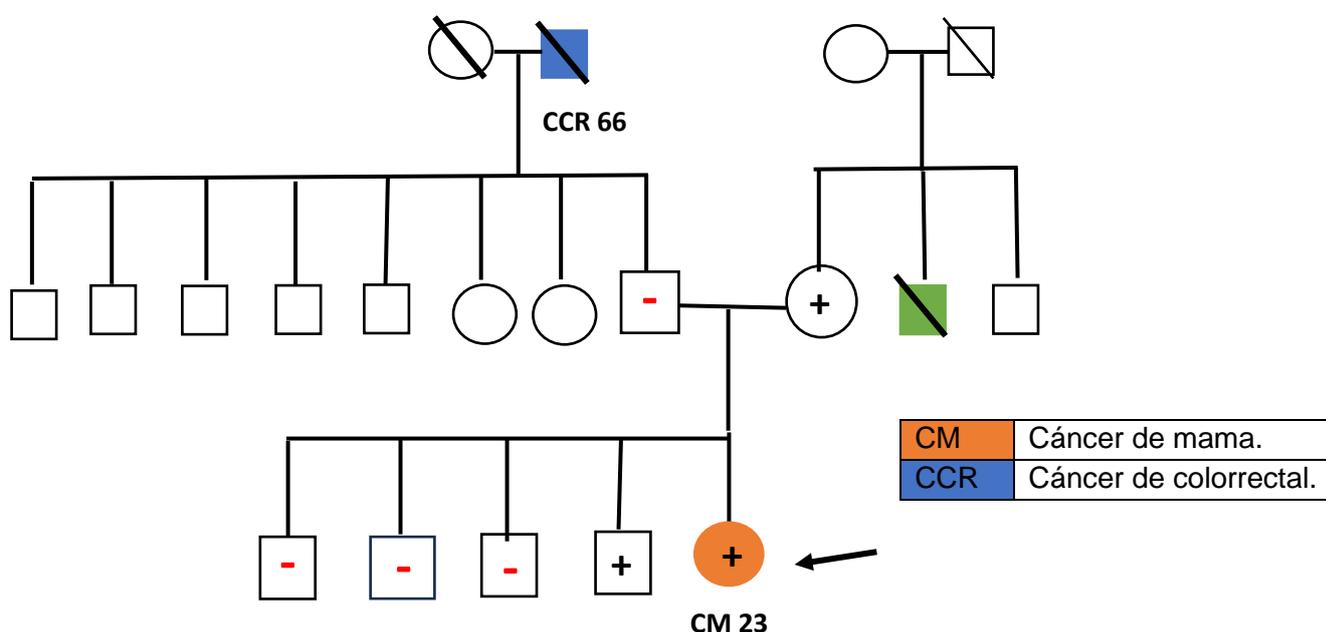
**CI:** criterio de inclusión / **EAT:** Edad aparición del tumor.

**CM:** cáncer de mama/ **CCR:** cáncer colorrectal/ **TP:** tumor próstata/ **TV:** tumor vejiga/ **TT:** tumor testicular / **CPAN:** cáncer páncreas / **TTI:** tumor tiroides.

**Hno/a:** hermano/a, **P:** padre, **M:** madre, **mat:** materno, **pat:** paterno **ClinVar ID:** número de identificación de la mutación / **ClinVar P:** patogénica.

Hemos profundizado en los resultados obtenidos y desde el laboratorio de Cáncer Hereditario se han solicitado los árboles familiares de estos casos. Discutimos los resultados obtenidos con el fin de mostrar la implicación de los genes mutados en el desarrollo de los casos de cáncer.

### 5.1. Familia 1473. Resultados, discusión y relación genotipo-fenotipo.



**Figura 1.** Árbol familiar. Portadora de la variante c.211A>G; p. Arg71Gly en el gen BRCA1. Se especifica el tipo de tumor y la edad al momento del diagnóstico. La fecha indica el caso índice, +: detectada la mutación; -: no detectada la mutación.

El caso índice es una mujer de 26 años, diagnosticada de cáncer de mama a los 23 años, su histología es un triple negativo y se ha detectado una mutación en *BRCA1*. A raíz de este resultado se llevó a cabo el estudio de portadores, siendo positivos para la

mutación en *BRCA1* uno de sus hermanos y su madre. Los antecedentes familiares incluyen el diagnóstico de cáncer de colon en su abuelo paterno a los 66 años.

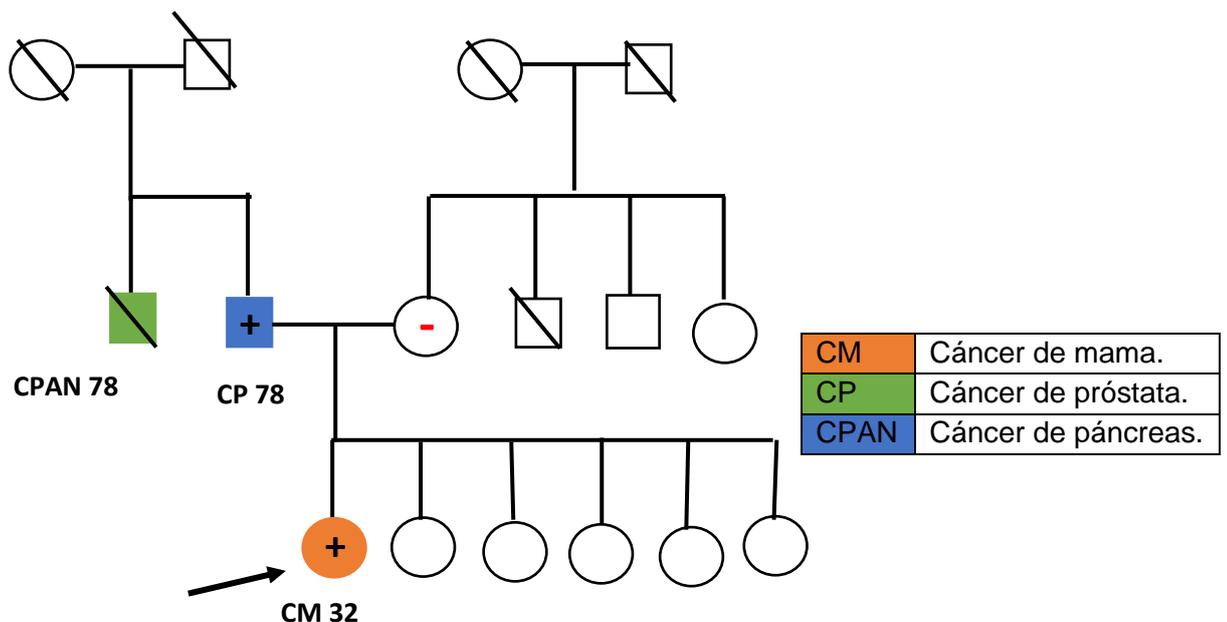
Esta mutación esta descrita en ClinVar como la variante c.211A>G; p.Arg71Gly en el exón 5 del gen *BRCA1* es un cambio de nucleótido que produce un cambio de aminoácido, esta variante de tipo missense aparece descrita en la base de datos como patogénica, con el número de identificación 17693.

El gen *BRCA1* codifica una fosfoproteína que mantiene la estabilidad genómica y la supresión de tumores. Esta proteína combinada con otros supresores de tumores, sensores de daños en el ADN y transductores de señales para formar un complejo proteico conocido como complejo de vigilancia del genoma asociado a *BRCA1*. [22]

Las variantes patógenas predisponen a las portadoras al cáncer de mama y ovario hereditario. Los dos dominios más estudiados son RING y BRCT y la mayoría de las variantes que causan cáncer se encuentran dentro de estas dos regiones. [23]

La paciente presenta un cáncer de mama triple negativo, uno de los canceres de mama más agresivos. Más del 75% de las pacientes femeninas con cáncer de mama con mutación en el gen *BRCA1* presentan el fenotipo de nuestra paciente. [24]

### 5.2. Familia 1799. Resultados, discusión y relación genotipo-fenotipo.



**Figura 2.** Árbol familiar. Portadora de la variante c.190G>A (p.Glu64Lys) en el gen CHEK2. Se especifica el tipo de tumor y la edad al momento del diagnóstico. La flecha indica el caso índice, +: detectada la mutación; -: no detectada la mutación.

El caso índice se trata de una mujer de 35 años diagnosticada de un cáncer de mama, histológicamente se trata de un cáncer ductal infiltrante con receptores hormonales positivos. Se ha detectado la presencia de la mutación en el gen *CHEK2*. A partir de estos resultados se realizó el estudio de portadores siendo analizados los padres del caso índice, siendo positivo para la mutación el padre del caso índice. Los antecedentes familiares de esta paciente son cáncer de próstata a los 78 años de su padre y cáncer de páncreas detectado también a los 78 años en un hermano de su padre.

Esta mutación esta descrita en ClinVar como la variante c.190G>A (p.Glu64Lys) en el exón 1 del gen *CHEK2* es un cambio de nucleótido que produce un cambio de aminoácido, esta variante de tipo missense aparece descrita en la base de datos como patogénica, con el número de identificación 128068.

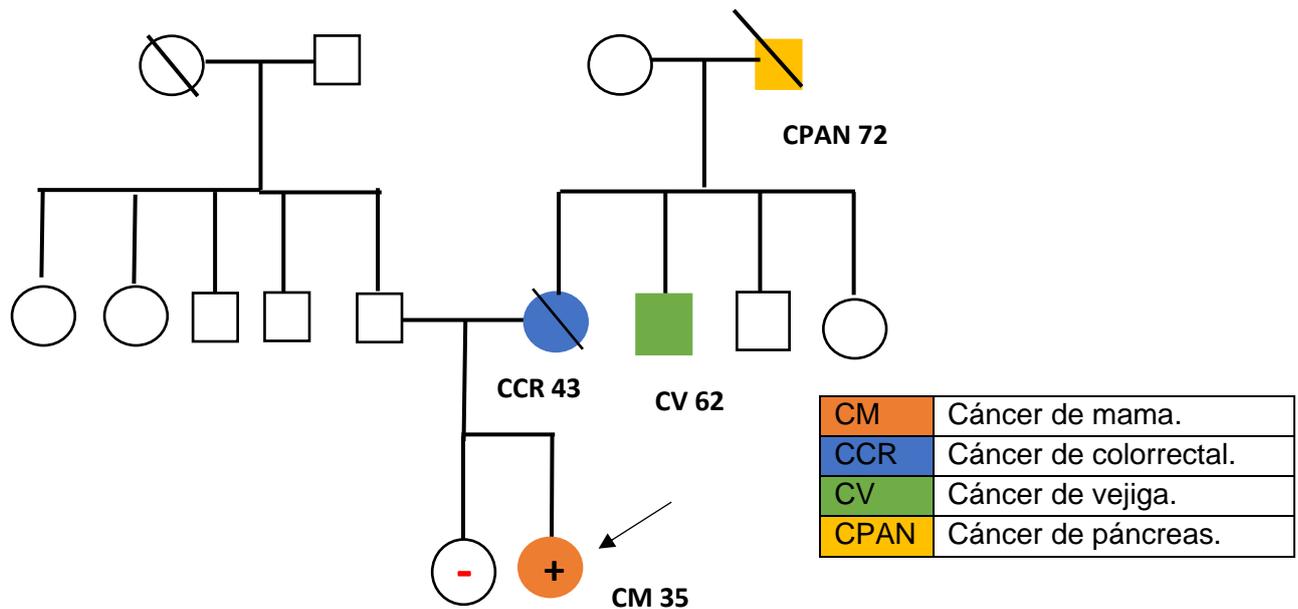
*CHEK2* (*Checkpoint kinase 2*), que codifica la proteína CHK2, siendo uno de los componentes clave de la vía de respuesta al daño del ADN induciendo la detención del ciclo celular y la apoptosis en el momento que se detecta el daño en el ADN.[25]

Mantiene la estabilidad genómica y es activado por la quinasa ATM, la cual interactúa a su vez con los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *p53* y *CD25* y otros genes relacionados en la reparación del ADN, apoptosis y detención del ciclo celular.[26]

Ciertas mutaciones en dicho gen se han visto vinculadas con cáncer de mama, la mayoría de ellos invasivos, presentando peor pronóstico y domina la presencia , además, los cánceres con receptores hormonales positivos.[26] Ambas características se encuentran presentes en nuestro paciente.

*CHEK2* ha sido implicado en conferir un mayor riesgo de cáncer de próstata especialmente en aparición temprana y cáncer de próstata metastásico.[27] Posible relación que explicaría la positividad en la mutación en el estudio realizado al padre del caso índice con la aparición de su cáncer de próstata.

### 5.3. Familia 6204. Resultados, discusión y relación genotipo-fenotipo.



**Figura 3.** Árbol familiar. Portadora c.715dup (p.Ser239fs) en el gen BRCA2. Se especifica el tipo de tumor y la edad al momento del diagnóstico. La flecha indica el caso índice, +: detectada la mutación; -: no detectada la mutación.

El caso es una mujer de 36 años que a sus 35 años fue diagnosticada de carcinoma ductal infiltrante de mama con receptores hormonales positivos, HER2 negativo. Presenta una mutación en *BRCA2*. En consecuencia, de los resultados se realizó el estudio de portadores, no hallándose mutación en ningún familiar analizado. Los antecedentes familiares de esta paciente son madre diagnosticada de cáncer de colon a sus 43 años, tío materno diagnosticado de cáncer de vejiga a sus 62 años y abuelo materno diagnosticado con 72 años de neoplasia de páncreas.

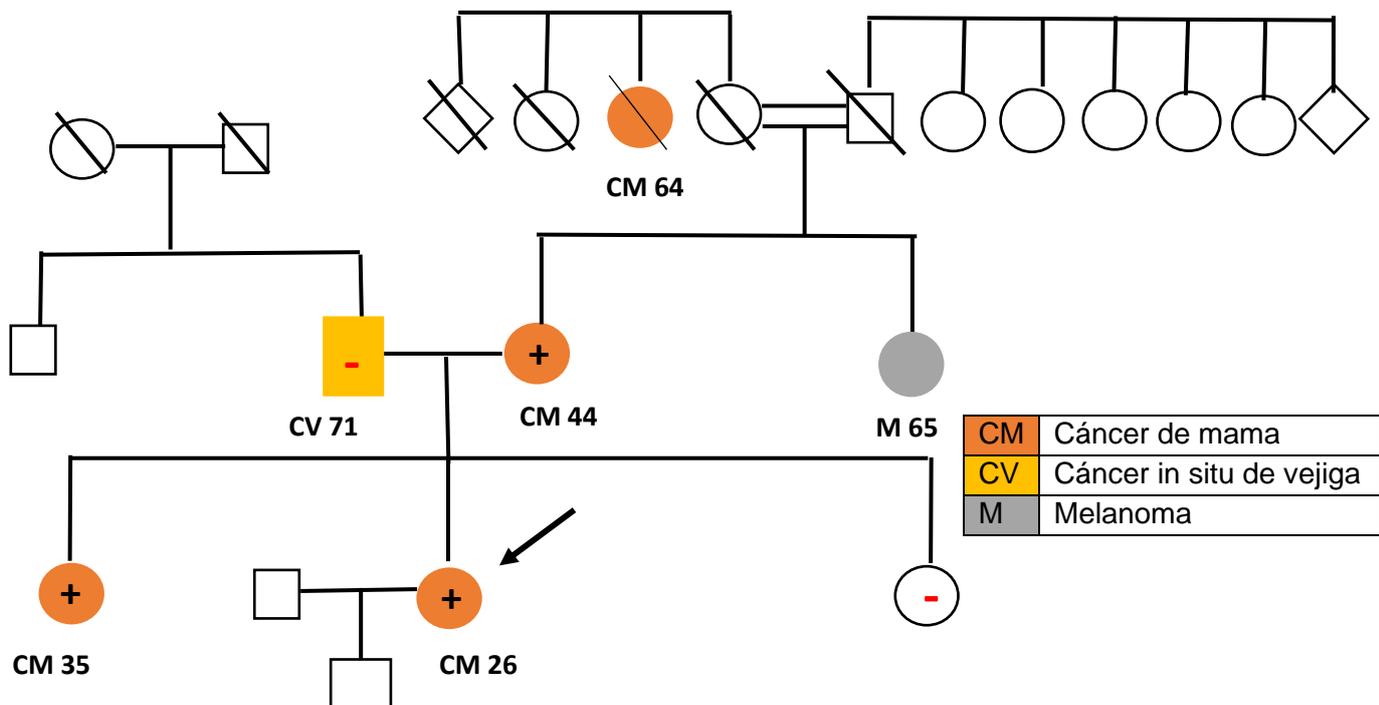
Esta mutación está descrita en ClinVar como la variante c.715dup (p.Ser239fs) en el exón 9 del gen *BRCA2* es un cambio de pauta de lectura produciendo una duplicación, esta variante de tipo frameshift aparece descrita en la base de datos como patogénica, con el número de identificación 266988.

La mayoría de mutaciones que se producen en el gen *BRCA2* son de dos tipos de cambio o de sentido erróneo. Una asociación a destacar es la unión del extremo N del *BRCA2* al gen *PALB2*. Las funciones de *BRCA2* son múltiples, están implicados durante el reclutamiento de filamentos RAD51 en el lugar de rotura de la doble hebra del ADN permitiendo así procesos de reparación con el complejo *RAD51-BRCA2-DSS1*. [28]

Un estudio en mujeres sanas europeas y americanas describió un riesgo acumulativo de cáncer de mama con mutaciones en este gen en torno al 69%. Las mutaciones de *BRCA2* se han relacionado con mayor frecuencia con cáncer de ovario, tiroides y gástrico, sin embargo, estudios recientes han ampliado su estudio a otros tipos.[28]

Un estudio prospectivo con 7.015 mujeres con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, seguidas durante una media de 5,5 años, estableció un riesgo de cinco veces mayor de cáncer colorrectal en mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA1* menores de 50 años.[29] Esta relación podría explicarnos la aparición del cáncer de colon en la madre de la paciente ya que la edad aparición es muy temprana, siendo una posible portadora de la mutación encontrada en su hija.

#### 5.4. Familia 6593. Resultados, discusión y relación genotipo-fenotipo.



**Figura 4.** Árbol familiar. Portadora de la variante c.2257C>T (p. Arg753Ter), en el gen *PALB2*. Se especifica el tipo de tumor y la edad al momento del diagnóstico. La flecha indica el caso índice; +: detectada la mutación; -: no detectada la mutación.

El caso índice presenta un carcinoma ductal infiltrante de mama con ausencia de HER2 + pero con receptores hormonales positivos, diagnosticado a los 26 años. Presenta una mutación en *PALB2*. A raíz de mi resultado se realizó el estudio de portadores, analizándose a cuatro familiares del caso índice. Siendo portadoras de la mutación la hermana y la madre del caso índice. Los antecedentes familiares son: hermana con

cáncer de mama descubierto a los 33 años, madre con cáncer de mama diagnosticado a los 44 años y padre diagnosticado de cáncer in situ de vejiga.

Esta mutación esta descrita en ClinVar como la variante c.2257C>T (p. Arg753Ter), en el exón 5 del gen *PALB2* es un cambio de nucleótido que produce un cambio de aminoácido, esta variante de tipo nonsense aparece descrita en la base de datos como patogénica, con el número de identificación 142403.

*PALB2* es un gen que codifica una proteína cuya función principal es la reparación de genes. Se le conoce como compañero y localizador de *BRCA2* ya que se encuentra unido a este gen por su extremo amino terminal. Se ha descrito como uno de los genes más relacionados con el cáncer de mama y ovario posteriormente a *BRCA1* y *BRCA2*. [30]

Se ha demostrado la relación del tipo de cáncer que muestra nuestro caso (ductal infiltrante) con la mutación en *PALB2*. El primero de ellos se realizo en Argentina en un grupo 1905 mujeres. Aquellas que presentaron mutación en *PALB2* desarrollaron en un 78% desarrollaron el subtipo ductal invasivo. [31] Posteriormente otro estudio realizado en Arabia Saudí mostraba que el 100% de las pacientes con mutación en dicho gen desarrollaron el subtipo de nuestra paciente. [32]

Un estudio en donde se analizó 15.104 sometidas a cirugía de mama demostró que las mujeres con mutaciones en *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* y *PALB2* poseen mayor riesgo de cáncer colorrectal respecto al grupo que no presentaba dichas mutaciones. [33]

### 5.5. Familia 6908. Resultados, discusión y relación genotipo-fenotipo.

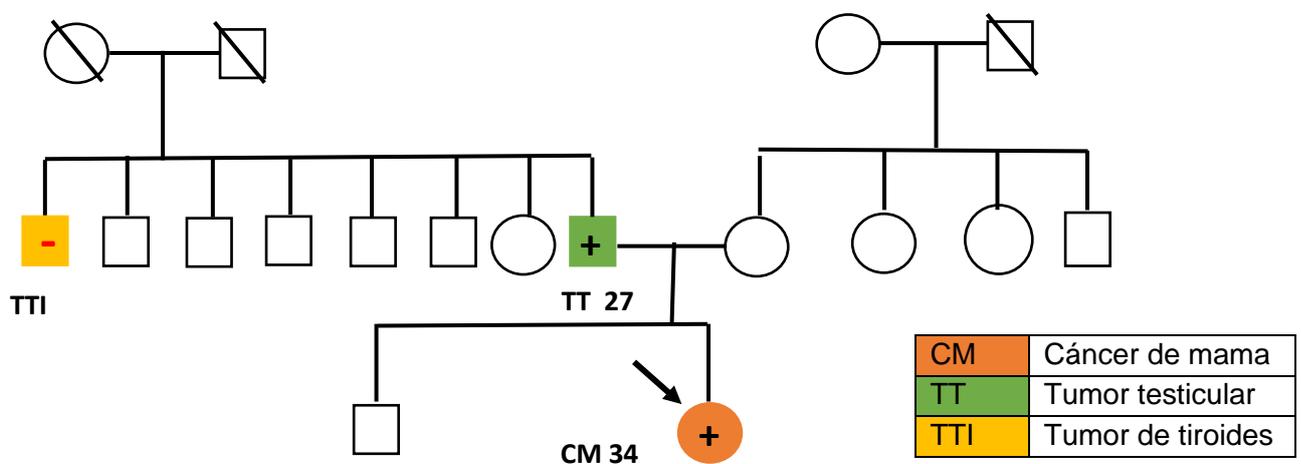


Figura 5. Árbol familiar. Portadora c.1702\_1703del (p. Asn568fs) en el gen *BRIP1*. Se especifica el tipo de tumor y la edad al momento del diagnóstico. La flecha indica el caso índice, +: detectada la mutación; -: no detectada la mutación.

El caso índice presenta un carcinoma ductal infiltrante de mama con positividad tanto para receptores hormonales y HER2. Presenta una mutación en el gen *BRIP1*. A partir de este resultado se realizó el estudio de portadores, hallándose la mutación en el padre del caso índice. Los antecedentes familiares son padre diagnosticado de tumor testicular a los 27 años.

Esta mutación esta descrita en ClinVar como la variante c.1702\_1703del (p. Asn568fs) en el exón 12 del gen *BRIP1* tratándose de una delección de un nucleótido que provoca un cambio en el marco de lectura, esta variante de tipo frameshift aparece descrita en la base de datos como patogénica, con el número de identificación 221621.

La helicasa 1 que interactúa con *BRCA1* (*BRIP1*) pertenece a la familia de helicasas DEAH, las cuales se unen directamente al *BRCA1*. Su dominio N- terminal contiene siete motivos de helicasa DEAH conservados desempeñando un papel importante en la liberación del ADN. Posee una función en la integridad del genoma a través de la regulación de la replicación y la recombinación homologa.[34]

La pérdida de función de la línea germinal en la proteína C- terminal de *BRIP1*, el cual interactúa con *BRCA1*, se asocian al carcinoma de ovario y al aumento de riesgo de cáncer de mama.[35]

En últimos estudios se ha relacionado con el cáncer de ovario de tipo epitelial. Este gen se está estudiando como candidato debido a que sus proteínas están involucradas en las vías del ADN del gen *BRCA1*, siendo este un gen de alta penetrancia en el cáncer de ovario y de mama. En este estudio se observe que los tumores de ovario más frecuentes son lo de alto grado.[36]

Están amplio el fenotipo tumoral de las mutaciones, que el cáncer hereditario puede dar tumores en cualquier tejido. Pero se necesitan una gran cantidad de estudios para poder llegar a relacionarlos.

## **6. Conclusiones**

1. La Secuenciación Masiva permite el uso de paneles de múltiples genes, que abre el espectro causal; el análisis de los genes *BRCA1* y *BRCA2* únicamente, produce una No detección de casos de cáncer de mama hereditario precoz.

2. Nuestros resultados, pese a su bajo número muestral, muestran la causalidad de genes de moderada penetrancia como nuevos responsables: *BRIP1*, *CHEK2*, y *PALB2*.
3. Se puede establecer una relación entre el genotipo de los casos y la edad de aparición temprana de los tumores de mama, tal y como se ha publicado en series mayores.
4. El conocimiento del perfil genético de los tumores de mama de origen temprano puede ayudar a la prevención mediante el diagnóstico precoz.

## 7. Bibliografía.

1. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell* 2023;41:374-403.
2. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Gampis N, et al. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res* 2020;40:6009-15.
3. Torry DS, Cooper GM. Proto-oncogenes in development and cancer. *Am J Reprod Immunol* 1991;25:129-32.
4. Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N, Shin YK. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem* 2018;51:2647-93.
5. Katsura C, Ogunmwonyi I, Kankam HK, Saha S. Breast cancer: presentation, investigation and management. *Br J Hosp Med (Lond)* 2022;83:1-7.
6. Trapani D, Ginsburg O, Fadelu T, Lin NU, Hassett M, Ilbawi AM, et al. Global challenges and policy solutions in breast cancer control. *Cancer Treat Rev* 2022;104:102339.
7. Cribado y prevención del cáncer de mama - Ginecología y obstetricia [Internet]. Manual MSD versión para profesionales [citado 2024 may 14]; Available from: <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/ginecología-y-obstetricia/cáncer-de-mama/cáncer-de-mama>
8. Martín M, Herrero A, Echavarría I. El cáncer de mama. *Arbor* 2015;191:a234-a234.
9. Libro\_Cancer\_hereditario\_2019.pdf [Internet]. [citado 2024 may 12]; Available from: [https://seom.org/images/Libro\\_Cancer\\_hereditario\\_2019.pdf](https://seom.org/images/Libro_Cancer_hereditario_2019.pdf)
10. Casaubon JT, Kashyap S, Regan JP. BRCA1 and BRCA2 Mutations [Internet]. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 2024 may 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470239/>
11. Narod SA, Rodríguez AA. Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. *salud pública de méxico* 2011;53.
12. 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.

13. Consejo Genético en Cáncer Hereditario | Ciudadanos [Internet]. [citado 2024 may 12]; Available from: <https://www.saludcastillayleon.es/es/salud-estilos-vida/prevencion-cancer/consejo-genetico-cancer-hereditario>
14. McGinn S, Gut IG. DNA sequencing - spanning the generations. *N Biotechnol* 2013;30:366-72.
15. Schmid K, Dohmen H, Ritschel N, Selignow C, Zohner J, Sehring J, et al. SangeR: the high-throughput Sanger sequencing analysis pipeline. *Bioinform Adv* 2022;2:vbac009.
16. Yin Y, Butler C, Zhang Q. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol* 2021;82:812-9.
17. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, D'Amico P, Duso BA, Curigliano G. Next Generation Sequencing (NGS): A Revolutionary Technology in Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2019;1168:9-30.
18. Pervez MT, Hasnain MJU, Abbas SH, Moustafa MF, Aslam N, Shah SSM. A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. *Biomed Res Int* 2022;2022:3457806.
19. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* 2008;29:1282-91.
20. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucl. Acids Res.* 2014;42:D980-5.
21. Criterios de inclusión para acceder a las Unidades de Consejo Genético [Internet]. Portal de Salud de la Junta de Castilla y León [citado 2024 may 22]; Available from: <https://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/programas-guias-clinicas/programas-salud/programa-consejo-genetico-cancer-hereditario/criterios-inclusion-acceder-unidades-consejo-genetico>
22. Adamopoulos PG, Athanasopoulou K, Boti MA, Dimitroulis G, Daneva GN, Tsiakanikas P, et al. Hybrid-seq deciphers the complex transcriptional profile of the human BRCA1 DNA repair associated gene. *RNA Biol* 20:281-95.
23. Boonen RACM, Wiegant WW, Celosse N, Vroling B, Heijl S, Kote-Jarai Z, et al. Functional Analysis Identifies Damaging *CHEK2* Missense Variants Associated with Increased Cancer Risk. *Cancer Research* 2022;82:615-31.
24. Choi E, Mun GI, Lee J, Lee H, Cho J, Lee YS. BRCA1 deficiency in triple-negative breast cancer: Protein stability as a basis for therapy. *Biomed Pharmacother* 2023;158:114090.
25. Kumpula TA, Koivuluoma S, Soikkonen L, Vorimo S, Moilanen J, Winqvist R, et al. Evaluating the role of *CHEK2* p.(Asp438Tyr) allele in inherited breast cancer predisposition. *Fam Cancer* 2023;22:291-4.
26. Schwartz CJ, Khorsandi N, Blanco A, Mukhtar RA, Chen YY, Krings G. Clinicopathologic and genetic analysis of invasive breast carcinomas in women with germline *CHEK2* variants. *Breast Cancer Res Treat* 2024;204:171-9.

27. Kirchner K, Gamulin M, Kulis T, Sievers B, Kastelan Z, Lessel D. Comprehensive Clinical and Genetic Analysis of CHEK2 in Croatian Men with Prostate Cancer. *Genes (Basel)* 2022;13:1955.
28. Xie C, Luo J, He Y, Jiang L, Zhong L, Shi Y. BRCA2 gene mutation in cancer. *Medicine (Baltimore)* 2022;101:e31705.
29. Sopik V, Phelan C, Cybulski C, Narod SA. BRCA1 and BRCA2 mutations and the risk for colorectal cancer. *Clin Genet* 2015;87:411-8.
30. La genética como factor de riesgo del cáncer de mama [Internet]. [citado 2024 may 14];Available from: <https://www.breastcancer.org/es/riesgo/factores-riesgo/genetica>
31. Gonzalez A, Del Greco F, Vargas-Roig L, Brun B, Tabares G, Mampel A, et al. PALB2 germline mutations in a multi-gene panel testing cohort of 1905 breast-ovarian cancer patients in Argentina. *Breast Cancer Res Treat* 2022;194:403-12.
32. Siraj AK, Bu R, Parvathareddy SK, Iqbal K, Azam S, Qadri Z, et al. PALB2 germline mutations in a large cohort of Middle Eastern breast-ovarian cancer patients. *Sci Rep* 2023;13:7666.
33. Morra A, Mavaddat N, Muranen TA, Ahearn TU, Allen J, Andrulis IL, et al. The impact of coding germline variants on contralateral breast cancer risk and survival. 2023 [citado 2024 may 14];Available from: <https://christie.openrepository.com/handle/10541/626085>
34. Long G, Hu K, Zhang X, Zhou L, Li J. Spectrum of BRCA1 interacting helicase 1 aberrations and potential prognostic and therapeutic implication: a pan cancer analysis. *Sci Rep* 2023;13:4435.
35. Moyer CL, Ivanovich J, Gillespie JL, Doberstein R, Radke MR, Richardson ME, et al. Rare BRIP1 Missense Alleles Confer Risk for Ovarian and Breast Cancer. *Cancer Res* 2020;80:857-67.
36. Ramus SJ, Song H, Dicks E, Tyrer JP, Rosenthal AN, Intermaggio MP, et al. Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2015;107:djv214.

## **8. Anexos.**

### **8.1 Índice de tablas y figuras.**

#### Índice de tablas.

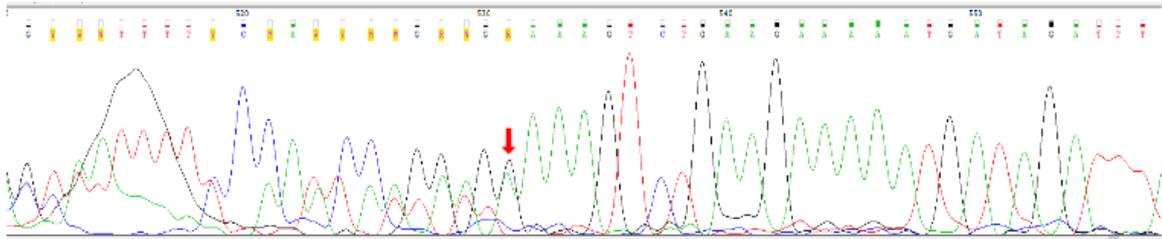
1. Tabla 1.....	5
2. Tabla 2.....	8
3. Tabla 3.....	11

#### Índice de figuras.

1. Figura 1.....	11
2. Figura 2.....	12
3. Figura 3.....	14
4. Figura 4.....	15



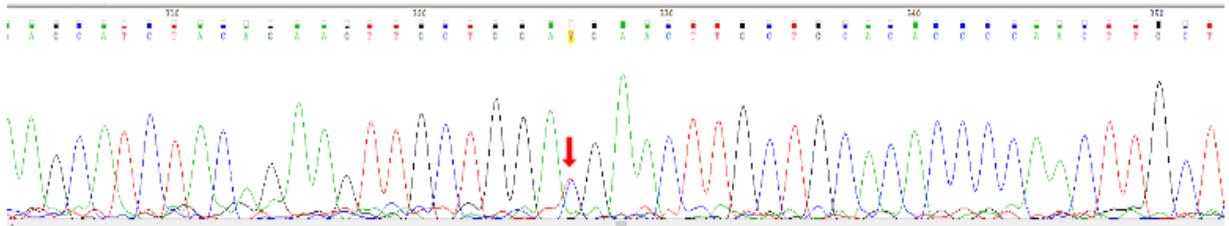
## BRCA2-9-REV



- **Muestra 6593.**

Cromatograma por secuenciación Sanger de la mutación de tipo nonsense en el gen *PALB2*, P.Arg753X (C.2257 C>T)

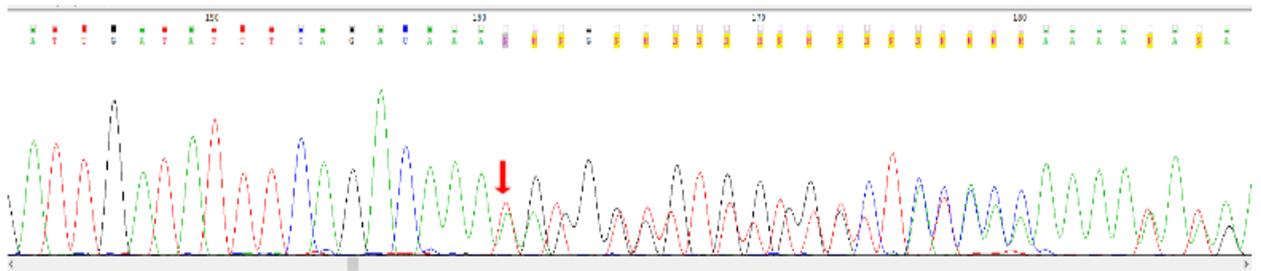
## PALB2-5



- **Muestra 6908.**

Cromatograma por secuenciación Sanger de la mutación de tipo frameshift en el gen *BRIP1*, p.Asn568TrpX9 (c.1702\_1703 del AA)

## BRIP1-12



# PERFIL GENÉTICO DEL CÁNCER DE MAMA HEREDITARIO EN MUJERES JÓVENES



Autora: Cristina Pérez Reguero.  
Tutora: Dra. Mercedes Durán Domínguez.



## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama se trata de la neoplasia maligna más frecuente y la principal causa de muerte dentro del grupo de mujeres. El 10% de los cánceres de mama son hereditarios. Los primeros genes estudiados fueron BRCA1 y BRCA2, siendo únicamente el 25% del cáncer de mama hereditario atribuible a ellos. Siendo necesario ampliar el estudio de más genes. Actualmente se sabe que hay alrededor de 25 genes relacionados con este tipo de cáncer.

## MATERIAL Y METODOS.

Fueron seleccionadas 32 muestras de mujeres con sospecha de Síndrome de Mama Hereditario que cumplieran el requisito de ser menores de 35 años. Todas ellas estudiadas de forma anónima derivadas del Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid.



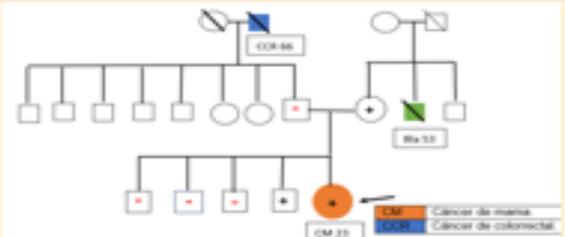
## RESULTADOS

De las 32 muestras se detectó mutación patogénica en 5 casos, corresponde al 15% de todos los casos. En la tabla 1 mostramos las características de las mutaciones encontradas.

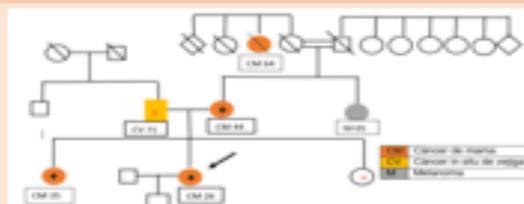
Tabla 1. Características de las mutaciones de los 5 casos seleccionados.

Muestra	Gen	Función	ClinVar
1473	BRCA1	Missense	Patogénica 17093
1799	CHEK2	Missense	Patogénica 126068
6504	BRCA2	Frameshift	Patogénica 266968
6593	PALB2	Nonsense	Patogénica 142403
6908	BRIP1	Frameshift	Patogénica 221621

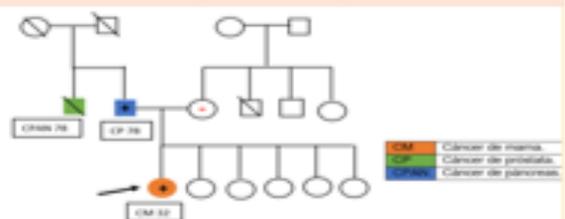
Mostramos las figuras de cada una de las familias seleccionadas.



Familia 1473. Estudio de portadores: 6 familiares estudiados, madre positiva y uno de los hermanos positivos. Flecha: caso índice; +portador; - no portador.



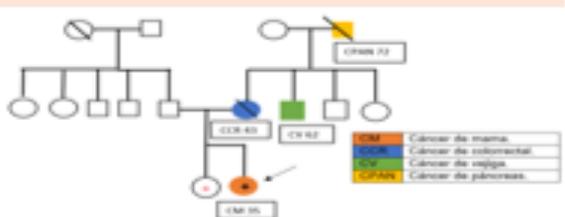
Familia 6685. Estudio portadores: Padre y una hermana no portadores. Madre y otra de las hermanas portadoras



Familia 1788. Estudio de portadores, madre portadora y padre no portador.



Familia 6908. Estudio de portadores, siendo positivo padre del caso índice.



Familia 8504. Estudio de portadores, no se detecta portadores en los familiares analizados.

## CONCLUSIONES

- ✓ La secuenciación masiva permite detectar otros genes implicados en el cáncer de mama hereditario.
- ✓ Mutaciones en los genes BRIP1, CHEK2, PALB2 podrían explicar casos de edad temprana de aparición en familias con sospecha de cáncer de mama hereditario.
- ✓ El conocimiento del perfil genético de los tumores de mama de origen temprano puede ayudar a la prevención mediante el diagnóstico precoz.

## BIBLIOGRAFIA

