



ANÁLISIS MOLECULAR MULTIGÉNICO DE CASOS CON CÁNCER COLORRECTAL FAMILIAR TIPO X

Trabajo de Fin de Grado
Curso 2024-2025



AUTORA: Elena Feijóo Rico

TUTORA: Dra. Mercedes Durán Domínguez

INSTITUCIÓN: Instituto de Biomedicina y Genética Molecular

ÍNDICE:

1. Abstract	2
2. Introducción	2
2.1 ¿Qué es el cáncer?.....	2
2.2 Cáncer colorrectal (CCR)	3
2.3 Síndrome de Lynch	4
2.4 Cáncer familiar hereditario.....	5
2.5 Cáncer colorrectal familiar tipo X	6
2.6 Detección de las mutaciones	8
2.7 Clasificación de las variantes	9
3. Objetivos.....	10
4. Material y métodos	10
4.1 Material:.....	10
4.2 Método:.....	10
4.2.1 Obtención del ADN:.....	10
4.2.2 Cuantificación del material genético	10
4.2.3 NGS: secuenciación masiva	11
4.2.4 Análisis de datos	12
4.2.5 Confirmación por Sanger	12
4.2.6 Recogida de datos	12
5. Análisis y discusión de resultados	12
5.1 Caso C-2851	15
5.2 Caso C-555	16
6. Conclusiones	17
7. Bibliografía:	18
8. Anexo.....	20

1. ABSTRACT

Familial colorectal cancer type X (FCRC-X) is a clinical entity characterised by familial aggregation of colorectal cancer without alterations in DNA repair genes (MMR), despite meeting the Amsterdam criteria that would suggest a diagnosis of Lynch syndrome. This work aims to analyse by massive sequencing (NGS) a multigene panel in 32 cases selected for having a history of colorectal cancer (CRC). The results revealed clinically relevant mutations in genes not related to the DNA error correction system (MMR system), such as *BRCA1* and *CHEK2*. In addition, variants of uncertain significance were identified in *BRCA2*, *POLE* and *SMAD4*, highlighting the interpretive complexity of multigene genetic studies. The findings reinforce the clinical utility of NGS as a diagnostic tool and highlight the need to expand the genetic panels used in patients with suspected FCRC-X. Finally, personalised follow-up for unaffected relatives of cases with relevant mutations is proposed to improve prevention and early diagnosis.

RESUMEN

El cáncer colorrectal familiar tipo X (CCRF-X) es una entidad clínica caracterizada por la agregación familiar de cáncer colorrectal sin alteraciones en los genes reparadores del ADN (sistema MMR), a pesar de cumplir los criterios de Amsterdam que nos haría pensar en el diagnóstico de un Síndrome de Lynch. Este trabajo tiene como objetivo analizar mediante secuenciación masiva (NGS) un panel multigénico en 32 casos seleccionados por presentar antecedentes de cáncer colorrectal (CCR). Los resultados mostraron mutaciones relevantes desde el punto de vista clínico en genes no relacionados con el sistema de corrección de errores del ADN (sistema MMR), como *BRCA1* y *CHEK2*. Además, se identificaron variantes de significado incierto en *BRCA2*, *POLE* y *SMAD4*, lo que resalta la complejidad interpretativa de los estudios genéticos multigénicos. Los hallazgos refuerzan la utilidad clínica de la NGS como herramienta diagnóstica y destacan la necesidad de ampliar los paneles genéticos utilizados en pacientes con sospecha de CCRF-X. Finalmente, se propone un seguimiento personalizado para los familiares no afectados de los casos con mutaciones relevantes, con el fin de mejorar la prevención y el diagnóstico precoz.

2. INTRODUCCIÓN:

2.1 ¿QUÉ ES EL CÁNCER?

La división celular es el proceso por el cual una célula madre se divide en dos células hijas, esto permite reemplazar a aquellas células envejecidas o dañadas. Si este proceso se altera y se produce la proliferación sin control de un tejido, se formará un tumor que, dependiendo de las células por las que esté compuesto podrá ser de naturaleza benigna o maligna, estos últimos son los que conocemos como tumores cancerosos. (1)

Definimos, por lo tanto, el cáncer como un conjunto de enfermedades producidas por la proliferación incontrolada de una célula alterada (enfermedad monoclonal) sujeta a la evolución debido a la selección natural. Esta definición nos permite incluir las alteraciones tanto genéticas como epigenéticas que podrían desencadenar esta patología además de la capacidad de estas células para poder metastatizar en tejidos adyacentes o a distancia. Este proceso, puede estar mediado por tres tipos de genes diferentes: los protooncogenes, los genes supresores de tumores o los genes reparadores de ADN. (2)

Los protooncogenes estimulan el crecimiento celular, por lo que una mutación en ellos provoca la multiplicación celular continua. Pasan entonces a llamarse oncogenes que podrían activarse por variantes genéticas, por cambios epigenéticos, por reordenamientos cromosómicos o por duplicación de genes entre otros. (3)

Los genes supresores de tumores contrarrestan la acción de los anteriores: mantienen a las células sin dividirse para favorecer la acción de los reparadores del genoma y también favorecen la apoptosis en casos donde haya grandes errores que no puedan ser reparados con seguridad. Debido a esto, su alteración haría que las células perdiesen este freno y se reprodujesen de manera incontrolada.

Los genes reparadores del ADN, como su nombre indica reparan alteraciones en la secuenciación y en caso de no poder, desencadenan la muerte celular. Si falla alguno, las células acumularán errores que podría desencadenar también la división descontrolada de las mismas. (4)

2.2 CÁNCER COLORRECTAL (CCR)

El cáncer colorrectal es el tipo más frecuente en España en caso de no hacer diferenciación por sexos; diagnosticándose 40.203 nuevos casos en 2023 (mayor incidencia en hombres (24.385) que en mujeres: 15.818 nuevos casos). (5)

Hay que tener en cuenta que hay ciertos factores de riesgo que pueden influir en la aparición de estos casos como pueden ser el tabaco, el alcohol o la obesidad, todo ello asociado también a la edad.

Debido a la alta incidencia, en España hay un programa de cribado para todo paciente mayor de 50 años, que consiste en un Test de Sangre Oculta en Heces (TSOH). En caso de dar positivo, podría indicar la presencia de un tumor benigno o maligno o incluso la presencia de otra patología que no guarde relación con nada de lo anteriormente mencionado.

Para entender el desarrollo del CCR se han descrito varias vías que explican su heterogeneidad: vía supresora, mutadora y serrada. Además, cada vía será más frecuente en una zona determinada del colon: en el colon derecho o proximal veremos más casos de alteraciones por vía serrada y mutadora, mientras que la vía supresora será más frecuente en la zona distal del colon (colon descendente o izquierdo).

Desde el punto de vista del genetista, el CCR podríamos dividirlo en hereditario o esporádico.

En 1988, Vogelstein describió la primera vía de carcinogénesis (vía supresora), en la cual hay una evolución ordenada desde una mucosa normal hasta un carcinoma in situ pasando por mucosa hiperproliferativa, pólipos de pequeño tamaño y pólipos displásicos. Esta también es conocida como vía de inestabilidad cromosómica y corresponderá al 85% de los cánceres esporádicos, además de explicar el mecanismo de mutación subyacente a los casos de poliposis adenomatosa familiar. En este caso encontraremos mutaciones en los genes *APC* y *CTNNB1*, que conllevará el alargamiento de la vida media de la β -catenina. La entrada de esta proteína al núcleo celular será la responsable de la sobreexpresión de oncoproteínas que favorecerán la aparición de mutaciones en otros genes y así la aparición finalmente de un adenoma. (6)

La carcinogénesis colorrectal incluirá la vía clásica (vía mutadora): consistente en la progresión desde un adenoma a un adenocarcinoma y la vía alternativa (vía serrada) donde un pólipo derivará en un adenocarcinoma.

En la vía mutadora, hay inestabilidad de microsatélites, por lo que es la vía que producirá el Síndrome de Lynch y el porcentaje de CCR esporádicos restantes. El inicio de la vía se conoce como el mecanismo de “dos golpes”: consta de la alteración de los alelos de un gen MMR (*mismatch repair*).

Por último, las mutaciones en los genes *KRAS* o *BRAF* serán las responsables de la malignización por la vía serrada.

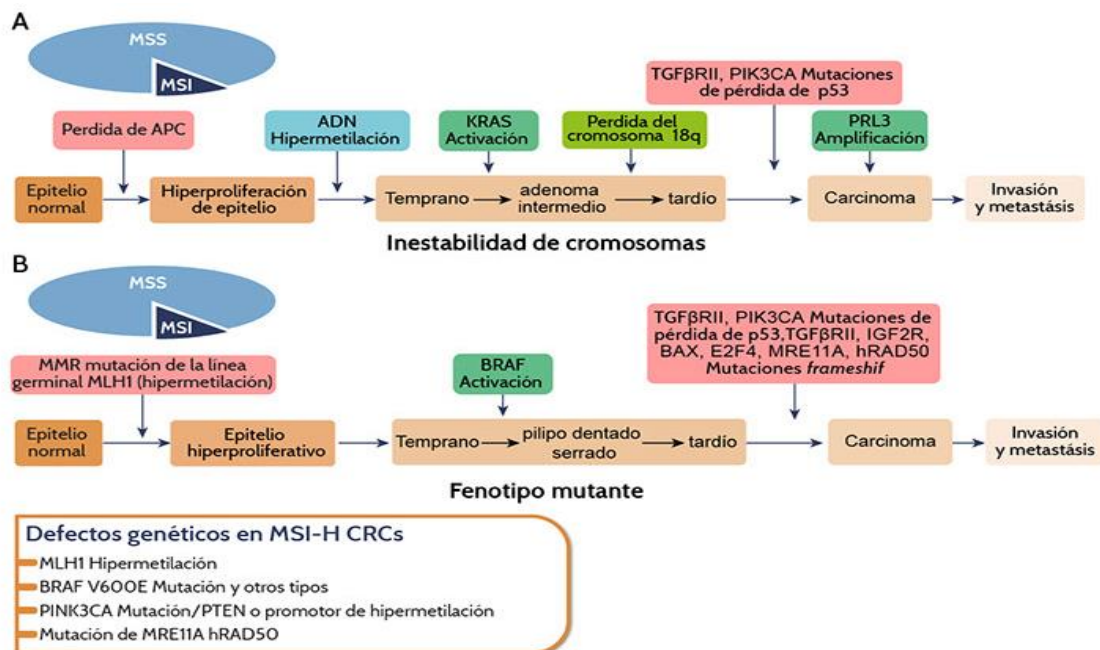


Figura 1. Grupos de CCR basados en inestabilidad cromosómica (A) y en el fenotipo mutador (B). Los modelos genéticos de tumorigénesis de CCR están en paralelo a cada una de las vías de desarrollo tumoral. (7)

2.3 SÍNDROME DE LYNCH

El Síndrome de Lynch también conocido como Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (HNPCC) tiene una herencia autosómica dominante y se estima que corresponde al 3-5% del total de los cánceres colorrectales.

Encontraremos mutaciones en genes reparadores de ADN (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) o en genes responsables de la adhesión celular (*EPCAM*). Estos genes son los responsables de detectar alteraciones en los nucleótidos durante la replicación y corregirlos. Estos errores se pueden dar con mayor facilidad en los microsatélites (secuencias cortas de ADN donde se repite una misma base, por ejemplo, 4 adeninas consecutivas). La alteración de este sistema de corrección significará el cúmulo de errores que causarán inestabilidad en la secuencia genómica. (8)

En 1991, el Grupo Colaborativo Internacional de HNPCC se reunió en Ámsterdam para establecer unos criterios homogéneos para el diagnóstico de esta enfermedad. Su principal desventaja era que sólo tenía en cuenta el riesgo para CCR, por lo que en 1999 se

revisan de nuevo y así surgen los criterios de Ámsterdam II. El principal inconveniente de estos es su baja sensibilidad. Para paliar esto, se diseñan los criterios de Bethesda. (9)

TABLA 1: Criterios de Ámsterdam I y II. Creada a partir del artículo de Diagnóstico de pacientes con Síndrome de Lynch. Revisión de octubre de 2023. (10)

Ámsterdam I (1991)	Ámsterdam II (1999)
Debe de haber al menos 3 parientes afectados	Al menos tres parientes con cánceres relacionados con CCHNP: colorrectal, endometrio, uréter o renal
Uno de ellos debe ser pariente de primer grado de los otros dos	Uno de ellos debe ser pariente de primer grado de los otros dos
Al menos dos generaciones consecutivas deben estar afectadas	Al menos dos generaciones consecutivas deben estar afectadas
Al menos uno de los casos debe de diagnosticarse antes de los 50 años	Al menos uno de los casos debe de diagnosticarse antes de los 50 años
Debe de excluirse la poliposis adenomatosa familiar	Debe de excluirse la poliposis adenomatosa familiar en casos de CCR
Verificación del tumor por parte del servicio de Anatomía Patológica	Verificación del tumor por parte del servicio de Anatomía Patológica

TABLA 2: Criterios de Bethesda revisados (2004). Creada a partir del artículo de Diagnóstico de pacientes con Síndrome de Lynch. Revisión de octubre de 2023. (10)

BETHESDA (2004)
Pacientes que cumplan alguno de estos criterios:
CCR en paciente menor de 50 años
Presencia de tumores sincrónicos o metacrónicos independientemente de la edad
CCR con histología de MSI alta en paciente menor de 60 años
CCR en paciente con al menos un familiar de primer grado con un tumor asociado a CCHNP

Una vez tenemos el diagnóstico de Síndrome de Lynch, se hará un seguimiento estrecho a aquellos familiares que sean portadores de la mutación en función de la historia de cáncer y el órgano afectado: CCR (colonoscopia cada dos años a partir de los 25 años y anual desde los 40); vigilancia de cáncer de endometrio y ovárico (ecografía transvaginal y determinación de marcadores cancerígenos como puede ser el CA-125); del cáncer gástrico (endoscopia digestiva anual desde los 30 años y tratamiento frente al *Helicobacter Pylori* en caso de tenerlo) y finalmente citología de orina y ecografía en familias con afectación de cáncer urológico. (11)

2.4 CÁNCER FAMILIAR HEREDITARIO

Las mutaciones hereditarias son aquellas que se transmiten por vía germinal, es decir, se transmiten de padres a hijos; debido a esto, todas las células derivadas de la unión del óvulo y el espermatozoide tendrán dicha mutación en su material genético. Por su parte, las mutaciones somáticas, son aquellas que tienen lugar de manera esporádica en las células

y que por lo tanto sólo estarán en algunas células y no en todo el organismo. Estas son mucho más frecuentes y no tienen por qué conllevar la aparición de una enfermedad.

El cáncer familiar es aquel que hace referencia a una mayor susceptibilidad genética a padecer un determinado tipo de cáncer, sin embargo, tras hacer los estudios necesarios para identificar la mutación, esta no se ha encontrado. Esto lo diferencia del cáncer hereditario (5% aproximadamente del total de los cánceres en nuestra sociedad) donde la mutación es conocida. (12)

Los humanos, tenemos dos copias de cada gen, cada una de ellas normalmente heredada de cada uno de nuestros progenitores, por lo tanto, en el caso de heredar un gen con una mutación que se relacione con la aparición del cáncer, tendremos mayor probabilidad de desarrollarlo. Remarcando que no tendría por qué aparecer, simplemente nuestras probabilidades iniciales aumentarán. Esto es lo que conocemos como penetrancia incompleta.

En caso de que esta mutación afecte a un gen supresor de tumores (genes que son considerados los frenos del ciclo celular), el gen no mutado mantendrá la normalidad en cuanto a la velocidad de división de las células y no habrá alteraciones debido a esta mutación por el momento. Sin embargo, este individuo será heterocigoto y con sólo una mutación más el ciclo celular se descontrolará.

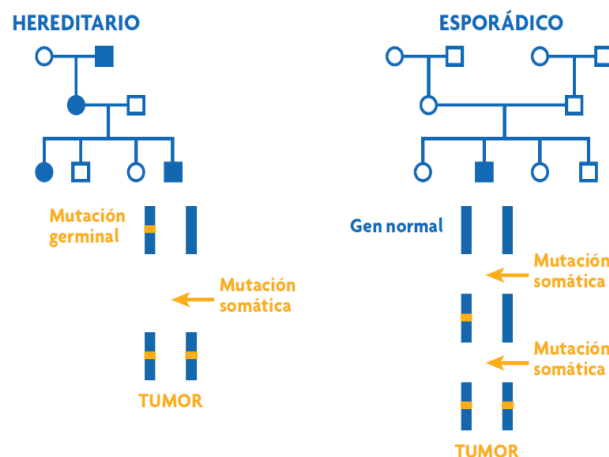


Figura 2. Imagen explicativa de la Hipótesis de Knudson (12)

Con esto en mente nace la hipótesis de Knudson (hipótesis del doble golpe). Alfred Knudson habla de un primer golpe que corresponde a la primera mutación heredada y, por lo tanto, a una mutación germinal. En este caso el individuo nacería siendo heterocigoto para este alelo. El segundo golpe será una mutación somática debido a multitud de factores como pueden ser los epigenéticos e implicaría la pérdida de la heterocigosidad. Esta hipótesis explicaría la presencia de cáncer en pacientes jóvenes, ya que sólo necesitan una mutación para la

aparición de la neoplasia maligna y no dos como sería lo esperado. (13)

2.5 CÁNCER COLORRECTAL FAMILIAR TIPO X

Este término, incluye a un grupo de pacientes con gran heterogeneidad, pero que tienen en común la presencia de cáncer colorrectal sin poliposis con agregación familiar y que, cumpliendo los criterios de Ámsterdam para el CCHNP, al hacerles el estudio genético no poseen ninguna mutación en su sistema de reparación de ADN (MMR) que justifique esta mayor incidencia de cáncer. Por lo que el diagnóstico se hará por descarte. Encontraremos una expresión normal de las proteínas MMR, sin inestabilidad en los microsatélites y sin variantes que consideremos como patogénicas en la línea germinal de los genes MMR, es

decir, no habrá alteraciones en el estudio inmunohistoquímico que se realiza al paciente. (14)

Una de las diferencias fundamentales del cáncer colorrectal familiar tipo X (CCRF-X) frente al Síndrome de Lynch, es que en estos casos normalmente las neoplasias afectan únicamente al colon y no a otras estructuras como sí podría ser el caso del Síndrome de Lynch. Este último, podría debutar como cáncer de endometrio, entre otros. Además, el CCRF-X suele debutar a una edad más tardía (50 años), afectar con mayor probabilidad al colon izquierdo y tener una arquitectura más heterogénea: predomina el crecimiento tubular.

La búsqueda de nuevos genes que puedan explicar esta patología no ha tenido demasiados resultados. Por el momento, únicamente han podido demostrar la asociación con el gen *RSP20*, aunque solo explicará el 0.07% de los casos de CCR familiar sin alteraciones en el sistema MMR. Cuando se posee esta mutación se trata como una enfermedad autosómica dominante, por lo que la probabilidad de transmitir el alelo mutado a la descendencia es de un 50%. Este dato se tratará con el paciente en la consulta de consejo genético, para darle todas las opciones disponibles a la hora de tener descendencia. (15)

En ausencia de un gen que justifique la predisposición al cáncer en estas familias, la vigilancia y el manejo clínico dependerá de la historia familiar y los antecedentes de cada caso.

El pronóstico, en estos casos no es muy bueno, ya que tiene una alta tasa de mortalidad (mayor que la del Síndrome de Lynch), además de peores valores tanto en supervivencia libre de enfermedad como en supervivencia global.

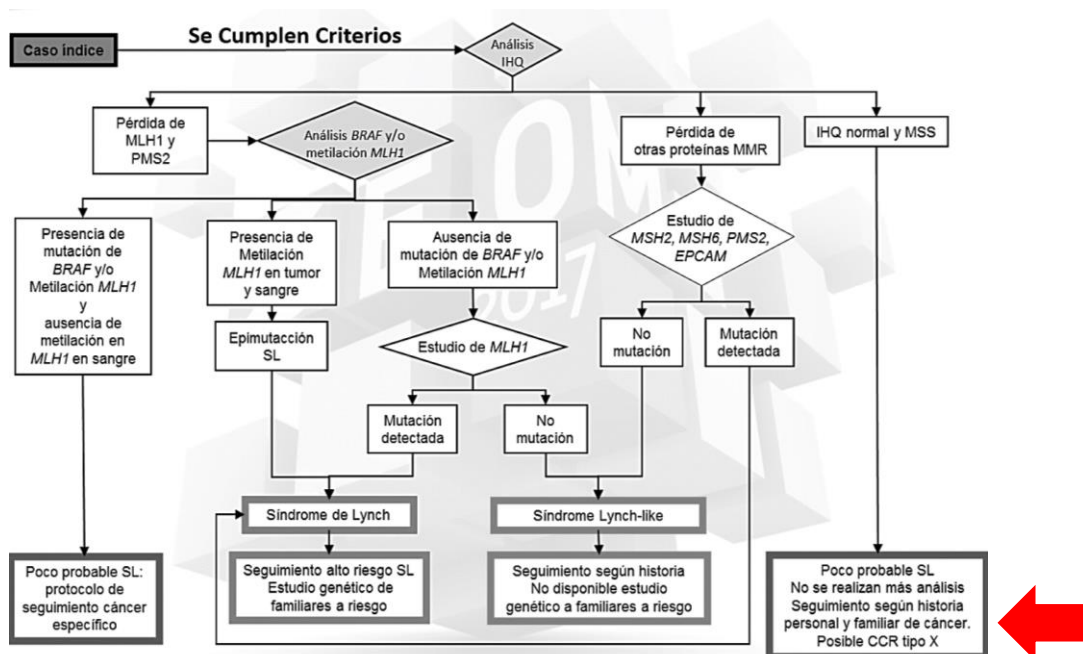


Figura 3. Algoritmo diagnóstico de la SEOM para el CCR familiar tipo X, en el cual se cumplen criterios de Ámsterdam, pero la inmunohistoquímica no revela ninguna mutación relevante. Publicado SEOM-2017.

2.6 DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES

Cuando un paciente cumple los criterios de inclusión en el Programa de Consejo Genético, que, en el caso de Castilla y León, incluye los programas de cáncer de mama y ovario y de cáncer colorrectal, irá a la consulta de consejo genético. En ella, se hace una evaluación individual de la susceptibilidad a padecer un cáncer, para ello, antes de cualquier estudio, se realiza una entrevista exhaustiva al paciente dónde será fundamental la realización de un árbol familiar donde se recoja información sobre los casos de cáncer en la familia, así como el tipo de tumor y la edad de aparición del mismo. (16)

Para la realización de una prueba genética, se usará el ADN del paciente que puede obtenerse de una muestra de sangre, piel, cabello, etc. Entre las pruebas disponibles, encontraremos las bioquímicas (estudian proteínas), pruebas citogenéticas (estudian cromosomas enteros) y pruebas moleculares (detectan pequeñas mutaciones en el ADN) y en estas últimas son en las que nos centraremos. (17)

El método Sanger, se trata de un proceso de secuenciación de ADN, desarrollada en el siglo XX por el británico Frederick Sanger. Su mecanismo de acción se basa en la acción de las ADN polimerasas. Estas, son unas enzimas capaces de unirse a un fragmento de material genético, al cual se ha unido previamente un cebador e ir añadiendo nucleótidos del medio que previamente habremos marcado con fluorocromos. En la reacción tendremos dos tipos de nucleótidos: los dNTP, que son considerados los normales y los ddNTP, que son didesoxirribonucleótidos. Cuando la enzima añade uno de estos últimos a la cadena, no podrá seguir alargando la secuencia, por lo que obtendremos fragmentos de diferentes tamaños. Esto se produce porque los didesoxirribonucleótidos carecen del grupo 3'-OH necesario para la formación de los enlaces fosfodiéster. (18)(19)

Gracias a esto podremos, posteriormente, separar los diferentes fragmentos por electroforesis y finalmente realizar la lectura para conocer la secuencia de nuestro paciente.

Previo a todo este proceso y para que se pueda llevar a cabo, se realizará una amplificación del material genético del paciente, para lo que usaremos la PCR. También hay que considerar, que para que la ADN polimerasa se pueda unir a los fragmentos de ADN, tendremos que separar las dos cadenas; para que esto tenga lugar, simplemente subiremos la temperatura de las reacciones.

La NGS o “Next Generation Sequencing” surge tras la necesidad de buscar un método de secuenciación más eficiente y rápido. Este concepto hace referencia a un conjunto de técnicas de biología molecular usadas para la secuenciación del genoma humano. (20)

La incorporación de las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) y su constante evolución han permitido analizar un mayor número de genes en comparación con las técnicas de secuenciación tradicionales. Se ha demostrado que estas tecnologías incrementan notablemente la eficiencia diagnóstica, ya que posibilitan la detección simultánea de múltiples variantes genéticas en un tiempo considerablemente menor, algo difícil de lograr con los métodos convencionales.

Diversas compañías han desarrollado plataformas de NGS que, aunque varían en ciertos aspectos técnicos, comparten un enfoque común: primero se construyen bibliotecas genómicas, luego se realiza una amplificación monoclonal y finalmente se lleva a cabo la reacción de secuenciación. Este proceso genera grandes volúmenes de datos a partir de

múltiples muestras de forma simultánea. Las principales diferencias entre plataformas radican en el método de templado —que puede ser mediante PCR de emulsión o PCR en puente— y en la química empleada para la secuenciación, siendo las más comunes la pirosecuenciación, la secuenciación por síntesis y la secuenciación por semiconducción.

Una de estas tecnologías, la secuenciación por semiconducción Ion Torrent, desarrollada por Life Technologies, utiliza templado por PCR de emulsión y detecta la incorporación de nucleótidos mediante sensores de iones semiconductores. Esta técnica mide los cambios de pH que ocurren cuando se añade un nucleótido a la cadena de ADN, ya que este proceso libera un protón. Dichos cambios de pH se traducen en variaciones de voltaje, que permiten identificar las bases incorporadas y, por tanto, leer la secuencia.

No obstante, la NGS aún presenta ciertos desafíos que deben tenerse en cuenta, especialmente en el ámbito de la genética clínica. Uno de los principales retos es la enorme cantidad de información generada, lo que puede dificultar su interpretación y análisis. Para garantizar la fiabilidad de los resultados y evitar falsos positivos o negativos, es fundamental asegurar la calidad de los datos mediante parámetros como la cobertura de secuenciación y su validación frente a bases de datos existentes.

2.7 CLASIFICACIÓN DE LAS VARIANTES

Las mutaciones encontradas en la secuencia genómica serán clasificadas por el American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) según la repercusión que tendrá luego en la clínica, teniendo en cuenta la probabilidad de desarrollo de cáncer y la necesidad de someterse a estudios periódicos. Así encontraremos cinco clases: benigno (clase 1), probablemente benigno (clase 2), significado incierto (clase 3), probablemente patogénico (clase 4) y patogénico (clase 5). Esta clasificación es la que aparece en la base de datos de variantes ClinVar, donde se consulta si las mutaciones o variantes detectadas están descritas o no. (21) (22)

El uso de este sistema de clasificación facilitará la transmisión de la información al paciente por parte de cualquier sanitario, aunque este no tenga conocimientos específicos, ya que es bastante sencilla. Además, los pacientes entenderán que dependiendo de la clase en la que se encuentre su mutación deberán someterse a diferentes pruebas y recibirán recomendaciones clínicas basadas en ellas. Teniendo esto en consideración, las mutaciones de clase 4 y 5 tendrán revisiones de vigilancia y prevención, mientras que los de clase 1 y 2 no necesitarán este seguimiento. Por último, el camino a seguir con los pacientes de clase 3 no está claro, por lo que el seguimiento se individualizará en función del patrón de cáncer familiar, histología tumoral y otros factores de riesgo. (22)

Teniendo esto presente, hay que tener en cuenta de que no se trata de un sistema rígido por lo que la reclasificación de las variantes previamente conocidas es un proceso frecuente, debido a una mejora continua en las herramientas disponibles, nuevos datos clínicos y mayor número de pacientes conocidos entre otros factores. Esta alteración de la clasificación de una mutación puede justificar cambios en la gestión clínica además de ayudar a resolver la incertidumbre de aquellas variaciones que se encuentran dentro de la clase 3 (significado incierto). (23)

3. OBJETIVOS:

El CCRX representa un reto tanto diagnóstico como terapéutico, ya que sus bases genéticas aún no están claramente establecidas. La caracterización molecular de estas familias es fundamental para mejorar la comprensión de su predisposición genética y para implementar estrategias de prevención, seguimiento y tratamiento más precisas.

En este contexto, el presente Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo principal contribuir al estudio del CCRF-X y para ello planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificar y seleccionar familias con antecedentes de cáncer colorrectal tipo X según criterios clínicos y genéticos establecidos.
2. Analizar las muestras biológicas de los individuos afectados mediante el uso de paneles multigénicos y tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación (NGS).
3. Establecer correlaciones entre las alteraciones genéticas detectadas y el aumento observado en la incidencia de CCR en las familias estudiadas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material:

El IBGM es el laboratorio de referencia del Programa de Prevención del Cáncer Hereditario de la JCyL del área Este de la Comunidad: Burgos, Palencia, Soria, Segovia y Valladolid; recibiendo muestras de las Consultas de Consejo Genético de Burgos y Valladolid. Los Síndromes Hereditarios de Cáncer que se estudian son Cáncer de mama/Ovario Hereditario y Síndrome Colorrectal Hereditario. Los casos que cumplen criterios para Síndrome de Lynch son recibidos para estudio bajo un Consentimiento informado. De estos casos, que no presentan mutación en los genes MMR, es decir, presentan microsatélites estables y además, la Inmunohistoquímica es normal, seleccionamos 32 muestras.

Las muestras están anonimizadas, sólo conocemos su historia personal y familiar de cáncer. El uso de estas muestras está aprobado por el dictamen favorable del CEIm, en la reunión celebrada el 30/04/2025 (acta nº7 de 2025) y acepta que dicho proyecto de investigación sea realizado por el investigador principal y su equipo.

4.2 Método:

Lo que se pretende es realizar un análisis multigénico mediante un panel de 40 genes y NGS en los 32 casos, para ello se siguió el siguiente protocolo:

4.2.1 Obtención del ADN:

La muestra inicial de cada caso son 200ml de sangre periférica de la cual obtendremos finalmente un volumen de 50 ul de su material genético siguiendo el Protocolo FlexiGene DNA de Quiagen.

4.2.2 Cuantificación del material genético

La cuantificación se realizará por medio del sistema fluorómetro Qubit® 3.0, mediante el kit Qubit™ dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Esta cuantificación nos dará la concentración de ADN de cada una de las muestras y esto nos ayudará a saber cuál es la proporción de ADN y de agua que usaremos para tener una concentración final de 10ng de cada muestra, puesto que es la concentración que necesitaremos para realizar el siguiente paso: las librerías en el Ion Chef.

4.2.3 NGS: secuenciación masiva

De cada muestra, analizaremos 40 genes: EasyNGS HCPanel de la marca HoopBio, se muestra en la siguiente figura.

CANCER				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
BRCA1	MSH2	BRCA1	BRCA2	MLH2	MUTYH	MAX	STK11
BRCA2	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	RAD51C		SDHC	
			RAD51D	RAD51D		SDHB	
						SDHA	
						TMEM127	
						ADHAF2	
Cowden	Von Hippel - Lindau	Recombinación Homóloga	Peutz Jeghers	Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 1	Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2	Gástrico Difuso	Melanoma Familiar
PTEN	VHL	RB1	STK11	MEN1	RET	CDH1	CDKN2A

Figura 4: Se muestran los 40 genes que incluye el panel multigénico HoopBio utilizado. Los genes aparecen distribuidos por síndromes hereditarios de cáncer.

Para llevar a cabo este proceso, tendremos que crear las librerías y hacer el templado, todo ello, será llevado a cabo por el Ion Chef de Thermo Fisher de manera automática.

Como tenemos 32 pacientes, crearemos las librerías de 8 en 8, dando lugar así a 4 sets diferentes. Las librerías se realizan mediante High Multiplex PCR, programado con 17 ciclos de amplificación y 8 minutos de extensión a partir de dos pools con 1.949 amplicones. Durante este proceso, las muestras también se marcaron con los adaptadores Ion Xpress Barcoded Adapters (Life Technologies), permitiendo su identificación durante la posterior secuenciación.

Para llevar a cabo el templado, se mezclaron manualmente, de dos en dos las librerías, para ser introducidas en dos chips 530™ hasta alcanzar una concentración final de 27,5 pM. Todo el procedimiento de templado y carga de los Chips se realizó de forma automatizada utilizando el equipo Ion Chef™ (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En la primera etapa, los amplicones de las bibliotecas genómicas se emulsionaron junto con esferas magnéticas, con el fin de adherir cada amplicón a la superficie de una esfera. Posteriormente, se efectuó una amplificación monoclonal y, como paso final, se cargaron los micropocillos del chip Ion 530™ con las 16 muestras que serían sometidas a secuenciación.

Una vez finalizado el templado, se obtuvo el chip completamente cargado las 16 muestras, listo para ser utilizado en la secuenciación mediante el sistema Ion S5™ (Thermo Fisher Scientific).

La secuenciación por semiconducción se realizó utilizando el sistema Ion S5. Previamente, se llevó a cabo la inicialización del secuenciador siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez completada esta etapa, se insertó el chip previamente cargado, comenzando la secuenciación simultánea de las 16 muestras.

4.2.4 [Análisis de datos](#)

Una vez obtenida la secuencia genómica de cada uno de los pacientes, se compara con la secuencia de referencia hg19, gracias al software del Ion Reporter. Una vez encontramos una mutación, se nombra y se clasifica según como esté considerada en la base de datos ClinVar.

4.2.5 [Confirmación por Sanger](#)

Una vez hemos encontrado una mutación aparentemente relevante, habrá que confirmarlo usando el método de secuenciación Sanger, esta misma técnica se realizará a aquellos familiares de nuestro paciente que quieran realizarse el estudio genético para saber si son portadores de la mutación encontrada.

4.2.6 [Recogida de datos](#)

Los datos fenotípicos, de las muestras analizadas, se recogen en sus correspondientes árboles familiares, anonimizados: número de tumores, tipo tumoral y edad de aparición de los mismos.

5. [ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS](#)

En los últimos 10 años (2014-2024) se han recibido 2370 muestras con sospecha de un síndrome colorrectal hereditario (polipósicos y no polipósicos) pertenecientes a 2719 familias diferentes, 1905 casos cumplían el criterio de edad de aparición menor o igual a 70 años (el más restrictivo de los criterios) y sospecha de síndrome de Lynch, esto es un 80% de las muestras recibidas. De ese 80% de casos, sólo el 10% presentan mutación en alguno de los genes de reparación del ADN o MMR: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*.

Actualmente, desde el uso de la NGS ese porcentaje ha aumentado, ya que se detecta la presencia de mutación en otros genes como causantes de Síndrome de Lynch.

De todos estos casos, hemos seleccionado aquellas que cumplen criterios de Ámsterdam para sospecha de Síndrome de Lynch, pero el resultado de la Inmunohistoquímica es normal para los genes MMR, esto son 381 casos (20% de los 1905). De estas muestras, hemos seleccionado 32 con alta carga familiar y MMR negativos, lo que normalmente se denominan CCR tipo X. Al haberles realizado una NGS de un panel de 40 genes, se han obtenido los resultados que se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 3. Resultados obtenidos de los casos C-2851 y C-555; se recoge información acerca de la mutación hallada y cómo se clasifica en ClinVar

Caso	CR	EA	Gen	Función	Exón	Proteína	cDNA	ClinVar ID	Clasificación
C-2851	C1	58	BRCA1	Missense	18	p.Ala1708Glu	c.5123C>A	55407	P
C-555	C1	56	CHEK2	Missense	3	p.Arg117Gly	c.349A>G	128071	PP

CR: Criterio, EA: Edad de aparición del tumor, ID: Número de Identificación en la base de datos ClinVar, P: patogénica; PP: probablemente patogénica

De las 32 muestras elegidas, 2 resultaron positivas para otros genes diferentes de *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* y se consideran relevantes al estar clasificadas como patogénicas o probablemente patogénicas.

En el caso C-2851, encontremos una mutación clasificada como patogénica en ClinVar. Se trata de una mutación missense del gen *BRCA1*, es decir, el cambio de un único nucleótido (citocina por adenina) altera el código genético y consecuentemente en la proteína encontraremos un aminoácido diferente al habitual (en vez de arginina habrá glutamato); esto, en unos casos resulta patogénico y en otros no (estará considerado como benigno). En este caso, el cambio repercutirá finalmente en la función de la proteína, impidiendo realizarla de manera correcta, según ClinVar55407. (24)

En el siguiente caso (C-555), la mutación, también missense, producida en el gen *CHEK2* está clasificada como probablemente patogénica. Esto implica una probabilidad de entre 0.95-0.99 de ser patogénica, por lo que se aconsejará a este paciente someterse a tratamientos de vigilancia y prevención del cáncer. Sin embargo, este seguimiento podría conllevar mayor riesgo de complicaciones por las pruebas requeridas como, por ejemplo, las colonoscopias (a menudo anuales). En este caso, la variedad de pruebas además de la frecuencia con la que estas se realicen dependerán también de la historia familiar (22).

Variant Details: chr22:29121326

Allele Frequency %	41.86
Allele Ratio	T=0.5814, C=0.4186
Amino Acid Change	p.Arg117Gly
COSMIC	carcinoma ... (2)
ClinVar	Pathogenic/Likely pathogenic
Coding	c.349A>G
Ref+/Ref-/Var+/Var-	T=227/198, C=168/138

Figura 5. Imagen tomada del programa Ion Reporter donde se muestran los parámetros de fiabilidad del resultado.

Para la interpretación de los resultados, iremos a IonReporter dónde para asegurarnos que la variante cumple los parámetros de verosimilitud hay que fijarse en varios ítems. En la imagen adyacente, resultado ofrecido por IonReporter, hay que dirigir la atención a la frecuencia con la que encontramos esta variación alélica en nuestra muestra. Como se trata de una mutación heredada por parte de uno de los progenitores, el valor numérico que buscamos es que se parezca lo máximo posible al 50, ya que el otro 50 correspondería al material genético libre de mutación (Allele Frequency %

alrededor de 50).

También nos fijaremos en el apartado de Ref+/Ref-/Var+/Var-; aquí el objetivo será obtener números parecidos entre sí. Siendo la Ref la secuencia de referencia y Var la de la Variante, los símbolos + y – se refieren a las distintas hebras del ADN.

Además de las mutaciones anteriormente mostradas, se han detectado numerosos polimorfismos y tres variantes clasificadas como variantes de significado incierto o UV en ClinVar. Esto es normal en estudios multigénicos, la aparición de variantes polimórficas y de significado incierto, es el resultado del uso de la NGS.

TABLA 4. Resultados obtenidos de los casos C-2351, C-24591 y C-2056; se recoge información acerca de la mutación hallada y cómo se clasifica en ClinVar

Caso	Gen	Función	Exón	Proteína	cDNA	ClinVar ID	Clasificación
C-2351	<i>BRCA2</i>	missense	20	p.Ile2840Val	c.8518A>G	52609	UV
C-2459	<i>POLE</i>	missense	15	p.Gln520Arg	c.1559A>G	405836	UV
C-2056	<i>SMAD4</i>	missense	6	p.Ala226Val	c.677C>T	182869	Conflicto: UV(6), LB(7)

CR: Criterio, EA: Edad de aparición del tumor, ID: Número de Identificación en la base de datos ClinVar, UV: significado incierto; LB: probablemente benigna

En estos tres casos, la mutación era missense, es decir, de nuevo se cambia un único nucleótido para dar lugar a un cambio de aminoácido que tendrá como resultado la alteración de la proteína final. Estas muestras están catalogadas en ClinVar como variantes de significado incierto por lo que a estas familias tendremos que estudiarlas de manera individual para llegar a un consenso y decidir a qué estudios y con qué frecuencia les realizaremos pruebas diagnósticas para ver si han desarrollado algún tumor.

En el caso del paciente C-2351 encontramos una mutación del gen *BRCA2*; gen productor de proteínas reparadoras del ADN. Mutaciones en este gen se han relacionado con la aparición de cánceres hereditarios de mama u ovario, sin embargo, no hay una relación clara con el CCR. (25) (26)

Por su parte, el gen *POLE*, mutado en el caso C-2459, codifica una de las subunidades de la polimerasa ϵ que se encarga de la replicación y reparación del ADN. Se han encontrado mutaciones en este gen que aumentan el riesgo de padecer CCR en sus portadores, sin embargo, estas mutaciones son otras como c.1270C>G (p.Leu424Val), no la que hemos encontrado en nuestro paciente. (27)

El caso de la mutación en el gen *SMAD4* (gen encargado de la regulación de la proliferación celular, es decir, inhibe el crecimiento tumoral), al buscar la mutación en ClinVar aparece como mutación conflictiva. Esto se debe a la falta de consenso de la implicación clínica de la mutación, ya que en ocasiones se ha clasificado como de significado incierto (UV) y otras veces es considerada dentro de las mutaciones probablemente benignas (LB).

Centrándonos ahora en las muestras que hemos clasificado como patogénica, nos interesa saber la posible relación de las mutaciones en los genes *BRCA1* y *CHEK2* con el CCR familiar tipo X.

5.1 CASO C-2851

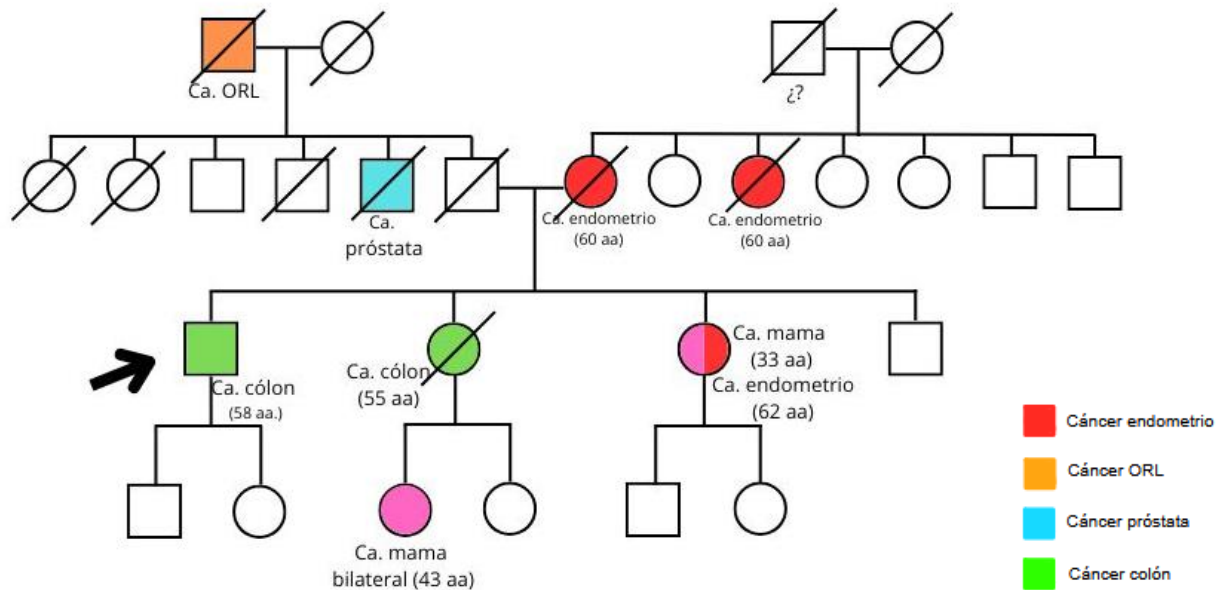


Figura 6. Genograma perteneciente al paciente C-2851. El paciente índice (señalado con una flecha) se le realiza la NGS y se encuentra la mutación en el gen *BRCA1*. Se incluye una leyenda que correlaciona la presencia de diferentes cánceres con un color determinado.

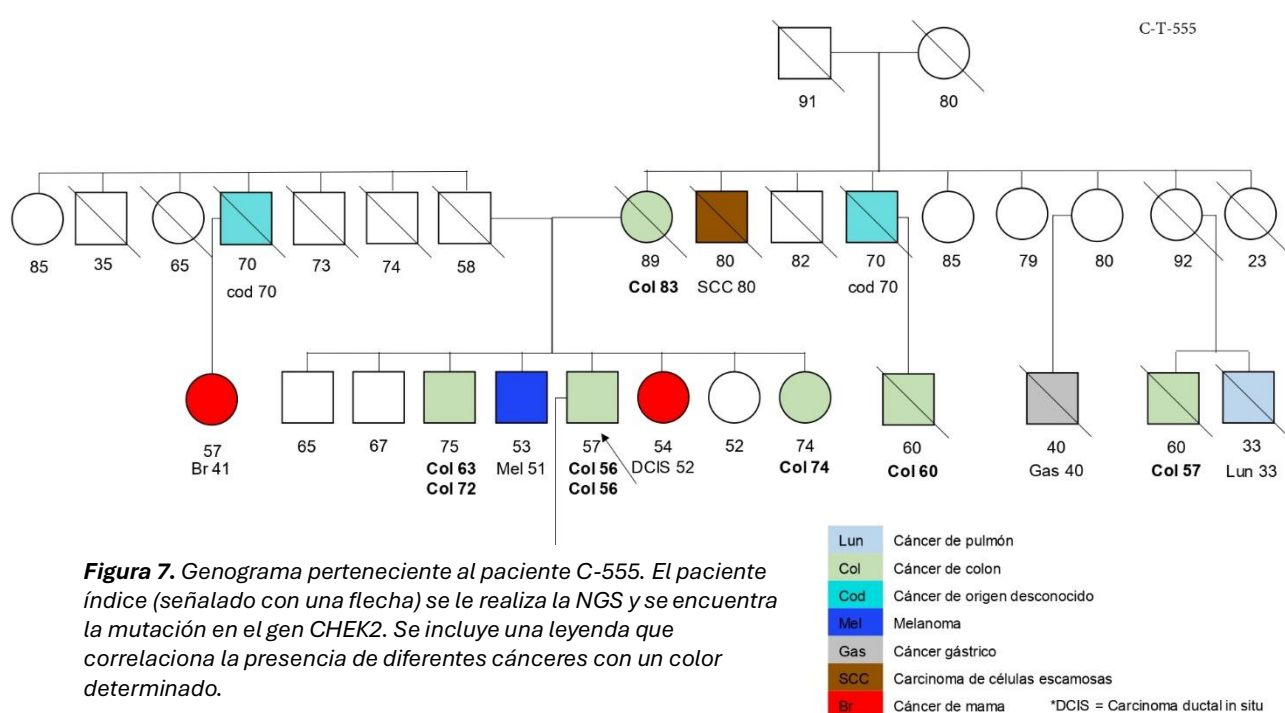
En esta familia, encontramos varios casos de cáncer (dos de ellos, además en pacientes menores de 50 años) que podrían responder a la presencia de un Síndrome de Lynch, como serían el cáncer CCR, endometrio, mama y próstata. Sin embargo, en el caso índice (señalado con flecha), mediante panel multigénico encontramos mutado el gen *BRCA1*.

El gen *BRCA1* (17q.21) es uno de los genes encargados de la reparación del ADN mediante la recombinación homóloga. Esta es considerada su función principal, pero también se relaciona con la transcripción de complejos que contribuyen a la estabilidad genómica. Cada persona hereda dos copias de este, uno de cada progenitor. Heredar un gen mutado se traduce en un aumento de las probabilidades de padecer cáncer a una edad más temprana, sobre todo de mama y de ovario, pero como luego veremos también se relaciona con otro tipo de cánceres. Y es que, mientras la otra copia del gen o alelo sea funcional, no veremos diferencias en la corrección del ADN entre un paciente con un gen mutado y otro paciente donde ambas copias estén libres de mutación. (28) (29)

Pese a que este gen se relaciona tradicionalmente con cáncer de mama y ovario, hay algunos estudios que aceptan la relación entre mutaciones en el gen *BRCA1* y el aumento de la incidencia de CCR en algunas familias. En ocasiones, la mutación en este gen puede ir acompañada de otras mutaciones en el mismo cromosoma, como sería el caso de encontrar mutaciones en el gen *RNF43*. En el estudio, diez miembros de la familia eran portadores de la mutación en *BRCA1*, cuatro de los cuales desarrollaron CCR. En este caso, además se realizó un estudio de la tumorigénesis que concluyó que la aparición de los tumores se debe a alteraciones en el proceso de HDR (reparación dirigida por homología), que como antes hemos comentado, es la función principal de este gen afectado (30).

En el caso de nuestro paciente C-2851, la mutación por ClinVar está catalogada como patogénica, por lo que se considera un resultado positivo en la prueba y podría explicar el aumento de prevalencia en cáncer en esta familia, teniendo en cuenta que ser portador de esta mutación no implica que todos vayan a padecer cáncer, ni predice el tiempo o el tipo, pero aumenta la probabilidad considerablemente. Podemos concluir que de no haber sido por el uso de un panel multigénico mediante NGS, esta familia habría quedado sin un diagnóstico de cáncer hereditario y demuestra la importancia de esta tecnología para el manejo de las familias y para la identificación de otros genes que pueden estar implicados en cáncer colorrectal tipo X.

5.2 CASO C-555



En este caso, al hacer el panel genético al caso índice, encontramos una mutación clasificada como probablemente patogénica en el gen *CHEK2*; gen que codifica la proteína quinasas del punto de control del ciclo celular. Intervendrá fundamentalmente ante roturas de doble cadena, facilitando la reparación; además de modular la actividad de distintas proteínas para detener el ciclo celular y, por último, podría inducir la apoptosis celular en caso de que el daño sea irreparable. Por lo que en caso de sufrir una mutación y verse alterado el resultado final, encontraremos daño en el ADN que no está siendo reparado.

Inicialmente, mutaciones en este gen estaban relacionadas con un riesgo moderado de padecer cáncer de mama, sin embargo, con el tiempo se descubrió que estaba implicado en multitud de cánceres (próstata, riñón, tiroides...), de tal manera que se incluyó en el panel de genes para NGS. A pesar de todo ello, hay multitud de mutaciones presentes en este gen que siguen siendo de significado incierto (VUS). Por ello, en ocasiones el hallazgo de una mutación en este gen se percibe como un obstáculo para la interpretación genética

más que como una ventaja para conocer el mejor manejo clínico que podremos ofrecer al paciente. (26)(31)

Hay estudios dónde analizan y confirman que la presencia de una mutación en este gen puede ser la causa del aumento de incidencia de CCR. Esta mutación puede ser heredada o en caso de encontrar un único caso de cáncer en la familia, corresponder a una mutación esporádica lo que conllevará un estudio de su descendencia en el futuro. (26)

Habría, además, que considerar que hay ciertas mutaciones que si se combinan tienen mayor probabilidad de causar cáncer que ambas por separado. Sería el caso, por ejemplo, de mutaciones en los genes *CHEK2* y *FAN1* (gen que actúa como soporte del sistema MMR y que vemos implicado en otras enfermedades como la anemia de Fanconi). (31)

En este caso, como en el anterior, se ha podido llegar a esclarecer las causas familiares de incidencia de cánceres.

Nuestro estudio, aunque pequeño en el número de muestras, ha resultado muy positivo ya que se ha resuelto el diagnóstico de dos casos que estaban catalogados como tipo X y ahora se sabe que son casos de cáncer hereditario debido a los genes *BRCA1* y *CHEK2* respectivamente. Las recomendaciones de manejo aparecen en las guías clínica y por tanto, los familiares de los casos índice podrán beneficiarse de los programas de prevención.

6. CONCLUSIONES

1. El cáncer colorrectal tipo X continúa siendo una entidad tumoral poco caracterizada. Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen al conocimiento de su base genética y abren nuevas líneas de investigación, especialmente por la implicación de genes que hasta ahora no habían sido claramente relacionados con esta patología.
2. Las tecnologías de secuenciación masiva (NGS) se consolidan, una vez más, como la herramienta más sólida y eficiente para la identificación de alteraciones en genes candidatos. En este estudio, se han identificado variantes relevantes en genes como *BRCA1*, *CHEK2*, *BRCA2*, *POLE* y *SMAD4*, lo que refuerza el valor diagnóstico de estas técnicas en contextos clínicos complejos.
3. La detección de variantes patogénicas en genes distintos a los tradicionalmente asociados al sistema de reparación de errores de apareamiento (MMR) y su correlación con el fenotipo clínico permite mejorar el abordaje diagnóstico y terapéutico de los pacientes con cáncer colorrectal tipo X, así como el seguimiento de sus familiares.
4. Si bien el tamaño muestral del presente estudio es limitado, los hallazgos son de gran relevancia. En particular, la identificación de *BRCA1* y *CHEK2* como genes potencialmente causales sugiere que deberían ser considerados en los paneles de análisis genético para casos de cáncer colorrectal tipo X.
5. Finalmente, los familiares no afectados de pacientes portadores de mutaciones patogénicas podrán beneficiarse del estudio genético directo. Aquellos que resulten portadores podrán ser incluidos en programas de prevención y seguimiento personalizado, lo cual puede tener un impacto significativo en la detección precoz y reducción del riesgo.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. ¿Qué es el cáncer? [Internet]. 1980 [citado 26 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
2. Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ. Updating the Definition of Cancer. *Mol Cancer Res*. 1 de noviembre de 2023;21(11):1142-7.
3. Oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN [Internet]. [citado 26 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/entendimiento-del-cancer/genetica-y-cancer/oncogenes-genes-supresores-de-tumores-y-genes-reparadores-del-adn.html>
4. 01102014_CARCI NOGENESIS_I.pdf [Internet]. [citado 26 de diciembre de 2024]. Disponible en: http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/educacion/01102014_CARCI NOGENESIS_I.PDF
5. Asociación Española Contra el Cáncer [Internet]. [citado 21 de enero de 2025]. Cáncer de colon. Disponible en: <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-colon>
6. Casimiro C. Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos genéticos y clínicos (primera de dos partes). *Nutr Hosp*. 2002;
7. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*. marzo de 2010;7(3):153-62.
8. Guardiola AM. Genes reparadores del DNA [Internet]. Biopat. [citado 23 de enero de 2025]. Disponible en: <http://www.biopat.es/2014/07/01/genes-reparadores-del-dna/>
9. Jover R, Payá A. Inestabilidad de microsatélites en el cáncer colorrectal: concepto, métodos de detección y utilidad clínica. *Gastroenterol Hepatol*. 1 de diciembre de 2003;26(10):656-63.
10. 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. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. 20 de octubre de 2023;21(1):21.
11. Rossi BM, Vaccaro C, Kronberg U. SINDROMES HEREDITARIOS QUE PREDISPONEN AL DESARROLLO DEL CANCER COLORRECTAL. *Rev Med Clin Condes*. 1 de julio de 2017;28(4):617-26.
12. Samuel. Cáncer hereditario y familiar [Internet]. VIVOLABS. 2022 [citado 23 de enero de 2025]. Disponible en: <https://vivolabs.es/cancer-hereditario-y-familiar/>
13. Carvallo P. CONCEPTOS SOBRE GENÉTICA HUMANA PARA LA COMPRENSIÓN E INTERPRETACIÓN DE LAS MUTACIONES EN CÁNCER Y OTRAS PATOLOGÍAS HEREDITARIAS. *Rev Med Clin Condes*. 1 de julio de 2017;28(4):531-7.
14. Vaccaro CA, Peralta NC, Bonadeo F. SINDROME DE LYNCH Y CANCER FAMILIAR X.
15. Orphanet: Cáncer colorrectal familiar tipo X [Internet]. [citado 9 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.orpha.net/es/disease/detail/440437>

16. Ferrer Márquez M, Reina Duarte Á, Maturana Ibáñez V, Belda Lozano R, Rubio Gil F, Blesa Sierra I, et al. Síndrome de Lynch: genética y cirugía. *Cir Esp*. 1 de enero de 2010;89(1):3-9.
17. Alliance G, ScreeningServices TNYMAC for G and N. PRUEBAS GENÉTICAS. En: *Cómo entender la genética: Una guía para pacientes y profesionales médicos en la región de Nueva York y el Atlántico Medio* [Internet]. Genetic Alliance; 2009 [citado 9 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132203/>
18. Garrigues F. Secuenciación de Sanger [Internet]. Genotipia. 2023 [citado 18 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://genotipia.com/sanger/>
19. Pasos y método de secuenciación de Sanger [Internet]. [citado 18 de febrero de 2025]. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing?srsId=AfmBOori9h_Co85L9oGOWFcwmdNlcLweDDR0-X6XSkcfVc3weAFZ6Ogh
20. Garrigues F. NGS: Secuenciación de Nueva Generación [Internet]. Genotipia. 2023 [citado 18 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://genotipia.com/ngs-secuenciacion/>
21. 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*. mayo de 2015;17(5):405-24.
22. 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*. noviembre de 2008;29(11):1282-91.
23. Thummala A, Sudhakaran R, Gurram A, Mersch J, Badalamenti A, Gottaway G, et al. Variant reclassification and recontact research: A scoping review. *Genetics in Medicine Open*. 1 de enero de 2024;2:101867.
24. Definition of missense mutation - NCI Dictionary of Genetics Terms - NCI [Internet]. 2012 [citado 16 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/missense-mutation>
25. Phelan CM, Iqbal J, Lynch HT, Lubinski J, Gronwald J, Moller P, et al. Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. *Br J Cancer*. 21 de enero de 2014;110(2):530-4.
26. Garcia FA de O, de Andrade ES, de Campos Reis Galvão H, da Silva Sábato C, Campacci N, de Paula AE, et al. New insights on familial colorectal cancer type X syndrome. *Sci Rep*. 18 de febrero de 2022;12(1):2846.
27. Buchanan DD, Stewart JR, Clendenning M, Rosty C, Mahmood K, Pope BJ, et al. Risk of colorectal cancer for carriers of a germline mutation in POLE or POLD1. *Genet Med*. agosto de 2018;20(8):890-5.

28. Savage KI, Harkin DP. BRCA1, a 'complex' protein involved in the maintenance of genomic stability. *The FEBS Journal*. 2015;282(4):630-46.
29. Hoja informativa sobre los cambios en el gen BRCA y las pruebas genéticas [Internet]. 2021 [citado 3 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica/hoja-informativa-brca>
30. Chan JM, Clendenning M, Joseland S, Georgeson P, Mahmood K, Joo JE, et al. Inherited BRCA1 and RNF43 pathogenic variants in a familial colorectal cancer type X family. *Fam Cancer*. marzo de 2024;23(1):9-21.
31. Stolarova L, Kleiblova P, Janatova M, Soukupova J, Zemankova P, Macurek L, et al. CHEK2 Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate. *Cells*. 12 de diciembre de 2020;9(12):2675.
32. Cabrero AO. Cáncer hereditario [Internet]. *Revista Método*. 2013 [citado 2 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://metode.es/revistas-metode/monograficos/cancer-hereditario.html>

8. ANEXO

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Grupos de CCR basados en inestabilidad cromosómica (A) y en el fenotipo mutador (B). Los modelos genéticos de tumorigénesis de CCR están en paralelo a cada una de las vías de desarrollo tumoral.

Figura 2. Imagen explicativa de la Hipótesis de Knudson (32)

Figura 3. Algoritmo diagnóstico de la SEOM para el CCR familiar tipo X, en el cual se cumplen criterios de Ámsterdam, pero la inmunohistoquímica no revela ninguna mutación relevante.

Figura 4. Se muestran los 40 genes que incluye el panel multigénico HoopBio utilizado. Los genes aparecen distribuidos por síndromes hereditarios de cáncer.

Figura 5. Imagen tomada del programa Ion Reporter donde se muestran los parámetros de fiabilidad del resultado.

Figura 6. Genograma perteneciente al paciente C-2851. El paciente índice (señalado con una flecha) se le realiza la NGS y se encuentra la mutación en el gen *BRCA1*. Se incluye una leyenda que correlaciona la presencia de diferentes cánceres con un color determinado.

Figura 7. Genograma perteneciente al paciente C-555. El paciente índice (señalado con una flecha) se le realiza la NGS y se encuentra la mutación en el gen *CHEK2*. Se incluye una leyenda que correlaciona la presencia de diferentes cánceres con un color determinado.

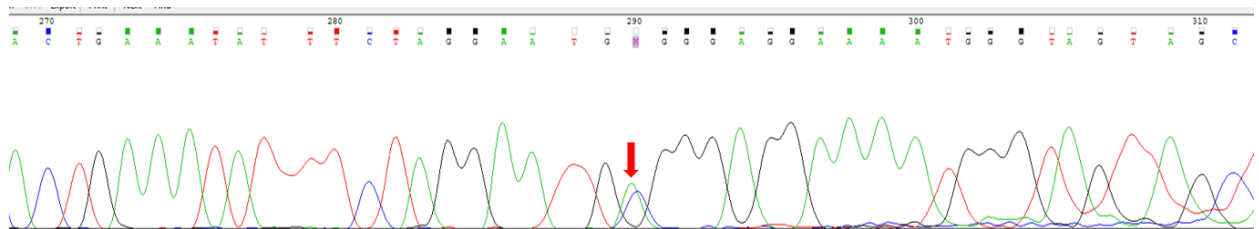
Tabla 1. Criterios de Ámsterdam I y II. Creada a partir del artículo de Diagnóstico de pacientes con Síndrome de Lynch. Revisión de octubre de 2023. (10)

Tabla 2. Criterios de Bethesda revisados (2004). Creada a partir del artículo de Diagnóstico de pacientes con Síndrome de Lynch. Revisión de octubre de 2023. (10)

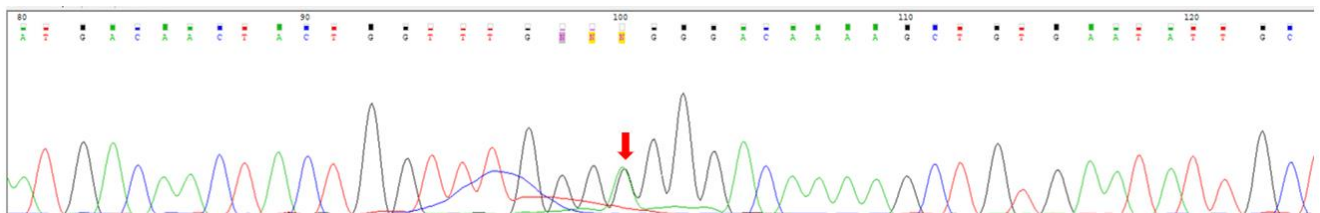
TABLA 3. Resultados obtenidos de los casos C-2851 y C-555; se recoge información acerca de la mutación hallada y cómo se clasifica en ClinVar.

TABLA 4. Resultados obtenidos de los casos C-2351, C-24591 y C-2056; se recoge información acerca de la mutación hallada y cómo se clasifica en ClinVar.

CROMATOGRAMAS DE CASOS ESTUDIADOS



Cromatograma correspondiente al paciente C-2851 donde vemos la mutación detectada. En el lugar de la citosina, encontramos adenosina; lo que trae como consecuencia el cambio de aminoácido: alanina por ácido glutámico. Esta mutación es clasificada en ClinVar como probablemente patogénica (ID ClinVar: 55407)



Cromatograma correspondiente al paciente C-555 donde vemos la mutación detectada. En el lugar de la adenosina, encontramos una glutamina; lo que trae como consecuencia el cambio de aminoácido: arginina por glicina. Esta mutación es clasificada en ClinVar como probablemente patogénica (ID ClinVar: 128071)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

CCR Cáncer colorrectal

CCRF-X Cáncer colorrectal familiar tipo X

ADN Ácido desoxirribonucleico

ACMG American College of Medical Genetics and Genomics

CR Criterio

dNTP Desoxinucleótidos

ddNTP Didesoxinucleótidos

EA Edad de aparición del tumor

EPCAM Genes responsables de la adhesión celular

HNPCC Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico

ID Número de Identificación en la base de datos

LB Probablemente Benigna/Likely Benign

MMR DNA Mismatch Repair

NGS New Generation Sequencing (secuenciación de nueva generación o secuenciación masiva)

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

NIH National Institutes of Health

UV Significado incierto/Uncertain Significance

ANÁLISIS MOLECULAR MULTIGÉNICO DE CASOS CON CÁNCER COLORRECTAL FAMILIAR TIPO X

Autora: Elena Feijóo Rico

Tutora: Mercedes Durán Domínguez



1. INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer más frecuente en España, y puede producirse por diversos mecanismos fisiopatológicos (figura 1). Dentro de estos, encontramos el CCR familiar tipo X (CCRX), los cuales cumplen los criterios de Ámsterdam (tabla 1) para el Síndrome de Lynch, pero encontraremos una inmunohistoquímica normal (figura 2).

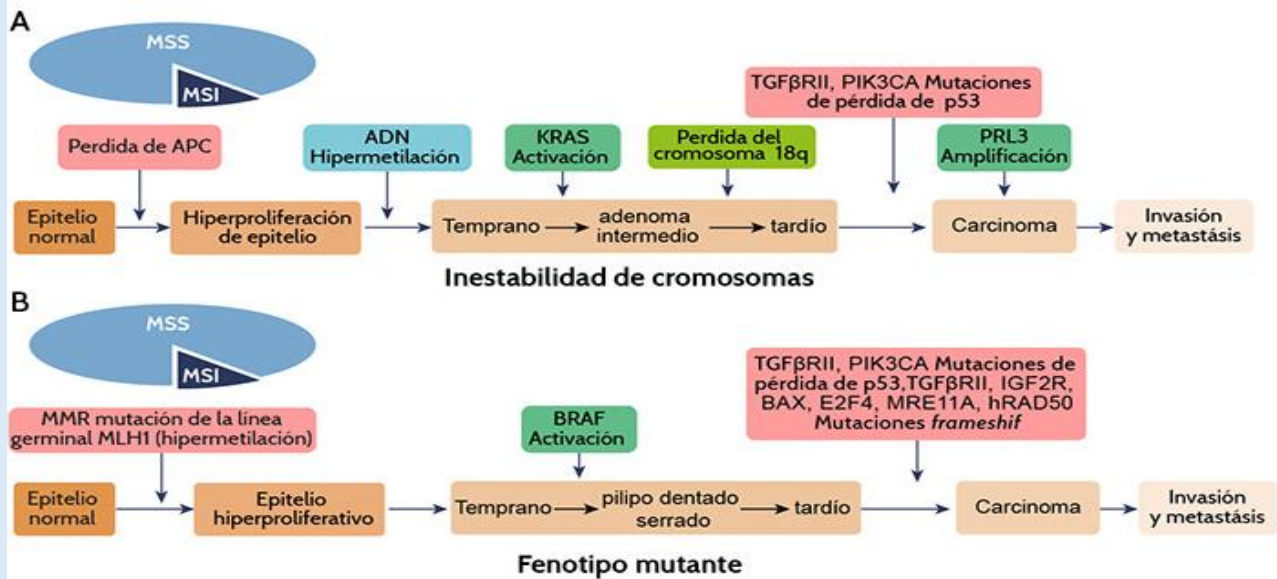


Figura 1. Representación de posibles rutas de carcinogénesis colorrectal

Ámsterdam II (1999)

Al menos tres pacientes con
cánceres relacionados con
Cáncer Colorrectal hereditario no
polipósico (CCHNP)

Uno de ellos debe ser pariente de primer grado

Al menos dos generaciones consecutivas deben de estar afectadas

Al menos uno antes de los 50 años

Debe excluirse la poliposis adenomatosa familiar

Verificación del tumor por parte de AP

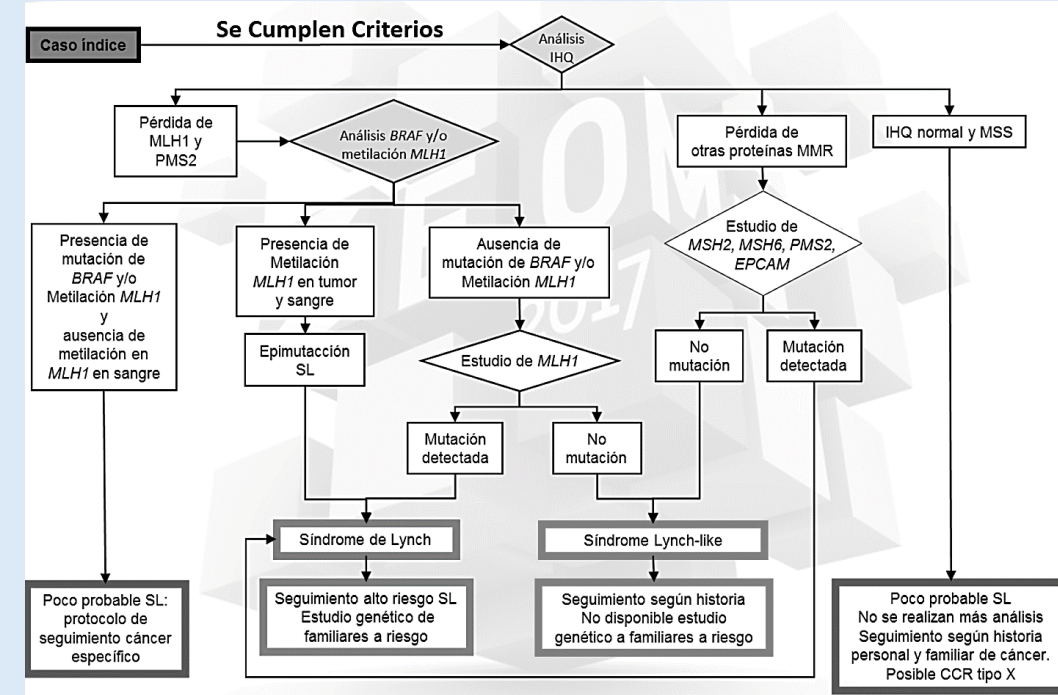


Figura 2. Algoritmo diagnóstico de la SEOM para el CCR familiar tipo X

Tabla 1. Criterios de Ámsterdam

2. OBJETIVOS

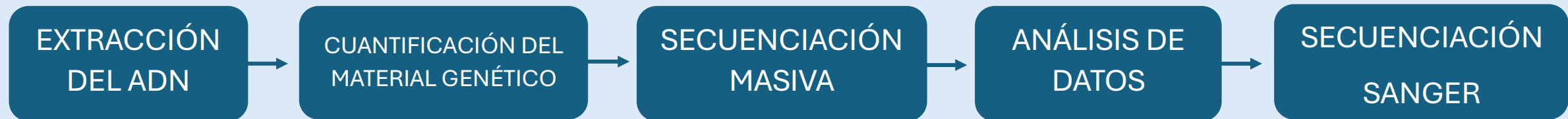
2. OBJETIVOS

El CCRX representa un reto tanto diagnóstico como terapéutico, ya que sus bases genéticas aún no están claramente establecidas. Con la finalidad contribuir al estudio del CCRX, nos plantaremos los siguientes objetivos:

- Identificar y seleccionar familias candidatas según los criterios clínicos y genéticos establecidos.
- Analizar las muestras biológicas mediante el uso de la NGS (Secuenciación masiva).
- Establecer correlaciones entre las alteraciones genéticas detectadas y el aumento observado en la incidencia de CCR.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se pretende realizar un análisis multigénico mediante un panel de 40 genes y NGS a los 32 casos seleccionados que cumplen criterios de CCRX, siguiendo un proceso consistente en:



4. RESULTADOS

De las 32 muestras seleccionadas, había 3 casos donde se halló una mutación de significado incierto, por lo que estudiaremos a cada familia de manera individual. Por otro lado, el caso C-2851 y C-555 resultaron patológica y probablemente patológica respectivamente en genes diferentes a los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*.

Caso	EA	Gen	Función	ClinVar ID	Clasificación
C-2851	58	BRCA1	Missense	55407	Patogénica

Tabla 4. Datos recogidos del caso C-2851

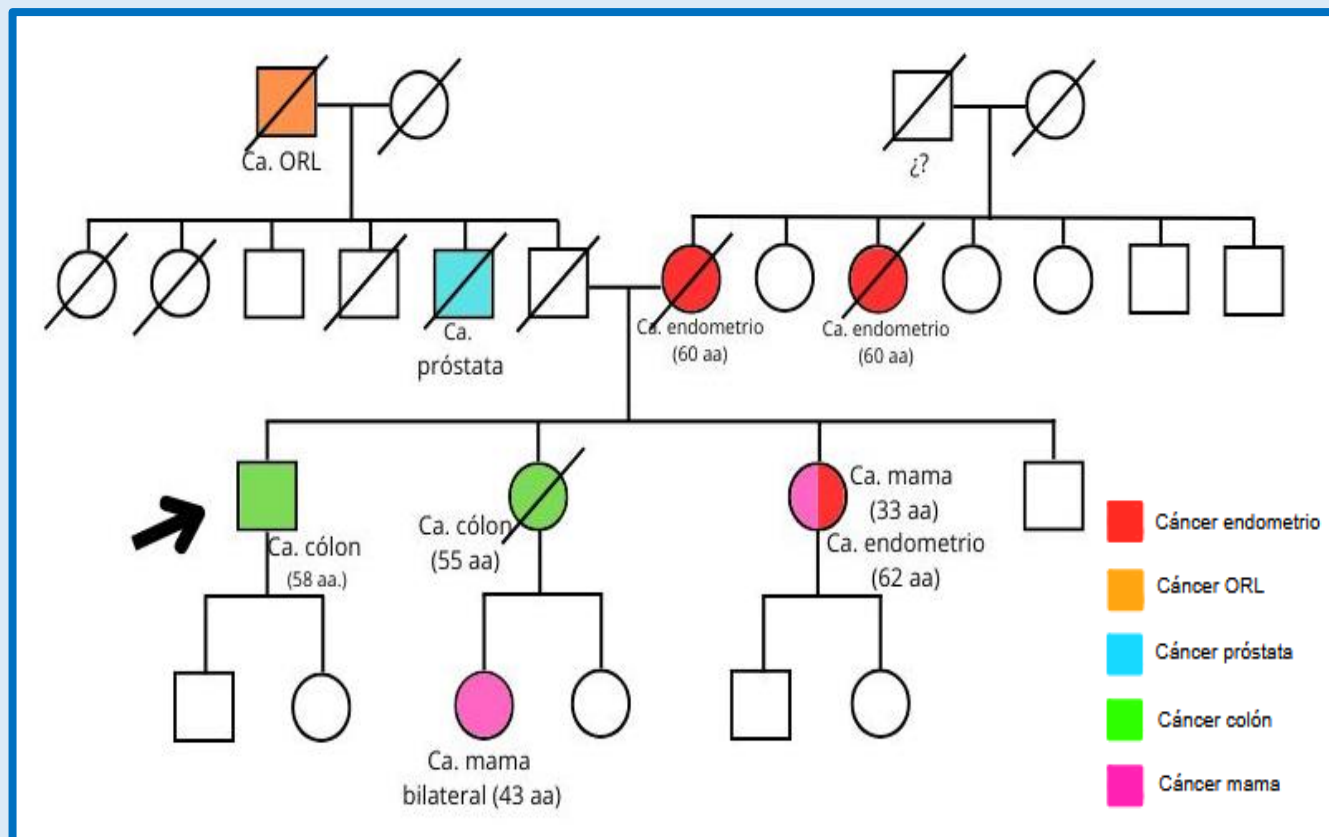


Figura 3. Representación del árbol familiar del paciente C-2851

Caso	CR	Función	Proteína	Exón	ClinVar ID	Clasificación
C-2351	<i>BRCA2</i>	Missense	p.Ile2840Val	c.8518A>G	52609	Significado incierto (UV)
C-2459	<i>POLE</i>	Missense	p.Gln520Arg	c.1559A>G	405836	Significado incierto (UV)
C-2056	<i>SMAD4</i>	Missense	p.Ala226Val	c.677C>T	182869	Conflicto: UV(6), LB(7)

Tabla 3. Datos recogidos de los casos C-2351, C-2459 y C-2056

Caso	EA	Gen	Función	ClinVar ID	Clasificación
C-555	56	<i>CHEK2</i>	Missense	128071	Probablemente patogénica

Tabla 5. Datos recogidos del caso C-555

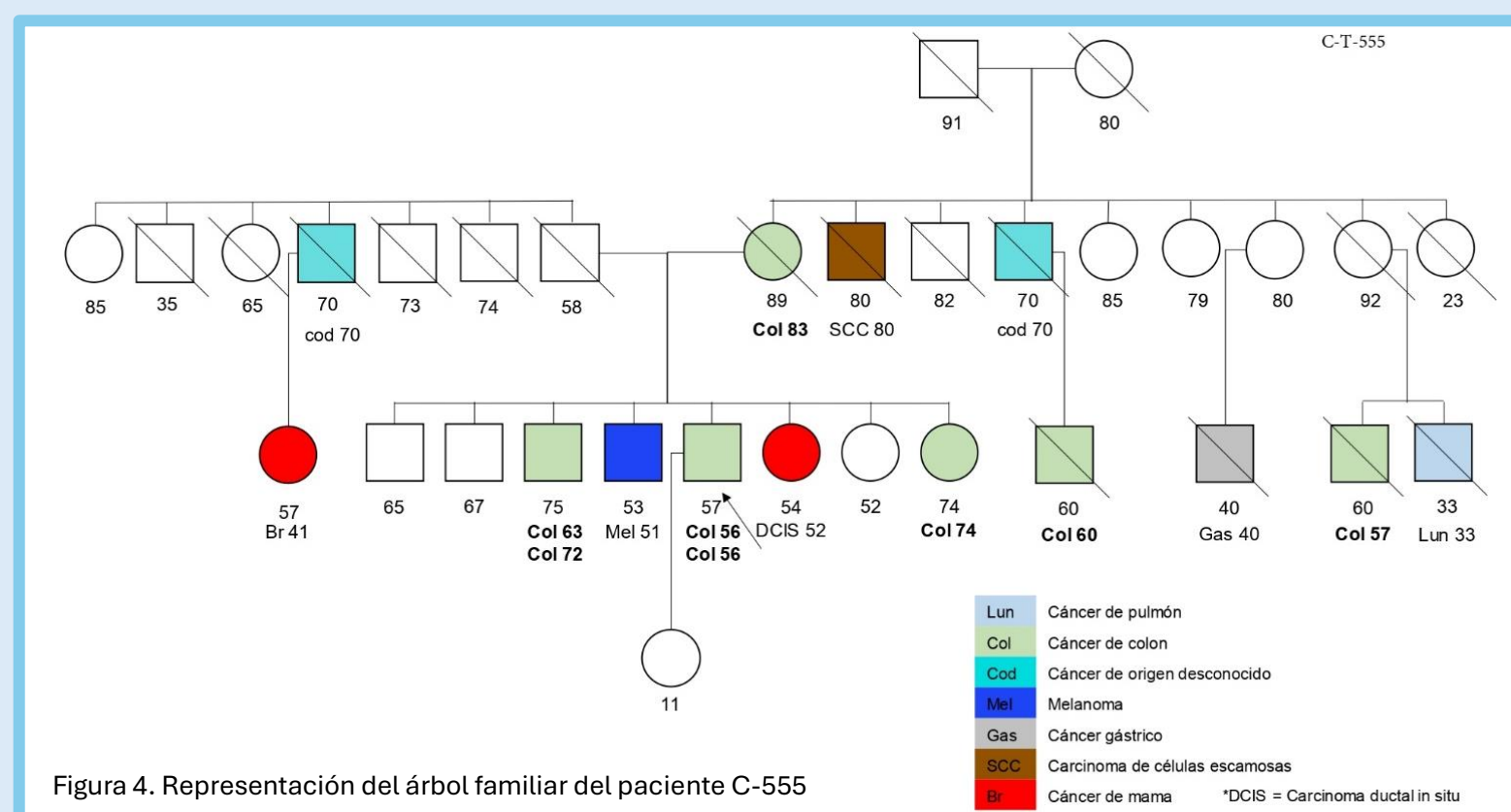


Figura 4. Representación del árbol familiar del paciente C-555

5. CONCLUSIÓN

- Los resultados del estudio contribuyen al conocimiento de la base genética del CCRX a pesar de que siga siendo una entidad tumoral poco caracterizada.
- La NGS se consolida como la herramienta más sólida y eficiente para la identificación de alteraciones en los genes.
- La detección de variantes en genes que no corresponden al MMR permite mejorar el abordaje diagnóstico y terapéutico.
- La identificación de *BRCA1* y *CHEK2* como genes potencialmente causales sugiere que deberían ser considerados en los paneles de análisis genético para casos de cáncer colorrectal tipo X.
- Los familiares no afectados de pacientes portadores de mutaciones patogénicas podrán beneficiarse del estudio genético directo.

6. BIBLIOGRAFÍA

