

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO DE FIN DE GRADO
2024-2025



Grado en
Biomedicina y
Terapias Avanzadas



INSTITUTO DE BIOMEDICINA
Y GENÉTICA MOLECULAR
DE VALLADOLID

**Estudios Genéticos en el Cáncer de Ovario Hereditario:
Nuevas Perspectivas para el Diagnóstico**

*Genetic Studies in Hereditary Ovarian Cancer: New Perspectives for
Diagnosis*

Autor/a:

D^a. Natalia Rojo Calvo

Tutor/es:

D^a. Mercedes Durán Domínguez

INFORMACIÓN

TÍTULO: **Estudios Genéticos en el Cáncer de Ovario Hereditario: Nuevas Perspectivas para el Diagnóstico**

AUTOR/A: **Natalia Rojo Calvo**

TUTOR/ES: **Mercedes Durán Domínguez**

DEPARTAMENTO: **Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología**

TRIBUNAL

PRESIDENTE: **Laura Senovilla González**

SECRETARIO: **Sara Gil Bernabé**

VOCAL: **Mercedes Durán Domínguez**

SUPLENTE 1: **Mar Infante Sanz**

SUPLENTE 2: **Elena Bueno Martínez**

FECHA: 25-06-2025

CALIFICACIÓN:

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer todo el apoyo recibido durante estos últimos 4 años, y durante toda mi vida académica en realidad, a mi familia, a mi novio, Manuel, y a mis amigas, Marina, Alma y Ester. Porque sin ellos no habría llegado a donde estoy ahora, y quiero tenerlo siempre presente. Gracias por estar siempre ahí, para escucharme, consolarme y animarme a perseguir lo imposible.

También quiero dar las gracias al increíble equipo del B7, Merche, Mónica, Lara, Noemi y Mar, que me han ayudado con todo y me han dejado molestarlas estos dos últimos años que he compartido con ellas. Gracias por haber sido mi pequeña familia en el laboratorio.

RESUMEN

El cáncer de ovario hereditario representa un desafío clínico debido a su diagnóstico tardío y la necesidad de identificar variantes genéticas responsables. En este estudio, analizamos 32 casos de carcinoma epitelial de ovario no mucinoso de alto grado sin mutaciones en *BRCA1/2*, utilizando secuenciación de nueva generación (NGS) para evaluar la presencia de variantes en genes de predisposición a cáncer hereditario. Identificamos tres mutaciones patogénicas en diferentes genes, confirmadas mediante secuenciación Sanger o MLPA. Se detectaron además tres variantes de significado incierto, cuya clasificación se refinó según los criterios ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics). Estos hallazgos subrayan la importancia de ampliar el espectro mutacional en el cáncer de ovario hereditario más allá de *BRCA1/2*, lo que podría mejorar el asesoramiento genético y la detección precoz en pacientes con alto riesgo.

Palabras clave

Cáncer de ovario hereditario, reparación del ADN, secuenciación de nueva generación, variantes genéticas, genes de penetrancia moderada.

ABSTRACT

Hereditary ovarian cancer poses a clinical challenge due to late diagnosis and the need to identify responsible genetic variants. In this study, we analyzed 32 cases of high-grade non-mucinous epithelial ovarian carcinoma without BRCA1/2 mutations, using next-generation sequencing (NGS) to assess the presence of variants in DNA repair genes. We identified three pathogenic mutations in different genes, confirmed by Sanger sequencing or MLPA. Additionally, three variants of uncertain significance were detected, refined according to ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) criteria. These findings highlight the importance of expanding the mutational spectrum beyond BRCA1/2 in hereditary ovarian cancer, potentially improving genetic counseling and early detection in high-risk patients.

Keywords

Hereditary ovarian cancer, DNA repair, next-generation sequencing, genetic variants, moderate penetrance genes.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
1. ¿A qué llamamos cáncer? Origen molecular, estudio y epidemiología	1
2. Cáncer de Ovario	2
3. Cáncer Hereditario. Cáncer de Ovario Hereditario.	3
4. Técnicas de detección de variantes genéticas.	4
5. Clasificación de variantes	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
METODOLOGÍA	7
1. Selección de casos: muestras, procedencia, criterios de inclusión	7
2. Extracción de ADN de sangre periférica	7
3. Protocolo de estudio:	8
1. Cuantificación	8
2. Preparación de Librerías y Templado	8
3. Secuenciación	8
4. Análisis de resultados.	9
5. Verificación de resultados.	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
Alteraciones encontradas	11
Casos patogénicos	12
Muestra 4465	12
Muestra 6967	13
Muestra 7152	14
Reclasificación de variantes de significado incierto	16
Muestra 6940	16
Muestra 6734	17
Muestra 7519	17
CONCLUSIONES	19
BIBLIOGRAFÍA	21
ANEXOS	23
Anexo 1. EasyNGS HCPanel de HoopBio	23
Anexo 2. Resultados y Análisis	24
Anexo 3. Criterios de clasificación manuales de la ACMG	27
Anexo 4. Póster presentado en la ESHG	31
Anexo 5. Póster presentado en la XI IMFAHE International Conference	32

Índice de Tablas y Figuras

Índice de Tablas

Tabla 1. Criterios de inclusión en el Programa de Consejo Genético	7
Tabla 2. Características de las muestras patogénicas encontradas	11
Tabla 3. Características de las muestras de significado incierto encontradas	11

Índice de Figuras

Figura 1. Teoría de los dos golpes de Hudson	2
Figura 2. Relación entre los genes del EasyNGS HCPanel de HoopBio	9
Figura 3. Flujo de trabajo	10
Figura 4. Árbol familiar. Muestra 4465	12
Figura 5. Árbol familiar. Muestra 6967	13
Figura 6. Árbol familiar. Muestra 7152	14

Índice de Abreviaturas

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ADN (DNA)	Ácido Desoxirribonucleico
AMP	Association for Molecular Pathology
B	Benigna/Benign
BRIP1	<i>BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1</i>
CC	Cáncer colorrectal
CE	Cáncer de endometrio
CG	Cáncer gástrico
CI	Criterio de Inclusión
CLINVAR ID	Número de identificación en la base de datos ClinVar
CM	Cáncer de mama
CNV	Copy Number Variation (variación del número de copias)
CO	Cáncer de ovario
CO/E	Cáncer de ovario o endometrio
CORL	Cáncer de cabeza y cuello
CPR	Cáncer de próstata
CPU	Cáncer de Pulmón
CV	Cáncer de vejiga
DDNTPS	2',3'-didesoxinucleótidos
DNTPS	2'-desoxinucleótidos
E	Carcinoma epitelial no mucinoso de alto grado
EA	Edad de aparición del tumor
FUM	fumador/a
HBOC	Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario
LB	Probablemente Benigna/Likely Benign
LEU	Leucemia
LP	Probablemente Patogénica/Likely Pathogenic
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
NEO	Neoplasia no especificada
NGS	New Generation Sequencing (secuenciación de nueva generación o secuenciación masiva)
NIH	National Institutes of Health
P	Patogénica/Probablemente Patogénica
PALB2	<i>Partner and Localizer of BRCA2</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
POLE	<i>Polymerase Epsilon</i>
UV	Significado incierto/Uncertain Significance

INTRODUCCIÓN

1. ¿A qué llamamos cáncer? Origen molecular, estudio y epidemiología

El término '**cáncer**' engloba diversas enfermedades caracterizadas por la acumulación progresiva de **alteraciones celulares**. Estas provocan desregulación en la proliferación, evadiendo mecanismos de control como la apoptosis y la vigilancia inmunológica, lo que facilita la metástasis y la invasión tumoral. Es este característico descontrol e invasividad lo que convierten un tumor en cáncer, otorgando el matiz patogénico a la enfermedad. (1–3)

El origen de esta enfermedad se encuentra en alteraciones en tres tipos de **genes**: proto-oncogenes/oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de ADN.

Los primeros, **proto-oncogenes**, están presentes en células sanas donde cumplen funciones regulatorias indispensables para la célula, implicados en proliferación y diferenciación normal, así como supervivencia y crecimiento de la célula. Son mutaciones en estos genes, afectando su nivel de expresión, estructura de las proteínas que codifican o provocando una sobre activación de estos, lo que encontramos en las células cancerígenas y denominamos **oncogenes**, siendo la principal base molecular de esta enfermedad. (3,4)

La **complejidad** del cáncer como grupo de enfermedades ha llevado a la comunidad científica al desarrollo de múltiples modelos evolutivos de la enfermedad, tratando de comprender cómo progresa y que patrones sigue la carcinogénesis. Un cáncer no tiene por qué ajustarse a un solo modelo y **varios mecanismos pueden darse simultáneamente** o durante diferentes estados de la enfermedad. Además, para el desarrollo de estas teorías, se aplicaron los principios claves de la evolución darwiniana de variación heredabilidad y selección (1).

Entre los **modelos evolutivos**, cabe destacar la teoría de los dos golpes de Knudson, que en 1971 demostraba el impacto acumulativo de las mutaciones en el crecimiento tumoral. Esta hipótesis explica la inactivación de los **genes supresores tumorales**, otros protagonistas moleculares del desarrollo de la carcinogénesis. Estos genes, implicados en **resolver los desajustes celulares** que podrían desencadenar en la proliferación y supervivencia descontroladas, aparecen inactivados en numerosos cánceres. Sin embargo, la inactivación debe darse en ambos alelos para bloquear por completo su función, siendo necesarios los “dos golpes” para iniciar la carcinogénesis (1,5,6) .

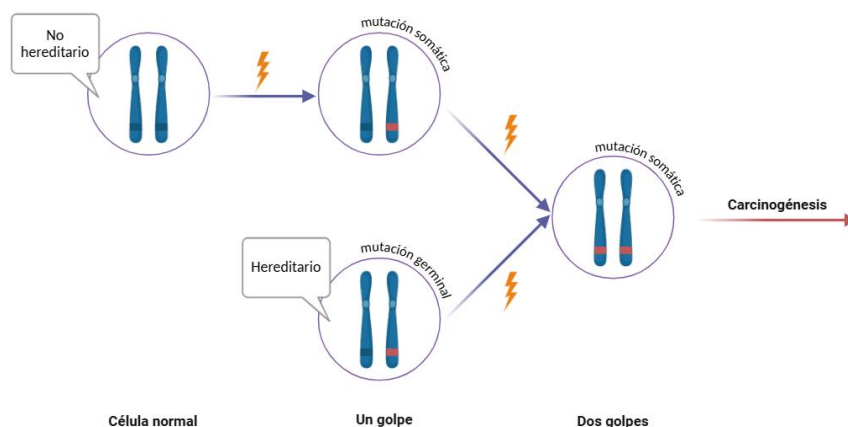


Figura 1. Representación gráfica de la Teoría de los dos golpes de Knudson. Elaboración propia. Creada con Biorender.

Los últimos genes clave en el origen y la progresión de la tumorigénesis son los **genes reparadores del ADN**, encargados de corregir aquellas mutaciones potencialmente peligrosas para el correcto funcionamiento celular, evitando que se desencadene el cáncer (7).

Este grupo de enfermedades de origen genético que se engloban con la etiqueta de cáncer suponen una inmensa carga tanto de enfermedad como económica a nivel mundial. Con referencia a los datos de 2022, se dieron aproximadamente 20 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, y esta enfermedad fue causante de casi 10 millones de muertes. Además, en 2040, se estima alcanzar los 40 millones de casos por cáncer a nivel mundial. Estos datos reflejan la importancia y progresión de la enfermedad en la sociedad, convirtiéndose en una de las grandes causas de morbilidad afectando todo el mundo, exponiendo la relevancia del estudio, comprensión y optimización del abordaje del cáncer como enfermedad hoy en día (8,9).

2. Cáncer de Ovario

Entre todos los cánceres, los **de tipo ginecológico** suponen una alta proporción de casos, siendo los más prevalentes entre mujeres de todo el mundo, independientemente del estado socioeconómico. La lista la encabeza el cáncer de mama, seguido de cervix y útero y, en tercer lugar, el **cáncer de ovario**. (10,11)

Este cáncer, con 324.603 casos registrados y causante de 206.956 muertes en 2022, se sitúa entre los **15 cánceres más mortales** actualmente, siendo el cáncer ginecológico de mayor mortalidad. Esta alta mortalidad se debe a que suele diagnosticarse en fases avanzadas, ya que, en estadios tempranos, los síntomas son ausentes o inespecíficos. El tipo histológico más frecuente es el cáncer de ovario epitelial, y se considera una entidad clínica única junto con los cánceres de trompa de Falopio y peritoneal debido a las características clínicas comunes. (8,11)

3. Cáncer Hereditario. Cáncer de Ovario Hereditario.

Aunque, además de las razones genéticas necesarias para el desarrollo del tumor, existen otros motivos adicionales implicados en la patogénesis, como mutaciones adquiridas, enfermedades promotoras y estilos de vida que favorezcan un microambiente tumorigénico, las primeras son indispensables para que se produzca la enfermedad, pudiendo además originar una heredabilidad familiar del cáncer (4,12).

Pese a que los casos hereditarios de esta enfermedad son una minoría, correspondiendo a **menos del 10%** de casos a nivel mundial y, por lo tanto, siendo el cáncer una enfermedad de carácter esporádico en general (4,5), el cáncer hereditario representa un **desafío clínico** debido a su transmisión genética y al riesgo elevado que confiere a los portadores de variantes patogénicas. En el caso del cáncer de ovario hereditario, la **identificación precoz** de individuos en riesgo mediante estudios genéticos permite establecer estrategias de vigilancia y prevención personalizadas, como la cirugía reductora de riesgo o el seguimiento intensivo, contribuyendo así a mejorar la supervivencia y la calidad de vida de las pacientes.

Hay dos tipos de **alteraciones heredables**, mutaciones en la secuencia del ADN o alteraciones epigenéticas que conllevan silenciamiento o activación de genes implicados en carcinogénesis. La mayoría de los casos de cáncer hereditario se deben a **genes de alta penetrancia** cuyas mutaciones son determinantes en la mayoría de las ocasiones para el desarrollo de un cáncer (4,13). Las mutaciones en estos genes funcionan según la teoría de Knudson, explicada previamente, donde el primer golpe correspondería a la mutación heredada por vía germinal y un segundo golpe, por mutación somática, posterior que desencadenaría el cáncer (5,6).

En el caso del cáncer de ovario, los principales genes implicados son **BRCA 1 y 2**, de alta penetrancia y herencia autosómica dominante, que siguen este patrón de dos golpes (12,14,15). Sin embargo, existen otros genes, de menor penetrancia, pero cuya importancia está en aumento gracias al mayor conocimiento y descubrimientos, mediante avances en técnicas que han permitido relacionarlos como partícipes indispensables de casos en los que no se había encontrado el origen. Estos genes son los correspondientes a la vía de reparación homóloga o a la vía de la anemia de Fanconi, que actúan junto a **BRCA1 y 2**, y son **BRIP1, BARD1, PALB2 y RAD51C y D**. Esta vía se encarga de corregir las roturas de doble cadena en el ADN provocadas por diferentes agentes dañinos (16).

4. Técnicas de detección de variantes genéticas.

Para analizar la presencia de variantes de los genes mencionados en pacientes o sujetos susceptibles a cáncer, con el fin de determinar la heredabilidad del cáncer, se emplean las técnicas de **secuenciación de ADN**, desde la secuenciación clásica de Sanger hasta las más punteras de Next Generation Sequencing (NGS).

La secuenciación de ADN se estandarizó con la técnica de Frederick **Sanger** en 1977, siendo durante 30 años la herramienta estrella. Consiste en una secuenciación por síntesis en la que, partiendo de una secuencia complementaria a la objetivo, se añaden mediante la ADN polimerasa dNTPs (2'-desoxinucleótidos), que continúan la cadena de manera normal, y ddNTPs (2',3'-didesoxinucleótidos) que detienen la síntesis y, además, están marcados con un fluorocromo distintivo según el nucleótido que corresponda. De esta manera, se obtienen numerosas secuencias de tamaño aleatorio con el último nucleótido marcado, estos fragmentos se separan mediante electroforesis capilar y pasan por un láser, que excita el fluorescente que se detecta mediante una cámara, registrando la secuencia completa. Sin embargo, la técnica resulta muy costosa tanto económicamente como en cantidad de tiempo empleado, además tiene un límite bajo (<1000 pares de bases) de longitud de fragmentos que puede leer. (17-19)

Tras su aparición en el mercado, sobre 2006, y el aumento de su popularidad hacia 2016, las técnicas de **secuenciación masiva o NGS** reemplazaron al método Sanger, por su mayor velocidad, rentabilidad y calidad y cantidad de datos generados y analizados. Estas técnicas son capaces de realizar la secuenciación de hasta millones de fragmentos simultáneamente en una reacción única. Existen varias tecnologías de secuenciación masiva, que siguen unos pasos comunes (preparación de las librerías, etiquetado de los fragmentos, amplificación y secuenciación de los mismos) los cuales llevan a cabo de maneras diferentes, entre las que destacamos las plataformas de Nanopore, Illumina e Ion Torrent (20-22). Sin embargo, la herramienta de Sanger sigue siendo ampliamente utilizada hoy en día para **verificar** las variantes y **confirmar** resultados confusos de las tecnologías de secuenciación masiva (19,23).

Por otro lado, cuando la variante génica consiste en un **variación del número de copias** o CNV (*Copy Number Variation*), la forma de verificar la mutación es el análisis **MLPA** (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). Esta técnica se basa en el uso de **sondas** específicas que hibridan a regiones diana del ADN de interés y, tras una reacción de ligadura dependiente de la secuencia, se amplifican mediante **PCR** multiplex. La cantidad de producto amplificado se analiza mediante **electroforesis** capilar, permitiendo cuantificar diferencias en el número de copias de los fragmentos

amplificados en comparación con una muestra de referencia. MLPA es una técnica sensible y eficaz para detectar **deleciones**, **duplicaciones** y otras **alteraciones estructurales** en genes asociados a diversas enfermedades genéticas, entre ellas el cáncer (24).

A raíz de esta evolución de las técnicas de análisis de secuencia genética, y de comprender la importancia de la heredabilidad de las mutaciones en el cáncer, estas herramientas constituyen un pilar en el diagnóstico precoz y detección de variantes en cáncer. Para ello, se han establecido **paneles genéticos** de acuerdo con distintos síndromes, cánceres y otras enfermedades, incluyendo los principales genes implicados en las vías patogénicas de dichas enfermedades (25). Además, las diferentes autoridades sanitarias han creado **guías** de inclusión con determinantes clínicos y de historia médica que permiten acotar los pacientes y sujetos a los que realizar este tipo de análisis, aumentando la tasa de relevancia de estos (26).

5. Clasificación de variantes

Estas mutaciones o variantes detectadas con las técnicas de secuenciación se recogen en bases de datos y se estudian para establecer una clasificación de su patogenicidad, utilizándose como guía para el diagnóstico, en este caso, de cáncer o riesgo de padecerlo.

La clasificación de variantes se realiza constatando diversas **líneas de evidencia**, siguiendo las guías publicadas por el **American College of Medical Genetics (ACMG)** y la Association for Molecular Pathology (AMP) que se basan en 28 criterios. Podemos diferenciar, en consecuencia, **cinco categorías**: Benigna/Benign (**B**), Probablemente Benigna/Likely Benign (**LB**), Significado Incierto/Uncertain Significance (**UV**), Probablemente Patogénica/Likely Pathogenic (**LP**) y Patogénica/Pathogenic (**P**), o Clases 1, 2, 3 4 y 5 respectivamente. El límite de decisión entre las variantes es estipulado y actualizado por el ACMG y la AMP, junto a la plataforma ClinGen del NIH (National Institutes of Health). Según la clasificación de la variante, las diferentes guías médicas recomiendan una actuación correspondiente, ya sea intervención, tratamiento o seguimiento (26-28). Esta información se almacena en la **base de datos ClinVar**, de libre acceso, donde se realizan consultas y actualizaciones según aparezcan nuevas evidencias sobre la naturaleza de una variante (30,31).

En resumen, existe una gran importancia en relacionar las modificaciones genéticas del ADN con una causalidad que desemboque en carcinogénesis, más aún, conociendo el riesgo de heredar estas variantes, ya que este conocimiento permitiría una mayor prevención al potenciar el diagnóstico precoz.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de investigación y análisis es, principalmente, ampliar el conocimiento sobre el **espectro mutacional de los tumores de ovario hereditario**, extendiendo la mira más allá de los genes de alta penetrancia (*BRCA1* y *2*), y asegurar una correcta clasificación de las variantes encontradas durante el análisis.

Para ello, establecemos objetivos más concretos, como son:

- Revisar casos de carcinoma epitelial no mucinoso de alto grado independientes en la historia familiar (**Criterio E** de inclusión del programa de asesoramiento genético para cáncer de mama y ovario hereditario en Castilla y León)
- Seleccionar **32 casos** entre los anteriores, excluyendo los que presentan alteraciones en los genes *BRCA1* y *2*, y realizar el análisis mediante un panel multigénico y la tecnología **NGS** de Ion Torrent, confirmando los resultados con Sanger.
- Buscar la **asociación genotípica-fenotípica** de las muestras estudiadas, buscando ampliar los datos sobre la heredabilidad de mutaciones predisponentes en cáncer hereditario de ovario.
- Revisar y asegurar una **correcta clasificación** de las variantes encontradas.

La hipótesis que planteamos, por lo tanto, con este proyecto es que las variantes en **genes reparadores de ADN** diferentes a *BRCA1* y *2* suponen una **carga relevante** de patogenicidad y presentan una **causalidad** directa con los casos estudiados.

METODOLOGÍA

1. Selección de casos: muestras, procedencia, criterios de inclusión

Este estudio se ha desarrollado a partir de muestras completamente anonimizadas, recibidas dentro del programa de prevención del Cáncer Hereditario de la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León (32).

Para el estudio genético, los pacientes deben cumplir los criterios de inclusión del programa de asesoramiento genético para cáncer de mama y ovario hereditario en Castilla y León (Tabla 1). En el período comprendido entre 2014 y 2024, se han analizado un total de 5331 muestras con sospecha de un síndrome de mama/ovario hereditario, de las cuales el 16% (853 muestras) cumplían el criterio E, definido como carcinoma epitelial no mucinoso de alto grado (ovario, trompa de Falopio o peritoneal primario).

Tabla 1. Criterios de inclusión en el Programa de Consejo Genético en Cáncer de Mama y Ovario Hereditario de la Junta de Castilla y León (32)

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

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

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

Entre estas 853 muestras, se identificaron alteraciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2* en 85 casos (10%). Del grupo restante, compuesto por 768 muestras que cumplían criterio E, pero no presentaban alteraciones en *BRCA1/2*, se seleccionaron 32 casos adicionales con criterio E y una fuerte historia familiar. A partir de estas muestras, se llevó a cabo un estudio multigénico mediante un panel de 40 genes, con el objetivo de identificar otras posibles variantes genéticas involucradas en el cáncer de ovario hereditario.

2. Extracción de ADN de sangre periférica

A partir de 200µl de sangre periférica y siguiendo el Protocolo del kit *Magna Pure 24 Total NA Isolation Kit*, se realizó la extracción de ADN genómico.

3. Protocolo de estudio:

1. Cuantificación

Utilizaremos la tecnología de cuantificación fluorimétrica de ADN de Thermo Fisher, Qubit. Empleamos el protocolo recomendado para nuestro tipo de muestras (ajuste de concentraciones, adición de fluorocromo Pico Green y calibración con estándares).

2. Preparación de Librerías y Templado

Se llevan a cabo de manera automática empleando el sistema Ion Chef de Thermo Fisher, según las instrucciones del fabricante.

Se cargan 15µl de cada muestra sobre los pocillos de las dos primeras columnas de la placa específica para el Ion Chef, utilizando para ello unas pipetas reservadas para este uso, asegurando así una mayor precisión de la técnica. A continuación, se introducen todos los componentes desechables en el Ion Chef (puntas, reactivos, pocillos...) y, por último, la placa con nuestras muestras, para que automáticamente el robot prepare las librerías, en lo que se demora 8 horas y 30 minutos. La preparación de la librería fragmenta, etiqueta y acondiciona el ADN para que el secuenciador lo procese eficientemente.

Una vez completado el paso anterior, procedemos a preparar el Plan Run, registrando los códigos de los chips y las librerías que incluiremos en cada uno. Por cada Inicialización del secuenciador, podemos llevar a cabo la lectura o secuenciación de 2 chips, con 16 muestras cada uno, un equivalente de 1000 carreras en total o 500 carreras por chip. Buscamos una concentración de 27'5µM de las muestras para incorporarlas al chip y optimizar la tarea de secuenciación. Entonces, el Ion Chef llevará a cabo un procesamiento del ADN de las muestras, en el que cada fragmento de ADN se une a beads o microesferas metálicas y se amplifican mediante PCR en emulsión. Las beads amplificadas con ADN se distribuyen en los pozos del chip de secuenciación, que contienen sensores individuales para detectar la reacción de secuenciación.

3. Secuenciación

Las muestras se secuenciaron en la plataforma Ion S5 utilizando un Ion 530® Chip, siguiendo las recomendaciones del fabricante con el objetivo de identificar mutaciones en la línea germinal. Dado que cada chip tiene una capacidad para 16 muestras, el uso de dos Chips 530 en una sola carrera de NGS permite analizar las 32 muestras.

Durante la secuenciación, los nucleótidos se incorporan al ADN de las beads. La incorporación libera iones de hidrógeno (H⁺). Los sensores del chip detectan el cambio

de pH generado y lo traducen en señales eléctricas. Estas señales se convierten en secuencias de nucleótidos mediante el software del secuenciador.

Para analizar dichas mutaciones, se utilizó el panel multigénico EasyNGS HCPanel de HoopBio (Anexo 1). Este panel abarca 40 genes relacionados con el síndrome de mama/ovario hereditario, el síndrome colorrectal hereditario y otros trastornos genéticos.

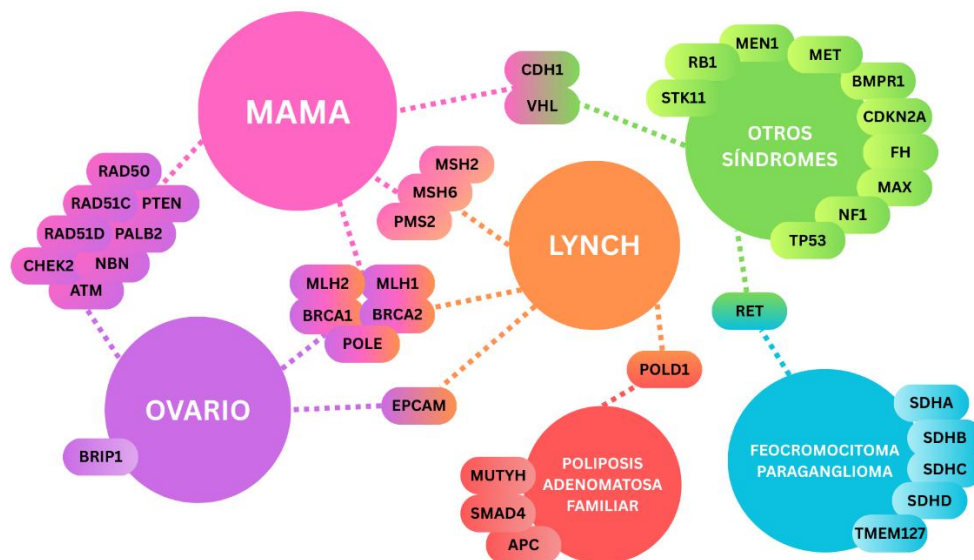


Figura 2. Relación entre los genes del EasyNGS HCPanel de HoopBio

4. Análisis de resultados.

Los resultados de la secuenciación se compararon con el genoma de referencia humano hg19 y fueron evaluados mediante el software Ion Reporter (Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente, todas las variantes genéticas identificadas fueron analizadas y clasificadas según su categoría en la base de datos ClinVar y los resultados patogénicos verificados con secuenciación Sanger o MLPA.

5. Verificación de resultados.

Las mutaciones puntuales patogénicas identificadas en las muestras se confirmaron mediante secuenciación tipo Sanger en un analizador automático ABI3130XL, utilizando un array de 16 capilares y terminadores marcados BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), en el caso de variantes puntuales.

Para la confirmación de las variaciones del número de copias (CNV), se realizó la técnica MLPA (en el mismo analizador automático ABI3130XL) y se analizó el resultado con el software Coffalyser.

Los estudios de segregación en familiares se realizaron mediante una de las dos técnicas, dependiendo del tipo de mutación detectada.

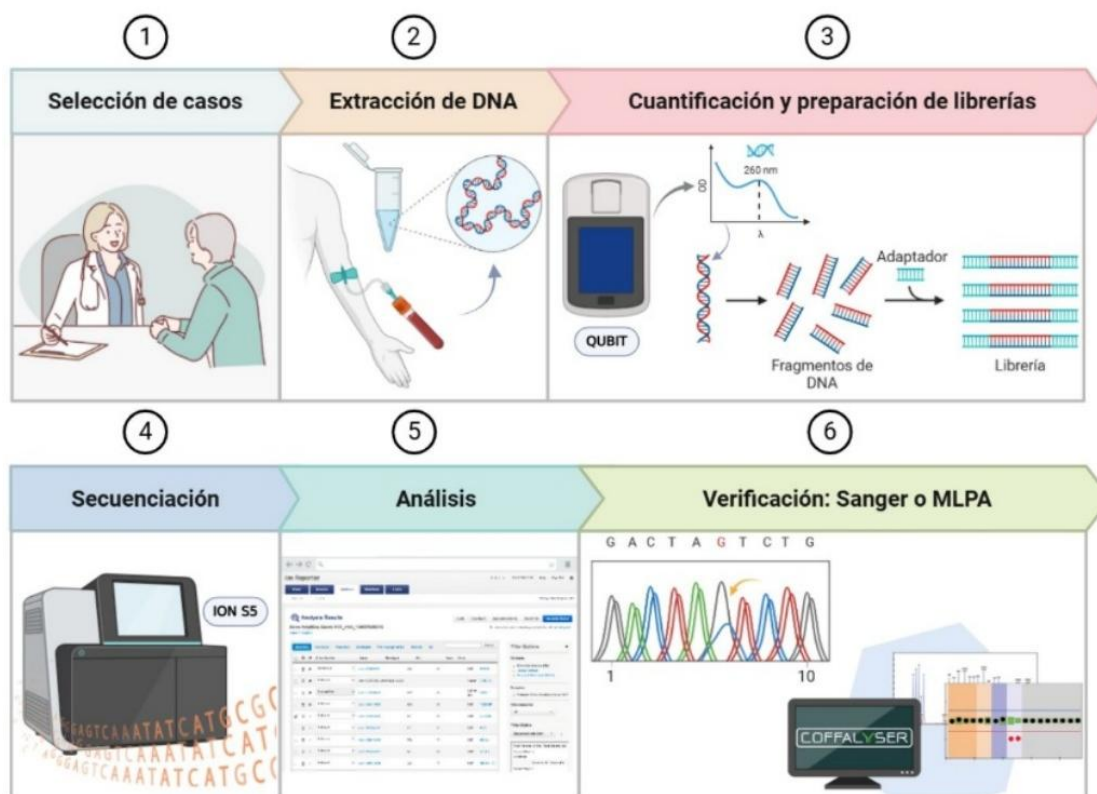


Figura 3. Flujo de trabajo. Elaboración propia. Creado con Biorender.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la secuenciación, mediante panel multigénico y NGS, de las 32 muestras seleccionadas, y confirmación mediante Sanger o MLPA, los resultados obtenidos son los que se muestran en las TABLAS: 3 casos presentaron variantes patogénicas en genes diferentes a *BRCA1/BRCA2*; y otros 3 casos presentaron variantes de significado incierto o UV, según la base de datos ClinVar. Además de numerosas variantes de tipo polimórfico, sin relevancia clínica, que no se muestran en esta memoria.

Alteraciones encontradas

De las 32 muestras elegidas (*BRCA* negativas), 3 resultaron positivas para otros genes diferentes de *BRCA1* y *BRCA2*:

Tabla 3. Características de las muestras patogénicas encontradas. **CI:** Criterio de Inclusión, **E:** Carcinoma epitelial no mucinoso de alto grado, **EA:** Edad de aparición del tumor; **ClinVar ID:** número de identificación en la base de datos ClinVar; **LP:** Probablemente Patogénica (Likely Pathogenic); **P:** Patogénica (Pathogenic)

Caso	CR	EA	Gen	Función	Exón	Proteína	cDNA	ClinVar ID	Clasificación
4465	E	43	PALB2	CNV	11		c.3114-?_3201+?dup	216008	LP
6967	E	49	RAD51C	Nonsense	5	p.Arg237X	c.709C>T	186364	P
7152	E	45	BRIP1	Frameshift	12	p.Asn568TrpfsX9	c.1702_1703delAA	221621	P

Como se muestra en la tabla, se ha detectado una variante de tipo CNV en el gen *PALB2*; una variante de tipo nonsense, truncante de la proteína, en el gen *RAD51C*; y una variante de tipo frameshift, también truncante de la proteína, en el gen *BRIP1*. Todas estas variantes aparecen descritas en la base de datos ClinVar como patogénicas o probablemente patogénica.

Además de estos casos patogénicos confirmados, encontramos también 3 muestras con variantes de significado incierto en diferentes genes:

Tabla 4. Características de las muestras de significado incierto encontradas. **CI:** Criterio de Inclusión, **E:** Carcinoma epitelial no mucinoso de alto grado, **EA:** Edad de aparición del tumor; **ClinVar ID:** número de identificación en la base de datos ClinVar; **UV:** Variante de Significado Incierto (Uncertain Significance Variant)

Caso	CR	EA	Gen	Función	Exón	Proteína	cDNA	ClinVar ID	Clasificación
6940	E	65	POLE	Missense	23	p.Ser871Thr	c.26126G>C	405751	UV
6734	E	53	RAD51D	Missense	4	p.Asp90Gly	c.269A>G	1098879	UV
7519	E	-	BRIP1	Missense	15	p.Gln740His	c.2220G>T	133752	UV

Las tres variantes detectadas, clasificadas como de significado incierto o UV, son de tipo missense o cambio de aminoácido. Sería necesario realizar estudios de segregación familiar, frecuencia en población control, estudios en modelo animal y análisis *in silico*; para intentar reclasificarlas a Clase 4-5 o Clase 2-1. Para ello, las muestras se reclasifican aplicando los criterios ACMG, dándolas una puntuación de patogenicidad-

benignidad de forma manual. Dichos criterios, junto a sus descripciones e indicaciones, se recogen en el Anexo 3.

A continuación, se muestran los árboles familiares correspondientes a los tres casos con variante patogénica para intentar establecer una relación genotipo-fenotipo en estas familias.

Casos patogénicos

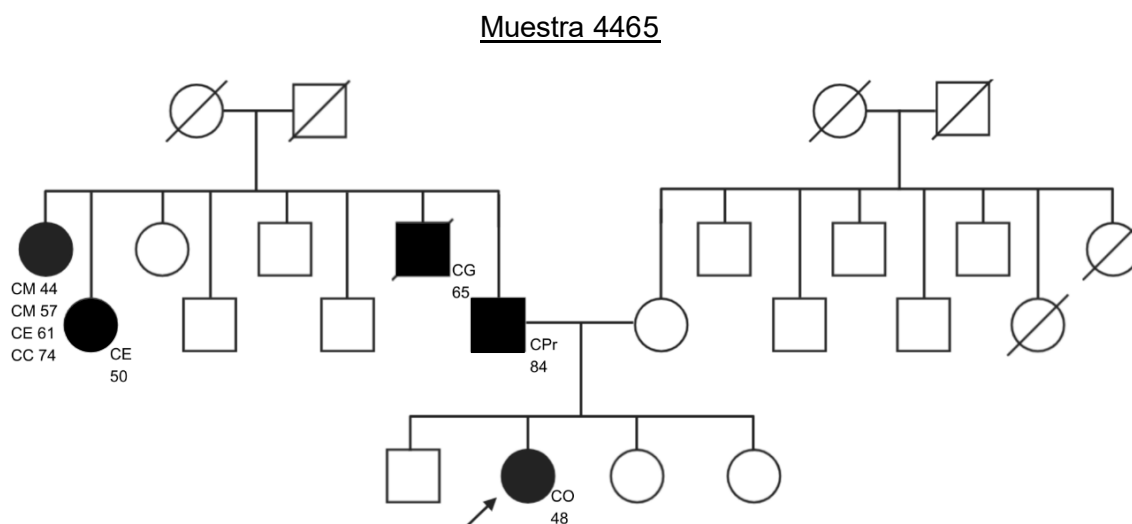


Figura 3. Árbol familiar de la muestra 4465. Se especifica el tipo de tumor y la edad en el momento del diagnóstico. La fecha indica el caso índice. **CO**: Cáncer de ovario, **CPr**: Cáncer de próstata, **CG**: Cáncer gástrico, **CE**: Cáncer de endometrio, **CM**: Cáncer de mama, **CC**: Cáncer colorrectal.

El caso índice corresponde a una mujer diagnosticada de cistoadenocarcinoma seroso papilar de ovario, y, tras el estudio genético, se encontró una mutación en el gen **PALB2**.

Dentro de la historia familiar realizada, se encuentra un antecedente llamativo en una de las tías paternas, que fue diagnosticada de cáncer de mama a los 44 y 57 años, de cáncer de endometrio a los 61 años y cáncer colorrectal a los 74 años. Además, otra de las tías paternas presenta un diagnóstico de cáncer de endometrio a los 50 años.

A raíz de los resultados del análisis se realizó la búsqueda de la mutación encontrada en el caso índice en la hermana de la paciente, cuya muestra se ha anonimizado bajo el código de muestra 5507. La muestra resultó portadora de la mutación

Esta mutación se encuentra en el **exón 11** del gen **PALB2**, de tipo **CNV**, descrita en ClinVar como la variante **c.3114-?_3201+?dup**. Consiste, por tanto, en una duplicación del exón 11 del gen **PALB2**. Esta variante aparece descrita en la base de datos como patogénica, con el número de identificación 17693.

El gen **PALB2** (*Partner and Localizer of BRCA2*) codifica una proteína clave para la reparación del ADN mediante recombinación homóloga. Su función principal es

estabilizar y facilitar la interacción de *BRCA2* con el ADN dañado, permitiendo la reparación eficiente de roturas de doble cadena.

Las mutaciones en el gen *PALB2* se han asociado con un aumento del riesgo de cáncer de mama y, en menor medida, de ovario. Aunque su impacto es menor que el de las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, se ha demostrado que las alteraciones patogénicas en *PALB2* pueden comprometer la reparación por **recombinación homóloga** del ADN, favoreciendo la **inestabilidad genética** y la carcinogénesis. En el contexto del cáncer hereditario de ovario, estas mutaciones representan un factor de predisposición menos frecuente, pero relevante, ya que las pacientes afectadas pueden presentar un **perfil clínico similar** al de aquellas con mutaciones en *BRCA*, con tumores **más agresivos** y de difícil tratamiento. Por ello, la identificación de mutaciones en *PALB2* es fundamental para definir estrategias de vigilancia y prevención en personas con antecedentes familiares de cáncer hereditario. (33–35)

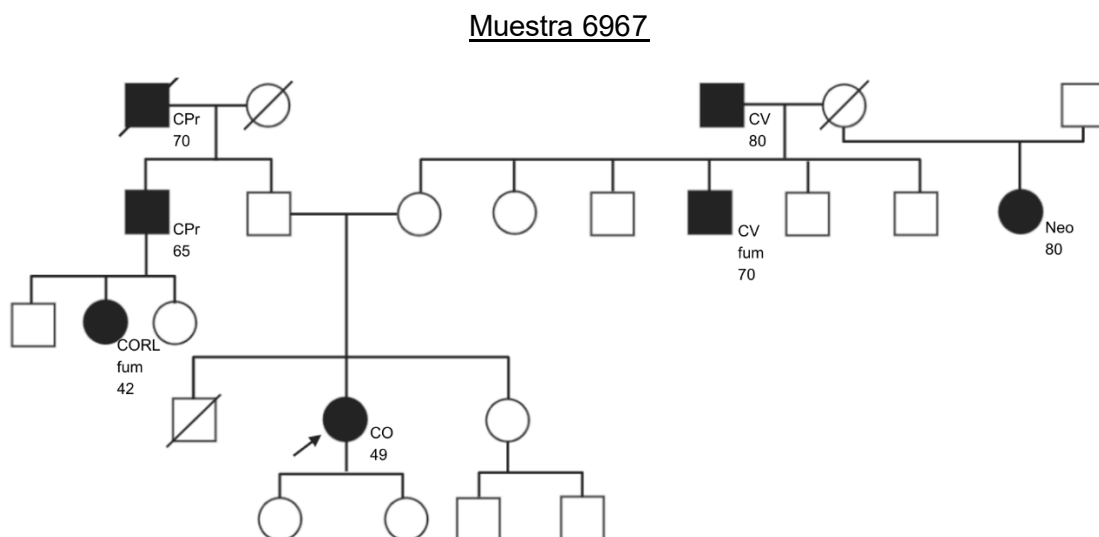


Figura 4. Árbol familiar de la muestra 4465. Se especifica el tipo de tumor y la edad en el momento del diagnóstico. La fecha indica el caso índice. CO: Cáncer de ovario, CPr: Cáncer de próstata, CORL: Cáncer de cabeza y cuello, Neo: Neoplasia no especificada, CV: Cáncer de vejiga, fum: fumador/a

El caso índice corresponde a una mujer diagnosticada de carcinoma seroso de ovario, y, tras el estudio genético, se encontró una mutación en el gen ***RAD51C***.

Dentro de la historia familiar realizada, se encuentran antecedentes en ambas partes de la familia, materna y paterna. Por un lado, el tío paterno sufre cáncer de próstata, diagnosticado a los 65 años, que padeció también el abuelo, diagnosticado a los 70 años, y su hija, prima paterna del caso índice, ha sido diagnosticada de cáncer de cabeza y cuello, siendo fumadora, a los 42 años. El abuelo y uno de los tíos maternos, por otro lado, están diagnosticados de cáncer de vejiga, siendo el tío fumador.

A raíz de los resultados del análisis se realizó la búsqueda de la mutación encontrada en el caso índice en su hija mayor, de 28 años, cuya muestra se ha anonimizado bajo el código de muestra 7161. La muestra resultó negativa, es decir, no es portadora de la mutación.

Esta mutación se encuentra en el **exón 5** del gen **RAD51C**, de tipo nonsense, descrita en ClinVar como la variante **c.709C>T; p.Arg237X**. Consiste, por tanto, en un truncamiento de la proteína **RAD51C**. Esta variante aparece descrita en la base de datos como patogénica, con el número de identificación 186364.

El gen **RAD51C** codifica una proteína esencial en la reparación del ADN mediante **recombinación homóloga**, un mecanismo crucial para mantener la estabilidad genómica. Mutaciones en este gen pueden comprometer esta vía de reparación, aumentando el riesgo de cáncer hereditario, especialmente de ovario y, en menor medida, de mama. Se considera un gen de **susceptibilidad moderada-alta** dentro del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (HBOC), con un papel similar a **BRCA1** y **BRCA2**, genes clave en la reparación del ADN (34,36).

Muestra 7152

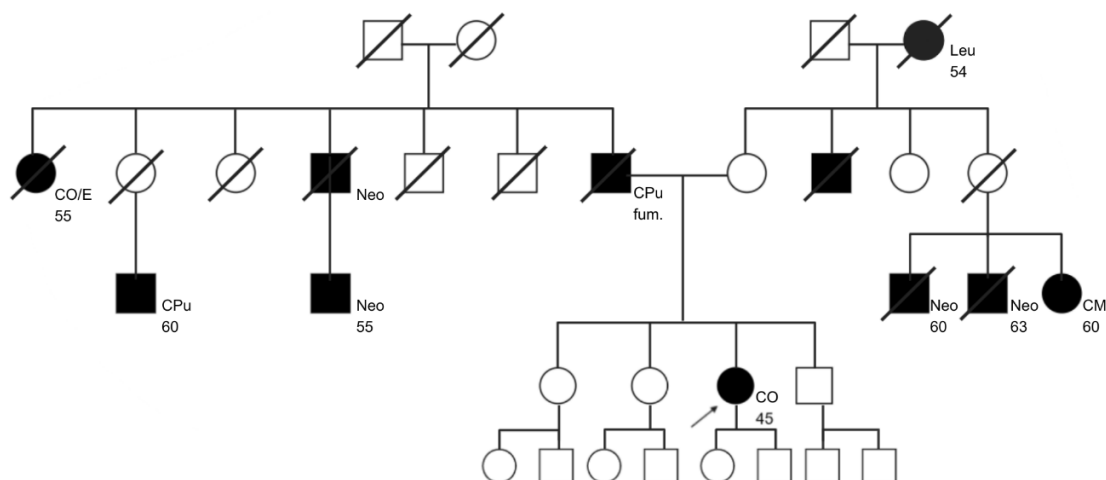


Figura 5. Árbol familiar de la muestra 4465. Se especifica el tipo de tumor y la edad en el momento del diagnóstico. La fecha indica el caso índice. **CO**: Cáncer de ovario, **CPu**: Cáncer de pulmón, **CO/E**: Cáncer de ovario o endometrio, **CM**: Cáncer de mama, **Neo**: Neoplasia no especificada, **Leu**: Leucemia, **fum**: fumador/a

El caso índice corresponde a una mujer diagnosticada de carcinoma de ovario, y, tras el estudio genético, se encontró una mutación en el gen **BRIP1**.

Dentro de la historia familiar realizada, se encuentran antecedentes en ambas partes de la familia, materna y paterna. Por un lado, el padre padeció cáncer de pulmón, uno de los tíos paternos y su hijo padecieron una neoplasia no especificada, y una de las tías paternas sufrió un cáncer de ovario o endometrio, diagnosticado a los 55 años. Por

último, un primo materno padece cáncer de pulmón diagnosticado a los 60 años. Los primos paternos tuvieron diagnóstico de neoplasia no especificada a los 60 y 63, y la prima un diagnóstico de cáncer de mama, diagnosticado a los 60 años. Además, la abuela paterna padeció leucemia diagnosticada a los 54 años.

A raíz de los resultados del análisis se realizó la búsqueda de la mutación encontrada en el caso índice sobre una de sus hermanas, de 54 años, cuya muestra se ha anonimizado bajo el código de muestra 7896. La muestra resultó positiva para la mutación.

Esta mutación se encuentra en el **exón 12** del gen **BRIP1**, de tipo frameshift, descrita en ClinVar como la variante **c.1702_1703delAA; p.Asn568TrpfsX9**. Esta variante aparece descrita en la base de datos como patogénica, con el número de identificación 221621.

El gen *BRIP1* (*BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1*) codifica para una helicasa que participa en la reparación del ADN mediante **recombinación homóloga**, interactuando con *BRCA1*. Su función es crucial para mantener la **estabilidad** del genoma y prevenir mutaciones que puedan llevar al desarrollo de cáncer (36).

En el contexto del cáncer hereditario de ovario, se han identificado mutaciones en *BRIP1* asociadas a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. Estas mutaciones suelen ser **truncantes** (pérdida de función), lo que impide la correcta reparación del ADN y favorece la acumulación de mutaciones, aumentando el riesgo de transformación maligna. Aunque *BRIP1* no tiene un impacto tan alto como *BRCA1* o *BRCA2* en términos de riesgo absoluto, se considera un gen de **susceptibilidad de moderado** riesgo para el cáncer de ovario hereditario.

Reclasificación de variantes de significado incierto

Muestra 6940

Paciente con cáncer de ovario epitelial no mucilaginoso de alto grado diagnosticado a los 65 años. Al repasar la historia familiar, observamos que la madre sufrió una lesión uterina benigna a los 65 años, la tía paterna presenta un diagnóstico de posible neoplasia de mama a los 84 años y sus tíos paternos un diagnóstico de neoplasia no especificada a los 85 años y un carcinoma de pulmón siendo fumador a los 92, respectivamente, además, la sobrina del paciente presenta un cáncer de mama diagnosticado a los 46 años.

Tras el análisis genético, se localizó una mutación de tipo **missense** en el **exón 23** del gen **POLE**, descrita en ClinVar como la variante **c.2612G>C; p.Ser871Thr**, bajo el código 405751.

El gen **POLE** (Polymerase Epsilon, Catalytic Subunit) codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa épsilon, una enzima esencial para la **replicación** del ADN y la **reparación** de errores de **emparejamiento** durante la división celular. Su correcto funcionamiento es clave para mantener la fidelidad del ADN y evitar mutaciones que puedan derivar en cáncer. (37)

Las mutaciones en **POLE**, particularmente en su dominio **exonucleasa**, se han relacionado con un subtipo de tumores **hipermutados**, caracterizados por una alta carga mutacional. Se ha identificado su papel en cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (síndrome de Lynch-like), así como en otros tipos de cáncer, incluyendo endometrial y de ovario. La detección de mutaciones en **POLE** puede tener implicaciones pronósticas y terapéuticas, ya que estos tumores suelen responder de manera diferente a la inmunoterapia. (37)

La ausencia de anotaciones de frecuencia de ninguna de las bases de datos poblacionales sobre la variable descrita nos lleva a establecer una calificación “supporting” del criterio **PM2**. En cambio, tras consultar en bases de datos las variantes patogénicas del gen **POLE**, damos una calificación “supporting” al criterio **BP1**, ya que las variantes patogénicas previamente descritas en las bases corresponden en su mayoría al tipo truncante (458/478, 95,8%), frente a las patogénicas del tipo missense (20/478, 4,2%), inclinando la balanza hacia la benignidad de la variable. Por último, tras la consulta de herramientas de predicción in silico, determinamos que en más del 50% de los casos, estas herramientas predicen un efecto benigno, por lo que establecemos

una calificación “moderate” al criterio **BP4**. El cómputo final de los criterios nos lleva a establecer que la variable tiene un carácter **probablemente benigno** (*likely benign*).

Muestra 6734

Paciente con cáncer de ovario epitelial no mucilaginoso de alto grado, sin antecedentes familiares conocidos.

Tras el análisis genético, se localizó una mutación de tipo missense en el **exón 4** del gen ***RAD51D***, descrita en ClinVar como la variante **c.269A>G; p.Asp90Gly**, bajo el código 1098879.

El gen *RAD51D* también participa en la **recombinación homóloga** del ADN y es un miembro fundamental del grupo de reparación junto con RAD51C y otras proteínas asociadas a BRCA1/BRCA2. Su función es esencial en la prevención de la acumulación de mutaciones que pueden llevar a la carcinogénesis. (36)

Las mutaciones en *RAD51D* se han asociado con un mayor riesgo de cáncer de ovario hereditario. Estudios han demostrado que mujeres con variantes patogénicas en este gen tienen una probabilidad significativamente elevada de desarrollar cáncer ovárico epitelial. (34,36)

La ausencia de anotaciones de frecuencia de ninguna de las bases de datos poblacionales sobre la variable descrita nos lleva a establecer una calificación “supporting” del criterio **PM2**. Además, tras la consulta de herramientas de predicción in silico, determinamos que en más del 80% de los casos, estas herramientas predicen un efecto patogénico, por lo que establecemos una calificación “strong” al criterio **PP3**. Finalmente, y en contraposición a lo anterior, tras consultar en bases de datos las variantes patogénicas del gen *RAD51D*, damos una calificación “supporting” al criterio **BP1**, ya que 26 de las 28 UV descritas en el gen, han sido definidas como benignas. La conclusión no es clara en el caso de esta variante, ya que no podemos confirmar la patogenicidad de la misma, pero sería imprudente calificarla como benigna, por lo que mantendremos la clasificación de variante de **significado incierto** (UV).

Muestra 7519

Paciente con cáncer de ovario epitelial no mucilaginoso de alto grado. Revisando la historia familiar encontramos que el padre padeció leucemia y la madre un tumor digestivo, la hermana presenta un carcinoma seroso de alto grado, con déficit de recombinación homóloga y pérdida de *PMS2*.

Tras el análisis genético, se localizó una mutación de tipo missense en el **exón 15** del gen **BRIP1**, descrita en ClinVar como la variante **c.2220G>T; p.Gln740His**, bajo el código 133752.

La ausencia de anotaciones de frecuencia de ninguna de las bases de datos poblacionales sobre la variable descrita nos lleva a establecer una calificación “supporting” del criterio **PM2**. En cambio, tras consultar en bases de datos las variantes patogénicas del gen **BRIP1**, damos una calificación “supporting” al criterio **BP1**, ya que el 65’5% de las variantes tipo missense del gen que no se clasifican como UV, se han clasificado como benignas, aumentando los indicios de benignidad de esta variable. Además, tras la consulta de herramientas de predicción in silico, determinamos que en más del 80% de los casos, estas herramientas predicen un efecto benigno, por lo que establecemos una calificación “strong” al criterio **BP4**. Por último, se ha encontrado un estudio funcional en la literatura que apoya la benignidad de la variante, otorgando una puntuación “supporting” al criterio **BS3** (38). El cómputo final de los criterios nos lleva a establecer que la variable se comporta con un carácter **benigno** (*benign*).

CONCLUSIONES

Este estudio ha permitido ampliar el conocimiento sobre el **espectro mutacional** del cáncer de ovario hereditario, evidenciando la relevancia de genes reparadores del ADN más allá de *BRCA1/2* en la predisposición a esta enfermedad.

1. El uso de **paneles multigénicos** y la **secuenciación masiva** (NGS) ha posibilitado la identificación de **nuevos genes** implicados en el desarrollo del cáncer de ovario hereditario, como *PALB2*, *RAD51C* y *BRIP1*.
2. La identificación de nuevas mutaciones en genes distintos a *BRCA1/2* ofrece oportunidades valiosas para el **asesoramiento genético y la estratificación** del riesgo, con un impacto potencial en la detección precoz y en la toma de decisiones terapéuticas personalizadas.
3. La detección de **variantes de significado incierto** (UV) plantea importantes **desafíos** en la interpretación de su implicación clínica, lo que refuerza la necesidad de llevar a cabo **estudios funcionales** y el **seguimiento** clínico de pacientes portadores.
4. Una **caracterización genética** exhaustiva permite identificar nuevos **biomarcadores** que pueden contribuir a **mejorar** el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento del cáncer de ovario hereditario, optimizando así su **manejo clínico**.
5. Los resultados obtenidos, a partir de una **muestra limitada**, ponen de manifiesto la necesidad de seguir avanzando en la investigación mediante estudios con **cohortes más amplias** y la realización de **ensayos funcionales** complementarios, con el objetivo de validar la aplicabilidad clínica de los hallazgos y optimizar la interpretación de las variantes genéticas identificadas.

CONCLUSSIONS

This study has allowed us to broaden our knowledge of the mutational spectrum of hereditary ovarian cancer, demonstrating the relevance of DNA repair genes beyond BRCA1/2 in the predisposition to this disease.

- 1. The use of **multigene panels and massive sequencing** (NGS) has made it possible to identify **new genes** involved in the development of hereditary ovarian cancer, such as PALB2, RAD51C and BRIP1.*
- 2. The identification of new mutations in genes other than BRCA1/2 offers valuable opportunities **for genetic counseling and risk stratification**, with a potential impact on early detection and personalized therapeutic decision-making.*
- 3. The detection of **variants of uncertain significance** (UV) poses significant **challenges** in the interpretation of their clinical implication, reinforcing the need **for functional studies and clinical follow-up** of carrier patients.*
- 4. A comprehensive **genetic characterization** allows the identification of new **biomarkers** that may contribute to **improve** the diagnosis, prognosis and treatment of hereditary ovarian cancer, thus optimizing its **clinical management**.*
- 5. The results obtained, from a **limited sample**, highlight the need for further progress in research through studies with **larger cohorts** and the performance of complementary **functional assays**, with the aim of validating the clinical applicability of the findings and optimizing the interpretation of the genetic variants identified.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Ashouri A, Zhang C, Gaiti F. Decoding Cancer Evolution: Integrating Genetic and Non-Genetic Insights. *Genes*. 24 de septiembre de 2023;14(10):1856.
2. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*. 13 de marzo de 2023;41(3):374-403.
3. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaos A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, et al. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res*. noviembre de 2020;40(11):6009-15.
4. MSD Manual Professional Edition [Internet]. [citado 30 de enero de 2025]. Cellular and Molecular Basis of Cancer - Hematology and Oncology. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/overview-of-cancer/cellular-and-molecular-basis-of-cancer>
5. Shlyakhtina Y, Moran KL, Portal MM. Genetic and Non-Genetic Mechanisms Underlying Cancer Evolution. *Cancers*. 18 de marzo de 2021;13(6):1380.
6. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. noviembre de 2001;1(2):157-62.
7. Toh M, Ngeow J. Homologous Recombination Deficiency: Cancer Predispositions and Treatment Implications. *The Oncologist*. septiembre de 2021;26(9):e1526-37.
8. Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory [Internet]. [citado 3 de febrero de 2025]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
9. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. enero de 2016;25(1):16-27.
10. MSD Manual Professional Edition [Internet]. [citado 30 de enero de 2025]. Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Cancer - Gynecology and Obstetrics. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/professional/gynecology-and-obstetrics/gynecologic-tumors/ovarian-fallopian-tube-and-peritoneal-cancer>
11. Cabaasag CJ, Fagan PJ, Ferlay J, Vignat J, Laversanne M, Liu L, et al. Ovarian cancer today and tomorrow: A global assessment by world region and Human Development Index using GLOBOCAN 2020. *Int J Cancer*. 2022;151(9):1535-41.
12. Huber-Keener KJ. Cancer genetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. junio de 2022;82:3-11.
13. MSD Manual Professional Edition [Internet]. [citado 3 de febrero de 2025]. Overview of Cancer - Hematology and Oncology. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/overview-of-cancer/overview-of-cancer>
14. Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci Landmark Ed*. 1 de enero de 2014;19(4):605-18.
15. Xie C, Luo J, He Y, Jiang L, Zhong L, Shi Y. BRCA2 gene mutation in cancer. *Medicine (Baltimore)*. 11 de noviembre de 2022;101(45):e31705.
16. Samuel D, Diaz-Barbe A, Pinto A, Schlumbrecht M, George S. Hereditary Ovarian Carcinoma: Cancer Pathogenesis Looking beyond BRCA1 and BRCA2. *Cells*. 4 de febrero de 2022;11(3):539.
17. Schmid K, Dohmen H, Ritschel N, Selignow C, Zohner J, Sehring J, et al. SangerR: the high-throughput Sanger sequencing analysis pipeline. *Bioinforma Adv*. 2022;2(1):vbac009.
18. Kopernik A, Sayganova M, Zobkova G, Doroschuk N, Smirnova A, Molodtsova-Zolotukhina D, et al. Sanger validation of WGS variants. *Sci Rep*. 29 de enero de 2025;15(1):3621.
19. Baudhuin LM, Lagerstedt SA, Klee EW, Fadra N, Oglesbee D, Ferber MJ. Confirming Variants in Next-Generation Sequencing Panel Testing by Sanger Sequencing. *J Mol Diagn JMD*. julio de 2015;17(4):456-61.
20. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. diciembre de 2013;98(6):236-8.
21. Georget M, Pisan E. [Next Generation Sequencing (NGS) for beginners]. *Rev Mal Respir*. abril de 2023;40(4):345-58.
22. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann Lab Med*. enero de 2021;41(1):25-43.
23. Mu W, Lu HM, Chen J, Li S, Elliott AM. Sanger Confirmation Is Required to Achieve Optimal Sensitivity and Specificity in Next-Generation Sequencing Panel Testing. *J Mol Diagn JMD*. noviembre de 2016;18(6):923-32.

24. Gabrielaite M, Torp MH, Rasmussen MS, Andreu-Sánchez S, Vieira FG, Pedersen CB, et al. A Comparison of Tools for Copy-Number Variation Detection in Germline Whole Exome and Whole Genome Sequencing Data. *Cancers*. 14 de diciembre de 2021;13(24):6283.
25. Ece Solmaz A, Yeniay L, Gökmen E, Zekioğlu O, Haydaroğlu A, Bilgen I, et al. Clinical Contribution of Next-Generation Sequencing Multigene Panel Testing for BRCA Negative High-Risk Patients With Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. diciembre de 2021;21(6):e647-53.
26. 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 Off J Am Coll Med Genet*. mayo de 2015;17(5):405-24.
27. Biesecker LG, Harrison SM, ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group. The ACMG/AMP reputable source criteria for the interpretation of sequence variants. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. diciembre de 2018;20(12):1687-8.
28. Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho YY, et al. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG–AMP variant classification criteria. *Genet Med*. 1 de octubre de 2017;19(10):1105-17.
29. Horak P, Griffith M, Danos AM, Pitel BA, Madhavan S, Liu X, et al. Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). *Genet Med*. 1 de mayo de 2022;24(5):986-98.
30. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 4 de enero de 2018;46(D1):D1062-7.
31. Walsh N, Cooper A, Dockery A, O'Byrne JJ. Variant reclassification and clinical implications. *J Med Genet*. 1 de marzo de 2024;61(3):207-11.
32. Portal de Salud de la Junta de Castilla y León [Internet]. [citado 30 de enero de 2025]. Consejo Genético en Cáncer Hereditario. Disponible en: <https://www.saludcastillayleon.es/es/salud-estilos-vida/prevencion-cancer/consejo-genetico-cancer-hereditario>
33. Nepomuceno TC, Carvalho MA, Rodrigue A, Simard J, Masson JY, Monteiro ANA. PALB2 Variants: Protein Domains and Cancer Susceptibility. *Trends Cancer*. marzo de 2021;7(3):188-97.
34. Foo TK, Xia B. BRCA1-Dependent and Independent Recruitment of PALB2-BRCA2-RAD51 in the DNA Damage Response and Cancer. *Cancer Res*. 16 de septiembre de 2022;82(18):3191-7.
35. Yang X, Leslie G, Doroszk A, Schneider S, Allen J, Decker B, et al. Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de marzo de 2020;38(7):674-85.
36. Boni J, Idani A, Roca C, Feliubadaló L, Tomiak E, Weber E, et al. A decade of RAD51C and RAD51D germline variants in cancer. *Hum Mutat*. marzo de 2022;43(3):285-98.
37. Ma X, Dong L, Liu X, Ou K, Yang L. POLE/POLD1 mutation and tumor immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2 de julio de 2022;41(1):216.
38. 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*. 15 de febrero de 2020;80(4):857-67.
39. Astete Frugoni JA. Desarrollo de una herramienta web para la clasificación de variantes genéticas. 20 de diciembre de 2021 [citado 1 de abril de 2025]; Disponible en: <https://openaccess.uoc.edu/handle/10609/138846>

ANEXOS

Anexo 1. EasyNGS HCPanel de HoopBio

Panel multigénico EasyNGS HCPanel de HoopBio, 40 genes

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

Anexo 2. Resultados y Análisis

- Ejemplo de resultado del análisis en el software de Ion Reporter de la **muestra 7152**

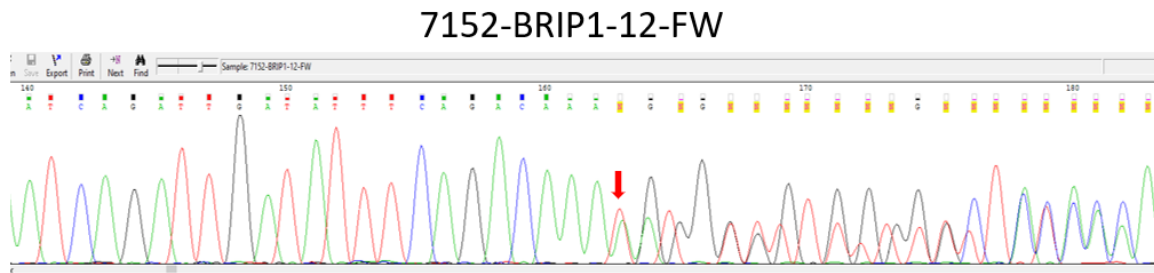
ionreporter.thermofisher.com/ir/secure/analyses/8a800da19596d36b0195a95c0a7f6ba4/edit_variants

Variant Details: chr17:59858291

Variant Details	Notes
Annotation Sou...	7152_v1
Allele Coverage	ATT=421, A=378
Allele Frequency %	47.31
Allele Ratio	ATT=0.5269, A=0.4731
Amino Acid Change	p.Asn568TrpfsTer9
ClinVar	Pathogenic/Likely pathogenic
Coding	c.1702_1703delAA
Codon	TGG
Coverage	799
Exon	12
Filter	PASS
Gene Ontology	4 iron, 4 sulfur cluster binding ...(30)
Genes	BRIP1
Ref+/Ref-/Var+/Var-	ATT=196/225, A=192/186

- Cromatogramas de mutaciones patogénicas por secuenciación Sanger
 - **Muestra 7152**

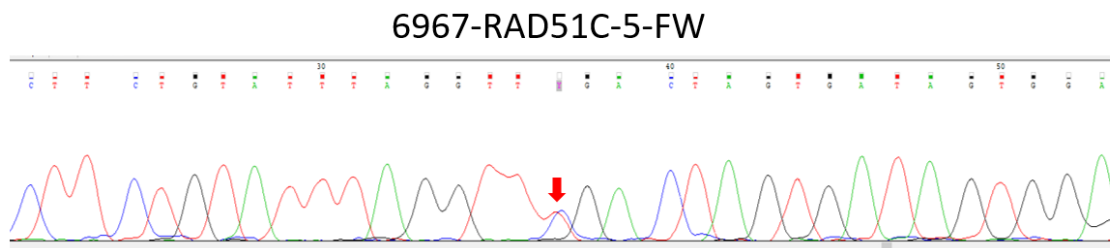
Cromatograma por secuenciación Sanger de la mutación de tipo frameshift en el gen *BRIP1*, p.Asn568TrpfsX9 (c.1702_1703delAA).



c.1702_1703delAA
p.Asn568TrpfsTer9
ClinVar221621

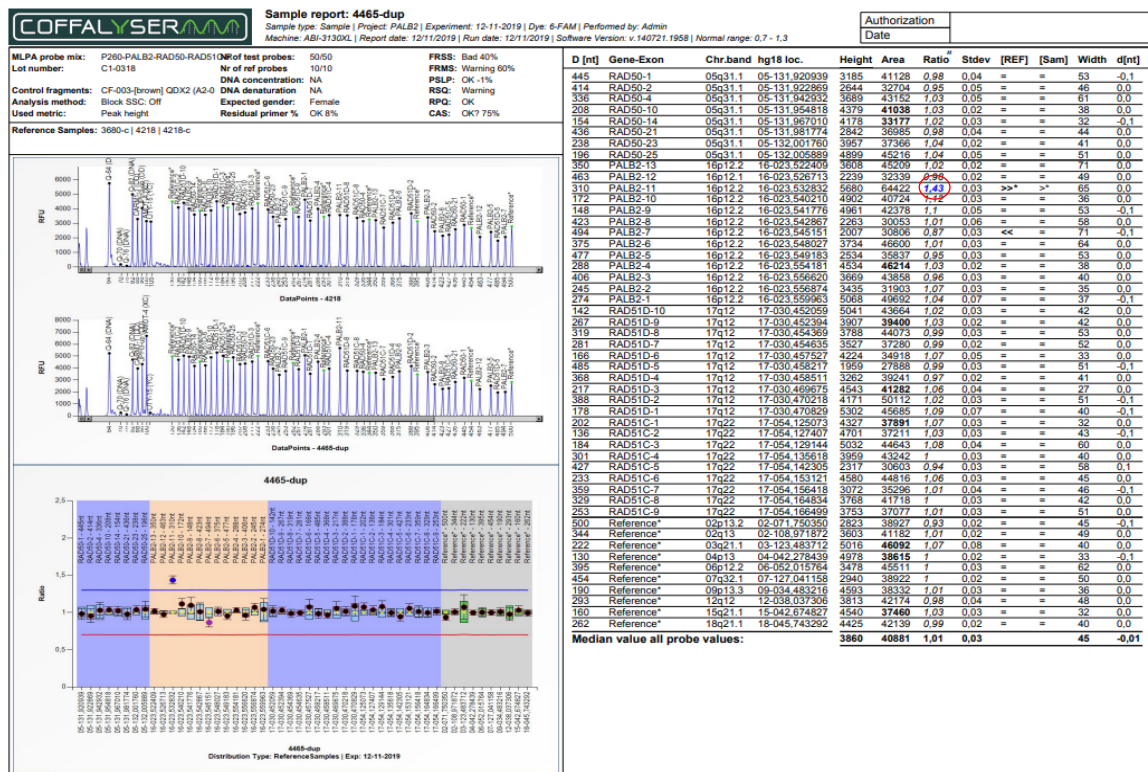
- **Muestra 6097**

Cromatograma por secuenciación Sanger de la mutación de tipo nonsense en el gen *RAD51C*, p.Arg237X (c.709C>T).



c.709C>T
p.Arg237X
ClinVar186364

• Resultado del análisis del MLPA con el software Coffalyser de la muestra 4465



Anexo 3. Criterios de clasificación manuales de la ACMG

(Adaptado de Astete Frugoni, Joaquín Américo. "Desarrollo de una herramienta web para la clasificación de variantes genéticas." (2021))(39)

BA1: Allele frequency is above 5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes, or ExAC

Si la variante tiene anotaciones de la frecuencia alélica de alguna de las siguientes bases de datos poblacionales: Exome Sequencing Project, GnomAD, 1000 Genomes. Si la frecuencia alélica es mayor a 0.05, se le asigna el criterio BA1.

PVS1: Null variant in a gene where loss of function (LOF) is a known mechanism of disease.

Para evaluar este criterio se ha utilizado el listado de genes creado por InterVar, en el que figuran genes en los que se encontraron variantes patogénicas que llevan a la pérdida de función (LOF). Lo han creado filtrando listado de genes de ClinVar que tuvieran por lo menos una variante LOF que haya sido clasificada como Patogénica, obtuvieron un total de 1,988, a los que agregaron el listado de genes susceptible de LOF propuesto por GnomAD, la lista final comprende un total de 3800 genes.

El script verifica si el gen en el que se encuentra la variante se encuentra en el listado de genes susceptibles de LOF. Si el gen se encuentra en dicha lista y la variante es de tipo nula: Frameshift, Canonical-splice, Stop-gain, Stop-loss, se le asigna el criterio PVS1.

PS1: Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change.

PM5: Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before

Para el cálculo de estos criterios, se ha descargado desde ClinVar el listado de variantes missense clasificadas como patogénicas, de este listado se ha utilizado el cambio de aminoácido que producen y en que gen se localizan. Con estos datos se ha generado una tabla que contiene los genes y el cambio de aminoácidos que producen estas variantes, el cambio de aminoácido se presenta en formato HGVS y se ha adaptado este formato al formato de diferentes base de datos que contienen anotaciones sobre el cambio de aminoácido en los datos de MyVariant.

Estas bases de datos son : CADD, dbNSFP y SNPEff.

Si la variante es clasificada como missense, si el gen que afecta se encuentra en el listado y produce el mismo cambio de aminoácido, se asigna el criterio PS1. Si afecta a un gen del listado, pero el cambio de aminoácido es diferente, le asigna el criterio PM5

BS1: Allele frequency is greater than expected for disorder.

La base de dato poblacional GnomAD, incluye en las últimas versiones el parámetro PopMax que representa el punto de corte de frecuencia alélica para considerar la variante como muy frecuente para causar una patología de herencia mendeliana. Esto se basa en la propuesta de Whiffin. Si existe anotación de la variante del parámetro PopMax y la frecuencia alélica de la variante es mayor que este parámetro, se asigna el criterio BS1.

En caso de que no hubiera la anotación PopMax para la variante, se utilizara un punto de corte predeterminado de 0.01, si la frecuencia alélica es mayor que este punto de corte, se asigna el criterio BS1. Este punto de corte puede ser modificado por el usuario.

PM2: Absent from controls in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes or ExAC

Si la variante no presenta anotaciones de frecuencia de ninguna de las bases de datos poblacionales, se asigna el criterio PM2.

BS2: Observed in a healthy adult individual for a recessive, dominant, or X-linked disorder with full penetrance expected at an early age.

Si el gen donde se encuentra la variante se encuentra en la lista, y la variante presenta anotaciones de GnomAD, se utilizará la propuesta de Varsome: Si la patología es de herencia autosómica dominante AD y se cuentan más de 5 personas sanas con el alelo, o es de herencia autosómica recesiva y se cuentan más de 3 personas sanas homocigotas con el alelo, o si es de herencia ligada al cromosoma X y se cuentan más de 3 personas con el alelo, asigna BS2.

PS4: The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared to the prevalence in controls.

Se ha utilizado la base de datos GWASv2, para generar un listado con variantes con un odds ratio mayor a 0.5. Si la variante se encuentra en este listado, se le asigna el criterio PS4

PM1: Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain without benign variation.

Para este criterio se ha utilizado el listado de dominios proteicos de los genes susceptibles de patogenicidad de InterVar. Si la variante es de tipo missense y la variante presenta anotación de Interpro que se encuentra en el listado mencionado anteriormente, se le asigna el criterio PM1.

PM4: Protein length changes due to in-frame deletions/insertions in a non-repeat region or stop-loss variants.

BP3: In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function

Se ha descargado la base de datos rmsk del UCSC Genome Browser que contiene información de secuencias de ADN de repetición intercaladas y de baja complejidad.

Si la variante es de tipo stop-loss, non-frameshift insertion o non-frameshift deletion, y afecta una región de repetición, se la asigna el criterio BP3. Si no afecta una región de repetición se le asigna el criterio PM4.

PP3: Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product.

BP4: Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product.

Para la evaluación de estos criterios se ha utilizado las herramientas de predicción de patogenicidad que presentan una sensibilidad y especificidad mayor del 60% según Niroula. Los predictores que he utilizado son:

- Provean
- SIFT
- FATHMM
- PolyPhen-2
- CADD
- VEST
- GERP++

Si más del 50% de los predictores de los que la variante tenga anotaciones predicen como patogénica, se le asigna el criterio de PP3. Si más del 50% de predicen la variante como benigna, se le asigna el criterio BP4.

PP2:Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and where missense variants are a common mechanism of disease.

Para este criterio se ha utilizado la tabla de GnomAD con las diferentes mediciones de restricción por missense. El script filtra los genes con un Z-Score mayor a un valor de corte, que por defecto es 3.09, pero este valor puede ser modificado por el usuario dependiendo de la patología en estudio como recomienda Harrison. Si la variante es de tipo missense y afecta un gen en el listado obtenido anteriormente, se asigna el criterio PP2.

PP2:Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease.

Se ha utilizado el listado de genes no susceptibles de variantes missense de InterVar. Si la variante es de tipo missense y afecta un gen de este listado, se asigna el criterio BP1.

PP5: Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation.

BP6:Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation.

Si la variante tiene anotaciones de ClinVar con entradas que la clasifican como patogénica y no hay conflictos en la revisión, se asigna el criterio PP5. Si tiene entradas que la clasifican como benigna y no hay conflictos en la revisión, se asigna el criterio BP6.

BP7:A synonymous variant for which splicing prediction algorithms predict no impact on the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved.

No se ha encontrado anotaciones en MyVariant que contengan datos de predicción de efecto en splicing.

PS2: De novo (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history.

PM6:Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity.

Estos criterios dependen de la confirmación de la paternidad del paciente, si es una mutación De Novo.

PS3: Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product

BS3: Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing.

Para estos criterios se necesitan de búsqueda en la literatura si hay estudios funcionales que muestren la patogenicidad/benignidad de la variante.

PM3: For recessive disorders, detected in trans with a pathogenic variant.

BP2: Observed in trans with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder; or observed in cis with a pathogenic variant in any inheritance pattern.

La patogenicidad de la variante depende si la patogenicidad conocida existe en cis o trans. El usuario deberá valorar este parámetro.

PP1: Co-segregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease.

BS4: Lack of segregation in affected members of a family

Estos criterios dependen de la historia familiar de la patología.

PP4: Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology.

El criterio depende si el fenotipo del paciente o la historia familiar de la patología puede ser explicada como un defecto genético.

BP5: Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease.

Si la patología tiene una base molecular alternativa y la variante afecta un gen relacionada con la patología, se le asignaría el criterio BP5.

Anexo 4. Póster presentado en la ESHG

E-Poster enviado a la European Human Genomics Conference de 2025.

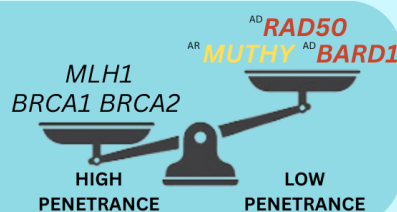
Incidence of Low-Penetrance *BARD1*, *MUTYH*, and *RAD50* Variants in Hereditary Cancer Syndromes: A Study of 1200 Samples

Mónica Arranz Ledo¹, Natalia Rojo Calvo², Enrique Lastra Aras³, Lucía Czystochowa Mateo Otero⁴, Amaya Olaverri Hernández⁴, Lara Hernández Sanz¹, Noemí Martínez Martín¹, Mar Infante Sanz¹, Mercedes Durán Domínguez¹.

¹Institute of Biomedicine and Molecular Genetics, Valladolid, Spain, ²Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM), Valladolid, Spain, ³Burgos University Hospital, Unit of Genetic Counseling in Cancer, Oncology, Burgos, Spain, ⁴Rio Hortega University Hospital, Unit of Genetic Counseling in Cancer, Oncology, Valladolid, Spain.

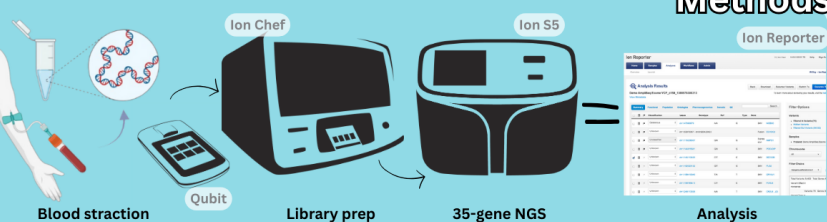
Background

- **Hereditary cancer syndromes (HCS)** arise from germline variants that increase cancer susceptibility.
- Over time, several **low penetrance genes** have been proposed to be associated with HCS, but their role in cancer predisposition remains unclear.
- This study analyzes the low-penetrance genes ***BARD1*, *MUTYH*, and *RAD50*** in our population.



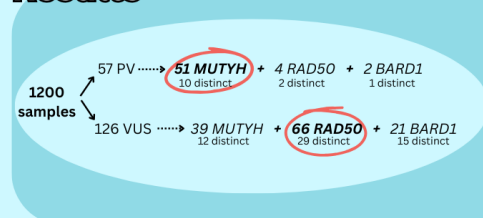
We analyzed **1,200 blood samples** from patients with suspected HCS referred from **genetic counseling centers** across the Castile and León region.

NGS was performed using a 35-gene predisposition panel. Genomic DNA was extracted from peripheral blood, and library preparation was performed using the **Ion Chef System** (ThermoFisher), followed by sequencing on the **Ion S5** platform. Variant analysis was conducted with **IonReporter Software**.



Methods

Results



- **Pathogenic variants (PV)** in at least one of the three genes were identified in **57 samples (4.75%)**: 51 in *MUTYH* (4.25%), 4 in *RAD50* (0.33%), and 2 in *BARD1* (0.16%). We detected 10 distinct PVs in *MUTYH*, 2 in *RAD50*, and 1 in *BARD1*.
- Additionally, 10.5% of samples carried at least one **Variant of Uncertain Significance (VUS)**: 39 in *MUTYH* (3.25%), 66 in *RAD50* (5.5%), and 21 in *BARD1* (1.75%), corresponding to 12 VUS in *MUTYH*, 29 in *RAD50*, and 15 in *BARD1*.

Conclusion

High prevalence of ***MUTYH* & *RAD50*** pathogenic variants and variants of uncertain significance

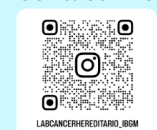
- Our study identifies **pathogenic variants and VUS** in *BARD1*, *MUTYH*, and *RAD50*, with *MUTYH* being the **most frequently altered gene**.
- The **high prevalence of *RAD50* VUS** highlights the need for further research to determine their clinical significance.
- These findings may have an impact on **genetic counseling and risk assessment** in hereditary cancer.

Funding



Thanks to the European Social Fund Plus, Operational Program of Castilla y León, and the Junta de Castilla y León, through the Consejería de Educación.

Contact Info



Anexo 5. Póster presentado en la XI IMFAHE International Conference

Póster presentado en el concurso de ponencias orales de la XI IMFAHE International Conference.

