



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**Identificación de biomarcadores asociados a cáncer  
hereditario mediante secuenciamiento de nueva  
generación en pacientes de alto riesgo**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en  
Biología Celular y Genética

**AUTOR**

Mev DOMÍNGUEZ VALENTIN

**ASESOR**

Alberto LOPEZ SOTOMAYOR

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Domínguez, M. (2022). *Identificación de biomarcadores asociados a cáncer hereditario mediante secuenciación de nueva generación en pacientes de alto riesgo*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Mev Dominguez Valentin
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40405453
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-7856-0057">https://orcid.org/0000-0001-7856-0057</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Alberto López Sotomayor
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10472260
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-6070-5836">https://orcid.org/0000-0001-6070-5836</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Mónica Paredes Anaya
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07901815
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Julio Solis Sarmiento
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09671619
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Wilser Andrés García Quispes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40480447
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	A.1.3.1. Salud Pública

Grupo de investigación	No aplica
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Instituto de Investigacion dee Canceer País: Noruega Departamento: Oslo Latitud: 59.91273 Longitud: 10.74609
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Octubre 2019 – Diciembre 2021
URL de disciplinas OCDE	Otros temas de biología <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.16">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.16</a>  Genética, Herencia <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.07</a>  Bioquímica, Biología molecular <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 14:08 horas del 26 de julio de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/uvq-nxmk-vac>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga con mención en Biología Celular y Genética** de **MEV DOMÍNGUEZ VALENTIN**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **UNMSM-20220017219**, la titulando expuso su tesis: “**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS A CÁNCER HEREDITARIO MEDIANTE SECUENCIAMIENTO DE NUEVA GENERACIÓN EN PACIENTES DE ALTO RIESGO**”, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **18**, calificativo: **Aprobado con mención honrosa**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga con mención en Biología Celular y Genética** a **MEV DOMÍNGUEZ VALENTIN** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 15:41 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 26 de julio de 2022.

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. MONICA PAREDES ANAYA**  
(PRESIDENTA)

  
\_\_\_\_\_  
**Blgo. ALBERTO LOPEZ SOTOMAYOR**  
(ASESOR)

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. WILSER GARCIA QUISPES**  
(MIEMBRO)

  
\_\_\_\_\_  
**Mg. JULIO SOLIS SARMIENTO**  
(MIEMBRO)

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi hijo Theo que me ha enseñado el verdadero significado de amor incondicional.

A Patrik por ser un esposo presente, amigo, confidente y buen compañero que hace ligera esta jornada de la vida.

A mis padres Constantino y Maxi, por el cuidado, formación y amor que me transmiten hasta el día de hoy.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas por la formación académica y científica transmitida durante mi graduación.

Al Prof. Alberto Lopez por su apoyo y orientación en el desarrollo de la presente tesis.

Al Dr. Spencer, por permitirme descubrir mi vocación como investigadora e iniciar mi vida académica.

Al Dr. Tone, por aceptarme como estudiante de Maestria y mostrarme el mundo científico y académico del sistema brasilero.

Al Dr. Benedito Mauro Rossi, mi mentor a nivel profesional y personal. Su apoyo profesional fue fundamental para el desarrollo de mi vida académica a nivel de América Latina.

Al Dr. Yves Bignon, por permitirme iniciar mi vida profesional en Europa.

A Mef Nilbert, por permitirme establecerme profesional y personalmente en Escandinava.

A Pål Møller y Eivind Hovig, por permitirme desarrollarme profesionalmente a nivel de Europa.

A mis hermanos y sobrinos por el cariño y apoyo en mi vida familiar.

A Hellen Marra, la hermana mayor que siempre quise tener.

A Susan Castillo, más que una hermana y un gran apoyo para mi.



## ÍNDICE

Introducción	<b>1</b>
Marco teórico	<b>5</b>
Objetivos	<b>8</b>
Hipótesis	<b>9</b>
Materiales y Métodos	<b>10</b>
Resultados	<b>16</b>
Discusión	<b>22</b>
Conclusiones	<b>25</b>
Recomendaciones	<b>26</b>
Referencias Bibliográficas	<b>27</b>

## RESUMEN

En el presente estudio se identificó 161 pacientes con cáncer familiar y con ausencia de variantes patogénicas en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53* o en los genes de reparación de apareamientos erróneos (*mismatch repair*, MMR). En esta cohorte, 108 casos correspondían al tipo de cáncer de mama familiar, 34 a cáncer colorrectal y 19 a cánceres múltiples de aparición temprana. Mediante el uso de un panel de 44 genes que predisponen al cáncer, se identificó 4.3 % (7/161) de variantes patogénicas o probablemente patogénicas y 54 % (87/161) de variantes de significado incierto (VUS). Las variantes patogénicas o probablemente patogénicas se identificaron mayoritariamente en individuos con cáncer de mama familiar (5/7) y se localizaron en 3 genes: *ATM* (3), *CHEK2* (1), *MSH6* (1), seguidos por individuos con cánceres múltiples de aparición temprana (2/7), afectando los genes *CHEK2* y *ATM*. El análisis in silico de las 87 VUS permitió identificar a 11 de estas como patogénicas.

Estudios funcionales son necesarios para analizar el impacto a nivel de ARN. El presente estudio describe la presencia de variantes patogénicas o probablemente patogénicas en genes que no se incluyen actualmente en el diagnóstico genético de forma rutinaria en el contexto de los fenotipos clínicos. Interesantemente, la mayoría de las variantes patogénicas a nivel germinal se encontraron en los genes *ATM* y *CHEK2*, genes moderadamente penetrantes, y cuya recomendación clínica es la de informar sólo la presencia de las variantes truncadas en estos genes.

Palabras clave: cáncer hereditario, cáncer familiar, VUS, asesoramiento genético.

## ABSTRACT

The study examined 161 familial cancer patients that were prospectively collected. These individuals did not harbor a pathogenic variant in the highly penetrant genes: *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53* or DNA mismatch repair genes (MMR). Overall, 108 breast cancer cases, 34 colorectal cancer and 19 multiple early-onset cancers were included in the study. A cancer panel gene identified 4.3 % (7/161) pathogenic or likely pathogenic variants and 54% (87/161) variants of uncertain significance (VUS). Five out of seven familial breast cancer individuals carried a pathogenic or likely pathogenic variants in 3 genes: *ATM* (3), *CHEK2* (1) and *MSH6* (1). Two of seven multiple early-onset individuals harbored a pathogenic or likely pathogenic variants in *CHEK2* and *ATM* genes. The VUS (n=87) were analyzed by *in silico* tools and 11/87 VUS were described as being pathogenic. Functional studies are necessary to analyze the impact at the RNA level. The study identified pathogenic or likely pathogenic variants in genes that are not routinely analyzed at the clinical setting. Importantly, the study described a high proportion of the pathogenic germline variants that are located in moderate- penetrant genes as *ATM* and *CHEK2*. Currently, the clinical genetic testing practice recommendation only applied for the truncating variants from these genes.

Keywords: hereditary cancer, familial cancer, VUS, genetic counselling.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los análisis genéticos clínicos para la evaluación del riesgo de cáncer se han ido estableciendo en las últimas dos décadas, mediante el desarrollo de guías clínicas en base a evidencias para el cáncer de mama hereditario, síndrome de Lynch (SL), la poliposis adenomatosa familiar, cáncer gástrico difuso hereditario y algunas otras condiciones. Generalmente, la edad temprana es útil para identificar a los pacientes afectados por síndromes hereditarios y posibles portadores de una variante patógena a nivel germinal. Así mismo, se sabe que la mayoría de las mutaciones asociadas a cáncer hereditario confieren susceptibilidad al desarrollo de cáncer en múltiples órganos (Cybulski et al. 2014). Sin embargo, existe aún una fracción significativa de los casos de cáncer de mama, múltiples tumores de aparición a edad temprana, cáncer colorrectal (CCR), entre otros, que no presentan una explicación o causa genética.

El desarrollo de cáncer de mama a una edad temprana puede ser un sello distintivo de predisposición hereditaria. Sin embargo, variantes en los genes *BRCA1* y *BRCA2* solo se han identificado en una minoría de pacientes jóvenes con cáncer de mama (Loizidou et al. 2007; Malone et al. 1998; Moller et al. 2007; Moller et al. 2014; Peto et al. 1999; Pradella et al. 2014). En portadores de variantes patógenas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, el riesgo acumulativo de desarrollar cáncer de mama a los 70 años se estima en 60 % y 55 %, respectivamente (Mavaddat et al. 2013). Por el contrario, en el cáncer hereditario de mama y ovario (HBOC), hasta aproximadamente 25 % de los casos pueden explicarse por los genes de riesgo altamente penetrantes *BRCA1* y *BRCA2* (Kast et al. 2016). Entre las familias negativas para los genes *BRCA1* y *BRCA2*, se sabe que una fracción de estas familias, porta variantes en los genes de *TP53*, *STK11*, *CDH1* y *PTEN*. Estos cuatro genes altamente penetrantes predisponen a una

variedad de síndromes clínicos diferentes (Bubien et al. 2013; Hearle et al. 2006; Moller, Stormorken, Holmen, Hagen, Vabo y Maehle 2014; Pharoah et al. 2001; Rustad et al. 2006 328; Wu et al. 2006). Adicionalmente, se ha descrito que los portadores de variantes patogénicas en los genes de *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *NBS1* y *RAD50* aumentan de dos a cinco veces el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Aloraifi et al. 2015; Antoniou et al. 2014 ; Mavaddat et al. 2013). La identificación de mujeres que portan variantes en estos genes permite un manejo adecuado de los riesgos de desarrollo de cáncer y de sus manifestaciones asociadas, una evaluación clínica, análisis de los antecedentes familiares, y a su vez permitiría identificar a potenciales portadores de estas variantes.

Según estudios recientes, entre el 30 % y el 45 % de los casos de CCR pueden tener una explicación hereditaria (AlDubayan et al. 2018; Grady 2003; Lichtenstein et al. 2000; Mucci et al. 2016). Sin embargo, las variantes patogénicas a nivel germinal son altamente penetrantes y puede asociarse a un desarrollo precoz de la enfermedad (por ejemplo, las variantes patogénicas en *APC* y en los genes que participan en la reparación de apareamientos erróneos (MMR) pero se detectan sólo entre un 5 % y un 10 % de los casos (Hahn et al. 2016).

Los estudios de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) describen que aproximadamente el 18 % de los pacientes diagnosticados con CCR, menores de 50 años, presentan variantes patogénicas a nivel germinal en genes que tradicionalmente no están asociados con el CCR, como *ATM*, *CHEK2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN2A* o *PALB2* (Kastrinos et al. 2017; Pearlman et al. 2016), mientras que hasta el 15 % de los pacientes con HBOC albergan variantes patogénicas en genes predisponentes al cáncer de mama como *RAD51C*, *RAD51D*, *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *PALB2*, *BARD1*, *RECQL*, *TP53*, *CDH1* y *NBN* (Gupta et al. 2017; Ramus et al. 2015). Por consiguiente, el 60 % a 70 % de todos los pacientes con CCR hereditario o HBOC analizados, la predisposición genética aún se desconoce. Es necesario determinar si estas

variantes contribuyen al riesgo hereditario de CCR o HBOC a través de la combinación de alelos de susceptibilidad de baja y/o moderada penetrancia, junto con factores ambientales (Boland et al. 2018; Dominguez-Valentin et al. 2018; Kastrinos et al. 2016; Picelli et al. 2013).

Es importante destacar que los paneles de genes basados en fenotipos proporcionan una tasa alta de detección de variantes patogénicas que tienen una accionabilidad clínica. Un estudio de cribado utilizando un panel de genes, describió que aproximadamente el 8 % al 13 % de las variantes patogénicas fueron encontradas en pacientes con HBOC que eran negativos para la presencia de variantes patogénicas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (Schubert et al. 2019; Tedaldi et al. 2017). El uso de panel de genes ha permitido identificar nuevos genes asociados a cáncer hereditario y/o familiar pero aún existen datos limitados sobre su riesgo asociado a cáncer, y por tanto, las pautas de manejo médico son escasas o inexistentes para algunos de ellos (Anele et al. 2017; Huang et al. 2018; Taylor et al. 2018).

Un evento relativamente común que dificulta la comprensión e interpretación de los resultados de los estudios genéticos es la detección de variantes de significado incierto (VUS). Se ha descrito que hasta el 20 % de todas las variantes en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son clasificadas como VUS (Eccles et al. 2015), mientras en los genes de MMR, es de aproximadamente una quinta a una tercera parte (Plazzer et al. 2013).

Actualmente, la mayoría de los análisis genéticos utilizan un panel de múltiples genes asociados a cáncer para identificar variantes patogénicas en pacientes con historia personal y/o familiar de cáncer. Sin embargo, existe una necesidad de identificar e interpretar los hallazgos genéticos en pacientes con historia familiar de cáncer hereditario, pero en los que no se les ha identificado una variante patogénica en los genes de alta penetrancia como *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53* y genes de MMR. Debido al riesgo elevado de cánceres múltiples en individuos con cáncer a una edad temprana así como en cáncer de mama y CCR familiar, la

identificación de variantes patogénicas en otros genes que no se analizan rutinariamente en el diagnóstico molecular, es crucial para el asesoramiento genético y para la aplicación de métodos de diagnóstico adecuados y de enfoques terapéuticos en estas familias. Por ello, en el presente estudio se presenta una primera aproximación a la investigación de posibles variantes patogénicas en casos de cáncer; por lo que el objetivo de la presente tesis es identificar a potenciales marcadores genéticos para cáncer en estos pacientes y sus familiares utilizando el secuenciamiento de nueva generación. Además, se analizó el impacto de las VUS identificadas en estos pacientes mediante el análisis *in silico*.”

## 2. MARCO TEÓRICO

El cáncer es una enfermedad genética, causada por variantes patogénicas en los genes que controlan las funciones de las células, especialmente, el crecimiento, la división y apoptosis. Estos cambios genéticos a nivel germinal, explican aproximadamente el 5 %-10 % de todos los cánceres y presenta una herencia del tipo autosómico dominante y una edad temprana de desarrollo de cáncer. El cáncer hereditario ocurre cuando una variante patogénica germinal aumenta el riesgo de cáncer y se transmite de padres a hijos. Las pruebas genéticas para síndromes de cáncer hereditario permiten detectar si una persona dentro de una familia con signos o sin signos de ese tipo de síndrome, es portadora de una de las variantes patogénicas en genes relacionados al cáncer. Al detectarse estas variantes, se guiará su tratamiento de manera eficiente y personalizado, así como medidas preventivas.

El cáncer familiar se define como la ocurrencia de cáncer de manera más frecuente de lo que se esperaría por casualidad. Estos cánceres a menudo ocurren a una edad temprana y pueden indicar la presencia de una variante patogénica que aumenta el riesgo de cáncer. También pueden ser por factores ambientales, estilo de vida o la conjunción de factores genéticos y ambientales.

Actualmente, el cáncer de mama y el SL son los síndromes hereditarios más comunes. EL SL es el CCR hereditario más común y afecta aproximadamente 1 de 279 individuos con CCR. El SL es causado por la presencia de variantes patogénicas en los genes que participan en la reparación de apareamientos erróneos (MMR) e incluye a los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Cada gen provoca un riesgo diferente para el desarrollo de cáncer en otros órganos: endometrio, ovarios, estómago, intestino delgado, conducto biliar, páncreas y tracto urinario superior (Dominguez-Valentin et al. 2019; Moller et al. 2017a; Moller et al. 2017b; Moller et al. 2018).



En Perú, aún no se realiza el diagnóstico genético para cáncer hereditario en el sistema de salud público, por lo tanto, existe la necesidad de implementar el análisis genético a fin de brindar un diagnóstico genético para la detección temprana del cáncer, ofrecer un manejo clínico personalizado y tratamiento oportuno (Remme et al. 2010). En este sentido y a nivel de América Latina, El Grupo Latinoamericano de Estudios de Tumores Hereditarios (LA-GETH), ha contribuido a la comprensión genética y manejo clínico de los individuos con SL, describiendo posibles mutaciones fundadoras en Colombia, Brasil y Chile (Della Valle 2019; Koger et al. 2018; Rossi et al. 2017; Vaccaro et al. 2016). Asimismo, a nivel de Europa, el European Hereditary Tumour Group (EHTG), ha establecido la Base Prospectiva de Síndrome de Lynch (PLSD) que permite determinar el riesgo que un individuo tiene para desarrollar cáncer hereditario en base al gen, género, edad y órgano afectado.

El cáncer de mama es una de las neoplasias femeninas más comunes (22 %), de todos los cánceres a nivel mundial. El 5 %–10 % de los casos de cáncer de mama se da por factores hereditarios y el 30% de este riesgo se explica por la presencia de variantes patogénicas en los genes de alta penetrancia. Las mujeres que presentan variantes patogénicas en los genes *BRCA1* o *BRCA2* tienen un mayor riesgo promedio (35 %-85 %) de desarrollar cáncer de mama y un riesgo promedio (11 %-39%) de desarrollar cáncer de ovario (Mavaddat et al. 2013).

Los avances en la tecnología de NGS y su disminución de costo, han permitido una evolución en el análisis genético: desde el análisis de un solo gen al uso de un panel de cientos de genes asociados a cáncer. Los beneficios potenciales de este enfoque incluyen la identificación de un gran número de genes y la descripción de su riesgo accionable a un tipo específico de cáncer (Castera et al. 2014). Este abordaje tecnológico ha permitido la determinación y asociación de variantes patogénicas en genes anteriormente no asociados a cáncer, e.g.: los

genes *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *NBS1* y *RAD50* asociados a un riesgo aumentado (2-5 veces) para desarrollar cáncer de mama hereditario; sin embargo, existe aún un grupo de individuos con sospecha de cáncer hereditario sin una causa genética identificada. Otro beneficio del uso de paneles de genes consiste en la identificación de ciertas variantes patogénicas asociadas a una población determinada, como lo demuestra la variante patogénica fundadora y frecuentemente estudiada: *CHEK2* c.1100delC (Consortium 2004; Turnbull y Rahman 2008).

En la población peruana, aún existe el desafío de implementar el diagnóstico genético para cáncer hereditario y/o familiar que permita caracterizar los tipos y frecuencia de variantes patogénicas asociadas a cáncer hereditario y/o familiar, lo que permitirá la identificación de biomarcadores de diagnóstico temprano, mejorar el pronóstico y brindar un tratamiento personalizado y preciso para el paciente y sus familiares.

La medicina de precisión se basa en la caracterización de los fenotipos y genotipos de los individuos con cáncer con el objetivo de brindar un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno y personalizado.

En las últimas décadas, se ha observado una revolución tecnológica de la secuenciación genética: desde secuenciar uno o varios exones de un gen específico, al uso de paneles de genes hasta la secuenciación masiva. El uso de la tecnología de NGS permite el análisis de varios genes al mismo tiempo, convirtiéndose en una estrategia costo-efectiva que provee información para la detección temprana, selección del tratamiento preciso y personalizado del paciente en base a su perfil genético. En la población peruana, aún existe el desafío de implementar el diagnóstico genético para cáncer hereditario, lo que permitiría evitar los efectos colaterales de los tratamientos estándar que actualmente son usados y mejorar la calidad de vida del paciente y su familia.

### **3. OBJETIVOS**

**3.1. Objetivo General:** Identificar potenciales biomarcadores genéticos en pacientes con antecedentes familiares o personales de cáncer identificados en el Registro de Cáncer Hereditario del Hospital Radium en Oslo, Noruega, mediante el secuenciamiento de nueva generación.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- 1) Identificar variantes patogénicas en genes asociados a cáncer en la población de estudio.
- 2) Determinar la tasa de mutación en la población de estudio.
- 3) Realizar un análisis bioinformático de las variantes de significado incierto (VUS).

## **4. HIPÓTESIS**

**4.1. Hipótesis Nula:** La tecnología de secuenciamiento de nueva generación permite identificar potenciales biomarcadores genéticos candidatos en casos de cáncer hereditario y familiar.

**4.2. Hipótesis Alternativa:** La tecnología de secuenciamiento de nueva generación no permite identificar potenciales biomarcadores genéticos candidatos en casos de cáncer hereditario y familiar.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Lugar

La tesis se desarrolló en el Instituto de Investigación de Cáncer (ICR) en Oslo (Noruega) y la población de estudio fue identificada a partir del Registro de Cáncer Hereditario del Hospital Radium.

### 5.2. Material Biológico Recolectado

La población de estudio se seleccionó del Biobanco de Cáncer Hereditario, que forma parte de la consulta externa de Cáncer Hereditario del Hospital Noruego Radium (Oslo, Noruega). El consentimiento informado fue obtenido por los pacientes durante la rutina de asesoramiento genético.

Los criterios de selección fueron los siguientes:

- Ser miembro de una familia con cáncer o tener antecedentes personales de cáncer;
- Presencia de múltiples cánceres de aparición a una edad temprana, incluidos cáncer de mama, cáncer ginecológico, CCR o cáncer de tiroides;
- Casos familiares de CCR: familias que cumplieron con los criterios clínicos de Amsterdam o las pautas revisadas de Bethesda y que presentaron un resultado negativo para la presencia de variantes patogénicas en los genes de MMR;
- Casos de cáncer de mama familiar: Mujeres con cáncer de mama o cáncer ginecológico que tuvieron un resultado negativo para la presencia de variantes patogénicas en los genes de *BRCA1* o *BRCA2*.

### **5.3. Material de Laboratorio**

#### **5.3.1. Equipos**

- Nanodrop 1000 (Thermofisher)
- Centrifuga
- Secuenciador: MiSeq (Illumina, Inc., San Diego)

#### **5.3.2. Materiales de Vidrio**

- Probetas 500 ml

#### **5.3.3 Kits Comerciales y Enzimas**

- Kits de extracción de ADN genómico (DNeasy Blood & Tissue Kit - Qiagen, Germantown,MD)
- *Targets* de 94 genes y 284 SNPs asociados a cáncer hereditario (Illumina, Inc., San Diego)

### **5.4. Metodología**

#### **5.4.1. Extracción de ADN**

El ADN genómico se aisló de las muestras de sangre periférica utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Germantown, MD) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Figura 1).

#### **5.4.2. Preparación de muestras (bibliotecas de ADN) y análisis por Secuenciamiento de Nueva Generación.**

El secuenciamiento se llevó a cabo utilizando TrueSeq v.1.5 (TSCA, Illumina, Inc., San Diego) en un MiSeq, según las instrucciones del fabricante (Illumina, Inc., San Diego). Las sondas de oligonucleótidos abarcaron toda la región genómica no repetitiva de 94 genes y 284

polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), incluidos exones e intrones. El panel de 94 genes incluye genes, en su mayor parte, asociados con un riesgo mayor de dos veces de CCR, cáncer de mama, cáncer de mama-ovario, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de próstata, cáncer gástrico y cáncer pancreático.

### **5.4.3. Análisis de datos**

Los análisis bioinformáticos fueron realizados utilizando el software R, versión 3.5.2 (R Core Team, 2017) .

#### **5.4.3.1. Llamado de variantes**

Las lecturas de secuencia del extremo emparejado se alinearon con el genoma de referencia humano (compilación GRCh37) utilizando el algoritmo BWA-mem (v.0.7.8-r55) (Li et al. 2009). Las alineaciones de secuencias se convirtieron al formato BAM, seguidas de la clasificación e indexación, todas utilizando SAMtools (v.1.1) (Li, Chen y Liu 2009). El genotipado de las variantes de un solo nucleótido (SNV) y los indels cortos se realizó utilizando HaplotypeCaller de GATK (v3.3.0, opciones predeterminadas, calidad de base mínima (BQ) = 10 y calidad de mapeo mínima (MQ) = 20). Para minimizar la cantidad de variantes de falsos positivos, se filtró las llamadas de genotipo sin procesar, utilizando la configuración de filtro sugerido por GATK: QD <2,0; FS > 60,0; MQ <40,0; ReadPosRankSum < -8,0; MQRankSum < -12,5 y HaplotypeScore > 13,0. Además, se excluyeron las llamadas potencialmente poco confiables en los casos en que el alelo alternativo sea compatible con menos del 20 % de las lecturas en el sitio de la variante, o la profundidad de lectura total sea inferior a 20. Regiones invocables (es decir, posiciones genómicas en las que la profundidad y la calidad de secuencia / mapeo sean adecuadas) en cada muestra se evaluaron utilizando la herramienta CallableLoci en GATK (McKenna et al. 2010). Se requirió posiciones invocables para tener un MQ mínimo, BQ y una profundidad de lectura de 20, 10 y 20, respectivamente. Estos requisitos se eligieron

en función de la configuración utilizada para HaplotypeCaller. Las regiones genómicas que no cumplieron estos criterios, se consideraron no invocables.

#### **5.4.3.2. Anotación de variantes**

Las variantes se anotaron utilizando ANNOVAR (Wang et al. 2010) con RefSeq como modelo genético. Todas las variantes fueron consultadas en las bases de datos de variantes y recursos de proteínas: dbSNP (build 147) (Sherry et al. 2001), 1000 Genome Project phase3 (Genomes Project et al. 2015), Exome Aggregation Consortium (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org>) (Lek et al. 2016), ClinVar (Landrum et al. 2014), UniProt Knowledgebase (Apweiler et al. 2004) y Pfam base de datos de dominios de proteínas (v29) (Finn et al. 2014).

#### **5.4.3.3. Nomenclatura y clasificación de las variantes genéticas**

Las pautas de nomenclatura de la Sociedad de Variación del Genoma Humano (HGVS) se utilizaron para describir las variantes genéticas detectadas (den Dunnen y Antonarakis 2000). La recurrencia de las variantes identificadas se estableció al consultar varias bases de datos: la Base de datos de variaciones abiertas de Leiden (LOVD), la Base de datos de mutaciones universales (UMD), ClinVar, la Sociedad Internacional de Tumores gastrointestinales (InSIGHT) y la Base de datos de mutaciones genéticas humanas (HGMD). Las variantes se clasificaron de acuerdo con el sistema de clasificación de cinco niveles en las siguientes categorías: clase 5 (patógena), clase 4 (probablemente patógena), clase 3 (variantes inciertas o variantes de significado incierto, VUS), clase 2 (probablemente no patogénica) y clase 1 (no patogénica) (Buchanan et al. 2014).

#### **5.4.3.4. Análisis *in silico* de VUS**



Se utilizaron dos tipos de métodos bioinformáticos para predecir el impacto de las variantes en el corte y empalme del ARN. Por un lado, se utilizó MaxEntScan (MES) y SSF-like (SSFL) para predecir alteraciones inducidas por variantes en el empalme 3' y 5', como fue descrito por Houdayer et al. (2012). Por otro lado, se utilizó los algoritmos  $\Delta$ tESRseq- (Di Giacomo et al. 2013),  $\Delta$ HZeI- (Erkelenz et al. 2015) y los algoritmos basados en SPANR (Xiong et al. 2015) para predecir alteraciones del empalme exónico inducidas por variantes de elementos reguladores (ESR) como fue descrito por Soukarieh et al. (2016). Las diferencias ( $\Delta$ ) entre la variante y el tipo salvaje (WT) se tomó como indicadores para evaluar la probabilidad de un defecto de empalme. Se consideró que un mapeo de variantes en un sitio de empalme era susceptible de afectar negativamente la inclusión de exones si  $\Delta$ MES  $\geq$  15 % y  $\Delta$ SSFL  $\geq$  5 % (Houdayer et al. 2012), mientras que una variante ubicada fuera de los sitios de empalme se consideró como un probable inductor de la omisión de exón si al menos 2 de las 3 herramientas *in silico* dedicadas a ESR proporcionaron puntuaciones  $\Delta$  negativas. Las predicciones de proteína *in silico* de variantes sin sentido se realizaron con Align-GVGD, SIFT y MAPP usando Alamut-Batch versión 1.4.4 (Interactive Biosoftware) y, con PolyPhen-2 y MutationTaster (Adzhubei et al. 2010; Kumar et al. 2009 ; Schwarz et al. 2014; Stone y Sidow 2005; Tavtigian et al. 2006).

#### **5.4.4 Cálculo de Tasa Mutacional**

Segun lo mencionado por Schubert et al. (2018) y Tedaldi et al.(2017), la tasa mutacional fue calculada dividiendo el número de individuos portadores de variantes patogénicas o probablemente patogénicas sobre el número total de individuos analizados genéticamente.

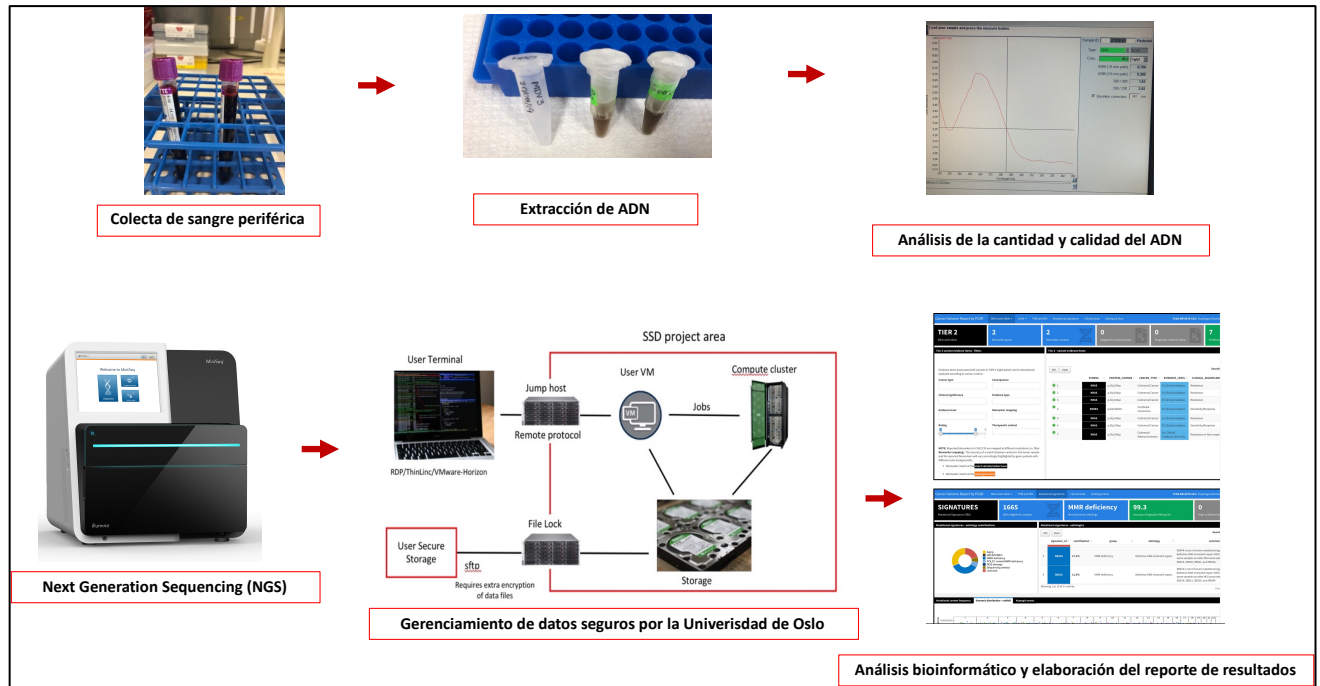


Figura 1. Metodología desarrollada en el proyecto. Se inicia con la extracción de ADN a partir de sangre periférica de los pacientes seleccionados. Se analiza la cantidad y calidad del ADN extraído para ser sometido a la secuenciación utilizando el panel de genes. Los datos brutos son almacenados en un sistema de seguridad de la Universidad de Oslo, que permite el acceso al investigador responsable para posteriormente realizar los análisis bioinformáticos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Población de estudio

Mediante el diagnóstico genético clínico, los individuos participantes de este estudio (n = 161) fueron seleccionados en base a la ausencia de variantes patogénicas en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN* o MMR, así como de grandes deleciones/duplicaciones en los exones que involucran a estos genes.

De los 161 casos seleccionados, 108 fueron identificados como cáncer de mama familiar, de los cuales 27 se denotaron como fenocopias de *BRCA* (casos que dieron negativo para la presencia de variantes patogénicas en los genes *BRCA1* (n=18) y *BRCA2* (n=9) de sus respectivas familias). Así mismo, se identificaron 34 casos de CCR y 19 casos de cánceres múltiples de edad temprana (Figura 2).

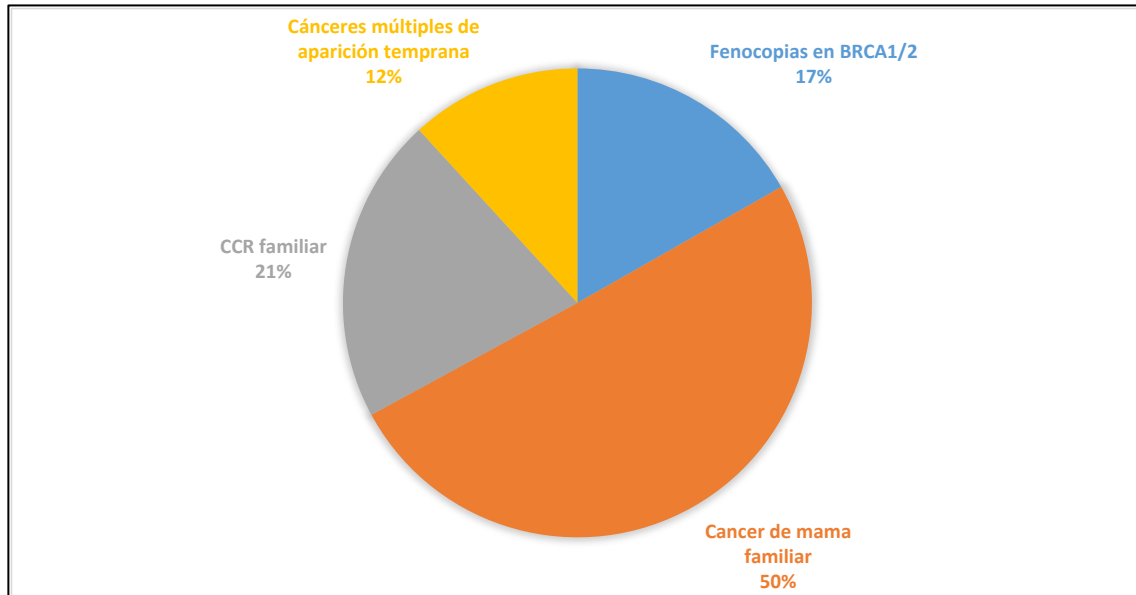


Figura 2. Descripción de los tipos de cáncer en la población de estudio.

## 6.2. Identificación de variantes patogénicas en genes asociados a cancer

En la población de análisis, se identificó 7 individuos de los 161 casos (que representa una tasa mutacional de 4,3 %) que presentaban 6 variantes patogénicas o probablemente patogénicas. Estas variantes fueron confirmadas mediante electroforesis capilar de temperatura cíclica, mostrando un 100 % de concordancia (Figura 3).

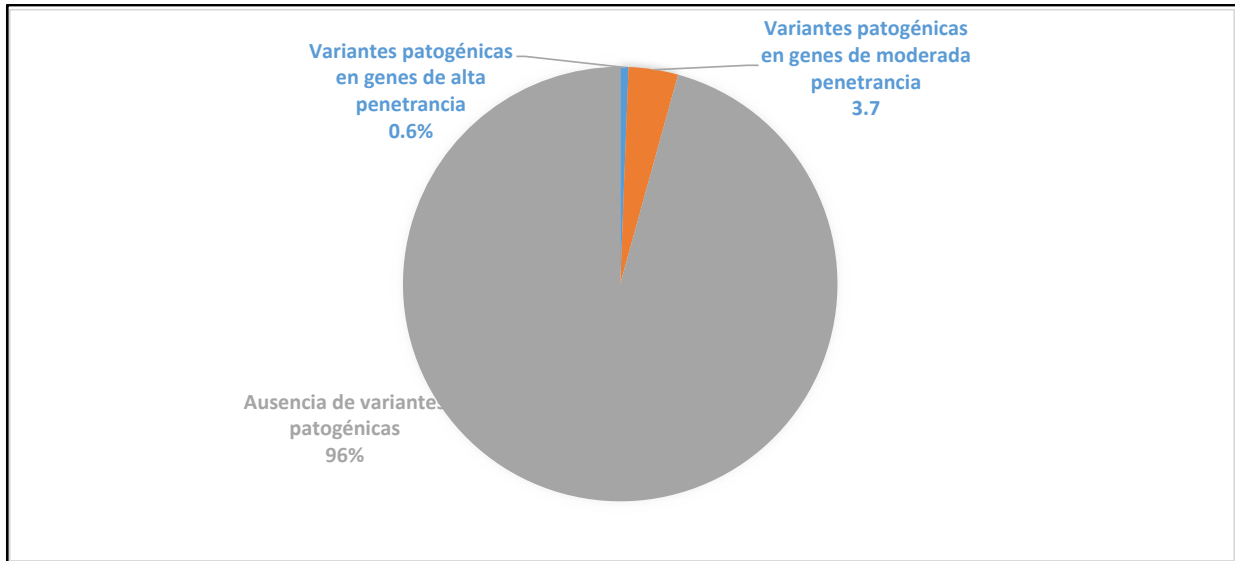


Figura 3. Frecuencia de variantes genéticas en la población de estudio

## 6.3. Identificación de variantes patogénicas en genes de alta a moderada penetrancia

Se identificó una variante patogénica en los 161 casos (que representa el 0,6 %) en genes de alta penetrancia, como *MSH6* c.3261delC (p.Phe1088Serfs\*2) en un caso de fenocopia (Tabla 1). Al ser un caso de cáncer de mama, el análisis genético de rutina incluyó solo los genes *BRCA1* y *BRCA2*.

Se detectaron seis variantes patogénicas en los 161 casos (que representa el 3,7 %) en genes de moderada penetrancia: *ATM* c.9139C>T (p.Arg3047\*) y *ATM* c.468G>A (p.Trp156\*) identificadas en dos casos de fenocopias. Así mismo, se detectó la variante fundadora noruega: *ATM* c.3245\_3247delinsTGAT (p.His1082Leufs) en un caso de cáncer de mama

familiar y la *ATM* c.8432delA (p.Lys2811Serfs\*46) en un caso de cancer múltiple de edad temprana. Además, se identificó la variante *CHEK2* c.319+2T>A (IVS2+2T>A en 2 casos: cáncer de mama familiar y cáncer múltiple de edad temprana (Tabla 1).

**Tabla 1.** Caracterización de las variantes patogénicas o probablemente patogénicas identificadas en la población de estudio.

Variante Genética	Penetrancia del gen	Tipo de cáncer	Clasificación basada en las bases de datos y ACMG
<i>ATM</i> (NM_000051) c. 9139C>T (p.Arg3047Ter)	Moderada	Fenocopia	Patogénica, Probablemente Patogénica / Patogénica
<i>ATM</i> (NM_000051) c.3245_3247delinsTGAT (p.His1082Leufs)	Moderada	Cáncer de mama familiar	Patogénica / Patogénica
<i>ATM</i> (NM_000051) c.468G>A (p.Trp156*)	Moderada	Fenocopia	No descrita / Patogénica
<i>ATM</i> (NM_000051) c.8432delA (p.Lys2811SerfsTer46)	Moderada	Cáncer múltiple de edad temprana	Patogénica / Patogénica
<i>CHEK2</i> (NM_007194) c.319+2T>A	Moderada	Cáncer múltiple de edad temprana	Probablemente Patogénica/ Patogénica
<i>CHEK2</i> (NM_007194) c.319+2T>A	Moderada	Cáncer de mama familiar	Probablemente Patogénica / Patogénica
<i>MSH6</i> (NM_000179) c.3261del (p.Phe1088SerfsTer2)	Alta	Fenocopia	Patogénica/Patogénica

#### 6.4. Variantes patogénicas o probables patogénicas por fenotipo clínico

Al analizar la presencia de variantes patogénicas por fenotipo clínico, se describe que los pacientes con fenocopia (43 %) es el subgrupo más afectado por la presencia de variantes patogénicas en genes de alta y moderada penetrancia (Figura 3). Las fenocopias fueron afectadas por la presencia de variantes patogénicas en los genes de alta penetrancia: *MSH6* y en el gen de moderada penetrancia: *ATM*. Los casos de mama familiar y de cancer múltiple de edad temprana se vieron afectados predominantemente por variantes patogénicas o probablemente patogénicas en genes de penetrancia moderada (*ATM*, *CHEK2*) (29 % cada uno) (Figura 4).

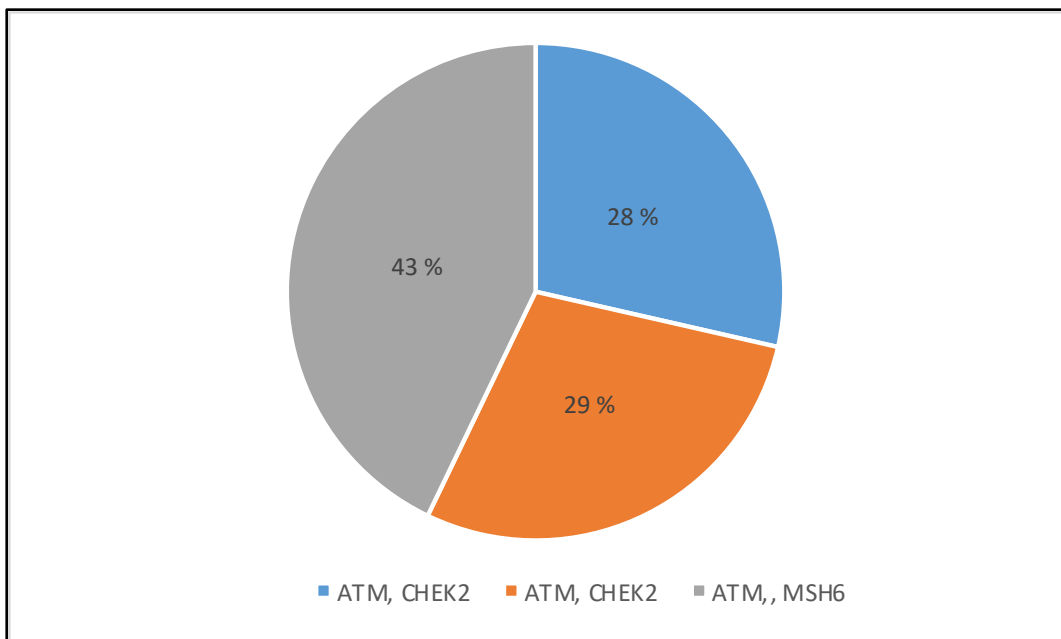


Figura 4. Distribución de las variantes genéticas de acuerdo a su fenotipo clínico.

#### 6.5. Análisis *in silico* de variantes de significado incierto (VUS)

En adición de las 7 variantes patogénicas encontradas en el estudio, los resultados de la NGS revelaron la presencia de 87 variantes de significado incierto (VUS). Se realizaron los análisis de predicciones de proteína y empalme *in silico*. De las 87 VUS, 17 VUS identificadas en 15

genes se describen como probablemente patogénicas y funcionalmente relevantes: *APC*, *ATM*, *AXIN2*, *BRCA2*, *BUB1*, *CDH1*, *CHEK1*, *CHEK2*, *MAP3K1*, *MSH2*, *NOTCH3*, *POLE*, *RAD51B*, *RAD51D* y *STK11* (Tabla 2). La frecuencia de alelo menor (MAF) de estas variantes en la base de datos gnomAD fueron muy bajos (< 1 %) o no se informaron (Tabla 2). El análisis de proteínas *in silico* sugiere un efecto potencialmente negativo (4 de las 5 herramientas de predicción) a nivel de proteína para las variantes en los genes *BRCA2* y *CHEK2* (*BRCA2* p.A39V y *CHEK2* p.D203G). Algunas discrepancias entre las herramientas de predicción fueron aún más notorias para las variantes en *APC*, *NOTCH3*, *POLE* y *POLD1*. Por el contrario, ninguna de las 5 herramientas de predicción mostró efectos deletéreos para las variantes detectadas en *CDH1* y *MAP3K1* (*CDH1* p.A592S y *MAP3K1* p.N255S) (Tabla 2).

Como se describe en la Tabla 2, cinco variantes de clase 3 afectarían la maduración del ARN en base a su potencial modificación en los sitios de empalme: *BRCA2* c.116C>T, *CDH1* c.1774G>T, *CHEK2* c.608A>G, *MAP3K1* c.764A>G y *NOTCH3* c.1490C>T.

Tabla 2. Descripción de las VUSes más relevantes identificadas en el estudio.

Genomic position (GRCh37)	Gene	Exon	Nucleotide change (cNomen)	Predicted protein change (pNomen)	European non-Finnish population frequency*	Reference splice site-dedicated analyses										Cryptic splice site-dedicated analyses			ESR-dedicated analyses			Protein-dedicated analyses				
						Nearest splice site		MES scores			SSFL scores			Local MFS		Potential local splice effect	WT	Var	ΔESRseq	ΔHeti	ΔΨ (%)	AGVGD	SIFT	MAPP	PolyPhen-2	MutationTaster
						Distance (nt)	Type (3' or 5'ss)	WT	Var	VAR vs WT Δ (%)	WT	Var	VAR vs WT Δ (%)	WT	Var											
chr5_112128218_G_A	APC	7	c.721G>A	p.Glu241Lys	0.00006666	-9	5'	7,1528	7,153		87,0697	87,0697	0					-1,51981	-49,76	-0,42	na	Deleterious	na	Possibly Damaging	Disease causing	
chr11_108155013_A>G	ATM	26	c.3806A>G	p.Lys1269Arg	0.00006668	60	3'	9,9	9,9	0	89	89	0	Cryptic 5'ss Strongly Activated	4,4	8,4	-1,61	-61,58	-0,05	C-25	Tolerated	good	Probably Damaging	Disease causing		
chr_17_63533012_G_A	AKM2	7	c.1882C>T	p.Arg628Trp	0.0002005	-26	5'	5,9	5,9	0	77,9	77,9	0					-0,55	-64,1	-1,19	na	Deleterious	bad	Benign	Disease causing	
chr13_32893262_C_T	BRCA2	3	c.116C>T	p.Ala39Val	na	49	3'	6,1	6,1	0	87,9	87,9	0	-	-	-		0,3	-40,5	-0,6	C0	Deleterious	bad	Probably Damaging	Disease causing	
chr_2_11425226_G_A	BUB1	8	c.677C>T	p.Ala229Val	0.001999	57	3'	9,6	9,6	0	81,4	81,4	0					1,179	-52,06	0,09	na	Deleterious	na	Possibly Damaging	Polymorphism	
chr_16_6885966_G_T	CDH1	12	c.1774G>T	p.Ala592Ser	na	63	3'	10,7	10,7	0	87,5	87,5	0	-	-	-		-2,1	-50,9	-0,1	C0	Tolerated	good	Benign	Polymorphism	
chr_11_125496724_G_A	CHEK1	2	c.61G>A	p.Gly21Arg	na	-5	5'	7,3	7,3	0	74,2	74,2	0					-2,79	-75,49	-3,74	na	Deleterious	bad	Probably Damaging	Polymorphism, Disease causing	
chr_22_29091774_C_A	CHEK2	12	c.1312G>T	p.Asp48Trp	0.0005327	53	5'	2	2	0	61,7	61,7	0					-1,93	-61,5	-3,49	C-25	Deleterious	good	Probably Damaging	Disease causing	
chr_22_29115458_T_C	CHEK2	5	c.608A>G	p.Asp203Gly	na	16	3'	9,2	9,2	0	81,1	81,1	0	Increase cryptic 3' ss	7	7,5	-1,6	-24	-0,06	C0	Deleterious	bad	Possibly Damaging	Disease causing		
chr5_56155672_A>G	MAP3K1	3	c.764A>G	p.Asn255Ser	0.02791	-71	5'	7,5	7,5	0	78,5	78,5	0	New Acceptor Site?	4,7	8,8	-1,18661	6,7	-0,04	C0	Tolerated	good	Benign	Polymorphism		
chr2_47641430_C_T	MSH2	5	c.815C>T	p.Ala272Val	0.0003365	23	3'	10,353	10,35	0	84,3224	84,3224	0					-2,17832	-46,5	-0,03	C0	Deleterious	good	Possibly Damaging	Disease causing	
chr19_15273335_C>T	NOTCH3	32	c.5854G>A	p.Val1952Met	0.01194	39	3'	11,5	11,5	0	89,2	89,2	0	-	-	-		-1,78501	-11,15	-0,89	C15	Deleterious	bad	Probably Damaging	Disease causing	
chr_19_15299048_G_A	NOTCH3	9	c.1490C>T	p.Ser497Leu	0.005013	-3	5'	8,5	6,7	-21	81,7	77,5	-5	-	-	-		-2,3	-52,1	-0,76	C15	Tolerated	bad	Benign	Disease causing	
chr_12_133244944_G_A	POLE	19	c.2171C>T	p.Ala724Val	na	-3	5'	9,8908	8,731	-11,7	86,6769	82,5488	-4,8	New Donor Site?	-	6,3	-2,14822	-32,05	-0,16	na	Tolerated	na	Possibly Damaging	Disease causing		
chr_14_68353893A_G	RAD51B	7	c.728A>G	p.Lys243Arg	0.01119	-29	5'	9,1	9,1	0	78,9	78,9	0	Cryptic 5'ss Strongly Activated (0,02 to 7,6)					-1,49	-40,5	-0,19	na	Deleterious	good	Probably Damaging	Disease causing
chr_17_33433488_G_A	RAD51D	6	c.493C>T	p.Arg165Trp	0.00006666	13	3'	8,2069	8,207	0	85,1161	85,1161	0					-2,55724	-32,32	1,42	na	Deleterious	good	Probably Damaging	Disease causing	
chr_19_1220569_C_T	STK11	9	c.1225C>T	p.Arg409Trp	na	-94	5'	6,9	6,9	0	80,5	80,5	0					-1,3	-63,67	-2,67	na	Deleterious	good	Probably Damaging	Disease causing	

Para predecir el impacto biológico de las VUS, se realizaron análisis bioinformáticos de proteínas y empalmes de ARN. Los resultados que se muestran en negrita se consideraron predictivos de un posible efecto biológico negativo inducido por la variante. MES, MaxEntScan; SSFL, tipo buscador de sitios de empalme; nt, nucleótido; 3' o 5'ss, sitio de empalme de 3' o sitio de empalme de 5'; ESR, reguladores de empalme exónico; AGVGD, alinear-GVGD (C0, C15, C25, C35, C.45, C55 o C65 con C65 con mayor probabilidad de interferir en la función y C0 con menor probabilidad), SIFT, clasificación como intolerantes y tolerantes, MAPP, Análisis multivariado de polimorfismo de proteínas (bueno o malo), PolyPhen-2, fenotipado de polimorfismo v2 (benigno, posiblemente dañino o probablemente dañino), MutationTaster (polimorfismo o causante de enfermedad), na: no aplica; \*: frecuencia en la población europea no finlandesa proporcionada por gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org>)



## 7. DISCUSIÓN

El presente estudio identificó 7 casos (4,3 %) de cáncer familiar que albergaban variantes patógenas o probablemente patógenas en genes asociados a diferentes tipos de cáncer mediante el análisis de un panel multigénico. Estas variantes se identificaron en genes de moderada a alta penetrancia: *MSH6*, *CHEK2* y *ATM*. La tasa de mutación identificada en este estudio está en concordancia con varios estudios previamente publicados (Schubert et al. 2018; Tedaldi et al. 2017).

Actualmente existe un desafío en estimar el riesgo de cáncer asociado a variantes patogénicas en genes de penetrancia moderada o baja. La importancia del riesgo asociado a cáncer radica en brindar un adecuado asesoramiento genético para la toma de decisiones en el tratamiento tanto para los pacientes como para sus familiares. Por ejemplo, el SL es una condición autosómica dominante causada por la presencia de variantes patogénicas en uno de los genes de MMR y se ha estimado diferentes riesgos de cáncer asociados al gen (MMR) y género. Por ejemplo, las variantes patogénicas en *MLH1* y *MSH2* son altamente penetrantes cuando se comparan con las variantes patogénicas en los genes *MSH6* y *PMS2* (Dominguez-Valentin et al. 2020; Moller et al. 2018). En relación a los genes *BRCA*, recientemente se ha descrito que las variantes patogénicas en *BRCA1* son más frecuentes en la población noruega y presentan una baja penetrancia en edades fértiles (Moller et al. 2019). Un alto riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama se ha descrito para los casos que presentan variantes del tipo truncadas en el gen *BRCA2* (riesgo relativo: 11,7), en comparación a las variantes truncadas en los genes *ATM* y *CHEK2*. Las variantes truncadas en los genes *ATM* y *CHEK2* presentan un menor riesgo relativo de 2,8 (intervalo de confianza de 95%: 2,2-3,7) y 3,0 (intervalo de confianza de 95%: 2,6-3,5), respectivamente (Easton et al. 2015).

Un reciente estudio evaluó las asociaciones sobre gen-enfermedad utilizando el marco de validez clínica *ClinGen* y estableció la clasificación para las variantes en los genes *ATM* y *CHEK2* asociados a cáncer de mama (Lee et al. 2018). Los resultados de este estudio están en concordancia respecto a la descripción de las variantes como patogénicas encontradas en los genes *ATM* (n=3) y *CHEK2* (n= 1), los cuales fueron identificados en casos de fenocopias o de cáncer de mama familiar (Lee et al.2018).

Actualmente, no existe evidencia sobre la asociación entre cáncer de mama y otros genes de reparación del ADN, como los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*. Así mismo, las recomendaciones clínicas para estos pacientes se está actualizando en base a los estudios científicos prospectivos. Por ejemplo, para los individuos con variante patogénica heterocigota a nivel germinal en el gen *MUTYH*, se ha sugerido un tamizaje colorrectal de riesgo moderado promedio basado en los antecedentes familiares (Nielsen et al. 1993; Out et al. 2012).

Aproximadamente el 25 % de las variantes *missense* y *nonsense* interrumpen el empalme del ARNm y la comprensión de las variaciones de empalme funcional puede permitir la (re)-clasificación de VUS en CCR, cáncer de mama, entre otros. En un reciente estudio retrospectivo, entre las variantes clasificadas inicialmente como VUS, el 7,7 % se reclasificó (el 91 % se reclasificó a la clase 1/2 y el 9 % se elevó a la clase 4/5) y el 8,7 % se elevó a la clase 4/5 (Mersch et al. 2018).

Existe la necesidad de comprender y cuantificar el riesgo de cáncer asociado a variantes patogénicas y VUS en los genes de moderada o baja penetrancia. Se ha sugerido un enfoque cuantitativo para priorizar las sustituciones sin sentido con altas probabilidades de patogenicidad para los genes *ATM*, *CHEK2* y *NBN*. Sin embargo, todavía hay una gran cantidad de variantes nuevas con un significado de patogenicidad incierta identificadas en pacientes con cáncer y con antecedentes familiares, que aún no han sido interpretadas ni clasificadas.

La evaluación de los parámetros clínicos, familiares, ensayos funcionales y análisis bioquímicos permitirían refinar la clasificación clínica de estas variantes. Para este último fin, se necesitan amplias colaboraciones para recopilar datos de diferentes fuentes para llegar a conclusiones, y el presente estudio contribuye a ese fin.

## 8. CONCLUSIONES

- El presente estudio describió e interpretó el potencial impacto de las variantes patogénicas localizadas en los genes de moderada o baja penetrancia (*ATM* y *CHEK2*), que actualmente no se analizan rutinariamente en los diagnósticos genéticos ni clínicos. Estos resultados tienen un impacto directo en el asesoramiento genético y tratamiento clínico adecuado para las personas y sus familiares que portan estas variantes.
- Se encontró una tasa de mutación de 4,3 % en la población estudiada.
- El presente estudio caracterizó *in silico* a cinco variantes de significado incierto (clase 3) que afectarían la maduración del ARN (*BRCA2 c.116C>T*, *CDH1 c.1774G>T*, *CHEK2 c.608A>G*, *MAP3K1 c.764A>G* y *NOTCH3 c.1490C>T*). Estas variantes pueden ser consideradas como candidatas de biomarcadores para ser incluidas en el panel de genes.

## 9. RECOMENDACIONES

- Realizar el estudio genético en pacientes con historia de cáncer personal y/o familiar para proporcionar un asesoramiento genético adecuado y un diagnóstico y tratamiento preciso.
- Implementar la vigilancia personalizada para la detección temprana del cáncer, la cual, es esencial para asegurar una supervivencia óptima de los pacientes con estos tipos de cánceres familiares.
- Realizar más estudios genéticos para investigar los mecanismos que subyacen al desarrollo de cáncer en pacientes de alto riesgo, así como para identificar nuevos genes de predisposición al cáncer.
- Que los sistemas de salud ofrezcan a todas las mujeres con cáncer de mama u ovario pruebas genéticas independientemente de las variantes genéticas identificadas como la causa del cáncer en la familia.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADZHUBEI, I. A., S. SCHMIDT, L. PESHKIN, V. E. RAMENSKY, et al. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7(4), 248-249.

ALDUBAYAN, S. H., M. GIANNAKIS, N. D. MOORE, G. C. HAN, et al. 2018. Inherited DNA-Repair Defects in Colorectal Cancer. *Am J Hum Genet*, , 102(3), 401-414.

ALORAIFI, F., D. MCCARTAN, T. MCDEVITT, A. J. GREEN, et al. 2015. Protein-truncating variants in moderate-risk breast cancer susceptibility genes: a meta-analysis of high-risk case-control screening studies. *Cancer Genet*, 208(9), 455-463.

ANELE, C. C., S. O. ADEGBOLA, A. ASKARI, A. RAJENDRAN, et al. 2017. Risk of metachronous colorectal cancer following colectomy in Lynch syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*, 19(6), 528-536.

ANTONIOU, A. C., S. CASADEI, T. HEIKKINEN, D. BARROWDALE, et al. 2014. Breast-Cancer Risk in Families With Mutations in PALB2 EDITORIAL COMMENT. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 69(11), 659-660.

APWEILER, R., A. BAIROCH, C. H. WU, W. C. BARKER, et al. 2004. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 32, D115-D119.

BOLAND, P. M., M. B. YURGELUN AND C. R. BOLAND. 2018. Recent progress in Lynch syndrome and other familial colorectal cancer syndromes. *CA Cancer J Clin*, 68(3):217-231. doi: 10.3322/caac.21448.

BUBIEN, V., F. BONNET, V. BROUSTE, S. HOPPE, et al. 2013. High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome. *Journal of medical genetics*, 50(4), 255-263.

BUCHANAN, D. D., C. ROSTY, M. CLENDENNING, A. B. SPURDLE, et al. 2014. Clinical problems of colorectal cancer and endometrial cancer cases with unknown cause of tumor mismatch repair deficiency (suspected Lynch syndrome). *Appl Clin Genet*, 7, 183-193.

CASTERA, L., S. KRIEGER, A. ROUSSELIN, A. LEGROS, et al. 2014. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet*, 1305-1313.

CHEK2 BREAST CANCER CASE-CONTROL CONSORTIUM, 2004. CHEK2\*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. *American journal of human genetics*, vol. 74, no. 6, pp. 1175-1182. ISSN 0002-9297 (Print). DOI 10.1086/421251.

CYBULSKI, C., S. NAZARALI AND S. A. NAROD. 2014. Multiple primary cancers as a guide to heritability. *International Journal of Cancer*, 135(8), 1756-1763.

DELLA VALLE, B. M. R., EDENIR INÊZ PALMERO, MARINA ANTELO, et al. 2019. A snapshot of current genetic testing practice in Lynch syndrome: The results of a representative survey of 33 Latin American existing centres/registries. *European Journal of Cancer*, 119, 112-121.

DEN DUNNEN, J.T. y ANTONARAKIS, S.E., 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human mutation*, vol. 15, no. 1, pp. 7-12. ISSN 1059-7794 (Print). DOI 10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<7::AID-HUMU4>3.0.CO;2-N.

DI GIACOMO, D., P. GAILDRAT, A. ABULI, J. ABDAT, et al. 2013. Functional analysis of a large set of BRCA2 exon 7 variants highlights the predictive value of hexamer scores in detecting alterations of exonic splicing regulatory elements. *Human Mutation*, 34(11), 1547-1557.

DOMINGUEZ-VALENTIN, M., D. G. R. EVANS, S. NAKKEN, H. TUBEUF, et al. 2018. Genetic variants of prospectively demonstrated phenocopies in BRCA1/2 kindreds. *Hered Cancer Clin Pract*, 16:4. doi: 10.1186/s13053-018-0086-0. eCollection 2018

DOMINGUEZ-VALENTIN, M., J. R. SAMPSON, T. T. SEPPALA, S. W. TEN BROEKE, et al. 2019. Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: findings from the Prospective Lynch Syndrome Database. *Genet Med*, 22(1):15-25. doi: 10.1038/s41436-019-0596-9

EASTON, D. F., P. D. PHAROAH, A. C. ANTONIOU, M. TISCHKOWITZ, et al. 2015. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med*, 372(23), 2243-2257.

ECCLES, D. M., G. MITCHELL, A. N. MONTEIRO, R. SCHMUTZLER, et al. 2015. BRCA1 and BRCA2 genetic testing-pitfalls and recommendations for managing variants of uncertain clinical significance.. *Annals of Oncology*, 26(10), 2057-2065.

ERKELENZ, S., F. HILLEBRAND, M. WIDERA, S. THEISS, et al. 2015. Balanced splicing at the Tat-specific HIV-1 3'ss A3 is critical for HIV-1 replication. *Retrovirology*, 12:29. doi: 10.1186/s12977-015-0154-

FINN, R. D., A. BATEMAN, J. CLEMENTS, P. COGGILL, et al. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, D222-D230.

1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, et al. 2015. A global reference for human genetic variation. *Nature*, 1;526(7571):68-74. doi: 10.1038/nature15393.

GRADY, W. M. 2003. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology*, 124(6), 1574-1594.

GUPTA, S., D. PROVENZALE, S. E. REGENBOGEN, H. HAMPEL, et al. 2017. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal, Version 3.2017. *J Natl Compr Canc Netw*, 15(12), 1465-1475.

HAHN, M. M., R. M. DE VOER, N. HOOGERBRUGGE, M. J. LIGTENBERG, et al. 2016. The genetic heterogeneity of colorectal cancer predisposition - guidelines for gene discovery. *Cell Oncol (Dordr)*, 39(6), 491-510.

HEARLE, N., V. SCHUMACHER, F. H. MENKO, S. OLSCHWANG, et al. 2006. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clinical Cancer Research*, 12(10), 3209-3215.

HOUDAYER, C., V. CAUX-MONCOUTIER, S. KRIEGER, M. BARROIS, et al. 2012. Guidelines for splicing analysis in molecular diagnosis derived from a set of 327 combined in silico/in vitro studies on BRCA1 and BRCA2 variants. *Human Mutation*, 33(8), 1228-1238.

HUANG, K. L., R. J. MASHL, Y. WU, D. I. RITTER, et al. 2018. Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. *Cell*, 173(2), 355-370 e314.

KAST, K., C. DOBBERSCHÜTZ, C. E. SADOWSKI, S. PISTORIUS, et al. 2016. Prevalence of Lynch syndrome in unselected patients with endometrial or ovarian cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, 294(6), 1299-1303.

KASTRINOS, F., H. UNO, C. UKAEGBU, C. ALVERO, et al. 2017. Development and Validation of the PREMM5 Model for Comprehensive Risk Assessment of Lynch Syndrome. *J Clin Oncol*, 35(19), 2165-2172.

KOGER, N., L. PAULSEN, F. LOPEZ-KOSTNER, A. DELLA VALLE, et al. 2018. Evaluation of MLH1 variants of unclear significance. *Genes Chromosomes Cancer*, 57(7):350-358. doi: 10.1002/gcc.22536.

KUMAR, P., S. HENIKOFF y P. C. NG. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), 1073-1082.

LANDRUM, M. J., J. M. LEE, G. R. RILEY, W. JANG, et al. 2014. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D980-D985.

LEE, K., B. A. SEIFERT, H. SHIMELIS, R. GHOSH, et al. 2018. Clinical validity assessment of genes frequently tested on hereditary breast and ovarian cancer susceptibility sequencing panels. *Genet Med*, 21(7):1497-1506. doi: 10.1038/s41436-018-0361-5.

LEK, M., K. J. KARCZEWSKI, E. V. MINIKEL, K. E. SAMOCHA, et al. 2016. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285-291.

LE, L., HONGCHANG, C. y LIXIONG, L., 2009. Sequence Alignment Algorithm in Similarity Measurement. 2009 International Forum on Information Technology and Applications. S.l.: s.n., pp. 453-456. ISBN VO - 1. DOI 10.1109/IFITA.2009.119



LICHTENSTEIN, P., N. V. HOLM, P. K. VERKASALO, A. ILIADOU, et al. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 343(2), 78-85.

LOIZIDOU, M., Y. MARCOU, V. ANASTASIADOU, R. NEWBOLD, et al. 2007. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germline mutations to the incidence of early-onset breast cancer in Cyprus. *Clinical Genetics*, 71(2), 165-170.

MALONE, K. E., J. R. DALING, J. D. THOMPSON, C. A. O'BRIEN, et al. 1998. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population - Analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 279(12), 922-929.

MAVADDAT, N., S. PEOCK, D. FROST, S. ELLIS, et al. 2013. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst*, 105(11), 812-822.

MCKENNA, A., M. HANNA, E. BANKS, A. SIVACHENKO, et al. 2010. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 1297-1303.

MERSCH, J., N. BROWN, S. PIRZADEH-MILLER, E. MUNDT, et al. 2018. Prevalence of Variant Reclassification Following Hereditary Cancer Genetic Testing. *JAMA*, 320(12), 1266-1274.

MOLLER, P., M. DOMINGUEZ-VALENTIN, E. A. RODLAND y E. HOVIG 2019. Causes for Frequent Pathogenic BRCA1 Variants Include Low Penetrance in Fertile Ages, Recurrent De-Novo Mutations and Genetic Drift. *Cancers (Basel)*, 11(2).

MOLLER, P., A. I. HAGEN, J. APOLD, L. MAEHLE, et al. 2007. Genetic epidemiology of BRCA mutations--family history detects less than 50% of the mutation carriers. *Eur J Cancer*, 43(11), 1713-1717.

MOLLER, P., T. SEPPALA, I. BERNSTEIN, E. HOLINSKI-FEDER, et al. 2017. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database. *Gut*, 66(3), 464-472.

MOLLER, P., T. SEPPALA, I. BERNSTEIN, E. HOLINSKI-FEDER, et al. 2017b. Incidence of and survival after subsequent cancers in carriers of pathogenic MMR variants with previous cancer: a report from the prospective Lynch syndrome database. *Gut*, 66(9), 1657-1664.

MOLLER, P., T. T. SEPPALA, I. BERNSTEIN, E. HOLINSKI-FEDER, et al. 2018. Cancer risk and survival in path\_MMR carriers by gene and gender up to 75 years of age: a report from the Prospective Lynch Syndrome Database. *Gut*, 67(7), 1306-1316.

MOLLER, P., A. STORMORKEN, M. M. HOLMEN, A. I. HAGEN, et al. 2014. The clinical utility of genetic testing in breast cancer kindreds: a prospective study in families without a demonstrable BRCA mutation. *Breast Cancer Res Treat*, 144(3), 607-614.

MUCCI, L. A., J. B. HJELMBORG, J. R. HARRIS, K. CZENE, et al. 2016. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA*, 315(1), 68-76.

NIELSEN M, INFANTE E, BRAND R. MUTYH Polyposis. 2012 Oct 4 [updated 2021 May 27]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Mirzaa GM, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022. PMID: 23035301.

OUT, A. A., M. WASIELEWSKI, P. E. HUIJTS, I. J. VAN MINDERHOUT, et al. 2012. MUTYH gene variants and breast cancer in a Dutch case-control study. *Breast Cancer Res Treat*, 134(1), 219-227.

PEARLMAN, R., W. L. FRANKEL, B. SWANSON, W. ZHAO, et al. 2016. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*, 3(4):464-471. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.5194.

PETO, J., N. COLLINS, R. BARFOOT, S. SEAL, et al. 1999. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 91(11), 943-949.

PHAROAH PD, GUILFORD P, CALDAS C; INTERNATIONAL GASTRIC CANCER LINKAGE CONSORTIUM. 2011. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*, 121(6):1348-53. doi: 10.1053/gast.2001.29611.

PICELLI, S., J. LORENZO BERMEJO, J. CHANG-CLAUDE, M. HOFFMEISTER, et al. 2013. Meta-analysis of mismatch repair polymorphisms within the cogent consortium for colorectal cancer susceptibility. *Plos One*, 8(9), e72091.

PLAZZER, J. P., R. H. SIJMONS, M. O. WOODS, P. PELTOMAKI, et al. 2013. The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch Syndrome. *Familial cancer*, 12(2), 175-180.

PRADELLA LM, EVANGELISTI C, LIGORIO C, CECCARELLI C, NERI I, ZUNTINI R et al. 2014. A novel deleterious PTEN mutation in a patient with early-onset bilateral breast cancer. *BMC Cancer*, 14:70. doi: 10.1186/1471-2407-14-70. PMID: 24498881; PMCID: PMC3922036.

R CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAMUS, S. J., H. SONG, E. DICKS, J. P. TYRER, et al. 2015. Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 107(11).

REMME, J. H., T. ADAM, F. BECERRA-POSADA, C. D'ARCANGUES, et al. 2010. Defining research to improve health systems. *PLoS Med*, 7(11), e1001000.

ROSSI, B. M., E. I. PALMERO, F. LOPEZ-KOSTNER, C. SARROCA, et al. 2017. A survey of the clinicopathological and molecular characteristics of patients with suspected Lynch syndrome in Latin America. *Bmc Cancer*, 17(1), 623.

RUSTAD, C. F., M. BJORNSLETT, K. R. HEIMDAL, L. MAEHLE, et al. 2006. Germline PTEN mutations are rare and highly penetrant. *Hered Cancer Clin Pract*, 4(4), 177-185.

SCHUBERT, S., J. L. VAN LUTTIKHUIZEN, B. AUBER, G. SCHMIDT, et al. 2018. The identification of pathogenic variants in BRCA1/2 negative, high risk, hereditary breast and/or ovarian cancer patients: High frequency of FANCM pathogenic variants. *International Journal of Cancer*, 144(11):2683-2694. doi: 10.1002/ijc.31992.

SCHWARZ, J. M., D. N. COOPER, M. SCHUELKE AND D. SEELow. 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*, 11(4), 361-362.

SHERRY, S. T., M. H. WARD, M. KHOLODOV, J. BAKER, et al. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 308-311.

SOUKARIEH, O., P. GAILDRAT, M. HAMIEH, A. DROUET, et al. 2016. Exonic Splicing Mutations Are More Prevalent than Currently Estimated and Can Be Predicted by Using In Silico Tools. *Plos Genetics*, 12(1):e1005756. doi: 10.1371/journal.pgen.1005756.

STONE, E. A. y A. SIDOW. 2005. Physicochemical constraint violation by missense substitutions mediates impairment of protein function and disease severity. *Genome Research*, 15(7), 978-986.

TAVTIGIAN, S. V., A. M. DEFFENBAUGH, L. YIN, T. JUDKINS, et al. 2006. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *Journal of medical genetics*, 43(4), 295-305.

TAYLOR, A., A. F. BRADY, I. M. FRAYLING, H. HANSON, et al. 2018. Consensus for genes to be included on cancer panel tests offered by UK genetics services: guidelines of the UK Cancer Genetics Group. *Journal of medical genetics*, 55(6):372-377. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-105188.

TEDALDI, G., M. TEBALDI, V. ZAMPIGA, R. DANESI, et al. 2017. Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. *Oncotarget*, 8(29), 47064-47075.

TURNBULL, C. y N. RAHMAN. 2008. Genetic predisposition to breast cancer: Past, present, and future. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 321-345.

VACCARO, C. A., C. SARROCA, B. ROSSI, F. LOPEZ-KOSTNER, et al. 2016. Lynch syndrome in South America: past, present and future. *Fam Cancer*, 15(3), 437-445.

WANG, K., M. LI AND H. HAKONARSON ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, Sep 2010, 38(16), e164.

WU, C. C., S. SHETE, C. I. AMOS y L. C. STRONG. 2006. Joint effects of germ-line p53 mutation and sex on cancer risk in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Research*, 66(16), 8287-8292.

XIONG, H. Y., B. ALIPANAHI, L. J. LEE, H. BRETSCHEIDER, et al. 2015. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science*, 347(6218).