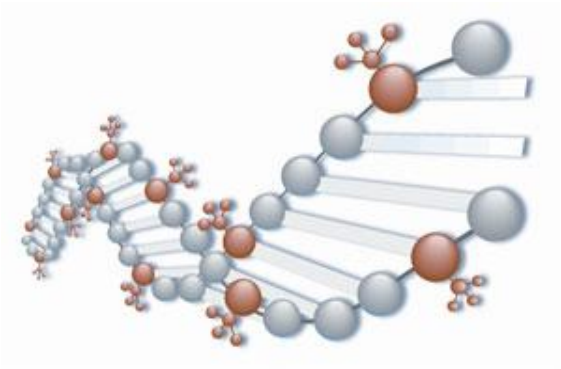
Evaluación de *RAD51C* como predictor de susceptibilidad genética en familias con síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario

Proyecto de Investigación

Y

Resultados preliminares



SEUDONIMO: DAR

Resumen

Dado el alto porcentaje de casos de cáncer de mama con alta agregación familiar que no se explican por alteraciones en los principales genes de susceptibilidad, *BRAC1* y *BRCA2*, planteamos este estudio con el objeto de conocer la prevalencia mutacional del gen *RAD51C* en nuestra población. Estos resultados serán útiles para la valoración de *RAD51C* como predictor de riesgo en cáncer de mama y ovario hereditario (CMOH). Para ello, se ha realizado un estudio transversal sobre pacientes que cumplen criterios de alto o moderado riesgo de síndrome de CMOH y en los que no se ha encontrado ninguna variante génica en *BRCA1*, *BRCA2* y *CHEK2* que esté relacionada con el aumento de riesgo. El cribado mutacional de los pacientes casos índice se realizará por secuenciación de las zonas de estudio (reacción en cadena de la polimerasa de los amplicones, comprobación de la amplificación mediante gel de agarosa, purificación enzimática de los amplicones, PCR de secuenciación, purificación en columnas y electroforesis capilar). Las secuencias obtenidas se analizarán mediante los softwares SeqScape v2.5™ y Sequencing Analysis 5.2. Para el análisis de las variantes se consultarán las principales bases de datos, se realizarán estudios bioinformáticos y de cosegregación familiar para evaluar la patogenicidad de las mismas. Desde el laboratorio de genómica se realizará un análisis de las mutaciones más recurrentes con el fin de determinar el perfil mutacional de nuestra población, calculando la prevalencia de éstas. También se realizará un análisis por subgrupos clínicos (C. mama bilateral/ C. ovario/ C mama y ovario), con el fin de realizar un estudio genotipo-fenotipo.

Palabras claves: Cáncer de mama y ovario hereditario (CMOH), *BRCA 1/ 2* negativo. *RAD51C.*

Abstract

Given the high percentage of breast cancer cases with high familial aggregation that are not explained by alterations in the major susceptibility genes, *BRCA1* and *BRCA2*, propose this study to determine the prevalence *RAD51C* gene mutation in our population. These results will be useful for the assessment of *RAD51C* as a predictor of cancer risk in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC). To do this, there has been a cross-sectional study on patients who meet criteria for high or moderate risk of HBOC syndrome and in which not has been found no gene variant in *BRCA1, BRCA2* and *CHEK2* that is associated with increased risk. Mutation screening of patients index cases be made by sequencing study areas (Polymerase chain of amplicons, amplification cheking by agarose gel purification of the amplicons enzyme, PCR sequencing purification columns and capillary electrophoresis). The sequences obtained were analyzed using the software "SeqScape v2.5™" and "Sequencing Analysis 5.2". For the analysis of the variants will consult major databases, bioinformatics studies will be conducted and family cosegregation to asses pathogenicity of them. From genomics laboratory, an analysis of the most frequent mutations in order to determine the mutation profile of our population, calculating the prevalence of these. Also there will be a clinical subgroup analysis (C. Bilateral breast / ovarian C. / C breast and ovarian), in order to conduct a genotype-phenotype study.

Keywords: Breast cancer and hereditary ovarian (HBOC), *BRCA 1/2* negative. *RAD51C*.

Índice

Resumen....2

Introducción 5

Antecedentes y estado actual del tema 5

Fundamento molecular 7

Hipótesis....9

Objetivos 9

Metodología 10

1. Reclutamiento de pacientes 10

2. Variables del estudio 11

3. Estudio genético....12

3.1 Extracción de ADN genómico 12

3.2 Amplificación y purificación de ADN genómico....13

3.3 Secuenciación automática directa 15

3.4 Purificación de la reacción de secuenciación 16

4. Análisis de los datos 17

4.1 Alteraciones en la secuencia 17

4.2 Análisis de los resultados 19

Dificultades y Limitaciones....19

Aspectos Éticos 20

Plan de trabajo....20

Etapas de desarrollo....20

Distribución de las tareas 22

Plan de difusión, aplicabilidad y utilidad práctica 22

Medios disponibles para la realización del proyecto y presupuesto....23

Bibliografía 24

Anexo I: Consentimiento Informado....27

Anexo II: Resultados....30

Introducción

Antecedentes y estado actual del tema

El cáncer de mama (CM), con más de un millón de casos al año en el mundo, es el cáncer más frecuente y una de las principales causas de mortalidad en la mujer en el mundo occidental. Se estima que en países de la Unión Europea la probabilidad de desarrollar esta enfermedad antes de los 75 años es del 8%(1). En España se calcula que se diagnostican anualmente 22.000 casos de cáncer de mama, lo que supone el 30% del total de los tumores diagnosticados en mujeres. Por otra parte, en todo el mundo se diagnostican más de 150.000 casos anuales de cáncer de ovario (CO), el cáncer ginecológico con mayor mortalidad, ya que suele diagnosticarse en estadios avanzados(2).

En el desarrollo de la enfermedad se han identificado múltiples factores de riesgo de tipo ambiental, hormonal y genéticos. Aunque la mayoría de ellos influye ligeramente, destacan especialmente en mujeres premenopáusicas la edad, la densidad de la mama, los antecedentes mamarios previos y el número de familiares de primer grado con CM. En el CO el riesgo se eleva con la edad (con un aumento de la incidencia en la quinta década de la vida) y disminuye inversamente con embarazos a término(3).

Como se ha comentado, uno de los principales factores de riesgo es la presencia de cáncer de mama en familiares directos. El riesgo de CM se duplica en parientes de primer grado de mujeres con CM, mientras que el de CO se triplica con parientes afectas de esta enfermedad comparadas con mujeres sin antecedentes familiares(4). Entre un 5 y un 10% de todos los casos presentan un componente hereditario, atribuible a mutaciones heredadas de forma autosómica dominante en varios genes de susceptibilidad. Un 15 % adicional de mujeres con cáncer de mama presenta algún antecedente familiar, aunque sin un patrón de herencia claro. Teniendo en cuenta la alta frecuencia de esta neoplasia, el cáncer de mama hereditario afecta a un gran número de nuestra población(5).

La comprensión de la etiología genética del cáncer de mama dio paso a la identificación sobre los años 90 de dos genes relacionados con la susceptibilidad al cáncer de mama. Los genes *BRCA 1* y *2* (breast-cancer-susceptibility genes)(6)(7).

Estos genes se caracterizan por tener herencia autosómica dominante, alta penetrancia y elevada prevalencia. Mutaciones en *BRCA1* o *2* no están solamente asociados

con un aumento del riesgo de cáncer de mama, sino que también incrementan la susceptibilidad a cánceres de ovario, próstata, páncreas, y mama en varón.(8)

Pero como en otros síndromes de cáncer hereditario, existe un porcentaje de los casos que no se explican por mutaciones en los genes de alta penetrancia conocidos. El síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (CMOH) es uno de los más llamativos, ya que en general, se considera que tan solo entre un 20-25% de los casos de alto y moderado riesgo se explican por mutaciones en BRCA1 o BRCA2(9). Esto significa que en la mayoría de los casos, el exceso de riesgo familiar que se observa no tiene una causa genética conocida.

Existen otros modelos genéticos que pueden explicar el riesgo familiar de CM no debido a *BRCA1* ni *BRCA2*. Se han identificado otros genes con mutaciones de alta penetrancia en síndromes hereditarios que incluyen el CM como parte del fenotipo (como *TP53* en el síndrome de Li–Fraumeni o *PTEN* en el síndrome de Cowden)(10)(11) pero son alelos de baja prevalencia y causan menos del 1% de los CM.

Aunque no se descarta la posibilidad de identificar un nuevo alelo de alta penetrancia, en la actualidad se sugiere la participación de múltiples genes de susceptibilidad, pero cada uno de ellos asociado a riesgos menores. La combinación de estos genes supone aproximadamente el 10% del componente genético del riesgo de CM(8).En esta segunda categoría de alelos de susceptibilidad donde se incluyen variantes con una moderada penetrancia y baja prevalencia debemos incluir *ATM, CHEK2, PALB2* y *BRIP1*, genes candidatos seleccionados por su interacción con *BRCA1 y BRCA2* o su participación en las mismas vías de reparación del DNA. Estos alelos de riesgo tienen baja prevalencia (<0.4%), confieren un aumento de riesgo moderado (2 a 4 veces) en portadoras y suponen un 5% del componente genético del riesgo.

En total, todos estos grupos de genes comprenden menos del 30% del riesgo familiar de CM (11)(12). Por lo tanto, sigue sin conocerse la causa de la mayoría de las agrupaciones familiares, que puede ser debida a un gran número de variantes, cada una de ellas asociada a un efecto moderado en el riesgo de CM **(Figura 1).**

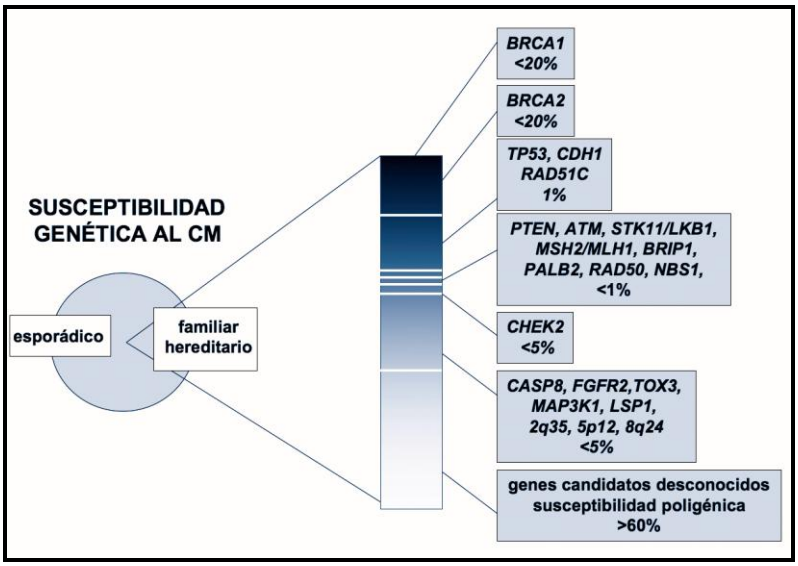


***Figura 1**: Genes de susceptibilidad al cáncer de mama*(12).

Fundamento molecular

Además de *BRCA1* y *BRCA2*, otros genes de susceptibilidad al CM (*ATM, CHEK2, BRIP1 o PALB2*) son esenciales para la estabilidad genómica celular y se han relacionado funcionalmente con la reparación del DNA mediante recombinación homóloga **(Figura 2).** La Recombinación Homóloga (HR), es un proceso fundamental para la conservación de los organismos, pues mantiene la integridad genómica mediante la reparación de las rupturas de la doble hebra de DNA (DSBs). Estos daños son generados durante la replicación del DNA (fase S del ciclo celular) y preferentemente reparados mediante recombinación con la cromátida hermana. Una disfunción en la HR puede causar un reordenamiento génico aberrante e inestabilidad genómica, dando lugar a traslocaciones cromosómicas, delecciones, amplificaciones y pérdida de heterozigosidad (LOH).

El mecanismo de interacción de estas proteínas en el proceso de HR se pone de manifiesto en patologías como la Anemia de Fanconi (FA) y otros síndromes neoplásicos que comparten inestabilidad cromosómica en la infancia, anomalías en el desarrollo y predisposición a leucemias y otros tipos de cáncer. En estos síndromes se han observado mutaciones bialélicas en *BRCA2, PALB2 y BRIP1*. Recientemente, se identificó una mutación "missense" en homocigosis en el gen *RAD51C* (17q22-q23) en una familia con características de FA y alta susceptibilidad celular a agentes causantes de lesiones en el DNA. Este gen de la familia *RAD51* está involucrado en la reparación del DNA por recombinación homóloga. La proteína se acumula en los lugares de lesión del

DNA junto con *RAD51*, actúa en algunas fases del proceso de reparación y participa además en la activación de *CHEK2* y en el paro del ciclo celular como respuesta al daño en el DNA. Por lo tanto, *RAD51C* contribuye a preservar la integridad del genoma.

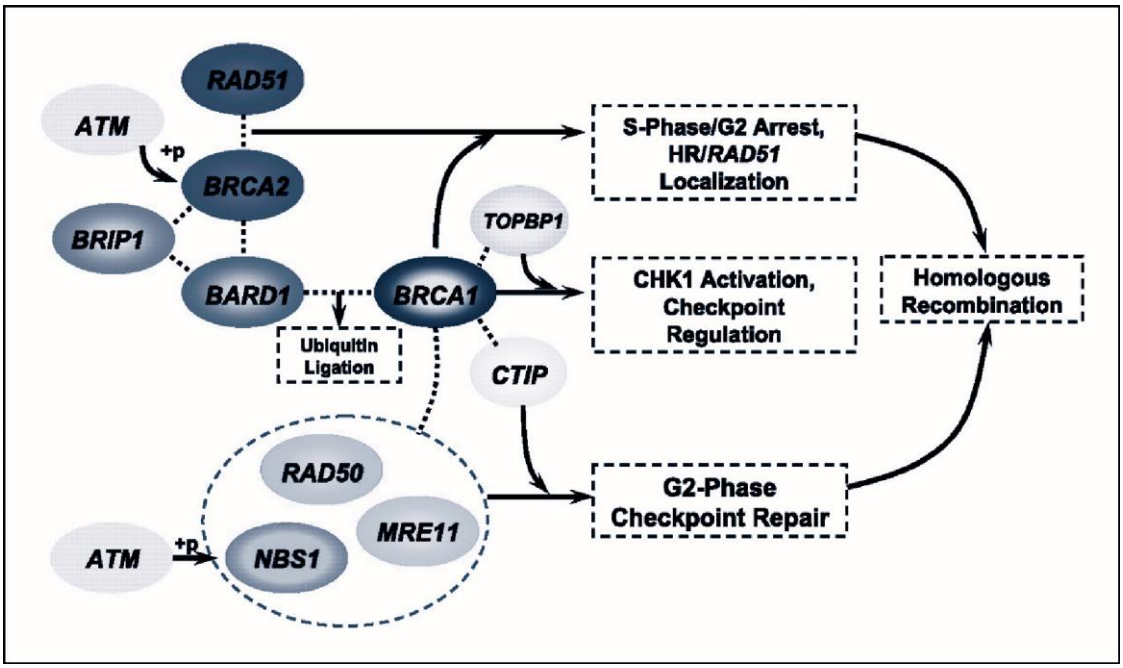


***Figura 2**: Recombinación Homóloga* (13).

Tras este fundamento, un importante estudio fue publicado en 2010 por Meindl y col. en el cual se realiza el análisis de *RAD51C* mediante secuenciación y DHPLC (cromatografía liquida desnaturalizante de alto rendimiento) en 1.100 probandos de familias alemanas con CM/CO sin mutaciones detectadas en *BRCA1* ni en *BRCA2* (BRCAX). Como resultados se identificaron seis mutaciones monoalélicas que conferían un aumento de riesgo para CM y CO(14) (dos inserciones, dos en lugares de "splicing" y dos" missense", que limitaban la función de la proteína). Se evidenció una prevalencia mutacional en el gen *RAD51C* de 1,3% (15).

Hipótesis

La asociación descrita entre riesgo genético de CM/CO y FA sugiere que el análisis de los genes FA y los de las proteínas con las que interactúan puede desvelar nuevos genes de susceptibilidad al cáncer en la vía de reparación por recombinación homóloga. La identificación de *RAD51C* como gen de susceptibilidad al CM/CO apoya la hipótesis de la existencia de alelos pocos prevalentes y de moderada penetrancia asociados a una enfermedad común.

A pesar de la existencia de evidencias sobre la implicación de *RAD51C* en este síndrome, son necesarios estudios para determinar el papel que juega en estos tipos de cáncer y esclarecer la prevalencia mutacional en nuestra población. Es por ello, que planteamos este trabajo con el fin de responder a la siguiente pregunta:
¿Sería útil incorporar a la práctica clínica diaria el estudio de *RAD51C* en las familias de nuestro territorio con síndrome de CMOH sin alteraciones en *BRCA1* y *BRCA2*?

Objetivos

Objetivo general:

Considerar la inclusión del test genético de *RAD51C* como marcador de susceptibilidad a presentar CMOH.

Objetivos específicos:

1. Estudiar el rendimiento diagnóstico del estudio de *BRCA1* y *BRCA2* en nuestra población.
2. Describir fenotípicamente las familias estudiadas así como los casos índices.
3. Conocer la prevalencia de mutaciones que *RAD51C* tiene en nuestra población.
4. Describir las distintas variantes génicas patológicas y estudiar la penetrancia de éstas en las familias portadoras de las mismas.
5. Conocer las variantes de la secuencia génica que se pueden categorizar como variante de efecto clínicamente desconocido (VED) e intentar averiguar su significado clínico y su posible asociación con el riesgo a desarrollar cáncer.

Metodología

1. Reclutamiento de pacientes

Planteamos un estudio transversal de nuestra población sobre pacientes que cumplen criterios de alto o moderado riesgo de Síndrome de CMOH para la realización del test genético. Estos pacientes habrán sido seleccionados previamente por la Unidad de Consejo Genético del servicio de Oncología, junto con la colaboración del Laboratorio de Diagnóstico Genético del servicio de Análisis Clínicos. Antes de la realización de la prueba se informará a los pacientes, mediante consentimiento informado, del objetivo del estudio y de las repercusiones y limitaciones de las pruebas genéticas (ANEXO 1).

Criterios de inclusión:

En el estudio se seleccionarán los pacientes que cumplan al menos uno de los criterios clínicos de alto o moderado riesgo de presentar síndrome cáncer de mama y ovario hereditario que propone la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Los criterios son los siguientes:

Criterios de alto riesgo

1. Un caso de cáncer de mama menor o igual a 40 años.
2. Diagnóstico de cáncer de mama y ovario mismo individuo.
3. Dos o más casos de cáncer de mama, uno de los cuales es menor de 50 años o bilateral.
4. Un caso de cáncer de mama menor o igual a 50 años o bilateral y un caso de cáncer de ovario en familiar 1º o 2º grado.
5. Tres casos de cáncer de mama y ovario (al menos un caso de ovario) en familiares de 1º o 2º grado.
6. Dos casos de cáncer de ovario en familiares de 1º y 2º grado.
7. Un caso de cáncer de mama en el varón y familiar de 1º o 2º grado con cáncer de mama u ovario.

Criterios de moderado riesgo

1. Dos familiares en 1º grado si ambos se han diagnosticado entre los 51 y 60 años.
2. Un familiar en 1º y 2º grado (madre o hermana y tía hermana o abuela materna), si la suma de sus edades en menor o igual a 118 años.

Criterios de exclusión:

Los casos índices que cumplan criterios de riesgo en síndrome de CMOH y que presenten mutaciones en los genes *BRCA1, BRCA2* o *CHEK2* no serán seleccionados para nuestro estudio.

2. Variables del estudio

En el estudio, se medirán como variables dependientes:

1. Las variantes génicas clasificadas como mutaciones en nuestra población seleccionada.
2. Las clasificadas como Variantes de Significado Clínico Incierto (VSCI).
3. Los polimorfismos encontrados.

Estas variables serán obtenidas a partir del estudio genético que se detalla en el apartado 3 de la metodología.

Como variables independientes tendremos en cuenta factores tales como:

1. Edad de diagnóstico del tumor.
2. Tipo de cáncer en el probando (C. mama bilateral/ C. ovario/ C mama y ovario).
3. Tipos de cáncer en la familia.
4. Inmunohistoquímica del tumor.

Estos datos serán suministrados por la Unidad de Consejo Genético del servicio de Oncología Médica mediante la petición para la realización del estudio genético en el laboratorio de diagnóstico genético. Se consultará la historia clínica del paciente mediante el programa informático “SELENE” para completar los datos.

3. Estudio genético

A continuación se detallan los procedimientos a seguir en el Laboratorio de Diagnóstico Genético. Desde la extracción de ADN hasta la predicción de patogenicidad de una variante nueva.

3.1 Extracción de ADN genómico

Trabajamos a partir de una muestra de sangre periférica en tubo con anticoagulante EDTA. Desde 400µL de la muestra se extrae el ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico de todos los casos índices mediante el sistema automático de Promega (Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit. **Figura 3**). La técnica se basa en la actuación de unas partículas paramagnéticas que funcionan como una fase sólida móvil que optimiza la captación, lavado y elución del ADN presente en los leucocitos de la muestra.

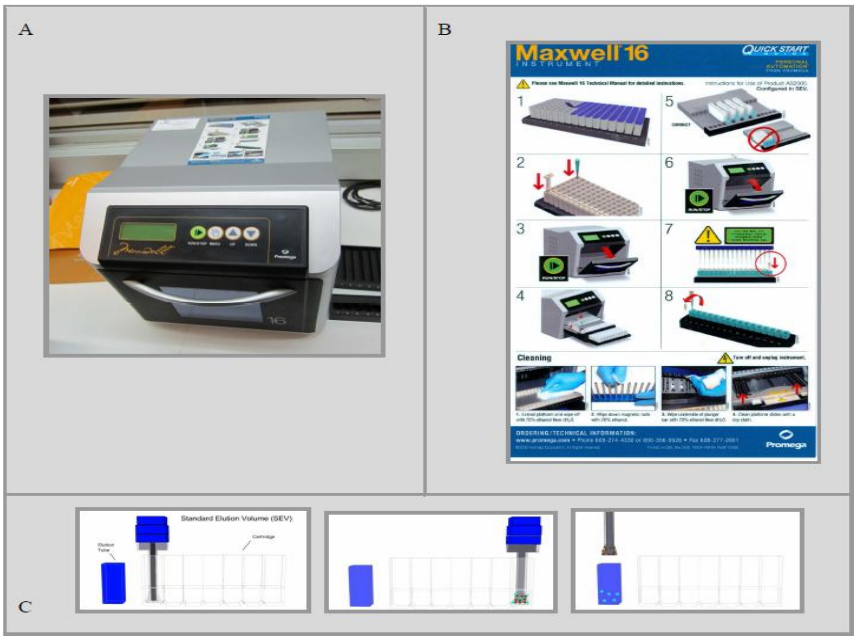


Figura 3. *A Maxwell 16 System. B Guía de utilización del Maxwell 16. C Esquema detalle de la extracción de ADN*

Tras la extracción, se mide la concentración y pureza del ADN mediante espectrofotometría utilizando el equipo de Thermo Scientific, Nanodrop 1000 (**Figura 4**). Las medidas se realizan a una absorbancia (A) de 260 nm, a la que absorben los ácidos nucleicos informándonos de la concentración de ADN en ng/µL. La relación obtenida en-

tre las absorbancias a A_{260}/A_{280} nm determina la calidad del ADN extraído, considerándose un ratio entre 1,5-1,8 como aceptable.

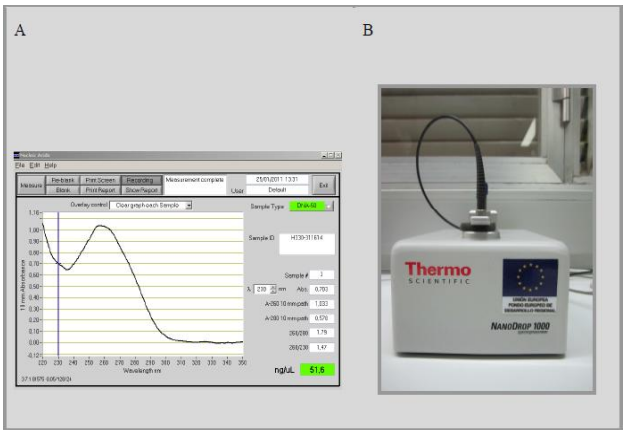


Figura 4. *(A). Curva de absorbancia de una muestra de ADN medida en elNanodrop1000 (Termo.) (B). Nanodrop1000 (Termo)*

.

3.2 Amplificación y purificación de ADN genómico.

Utilizamos como secuencia de referencia la isoforma a, la más larga del gen RAD51C (NM_058216.1, OMIM *602724). Se amplifican cada uno de los 9 exones del gen RAD51C mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Exón	Tª m	Cebador	Tamaño del amplicón (bp)
1	58º	F 5´-T AGCAGAATCTAACGGAGACT-3´ R 5´-ACAAGACTGCGCAAAGCTG-3´	294
2	58º	F 5´- TCCACTCCTAGCATCACTGTT -3´ R 5’- CCCACCCTTAAAAGGAGAAC -3´	399
3	60º	F 5´-TCATGATTTGGTTGTTTGTCATC-3´ R 5´- GGTCTCAGATGGGCACAAAT-3´	274
4	60º	F 5´- TGCCAATACATCCAAACAGG-3´ R 5´- CAGGCAAACGCTATTTTGAC-3´	249
5	60º	F 5´- TCTTGGAGAGAGAGAGCATTTT-3´ R 5´-CAGGCAAACGCTATTTTGAC-3´	299
6	62º	F 5´- TGGGGTTTCACAATCTTGG-3´ R 5´- GTCTGCTTTCATGAAGCGTATAGT-3´	251
7	60º	F 5´- TCTTGGAGAGAGAGAGCATTTT-3´ R 5´- GTCTGCTTTCATGAAGCGTATAGT-3´	243
8	62º	F 5´- ACGGGTAATTTGAAGGGTGT-3´ R 5´- AGCATCAAAAGCTGTCCTCA-3´	362
9	62º	F 5´- GCCTGGCCCTAGAATAAAGT-3´ R 5´- GGTATTTTTCCCATTCACTTCA3-3´	341

Tabla 1*: Cebadores del gen RAD51C*

Los cebadores utilizados para las amplificaciones vienen detallados en la tabla 1, la temperatura de melting media (Tªm) recomendada por el fabricante y el tamaño de los amplicones resultantes.

Las reacciones de amplificación se realizan en un volumen final de 25µL, 5 µmoles de cada dNTP´s (desoxinucleótidos trifosfato: ATP, GTP, CTP, TTP), 50 µmoles Cl_2Mg, 10 µmoles de cada cebador (sentido y antisentido), 0,125 µL Taq, 50 ng ADN **(Tabla 2)**

PCR	**V (µL)**
H_2O	10,875
Buffer (10x)	5,0
DNTP´s	2,5
Cl_2Mg	2,0
Cebardor F + R	1+1
Taq	0,125
DNA	2,5
Vol. total	**25µL**

Tabla 2*. Reacción en Cadena de la Polimerasa*

Se utilizan los modelos de termociclador: 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700 y modelo Veriti de la misma casa. El kit enzimático escogido para las amplificaciones es el kit de Promega Go Taq Hot Start polymerase. La enzima de Promega necesita un tiempo de activación menor que otras de las que están disponibles en el mercado, además reduce la formación de productos inespecíficos y la formación de dímeros de cebadores.

La PCR se realiza en varias fases dentro del termociclador; Primeramente se realiza una fase de reactivación de la polimerasa a 94ºC durante 2´, seguido de un programa de 30-35 ciclos que incluye tres temperaturas: 94ºC 1´ (desnaturalización de hebra molde), 58ºC-62ºC (Tª anillamiento varía en función del cebador) 45´´, 72ºC 45´´ (tiempo de extensión); por último una fase de extensión final 72ºC 7´ y 4ºC indefinidamente. Para agilizar el proceso, se agrupan todos cebadores en 3 temperaturas de hibridación (58ºC, 60ºC y 62ºC).

Para verificar la correcta amplificación de los fragmentos, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2% con tampón TBE 1X (Tris 89mM –ácido bórico 89 mM–EDTA (2mM) a pH8,4. Bio-Rad (161-0770)) utilizando para el revelado GelRed (0,1 μL GelRed/1μL gel) (GelRed Nucleic Acid Gel Satín, 10000X in Water. Catalog number: 41003. Biotium), una solución de tinción fluorescente de ácido nucleico que sustituye al bromuro de etidio, muy tóxico, utilizado habitualmente en los laboratorios de biología molecular para la tinción del el ADN de doble cadena. Se carga aproximadamente 3μL de producto amplificado junto con 1 μL de tampón de carga (0,25% (W/V) azul de bromofenol, 0,25% (W/V) cianol xileno, 30% (V/V) de glicerol en agua). El tamaño de las muestras se comparan con un marcador de tamaño de peso molecular (pGEM DNA Markers. Promega) Se utilizaron para el revelado el trasiluminador Alpha Innotech y la cámara PowerShot A640 AiAF de Canon.

A continuación se purifican los amplicones mediante un método enzimático, con el kit Exosap-It (usb. Affimetrix.). Este kit incluye dos enzimas, la exonucleasa I, que elimina las cadenas simples de ADN residuales que se puedan formar en la PCR o restos de cebadores y una fosfatasa alcalina que elimina los restos de dNTP´s. Se mezclan 5μL del producto de reacción de PCR con 2μL de Exosap-It, se incuba 15´a 37ºC y seguidamente 15´a 80ºC para su inactivación.

3.3 Secuenciación automática directa

Mediante una secuenciación bidireccional podemos detectar alteraciones en la secuencia génica. Realizamos una nueva PCR con el amplicón purificado empleando el Kit BigDye Terminador (BDt) v1.1 de Applied Biosystems, una adaptación de la reacción enzimática dideoxi de Sanger (1977). Las secuencias se analizan por electroforesis capilar en el equipo ABI3130, un analizador de cuatro capilares (Applied Biosystems).

Para la reacción de secuenciación utilizamos los mismos cebadores que para la PCR pero a una concentración de 3,2 μM. Se trabaja con un volumen final de 5 μL; 1,75 μL "Buffer enhancer sequencing" (10X), 1,5 μL agua miliQ, 0,25 μL de BDt v1.1, 0,5 μL cebador ("Forward" o "Reverse" 3,2 μM) y por último 1 μL del producto de PCR **(Tabla 3).**

PCR de secuencicación	Vol (µL)
H_2O	1,5
Buffer enhancer sequencing" (10X)	1,5
BigDye	0,5
Cebador F ó R	0,5
Amplicon purificado	1
Vol. Total	5 µL

Tabla 3: *Reacción de Secuenciación*

El programa del termociclador para la reacción de secuenciación consta de una desnaturalización a 96ºC 1´, seguido de un programa de 25 ciclos de tres temperaturas, 96ºC 10´´, 50ºC 5´´ y 4´ a 60ºC terminando a 4ºC indefinidamente.

3.4 Purificación de la reacción de secuenciación

Tras la reacción de secuenciación se eliminan los restos de dNTP´s sobrantes y posibles impurezas con las columnas EdgeBio (Performa DTR (Dye Terminator Removal) Gel Filtration Cartridges. Este Kit se basa en la descripción de Sambrook et al. (1989) de filtración de ADN en gel para separar fragmentos de más de 16 pares de bases (pb) de restos de dideoxinucleótidos marcados, dNTP´s y otras sales o compuestos de bajo peso molecular (elimina hasta el 98% de sales presentes).

El protocolo a seguir se detalla a continuación. Se centrifugan las columnas a 3000 rpm durante 2 minutos. Se retira el agua restante y colocamos la columna en un vial de 1,5ml nuevo. Añadimos a los 5µL de la reacción de secuenciación 10µL de agua miliQ, el volumen final (15µL) lo depositamos en el centro de la columna. Volvemos a centrifugar a 3000 rpm durante 2 minutos. Se añaden 10 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) que desnaturaliza la doble hebra del ADN, seguidamente se traspasan las muestras purificadas a una placa de 96 pocillos (MicroAmpTM. Optical 96-Well Reaction Plate. ApliedBiosystems) adaptada para el secuenciador.

4. Análisis de los datos

4.1 Alteraciones en la secuencia

El análisis de las secuencias se realiza con los softwares: "SeqScape v2.5™" y "Sequencing Analysis 5.2". Dentro de la secuencia podemos encontrarnos distinto tipos de alteraciones.

- Mutaciones conocidas y publicadas en las distintas bases de datos.
- Variantes de Significado Clínico Incientro (VSCI): aquellos cambios cuya influencia en la susceptibilidad a presentar CMOH no estén aún establecidas.
- Polimorfismos: variantes que no modifican el riesgo de aparición del CMOH.

En todos los casos, las variantes detectadas se consultarán en las bases de datos "Leiden Open Variation Database" (LOVD)(16) y "The Human Gene Mutation Database" (HGMD)(17). Se revisará la información y publicaciones contenidas en las distintos recursos del "National Center for Biotechnology Informatión" (NCBI)(18) para averiguar si han sido descritas con anterioridad y conocer su significado clínico.

En el caso de encontrar una variante génica con sospecha de patogenicidad en un caso índice, tanto conocida como nueva, mediante secuenciación bidireccional, se procederá al estudio del resto de familiares, secuenciando sólo el amplicón donde se detectó la variante.

Cuando detectamos una alteración no conocida podemos utilizar distintas herramientas para intentar esclarecer su implicación clínica:

1. Información Básica:

- <u>Tipo de mutación</u>
  - Silentes: cambio de nucleótido sin cambio de aminoácido, no suelen ser patogénicas (excepto zonas de "splicing")
  - Sin sentido: la introducción de un codón de terminación produce una proteína truncada
  - Sentido erróneo: producen cambio de aminoácido y suelen ser patogénicas pero menos severas
  - Cambio del marco de lectura: inserciones o deleciones que producen proteínas truncadas

- Región del gen y la proteína afectados:
  - Exones > región intrónica flanqueante > intrón
    - Región intrónica. Se tienen en cuenta las que se hallan 30 pb aguas arriba y abajo de la región codificante. Estas variaciones génicas pueden afectar a las zonas de reconocimiento de la maquinaria del corte y empalme, o pueden dar lugar a una posible eliminación o aparición del sitio aceptor o donador de "splicing".
  - Efecto dependiente de la región funcional de la proteína
- Conservación filogenética del aminoácidos:
  - Zonas conservadas entre especies o isoformas.
- Estudios bioinformáticos:
  - Mutaciones de sentido erróneo hay relación con los cambios fisicoquímicos entre aminoácidos: masa, carga, polaridad e hidrofobicidad.
    - Cuando se trata de variantes intrónicas se utilizan programas de análisis como el MaxEnt(19), NNSPLICE(20) y HSF(21).
    - Para el análisis variantes en regiones codificantes usamos los programas bioinformaticos SIFT(22) y Mutation Taster (23) como predictores de patogenicidad.
  - Son estudios indicativos, nunca suficientes para confirmar o descartar patogenicidad
- Estudios funcionales y modelos animales; poco viables en un laboratorio clínico.

2. Información clínica:

- Ausencia en controles sanos: Es importante el estudio de al menos 200 alelos de individuos sanos de la misma población para validar la patogenicidad de las variantes.
- Cosegregación de la mutación con la enfermedad:
  - Valorar los posibles patrones de herencia y los casos de penetrancia incompleta.
  - Dificultad en los casos con varias mutaciones (algunos afectos tendrán sólo una mutación).
- Descripciones previas de la mutación: Información sobre penetrancia, evolución y correlaciones genotipo-fenotipo.

4.2 Análisis de los resultados

Desde el laboratorio clínico se realizará un análisis de los resultados utilizando el programa SPSS v15.0. Las variables cualitativas se presentaran en forma de tabla incluyendo las frecuencias relativas y absolutas Las variables cuantitativas se describirán mediante la media, mediana, la desviación típica, el intervalo de confianza al 95%, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo.

Las condiciones de aplicación de los análisis estadísticos se verificaran previamente a los mismos. La normalidad se contrastará mediante el test de Kolmogorov – Smirnoff y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene. En caso de incumplimiento de alguna de las condiciones se realizará el análisis mediante pruebas no paramétricas.

Se analizarán las mutaciones con el fin de evaluar el perfil mutacional de nuestra población, calculando la prevalencia de éstas.

También se realizará un análisis por subgrupos clínicos (C. mama bilateral/ C. ovario/ C mama y ovario), con el fin de realizar un estudio genotipo-fenotipo.

El estudio de las familias con variantes génicas será importante para recopilar información muy valiosa sobre la prenetrancia de la variante y en consecuencia aportar información muy útil en los modelos de predicción de riesgo.

Dificultades y Limitaciones

- El tamaño muestral necesario para alcanzar todos los objetivos debe ser amplio, por lo que el estudio se puede alargar en el tiempo.
- El estudio abarca un periodo amplio de tiempo, y las determinaciones inmunohistoquímicas sobre tejido tumoral han variado a lo largo de este periodo, por lo que el perfil inmunohistoquímico puede aportar datos diversos según la fecha de estudio.
- La recogida de datos clínicos y demográficos de algunos pacientes puede ser dificultosa por la diversidad de origen de los pacientes. Los pacientes de la consulta de Consejo genético proceden de los distintos hospitales.

Aspectos Éticos

Las características del diseño de nuestro estudio, descriptivo transversal, implican un balance riesgo-beneficio de los pacientes claramente favorable, ya que no se realiza una intervención activa sobre los individuos.

Todos los pacientes incluidos en el estudio deberán cumplimentar una hoja de consentimiento informado, así como los familiares de primer grado a estudiar.

Plan de trabajo

Etapas de desarrollo

Etapa 1: optimización de las condiciones para las distintas técnicas moleculares.

Etapa 2: revisión y selección de los casos retrospectivos de los que se disponga de muestra de calidad en los archivos de Laboratorio de Diagnóstico Genético (LDG)

Etapa 3: puesta en común de los casos índice candidatos a análisis genético en la reunión celebrada semanalmente por el comité de mama.

Etapa 4: se reclutarán pacientes en el apartado prospectivo que cumplan los criterios de inclusión. Estos pacientes serán informados en la Unidad de Consejo Genético por los Facultativos responsables del servicio de Oncologia Médica. Ellos mismos les proporcionaran información sobre los aspectos éticos y la repercusión de las pruebas genéticas. Antes de la extracción de sangre el paciente debe firmar el consentimiento informado.

Etapa 5: recepción de muestras en el LDG y extracción de DNA para la realización de las técnicas moleculares descritas en el apartado de métodos del presente trabajo. En la figura 5 se muestra el diagrama de flujo en el procesamiento de las muestras.

Etapa 6: revisión de la información clínica disponible de los casos retrospectivos y de los incluidos de forma prospectiva durante el desarrollo del proyecto (edad de diagnóstico de la enfermedad, antecedentes familiares, inmunohistoquimica…). Los datos recogidos se incluirán en una base de datos generada específicamente para dicho proyecto.

Etapa 7: procesamiento y análisis de datos.

Etapa 8: elaboración del informe final y publicación de los resultados.

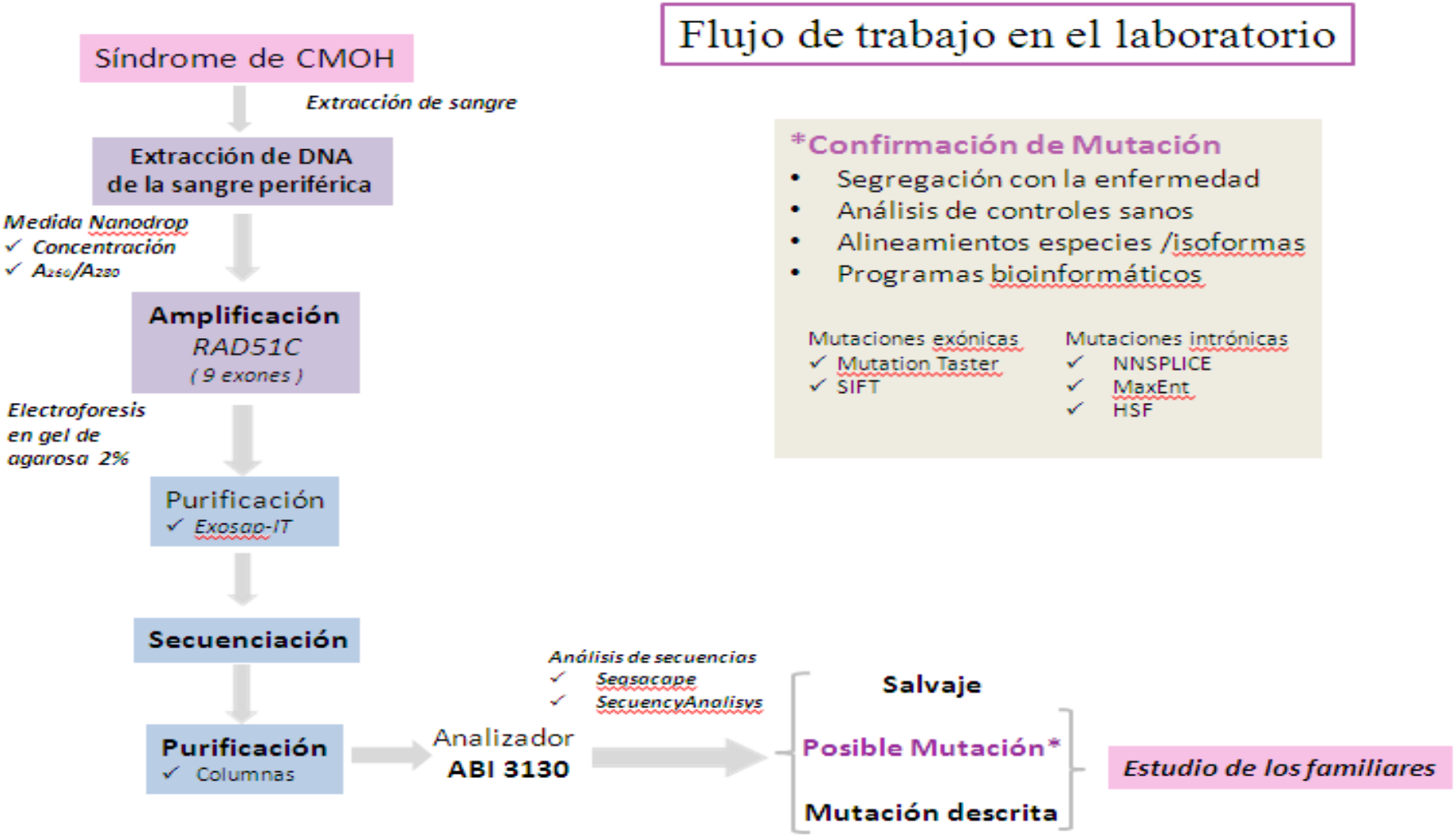


Figura 5: *Diagrama de trabajo*

Distribución de las tareas

- Los experimentos para la extracción de DNA, trascripción y estudio de variables génicas se realizarán por el investigador principal en el Laboratorio de Diagnóstico Genético.
- La revisión de la información clínica disponibles de los casos será recogida por los Facultativos de dicho laboratorio.
- Desde el inicio del estudio se reclutarán pacientes en el apartado prospectivo que cumplan los criterios de inclusión y que firmen el consentimiento informado. Este proceso se llevará a cabo en la Unidad de Consejo Genético asisitida por los Facultativos del servicio de Oncología Médica.
- La revisión de la inclusión de los pacientes se llevará a cabo en la reunión del Comité de mama Multidisciplinar con carácter semanal.
- Tras la elaboración del informe final se comunicarán los resultados en dicha reunión y se pondrá en común la estrategia a seguir.
- Los resultados preliminares que se vayan generando durante el proyecto podrán ser motivo previsible de comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales. En la elaboración de estas comunicaciones participará todo el equipo.
- Durante los últimos dos meses se procederá a la redacción de la memoria final del proyecto y manuscritos con los resultados obtenidos.

Plan de difusión, aplicabilidad y utilidad práctica

Destaca la aplicabilidad de los resultados en la práctica clínica al tratarse de un proyecto de investigación traslacional. La finalidad del proyecto es aportar conocimientos para el manejo clínico de las familias con síndrome de CMOH BRCAX. Los resultados podrán ser útiles en la valoración de *RAD51C* como predictor de riesgo en CMOH y en el diseño de un modelo de predicción de riesgo global con otros genes que nos permita rentabilizar al máximo los recursos para el diagnóstico molecular de mutaciones asociadas al CMOH.

Desde el punto de vista de la evidencia médica es esperable que los resultados preliminares sean motivo de comunicaciones a Congresos nacionales e internacionales. El

número de trabajos y la magnitud del factor de impacto de las revistas dependerán de la dimensión que alcancen los resultados.

Medios disponibles para la realización del proyecto y presupuesto

En lo referente a instalaciones y equipos no se solicita presupuesto con cargo al proyecto, ya que las infraestructuras utilizadas están disponibles en el laboratorio de Diagnóstico Genético del Servicio de AA.CC y permiten la realización de toda la metodología propuesta: Sistema automatizado de extracción de ácidos nucleicos Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit, Thermo Scientific, Nanodrop 1000 , revelado el trasiluminador Alpha Innotech y la cámara PowerShot A640 AiAF de Canon, ABI 3130 Sequence Detector System (Applied Biosystems), termocicladores, analizador genético por electroforesis capilar con software para secuenciación de DNA y análisis de fragmentos, sistemas de electroforesis en gel y equipo de videodocumentación y análisis de imagen, etc.

El presupuesto para la realización de este proyecto se solicita en el apartado de material fungible.

- Reactivos para el procesamiento y extracción de DNA de las muestras biológica…..1000 €
  - Kit de extracción DNA genómico para el sistema automático Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit…….....2 x 500 €
- Reactivos para amplificación, purificación y secuenciación de DNA ……7000 €
  - Oligonucleótidos cebadores…….…….. .603,26 €
  - Taq ADN polimerasa…….……...…...904,67 €
  - Reactivos para purificación de DNA…….……...…2 x 379,00 €
  - Kits de secuenciación Big Dye v1.1……..…….…….....5 x 296,16 €
  - Columna de purificación de productos de secuenciación…….... 2,59 €
  - Placa Purificación de 96 pocillos……..…….…….....20 x 80,08 €
  - Formamida desionizada…….....……..….86,23 €
  - Polímero separador ABI3130 (vPop7)……..……..…….2 x 82,82 €
  - Capilares para el secuenciador ABIPRISM……..……...844.78 €

Bibliografía

1. Graña Suárez B. Síndrome de cáncer de mama/ovario hereditario: desarrollo de una guía clínica y análisis de los genes ATM, TP53 en familias de alto riesgo para cáncer de mama no asociado a BRCA1 y/o BRCA2. 11 de febrero de 2013 [citado 31 de marzo de 2013]; Recuperado a partir de: http://dspace.usc.es/handle/10347/7279

2. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 25 de febrero de 2013;

3. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ. 9 de septiembre de 2000;321(7261):624-8.

4. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet. marzo de 1998;62(3):676-89.

5. Díez O, Gutiérrez-Enríquez S, Ramón y Cajal T. [Breast cancer susceptibility genes]. Med Clínica. 4 de marzo de 2006;126(8):304-10.

6. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science. 7 de octubre de 1994;266(5182):66-71.

7. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature. 21 de diciembre de 1995;378(6559):789-92.

8. Antoniou AC, Hardy R, Walker L, Evans DG, Shenton A, Eeles R, et al. Predicting the likelihood of carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation: validation of BOADICEA, BRCAPRO, IBIS, Myriad and the Manchester scoring system using data from UK genetics clinics. J Med Genet. julio de 2008;45(7):425-31.

9. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. marzo de 2007;18(3):581-92.

10. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science. 30 de noviembre de 1990;250(4985):1233-8.

11. Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, et al. Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. Hum Mol Genet. agosto de 1997;6(8):1383-7.

12. Luis Robles et ál. Cáncer Hereditario II Edicióm.

13. Rebbeck TR, Mitra N, Domchek SM, Wan F, Chuai S, Friebel TM, et al. Modification of ovarian cancer risk by BRCA1/2-interacting genes in a multicenter cohort of BRCA1/2 mutation carriers. Cancer Res. 15 de julio de 2009;69(14):5801-10.

14. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. Nat Genet. mayo de 2010;42(5):410-4.

15. Meindl A, Ditsch N, Kast K, Rhiem K, Schmutzler RK. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts. Dtsch Ärzteblatt Int. mayo de 2011;108(19):323-30.

16. Home - LOVD - An Open Source DNA variation database system [Internet]. [citado 4 de julio de 2013]. Recuperado a partir de: http://www.lovd.nl/3.0/home

17. HGMD® home page [Internet]. [citado 4 de julio de 2013]. Recuperado a partir de: http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php

18. National Center for Biotechnology Information [Internet]. [citado 3 de septiembre de 2013]. Recuperado a partir de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

19. MaxEntScan::scoresplice [Internet]. [citado 6 de agosto de 2013]. Recuperado a partir de: http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html

20. BDGP: Splice Site Prediction by Neural Network [Internet]. [citado 6 de agosto de 2013]. Recuperado a partir de: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

21. Human Splicing Finder - Version 2.4.1 [Internet]. [citado 6 de agosto de 2013]. Recuperado a partir de: http://www.umd.be/HSF/

22. SIFT - Tool to predict nonsynonmous / missense variants [Internet]. [citado 6 de agosto de 2013]. Recuperado a partir de: http://sift.bii.a-star.edu.sg/

23. MutationTaster [Internet]. [citado 24 de julio de 2013]. Recuperado a partir de: http://www.mutationtaster.org/

24. Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review). Oncol Rep. 19 de junio de 2013;

25. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. Nat Genet. mayo de 2010;42(5):410-4.

26. Osorio A, Endt D, Fernández F, Eirich K, de la Hoya M, Schmutzler R, et al. Predominance of pathogenic missense variants in the RAD51C gene occurring in breast and ovarian cancer families. Hum Mol Genet. 1 de julio de 2012;21(13):2889-98.

27. Lu W, Wang X, Lin H, Lindor NM, Couch FJ. Mutation screening of RAD51C in high-risk breast and ovarian cancer families. Fam Cancer. septiembre de 2012;11(3):381-5.

28. Kushnir A, Laitman Y, Shimon SP, Berger R, Friedman E. Germline mutations in RAD51C in Jewish high cancer risk families. Breast Cancer Res Treat. diciembre de 2012;136(3):869-74.

29. Zhu W, Michael CW. WT1, monoclonal CEA, TTF1, and CA125 antibodies in the differential diagnosis of lung, breast, and ovarian adenocarcinomas in serous effusions. Diagn Cytopathol. junio de 2007;35(6):370-5.

30. Romero A, Pérez-Segura P, Tosar A, García-Saenz JA, Díaz-Rubio E, Caldés T, et al. A HRM-based screening method detects RAD51C germ-line deleterious mutations in Spanish breast and ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat. octubre de 2011;129(3):939-46.

31. Vuorela M, Pylkäs K, Hartikainen JM, Sundfeldt K, Lindblom A, von Wachenfeldt Wäppling A, et al. Further evidence for the contribution of the RAD51C gene in hereditary breast and ovarian cancer susceptibility. Breast Cancer Res Treat. diciembre de 2011;130(3):1003-10.

Anexo I:

Consentimiento informado

Espacio reservado para la etiqueta identificativa

Consentimiento informado para la realización de pruebas genéticas de cáncer hereditario

UNIDAD DE CONSEJO GENÉTICO DE CÁNCER HEREDITARIO

SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA

Introducción

Este formulario describe los beneficios, riesgos y limitaciones de las pruebas genéticas de susceptibilidad heredada al cáncer. Ésta es una prueba voluntaria y es posible que usted desee obtener asesoramiento genético antes de firmar este formulario.

El propósito de esta información no es preocuparle ni liberar de responsabilidad al médico. Simplemente representa un esfuerzo para que usted conozca mejor los hechos y pueda tomar la decisión libre y voluntaria, de autorizar o rechazar dicho procedimiento.

Debe saber usted que es una norma de obligado cumplimiento para el/la médico que le atiende, informarle y solicitar su autorización o rechazo siempre que la urgencia lo permita.

¿Para qué se hace?

Esta prueba analiza un gen o genes específicos para detectar cambios genéticos denominados mutaciones. El gen o los genes analizados se asocian a un síndrome específico de cáncer hereditario.
Esta prueba ayudará a determinar si una persona tiene un riesgo significativamente mayor de desarrollar ciertos tumores debidos a una mutación (o mutaciones) del gen de predisposición al cáncer.
Las pruebas genéticas permiten calcular el riesgo de cáncer hereditario de manera más precisa que el que se logra considerando sólo los antecedentes personales y familiares de la persona.

¿Qué le vamos a hacer?

Para este estudio se le extraerá sangre para llenar un tubo de ensayo que se analizará en un laboratorio de este centro. En algunas ocasiones es posible que sea necesario que esta muestra sea enviada a otro laboratorio de referencia para completar el estudio.

¿Qué beneficios se esperan obtener de este procedimiento?

Los resultados de esta prueba podrían ayudarle a usted y a su médico a tomar decisiones informadas sobre su atención médica, tales como pruebas de detección, cirugías para reducir el riesgo y estrategias de tratamiento con fármacos con finalidad preventiva.

La identificación de una mutación (o mutaciones) en un gen en una familia permite que otros familiares consanguíneos determinen si comparten o no el mismo riesgo de cáncer hereditario. Si obtiene un resultado positivo, se le proporcionará la información de cómo se hereda este tumor y de la probabilidad de que sus hijos y parientes consanguíneos puedan haber heredado la misma mutación (o mutaciones) en el gen o genes analizados.

Si obtiene un resultado negativo para una mutación que se sabe que existe en su familia, no puede transmitir esta mutación a sus hijos y por lo general, se considera que usted tiene el mismo riesgo de cáncer que la población general.

¿Qué riesgos tiene?

Las pruebas genéticas por lo general requieren que el ADN se extraiga de una muestra de sangre. Los efectos secundarios de una extracción de sangre son poco comunes pero podrían incluir: mareos, desmayos, dolor, hemorragia, formación de hematomas, y en raras ocasiones, infección.

Los resultados de esta prueba serán comunicados exclusivamente a usted y serán custodiados por el Hospital para evitar cuestiones relativas a una posible discriminación por parte de sistemas de seguro médico.

Limitaciones

Esta prueba analiza sólo algunos genes asociados a un síndrome o síndromes específicos de cáncer hereditario. Las pruebas genéticas determinan el riesgo de cáncer sólo para aquellos tipos de cáncer asociados a los genes que se analizan.

Resultados de la prueba e interpretación

Los resultados de su prueba deben evaluarse teniendo en cuenta los antecedentes clínicos personales y familiares, los resultados del examen físico y las pruebas de laboratorio y diagnósticas pertinentes. Los resultados posibles son:

- ***Positivo***: se identificó una mutación asociada a un mayor riesgo de cáncer hereditario. Conocer esta información podría ayudarle a usted y a su médico a tomar decisiones sobre su atención médica, tales como pruebas de detección, cirugías para reducir el riesgo y estrategias de tratamiento con fármacos con finalidad preventiva.

- ***Negativo***: no se identificó ninguna mutación.
    - Si usted es la primera persona de su familia en someterse a la prueba, corre al menos el mismo riesgo que la población general. Aún así, su riesgo de cáncer hereditario podría ser mayor al promedio debido a una predisposición genética no detectable mediante esta prueba, ya sea en el gen o genes analizados o en cualquier otro gen asociado con el cáncer hereditario.
    - Si obtiene un resultado negativo para una mutación que se sabe existe en su familia, se considera que usted tiene el mismo riesgo que la población general.

- ***Incierto***: se detectó un cambio genético pero no se sabe si este cambio está asociado al riesgo de cáncer. Su riesgo de cáncer es al menos igual al de la población general. Además, su riesgo podría ser todavía más elevado que el promedio debido a este cambio o a una predisposición genética no detectable por esta prueba, ya sea en el gen o los genes analizados o en otro gen asociado al cáncer hereditario.

Los resultados de las pruebas genéticas tienen consecuencias para los parientes consanguíneos. Con el respaldo de esta Unidad de Consejo Genético, usted podría evaluar la posibilidad de compartir sus resultados con algunos de sus parientes consanguíneos que podrían también estar en riesgo. Si decide hacerlo debería evaluar la mejor forma de dar a conocer esta información, para lo cual también le ofrecemos nuestro apoyo profesional.

La no realización de este procedimiento supone tener que basarnos en los antecedentes personales o familiares para intentar hacer una aproximación al riesgo personal de padecer un cáncer aparentemente hereditario. Estas aproximaciones son menos precisas que las basadas en estudios genéticos y dificultan la toma de decisiones posterior para el seguimiento u otras medidas preventivas.

¿Qué alternativas hay?

La alternativa a la realización de estudios genéticos es la aproximación al riesgo basada en el estudio de los antecedentes personales y familiares, aunque los resultados son menos precisos que los proporcionados por estos estudios genéticos cuando están indicados.

Puede usted ampliar la información todo lo que desee, así como consultar cuantas dudas tenga, y además puede revocar el consentimiento en el momento que usted lo considere oportuno.

Yo _____ como paciente.

Yo _____ como representante legal del paciente_____

AUTORIZO a la Unidad de Consejo Genético del Cáncer Hereditario del Servicio de Oncología Médica a realizar el ESTUDIO GENÉTICO DE CÁNCER HEREDITARIO previamente descrito. He sido informado/a verbalmente y por escrito de su naturaleza, riesgos y posibles alternativas, y he recibido las aclaraciones a mis dudas por parte de mi médico.

El Paciente:

DNI:

El Representante Legal:

DNI:

El Médico:

Nº Colegiado:

Murcia, a de de

Anexo II: Resultados

Hasta este momento hemos realizando el estudio de forma retrospectiva sobre parte de los 213 casos índice con sospecha de síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (CMOH) seleccionados durante los años 2007-2012 por la Unidad de Consejo Genético del Servicio de Oncología. En la Figura 1 se especifican los resultados obtenidos tras el estudio de los genes *BRCA1, BRCA2 y CHEK2*. En total se han encontrado mutaciones de estos genes en 42 familias, siendo el 19.72% de los casos. Este dato es de especial relevancia ya que nos muestra que estamos acorde con las evidencias médicas de los últimos años, siendo muchos los estudios epidemiológicos que cifran los casos de CMOH asociados a mutaciones en los genes *BRCAs* solo en un 20% de los casos(24)(15). También podemos observar un porcentaje similar de mutaciones en *BRCA1 y BRCA2.*

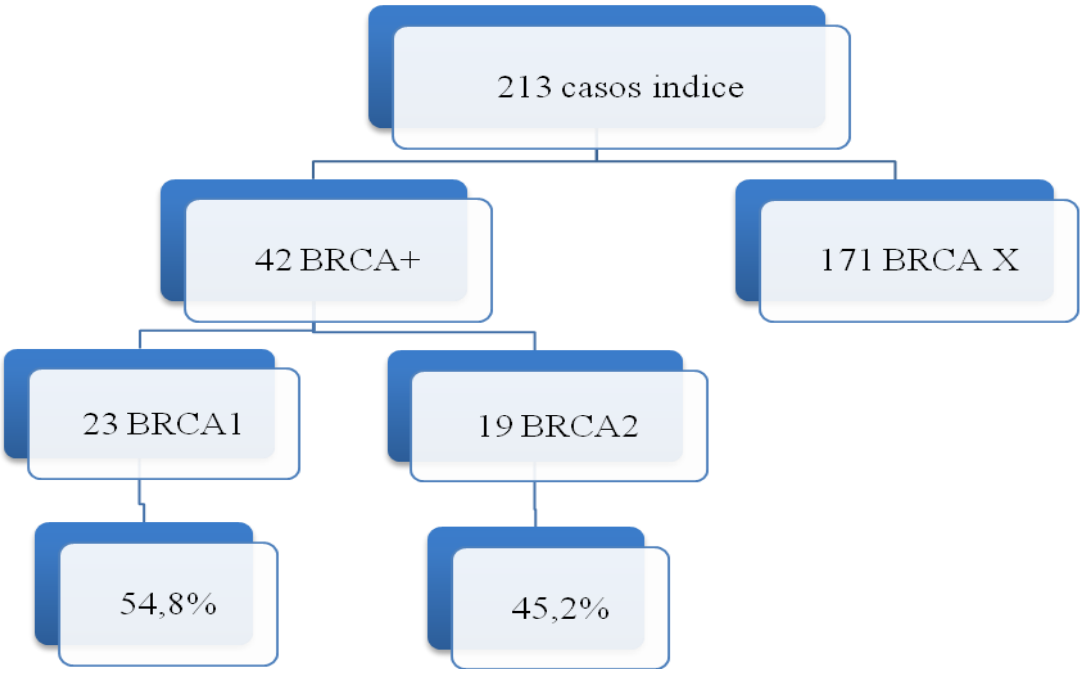


***Figura 1**. Análisis de BRCA.*

Entre los meses de Enero a Junio, se ha realizado el estudio del gen *RAD51C* a 24 familias de las 171 *BRCAX*. Todas ellas cumplían criterios de alto riesgo de CMOH y no eran portadoras de ninguna variante en *BRCA1, BRCA2 o CHEK2* descrita, hasta el momento, como mutación en las bases de datos consultadas.

Comenzamos el estudio por familias, según recomendaciones de la bibliografía consultada(25)(26), en las que coexistía el CM y CO, en ocasiones presentados por un mismo individuo. Este tipo de familias fueron clasificadas como tipo 1.

Se clasificó como familias tipo 2 aquellas en las que se daban menos de 3 casos de CM, como tipo 3 en las que había más de 3 casos de CM, tipo 4 solo un caso de CM siendo algunos cáncer de mama bilaterales (bCM) y tipo 5 casos de CO. En la **tabla 1** se muestra la distribución seguida hasta ahora.

Tipo de familia	Frecuencia	Porcentaje (%)
Tipo 1 (CM+ CO)	13	54.2
Tipo 2 (<3CM)	1	4.2
Tipo 3 (>3CM)	4	16.7
Tipo 4 (CM)	2	8.3
Tipo 5 (CO)	4	16.7

***Tabla1**: Familias estudiadas*

En la **tabla 2** se especifica la edad media de diagnóstico de los casos índice analizados agrupados en función del tipo de cáncer. Los análisis estadísticos están realizados con el programa SPSS. Al tener un tamaño muestral (n) pequeño, trabajamos con las variables de forma no paramétrica, por lo que expresamos resultados con mediana y percentiles 25 y 75.

Cáncer probando	Número de casos	Edad de Dx (años)	Percentil 25	Percentil 75
CM<40	4	33,5	33	37.75
CM	4	45	42,75	52,75
bCM	1	48	48	48
CO	10	38	29	52
CMO	5	53	42.5	66
Total	24	43,5	33.25	52,50

***Tabla2**: Casos estudiados*

Variantes encontradas

En estas 24 familias se encontraron 4 variantes génicas en total (detalladas en la **tabla 3**). Dos de estas variantes se encuentran en regiones intrónicas y están descritas en la base de datos de SNP del NCBI como clínicamente neutrales porque no se prevé que afecten al proceso de splicing (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/). Las otras dos variantes encontradas se encuentran en regiones exónicas y están descritas en la bibliografía como patogénica (exón 2 c.404C>T) y neutral (exón 6 c.859T>C). Aunque es pronto para poder sacar conclusiones, el hallazgo de una variante patogénica nos sitúa en una frecuencia mutacional de 4%, porcentaje que se prevé sobreestimado al tener un tamaño muestral pequeño.

Exón	Cambio nucleótido	Cambio proteína	Descrita previamente	Fenotipo familiar	MAF	SIFT	Mutation taster	Significado clínico
5´UTR	c.-26C>T	-	Rs12946397	-	0.184	-	-	No
2	c.404C>T	p.Cys135Tyr	CM125259	CM/CO		Deleterea	Causante enfermedad	Sí
6	c.859 A>G	p.Thr287Ala	Rs28363317	CM/CO	0.006	Tolerada	Causante de enfermedad	Incierto
IVS6	c.904+34T>C	-	RS28363318		0.224	-	-	No

***Tabla 3**: variantes en RAD51C*

Caracterización de las variantes exónicas

➢ c.404C>T : Patogénica

- Este cambio de base en el exón 2 es una variante missense que produce un cambio en la síntesis de proteína. El aminoácido 135 cambia de cisteína a treonina (C135Y).

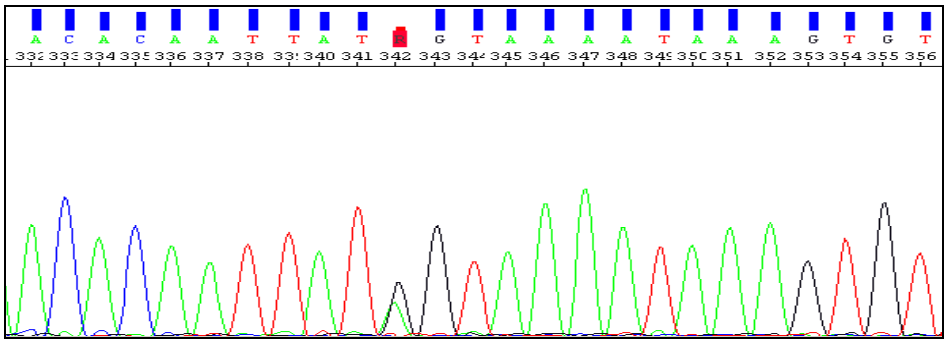


***Figura** 2: variante c.404C>T*

- Esta variante está descrita en la base de datos HGMD como causante de enfermedad. En la base de datos LOVD no está registrada.
- Un importante estudio, realizado en familias españolas, describe por primera vez esta variante donde está catalogada como clínicamente importante(26). En este trabajo se caracteriza esta mutación mediante un ensayo funcional donde se evalúa el potencial de la célula para ejercer la reparación del ADN. El ensayo se basa en la comparación de la formación de focos o agrupaciones de proteína *RAD51C* en núcleos de fibroblastos, obteniendo como resultado una pérdida de expresión de *RAD51C* en la población celular modificada genéticamente. En la **figura 3** se observan los distintos niveles de expresión. Imagen "A", una célula nativa e imagen "B" una célula con una expresión de *RAD51C* menor.

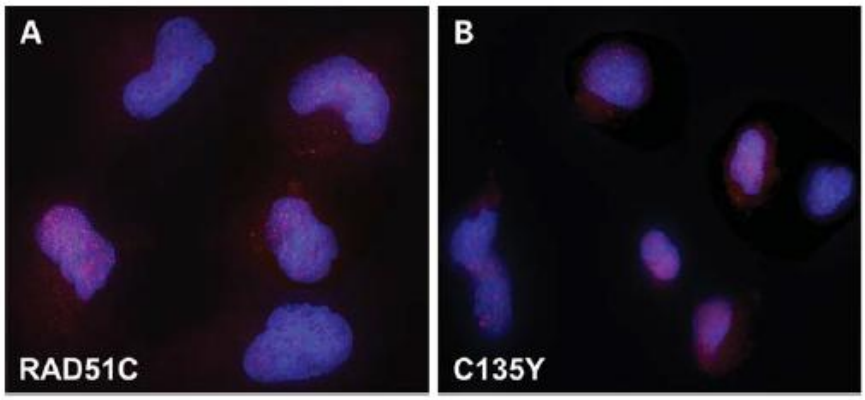


***Figura 3**: Diferentes grados de expresión de RAD51C en fibroblastos. (A) células wildtype muestran más del 50% (3 de 5) núcleos con más de 10 focos por núcleo. (B) células parcialmente complementadas con RAD51C missense (C135Y), muestran menos del 50% (3 de 7) con un menor número de focos por núcleo.*

- Estudios bioinformáticos. Programas "in silico":
  - Mutatión Taster: Causante de enfermedad por la alteración en la funcionalidad de la proteína e incluso se prevé que forme un transcrito aberrante al producir una alteración en el sitio donador de splicing.
  - SIFT: Deletérea
  - Programas de predicción de splicing: Predicen la pérdida del sitio donador de splicing con una probabilidad media de -70.7%.
    - MaxEnt: -100%
    - NNSPLICE:-98.9%
    - HSF:-13.3%

➢ c.859 A>G : VSCI

- Este cambio de base en el exón 6 produce un cambio en la síntesis de proteína. El aminoácido 287 cambia de treonina a alanina (T287A).

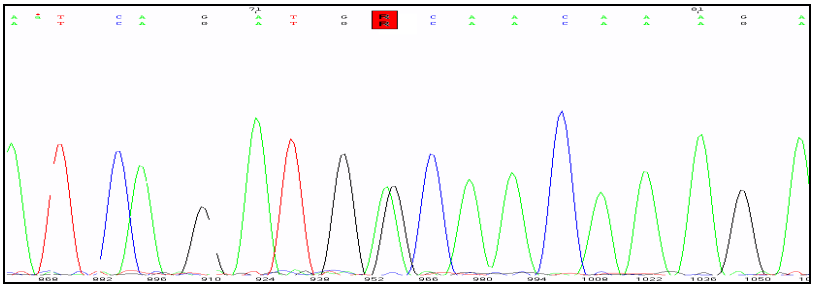


Figura 4: *Variante c.859A>G*

- Esta variante esta descrita en la base de datos HGMD como variante de significado clínico incierto. En la base de datos LOVD, también está descrita como variante de efecto desconocido.
- Se encuentra descrita en la base de datos dbSNP, con una frecuencia alélica de 0.006/12. Esto significa que el alelo "G" se ha visto con una frecuencia del 0.6% y que se ha visto 12 veces en una población de 1000 individuos.
- En la bibliográfica consultada se encuentran discrepancias:
  - El grupo de Meindl y col. analizó esta y otras variantes "missenses" o cambio de sentido mediante inmunofluorescencia, comparando la formación de focos de proteína RAD51C en células no modificadas y en células con variantes inducidas en *RAD51C*. La variante T287A mostraba una disminución de la supervivencia celular, pero una formación normal de focos de RAD51C. En este mismo estudio no se encontró ninguna asociación de estas variantes con el cáncer en 1.100 individuos afectados comparado con 2.912 controles sanos(25).
  - En otro trabajo publicado por Lu Wenping y col. en 2011 se identifica esta variante en 6 pacientes en una cohorte de 192 familias estudiadas. A pesar de la predicción de perdida de funcionalidad por parte de programas bioinformáticos como PolyPhen, hace referencia al ensayo funcional de Meindl y col y a su estudio casos-control, concluyendo que esta variante no aumenta el riesgo a cáncer de mama(27).

- El grupo de Kurhnir y col. publica en 2012 el hallazgo de esta variante en una mujer de etnia Norteafricana-Balcánica diagnosticada de CM a los 46 años. Su madre y abuela materna habían sido diagnosticadas de CM a la edad de 40 y 50 años respectivamente. No fue posible realizar estudios de cosegregación. No se encontró esta variante en ninguno de los 140 controles sanos de la misma etnia. El estudio concluye que la variante missense T287A puede ser una mutación recurrente en *RAD51C* en diversas poblaciones(28).

- Estudios Bioinformaticos:
  - Mutation taster: Causante de enfermedad.
  - SIFT: Tolerada

❖ Estudio de conservación filogenético

A continuación se muestra el alineamiento entre especies de la proteína RAD51C en las regiones en las que se encuentran las variantes encontradas (Cys135Tyr y Thr287Ala) obtenido de la base de datos HomoloGen perteneciente al ncbi (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene). En ambos casos son aminoácidos altamente conservados entre especies (**Figura 5**). Se resalta con sombreado la posición donde se ha detectado el cambio. Por orden de aparición: ref/NP_001006101.1/[D.rerio], ref/XP_415870.3/[G.gallus], ref/XP_001104781.2 /[M.mulatta], ref/XP_511913.3 [P.troglodytes], ref/NP_478123.1/ [H.sapiens].

C135Y

```
NP_001006101.1   73 ALDLLHQEQTLGSIVTFCSGLDDAIGGGVPVGKTTEICGAPGVGKTQLCM 122
XP_415870.3      78 ALELLEEEQTQGFIITFCSALDNILGGGVQLTKITEICGAPGVGKTQLCM 127
XP_001104781.2   78 ALELLEQEHTQGFIITFCSALDDILGGGVPLMKTTEICGAPGVGKTQLCM 127
XP_511913.3      78 ALELLEQEHTQGFIITFCSALDDILGGGVPLMKTTEICGAPGVGKTQLCM 127
NP_478123.1      87 ALELLEQEHTQGFIITFCSALDDILGGGVPLMKTTEICGAPGVGKTQLCM 136
```

T287A

```
NP_001006101.1  270 TTRVSNGQSKLVPALGESWGHAATQRLILHWEGQRRLASLYKSPSQMEAT 319
XP_415870.3     278 TTRFGQNQSMLVPALGESWGHAATVRLIFHWDNTQRLATLYKSPSQKEST 327
XP_001104781.2  278 TTKIDKNQALLVPALGESWGHAATIRLIFHWDRKQRLATLYKSPSQKEST 327
XP_511913.3     278 TTKIDRNQALLVPALGESWGHAATIRLIFHWDRKQRLATLYKSPSQKECT 327
NP_478123.1     287 TTKIDRNQALLVPALGESWGHAATIRLIFHWDRKQRLATLYKSPSQKECT 336
```

Figura 5: *Por orden de aparición: ref/NP_001006101.1/[D.rerio], ref/XP_415870.3/ G.gallus, ref/XP_001104781.2 /[M.mulatta], ref/XP_511913.3 [P.troglodytes], ref/NP_478123.1 [H.sapiens*].

Caracterización de las variantes intrónicas

- **c.- 26C>T**
  - Esta variante se encuentra en la región previa al exón 1 (rs12946397)
  - Se encuentra descrita en la base de datos dbSNP, con una frecuencia alélica de 0.184/400. Esto significa que el alelo "T" se ha visto con una frecuencia del 18.4 % y que se ha observado 400 veces en una población de 1058 individuos.
  - Esta descrita en la bibliografía como clínicamente no importante.
- **IVS6+34T>C**
  - Esta variante génica se encuentra en la región intrónica tras el exón 6 (rs28363318).
  - Esta descrita en la base de datos dbSNP, con una frecuencia alélica de 0.224/488, lo que significa que el alelo "C" se encuentra en una frecuencia del 22.4% y que se ha visto 488 veces en una población de 1059 individuos.
  - Está descrita en la bibliografía como variante clínicamente no importante.

Estudio familiar

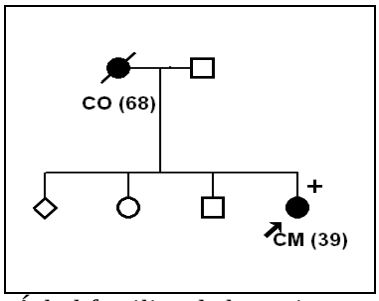


Figura 6: *Árbol familiar de la variante c.859A>G*
Entre paréntesis la edad de diagnostico

El caso índice de la familia T287A (**Figura 6**) es una mujer portadora en heterocigosis del cambio c.859A>G. Fue diagnosticada de cáncer de mama a los 39 años. El diagnóstico y tratamiento fue realizado en Madrid, por lo que la información de la que disponemos es menor. Sabemos que es un CM de estadio T_2 N_0 M_0 y que no recibió hormonoterapia, por lo que suponemos no expresaba receptores hormonales. Su madre fue diagnosticada de CO a la edad de 68. El hallazgo de esta variantes es muy reciente, pero estamos a la espera de ampliar la información así como el estudio genético familiar con el fin de obtener más datos a sobre la cosegregación de esta variante con la enfermedad.

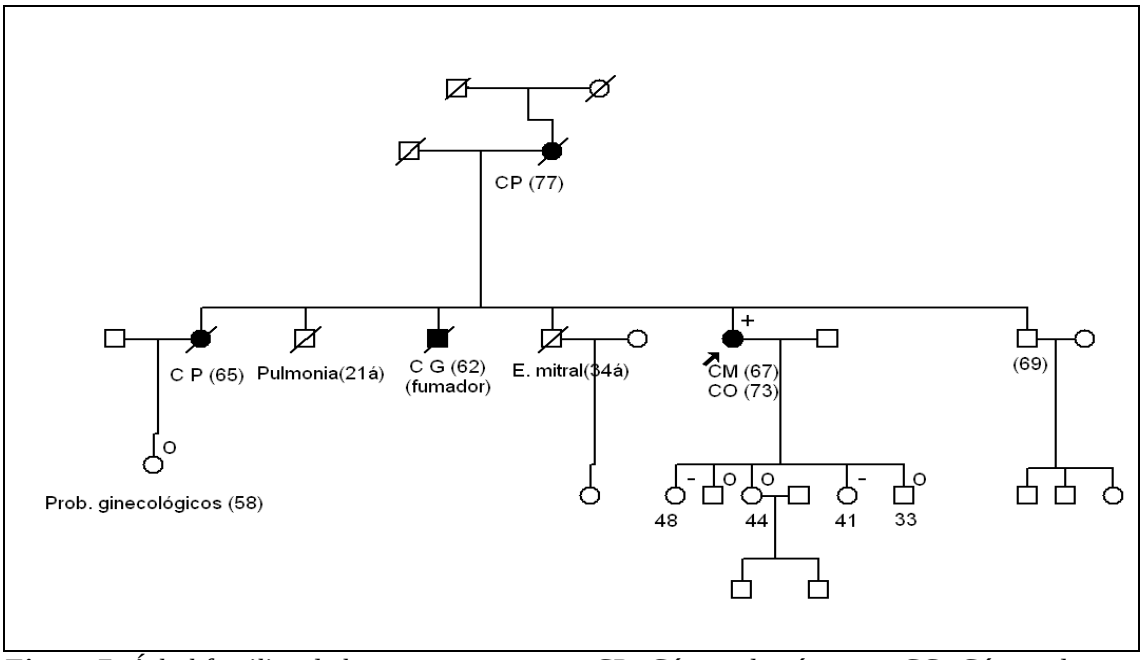


***Figura 7**: Árbol familiar de la variante c.404C>T. CP: Cáncer de páncreas. CG: Cáncer de garganta. CM: Cáncer de mama. CO: cáncer de ovario. Entre paréntesis la edad de diagnóstico.*

El caso índice de esta familia (**Figura 7**) es una mujer de 74 años portadora en heterocigosis de la variante génica c.404C>T que codifica el cambio C135T en la proteína. Esta mujer fue diagnosticada a los 67 años de un cáncer de mama que presentaba receptores estrogénicos negativos, progestágenos negativos, androgénicos negativos y Her2 neu negativo (RE-/RP-/RA-/HER-). A la edad de 73 años se le ha diagnosticado un cáncer de ovario considerado un tumor diferente y no una metástasis de tejido mamario ya que presentaba un patrón fenotípico distinto (RE+60-70%/WT1+/GDCFP15-). Receptores estrogénicos positivos, con una expresión del 70%, factor WT1 (Antígeno 1 del tumor de Wilm) positivo, considerado un factor específico de tejido ovárico(29). La determinación de GDCFP15 (marcador de diferenciación apocrina expresado en el 77% de los cáncer de mama) fue negativa (8). Su madre y su hermana murieron de cáncer de páncreas a la edad de 77 y 65 años, respectivamente. Un hermano sufrió cáncer de garganta a los 62 años. De momento, se han incluido en el estudio dos hijas de la probando de 48 y 41 años que no han presentado hasta el momento patología siendo el resultado del estudio genético negativo para la mutación. Está pendiente ampliar el estudio al resto de hijos y hermanos.

Discusión

Acorde con otros estudios epidemiológicos, el análisis realizado a nuestros pacientes seleccionados según los criterios de riesgo de síndrome de CMOH, ha demostrado que los genes *BRCA1* y *BRCA2* se asocian a una proporción de casos de cáncer de mama y ovario hereditarios de aproximadamente el 20%. Es importante recordar, que una proporción significativa de familias con agregación familiar y una aparente predisposición génica no puede explicarse mediante alteraciones de estos genes. Es por eso que, múltiples grupos trabajan sobre otros genes que puedan asociarse a este síndrome. El primer estudio en el que se evidenció una asociación del gen *RAD51C* con la susceptibilidad al CM y CO fue publicado por Meindl y col. en 2010, mostrando una frecuencia mutacional en familias con CMOH de 1,3 %(14). Este descubrimiento motivó otros trabajos durante los últimos años, con el objetivo de confirmar esta observación en diferentes poblaciones. Sin embargo, algunos de estos estudios han detectado mutaciones en un número claramente menor al descrito inicialmente(30)(31). En nuestro estudio, hemos realizado el análisis de este gen a 24 familias encontrando 4 variantes génicas descritas anteriormente en población Española. Se trata de 2 variantes intrónicas, c.-26C>T y IVS6+34T>C, categorizadas como polimorfismos y dos variantes exónicas, c.404C>T y c.859T>C, caracterizadas como patogénica e incierta respectivamente. Aunque es pronto para poder sacar conclusiones, el hallazgo de una variante patogénica nos sitúa en una frecuencia mutacional del 4%, porcentaje que se prevé sobreestimado al tener un tamaño muestral pequeño.

La mutación c.404C>T ha sido descrita en una probando con CMO en concordancia con otros estudios publicados, donde se demuestra un mayor porcentaje de mutaciones de *RAD51C* en familias en las que coexiste el cáncer de mama y el de ovario.

Estos resultados nos impulsan a seguir con el estudio con el fin de aportar información sobre la implicación de este gen en el síndrome de CMOH y así poder realizar una adecuada evaluación sobre la inclusión de este test genético en nuestra práctica clínica.

Bibliografía

1. Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review). Oncol Rep. 19 de junio de 2013;
2. Meindl A, Ditsch N, Kast K, Rhiem K, Schmutzler RK. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts. Dtsch Ärzteblatt Int. mayo de 2011;108(19):323-30.
3. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. Nat Genet. mayo de 2010;42(5):410-4.
4. Osorio A, Endt D, Fernández F, Eirich K, de la Hoya M, Schmutzler R, et al. Predominance of pathogenic missense variants in the RAD51C gene occurring in breast and ovarian cancer families. Hum Mol Genet. 1 de julio de 2012;21(13):2889-98.
5. Lu W, Wang X, Lin H, Lindor NM, Couch FJ. Mutation screening of RAD51C in high-risk breast and ovarian cancer families. Fam Cancer. septiembre de 2012;11(3):381-5.
6. Kushnir A, Laitman Y, Shimon SP, Berger R, Friedman E. Germline mutations in RAD51C in Jewish high cancer risk families. Breast Cancer Res Treat. diciembre de 2012;136(3):869-74.
7. Zhu W, Michael CW. WT1, monoclonal CEA, TTF1, and CA125 antibodies in the differential diagnosis of lung, breast, and ovarian adenocarcinomas in serous effusions. Diagn Cytopathol. junio de 2007;35(6):370-5.
8. Lerwill MF. Current Practical Applications of Diagnostic Immunohistochemistry in Breast Pathology: Am J Surg Pathol. agosto de 2004;28(8):1076-91.
9. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. Nat Genet. mayo de 2010;42(5):410-4.
10. Romero A, Pérez-Segura P, Tosar A, García-Saenz JA, Díaz-Rubio E, Caldés T, et al. A HRM-based screening method detects RAD51C germ-line deleterious mutations in Spanish breast and ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat. octubre de 2011;129(3):939-46.
11. Vuorela M, Pylkäs K, Hartikainen JM, Sundfeldt K, Lindblom A, von Wachenfeldt Wäppling A, et al. Further evidence for the contribution of the RAD51C gene in hereditary breast and ovarian cancer susceptibility. Breast Cancer Res Treat. diciembre de 2011;130(3):1003-10.