



Facultad de Ciencias de la Salud

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE
SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE
MAMA-OVARIO FAMILIAR**

Autores:

Paula Arbelo Pérez

Helena Martín Ávila

Carmen Rodríguez Barrios

Tutora:

Felicitas Díaz-Flores Estévez

Unidad de Diagnóstico Molecular,
Hospital Universitario de Canarias

Tenerife
Mayo 2019

ÍNDICE

ÍNDICE	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVO	14
MATERIAL Y MÉTODOS	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28
¿QUÉ HEMOS APRENDIDO REALIZANDO EL TFG?	30

RESUMEN

A pesar de la que la mayoría de los cánceres de mama se desarrollan en mujeres sin antecedentes familiares, entre un 15-20% de los casos se asocian con antecedentes familiares, denominándose cáncer de mama familiar (CMF). Además, entre un 5-10% de los cánceres de mama se consideran hereditarios y atribuibles a mutaciones en genes de herencia autosómica dominantes con penetrancia elevada, principalmente BRCA1 y BRCA2. Cuando una familia reúne criterios de CMO hereditario, se selecciona el caso índice y se analizan mediante secuenciación NGS las variantes en estos genes.

Desde enero de 2012, estos estudios se realizan rutinariamente en la Unidad de Diagnóstico Molecular del HUC. En un 14.5 % de los 860 casos estudiados se ha detectado una variante de significado desconocido (VSD), que son aquellas que no cuentan con evidencia científica suficiente para establecer las implicaciones funcionales y/o clínicas, debiéndose reclasificar en el futuro como patogénicas o benignas, recomendándose un control regular de la evidencia científica.

El objetivo de este proyecto es la reclasificación de todas las variantes de significado desconocido (VSD) informadas desde enero de 2012 por la unidad de Diagnóstico Molecular del Complejo Hospitalario Universitario de Canarias en cáncer de mama-ovario, con el empleo de bases de datos poblacionales, clínicas, bibliográficas y herramientas in silico., con el fin de redefinir su patogenicidad.

ABSTRAC

Despite the fact that most breast cancers develop in women with no family history, between 15-20% of cases are associated with family history, being called Familiar Breast Cancer (FBC). 5-10% of cases of breast-ovarian cancer (BOC) have an hereditary component that can be related to mutations inherited from DA in susceptibility genes, mainly BRCA1 and BRCA2. When a family has the hereditary BOC criteria, the index case is selected and the variants in these genes are analyzed by NGS sequencing. Since January 2012, these studies are routinely performed in the Molecular Diagnostic Unit of the HUC. In 14.5 % of the 860 cases, a variant of unknown significance (VUS) has been detected, they are the ones that not have enough scientific evidence to clasificate them as pathogenic or benign.

The purpose of this project is the reclassification of variants of unknown significance (VUS) reported since January 2012 by the Molecular Diagnostic Unit of the University Hospital of

the Canary Islands in breast-ovarian cancer, with the use of population, clinical, bibliographic and in silico databases, in order to redefine their pathogenicity.

PALABRAS CLAVE: Cáncer de mama ovario hereditario, BRCA1 Y BRCA2, Variantes de significado incierto

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en mujeres, afectando a 1 de cada 8 a lo largo de su vida. Es una enfermedad compleja causada por factores tanto genéticos como ambientales y supone la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial. La tasa de incidencia es de 39/100.000 mujeres y se estima que anualmente fallecen 458 mil mujeres por esta causa. El cáncer de mama también puede darse en hombres, aunque en porcentajes inferiores al 1%.

La mayoría de los cánceres se producen de manera esporádica, sin presentar antecedentes familiares relevantes o conocidos y un 15-20% de los casos se asocian con antecedentes familiares. Entre un 5 y un 10% de los cánceres familiares se consideran hereditarios y son atribuibles a mutaciones germinales en genes de herencia autosómica dominante, lo cual significa que cada descendiente del portador de la mutación posee la mitad de probabilidad de heredarla, junto con el riesgo de desarrollar el cáncer, nos referimos a ellos como Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (CMOH) Este hecho hace que la historia familiar sea realmente importante para el estudio de aquellos pacientes que padecen la enfermedad. (1)

En 1990, comenzaron a realizarse estudios en aquellas familias que presentaban criterios de inclusión relacionados con la aparición del cáncer de mama-ovario hereditario y se llegaron a identificar los genes asociados al cáncer de mama: BRCA1, del inglés “breastcancer 1” y BRCA2, del inglés “breastcancer 2”, ambos localizados en los cromosomas 17 y 13 respectivamente. (2)

Hoy en día son muchos otros los genes que se relacionan con el desarrollo de estos cánceres, siendo todos ellos objeto de estudio. Dentro de los genes relacionados con el cáncer de mama se analizan TP53, PALB2, PTEN, STK11, CDH1, aunque su contribución al cáncer de mama

hereditario es baja, aproximadamente del 1%. Otros genes de menor penetrancia como ATM, CHEK2 y NBN también han sido relacionados con este cáncer. En el caso del cáncer de ovario otros genes como BRIP1, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53, entre otros, han sido incorporados también a los estudios.

Las mutaciones encontradas en los genes BRCA1y BRCA2 no sólo son las más comunes sino las que presentan mayor penetrancia o lo que es lo mismo confieren mayor riesgo de padecer la enfermedad. Esto es debido a que son genes productores de proteínas supresoras de tumores, que ayudan a reparar el DNA dañado, asegurando así la estabilidad del material genético. (3)

Selección de familias

Las familias de riesgo alto-moderado de CMOH, en las que estaría indicado el estudio genético, son las que presentan al menos una de las características descritas por la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica):

- Un caso de cáncer de mama a edad temprana (≤ 40 años).
- Cáncer de mama y ovario en la misma paciente, independientemente de la edad.
- Dos o más casos de cáncer de mama, uno de los cuales es bilateral o en menor de 50 años.
- Un caso de cáncer de mama en menor de 50 años o bilateral y un caso de cáncer de ovario en la misma línea familiar (primer o segundo grado).
- Tres casos de cáncer de mama y ovario (al menos un caso de ovario) en familiares de primer y segundo grado.
- Dos casos de cáncer de ovario en familiares de primer y segundo grado.
- Un caso de cáncer de mama en el varón y familiar de primer grado o segundo grado con cáncer de mama u ovario.

Estos criterios se basan en las guías de Consenso (National Comprehensive Cancer Network, American College of Medical Genetics and New York State y Kaiser Permanente) desarrolladas por paneles de expertos: (4)

A. Individuo perteneciente a una familia con una mutación patogénica conocida en BRCA1/BRCA2.

B. Historia personal de cáncer de mama, presentando más uno o más de los siguientes

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

<i>critérios:</i>
✓ Diagnosticado con 45 años o menos.
✓ Diagnosticado a la edad 50 años con uno o más familiares de primer, segundo, o tercer grado (del mismo lado familiar) con cáncer de mama, ovario, trompa de Falopio, peritoneo primario a cualquier edad, o con un historial familiar limitado.
✓ Haber padecido dos cáncer de mama primarios, habiéndose diagnosticado el primero a los 50 años de edad o antes.
✓ Diagnosticado a los 60 años o antes, con un cáncer de mama triple negativo.
✓ Diagnosticado a cualquier edad con uno o más familiares de primer, segundo o tercer grado (del mismo lado familiar), diagnosticado con cáncer de mama, ovario, trompa de Falopio y/o peritoneo primario a la edad de 50 años.
✓ Diagnosticado a cualquier edad con dos o más familiares de primer, segundo o tercer grado (del mismo lado familiar), diagnosticado con cáncer de mama, ovario, trompa de Falopio y/o peritoneo primario a cualquier edad.
✓ Familiar varón de primer, segundo o tercer grado, en el mismo lado familiar, con cáncer de mama.
✓ Individuo que procede de una etnia con mayor frecuencia de mutación, sin que sea necesaria ninguna historia familiar adicional.
<i>C. Antecedentes personales de cáncer peritoneal epitelial de ovario o trompa de Falopio.</i>
<i>D. Antecedentes personales de cáncer de mama masculino.</i>
<i>E. Historia personal de cáncer de páncreas o de próstata, a cualquier edad con familiares de primer, segundo o tercer grado (del mismo lado familiar) con cáncer de mama y/u ovario y/o cáncer de páncreas o de próstata a cualquier edad.</i>

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

<i>F. Solo historia familiar:</i>
✓ Miembro de la familia de primer o segundo grado que presente alguno de los criterios mencionados.
✓ Un familiar de tercer grado con cáncer de mama y/u ovario, trompa de Falopio, peritoneo primario con más de dos familiares de primer, segundo, o tercer grado (en el mismo lado de la familia) con cáncer de mama (y al menos un cáncer de mama con menos de 50 años) y/o trompa de Falopio, ovario y peritoneo primario.

Tabla 1: Criterios de inclusión, recogidos en “BRCA testing National Comprehensive Cancer Network criteria”

Selección del caso índice

Tras haber elegido a la familia como sindrómica en función de los criterios mencionados, se procede a escoger un caso índice, que será un miembro de la familia afecto en el que se realizará el estudio genético de ambos genes y a partir de la cual se harán los estudios de segregación si fuesen necesarios. Los criterios de selección que debe cumplir el caso índice serán: (5)

- ✓ El individuo escogido siempre deberá padecer la enfermedad.
- ✓ Prevalecerá un varón sobre una mujer.
- ✓ Se escogerá a un paciente con cáncer de ovario por encima de uno con cáncer de mama.
- ✓ Prevalecerá cáncer bilateral sobre unilateral.
- ✓ Se elegirá siempre al caso que reúna las características y sea diagnosticada a edad más joven.

Estudio de variantes

La identificación de variantes de alta susceptibilidad relacionadas con determinados síndromes, como el cáncer hereditario, es una tarea compleja que en los últimos años ha experimentado un notorio avance, gracias a las técnicas de secuenciación masiva.

La secuenciación masiva es una técnica que se basa en dividir el genoma en fragmentos de pequeño tamaño (50-100pb), para posteriormente proceder a la secuenciación de los fragmentos y ensamblaje de los mismos en un continuo para su lectura de forma ordenada.

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA- OVARIO FAMILIAR

Existen varias plataformas de NGS (Next Generation Sequencing) que utilizan diferentes tecnologías para la secuenciación, aunque todas comparten la secuenciación de pequeños fragmentos y la unión de los mismos al mapear las lecturas individuales con el genoma de referencia. Algunas plataformas se basan en sistemas de detección óptica con la lectura de nucleótidos modificados con fluorescencia (Illumina, Pacific Biosciences) o con la detección de luz mediante pirosecuenciación (Roche 454). También existen sistemas no ópticos como la detección de protones liberados durante la reacción de polimerización con un sensor en estado sólido (Torrent). (6)

En el Hospital Universitario de Canarias durante los años 2012 a 2017 se utilizaba el sistema 454 GS Junior de Roche para la ultra-secuenciación del DNA extraído a partir de sangre periférica de los pacientes y posteriormente amplificado con PCR múltiplex.

La pirosecuenciación se basa en la detección de pirofosfato durante la síntesis de ADN, siendo un mecanismo que cuenta con ventajas de precisión, flexibilidad. Se utiliza para analizar polimorfismos de nucleótido único (SNP) y pequeñas inserciones o deleciones. (7)

Categorización de variantes

Según el colegio americano de Medicina Genética y Genómica, las variantes en BRCA1 y BRCA2 se clasifican en patogénica, probablemente patogénica, significado incierto, probablemente benigna usando una serie de criterios para evaluación de la evidencia: (8)

Criterios para la clasificación de las variantes benignas

Evidencia de benignidad	Categoría
Evidencia superior	BA1: alelo cuya frecuencia está >5% en el proyecto de secuenciación del exoma, en proyecto Genoma 1000 o en el ExAc.

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

Evidencia fuerte	<p>BS1: alelo cuya frecuencia es mayor de lo esperado para la enfermedad.</p> <p>BS2: observado en adultos sanos recesivos (homocigotos), dominantes (heterocigotos) o ligado al X (hemicigotos) para la enfermedad con penetrancia completa esperada a una edad temprano.</p> <p>BS3: bien establecidos in vitro o en vivo en estudios funcionales que muestran que no hay efecto dañino en la función de la proteína o el splicing.</p> <p>BS4: falta de segregación en miembros afectados de la familia.</p>
Evidencia de soporte	<p>BP1: variante missense en un gen con variantes truncadas causantes de la enfermedad.</p> <p>BP2: observadas en trans con una variante patogénica con una penetrancia completa del gen o la enfermedad dominante u observada en cis con una variante patogénica.</p> <p>BP3: inserciones/deleciones in-frame en una región repetitiva sin función conocida.</p> <p>BP4: múltiples evidencias en líneas computacionales sugestivas de no tener impacto en el gen o en la producción del gen.</p> <p>BP5: variante encontrada en un caso con bases moleculares alternativas en la enfermedad.</p> <p>BP6: recientes artículos de fuentes reputadas establecen la variante como benigna pero la evidencia no es siempre de un laboratorio que hace una evaluación independiente.</p> <p>BP7: una variante sinónima (silente) para la cual las predicciones de los algoritmos de splicing predicen que no tienen impacto en el consenso de splice de la secuencia y la creación de un nuevo splice y el nucleótido no está altamente conservado.</p>

Tabla 2: Criterios para la clasificación de las variantes benignas

Criterios para la clasificación de las variantes patogénicas

Evidencia de patogenicidad	Categoría
Evidencia muy fuerte	PVS1: variantes nulas en un gen donde LOF es un conocido mecanismo de enfermedad.

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

<p>Evidencia fuerte</p>	<p>PS1: el mismo cambio de aminoácido que se estableció previamente como patogénica independientemente del cambio de nucleótido.</p> <p>PS2: de novo (tanto el materno como el paterno conformado) en el paciente con la enfermedad y sin la historia de enfermedad.</p> <p>PS3: bien establecidos in vitro o in vivo en estudios funcionales que demuestran que hay efecto dañino en el gen o en la producción del gen.</p> <p>PS4: la prevalencia de la variante en individuos afectos ha incrementado comparado con la prevalencia en los controles.</p>
<p>Evidencia moderada</p>	<p>PM1: localizado en un punto caliente mutacional y/o un dominio funcional crítico y bien establecido sin variación benigna.</p> <p>PM2: ausencia en los controles en el proyecto de secuenciación del exoma, en proyecto Genoma 1000 o en el ExAc.</p> <p>PM3: para enfermedad recesivas detectadas en trans con una variante patogénica.</p> <p>PM4: cambio en la longitud de la proteína como resultado de las deleciones/inserciones in-frame en una región no repetida o variantes que hayan perdido el stop.</p> <p>PM5: cambios missense en un aminoácido residual donde un cambio missense diferente determina la patogenicidad como se ha visto antes.</p> <p>PM6: asumidas de novo, pero sin confirmación de la maternidad y paternidad.</p>

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

Evidencia de soporte	<p>PP1: cosegregación con enfermedad en múltiples miembros afectos de la familia en un gen que se conoce con seguridad que causa la enfermedad.</p> <p>PP2: variante missense en un gen que tiene una baja tasa de benignidad en la variante missense y en la cuales las variantes missense son comunes en el mecanismo de la enfermedad.</p> <p>PP3: varias líneas de evidencia computacional apoyan el efecto deletéreo en el gen o en la producción del gen.</p> <p>PP4: el fenotipo del paciente o la historia familiar es muy específica para una enfermedad con una única etiología.</p> <p>PP5: recientes artículos de una fuente reputada establecen la variante como patogénica, pero la evidencia no está disponible para el laboratorio para realizar una valoración independiente.</p>
----------------------	--

Tabla 3: Criterios para la clasificación de las variantes patogénicas

La clasificación de las variantes génicas según el nivel de evidencia recomendado por la AMCG queda recogido en la siguiente tabla:

Patogénica	<ul style="list-style-type: none"> (i) 1 evidencia muy fuerte (PVS1) y <ul style="list-style-type: none"> (a) Evidencia fuerte (PS1-PS4) o (b) Evidencia moderada (PM1-PM6) o (c) Evidencia moderada (PM1-PM6) y 1 evidencia de soporte (PP1-PP5) (d) Evidencia de soporte (PP1-PP5) (ii) 2 evidencia fuerte (PS1-PS4) o (iii) 1 evidencia fuerte (PS1-PS4) y <ul style="list-style-type: none"> (a) Evidencia moderada (PM1-PM6) o (b) Evidencia moderada (PM1-PM6) y evidencia de soporte (PP1-PP5) o (c) Evidencia moderada (PM1-PM6) y 4 evidencia de soporte (PP1-PP5)
------------	---

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

Probablemente patogénica	(i) 1 evidencia muy fuerte (PVS1) y 1 evidencia moderada (PM1-PM6) o (ii) Evidencia fuerte (PS1-PS4) y 1-2 evidencia moderada (PM1-PM6) o (iii) 1 evidencia fuerte (PS1-PS4) y evidencia de soporte (PP1-PP5) o (iv) Evidencia moderada (PM1-PM6) o (v) 2 evidencia moderada (PM1-PM6) y evidencia de soporte (PP1-PP5) o (vi) 1 evidencia moderada (PM1-PM6) y evidencia de soporte (PP1-PP5)
Benigna	(i) Evidencia superior (BA1) o (ii) 2 evidencia fuerte (BS1-BS4)
Probablemente benigna	(i) 1 evidencia fuerte (BS1-BS4) y evidencia de soporte (BP1-BP7) o (ii) Evidencia de soporte (BP1-BP7)
Significado incierto	(i) Otros criterios de los mostrados arriba que no se encuentren o (ii) Criterios de benignidad y patogenicidad contradictorios

Tabla 4: Clasificación de las variantes génicas según el nivel de evidencia recomendado por la AMCG

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) establecen para cada clase una recomendación con respecto a los puntos más importantes relacionados con el consejo genético: (2)

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

Clase	Definición Cuantitativa (P)	Definición Cualitativa	¿Incluir la variante en el informe de laboratorio?	¿Test genético predictivo en familiares?	¿Test genético con fines científicos en familiares?	¿Seguimiento?
Clase 5	>0.99	Patogénica	Sí	Sí	No	Medidas de seguimiento y/o profilaxis correspondientes a individuos de alto riesgo
Clase 4	0.95-0.99	Probablemente patogénica	Sí	Sí	Deseable	Medidas de seguimiento y/o profilaxis correspondientes a individuos de alto riesgo
Clase 3	0.05-0.949	Significado clínico desconocido	Sí	No	Deseable	Test genético irrelevante. Medidas basadas en la historia familiar y/o personal y en otros factores de riesgo
Clase 2	0.001-0.949	Probablemente benigna	Sin recomendación específica	No	Deseable	Test genético irrelevante. Medidas basadas en la historia familiar y/o personal y en otros factores de riesgo
Clase 1	<0.001	Benigna	No	No	No	Test genético irrelevante. Medidas basadas en la historia familiar y/o personal y en otros factores de riesgo

Tabla 5: Clasificación clínica de variantes genéticas y su traslación a la clínica.
(Tabla adaptada de Eccles et al, 2015) (8)

En el HUC desde 2012 a 2016 se estudiaron 860 pacientes clasificándose las variantes en BRCA1 y BRCA2 mediante herramientas bioinformáticas para análisis in silico, tales como Polyphen2, Mutationtester y Mutpred. (9)

- *Variante neutral, normal o polimórfica (90,59%)*: aquella que no está relacionada con el cáncer de mama hereditario. Se trata de una variación no mutagénica en un lugar determinado de la secuencia del ADN, que aporta biodiversidad a la población que la presenta, no siendo un factor de riesgo.
- *Variante patogénica (3,02%)*: aquella variante o mutación que tiene directa relación con la aparición de la enfermedad, ya que los cambios producidos en la secuencia de ADN conducen a una alteración o pérdida funcional proteica.
- *Variante de significado desconocido incierto (VSD) (6,39%)*: son aquellas variantes ante las cuales no se puede afirmar ni descartar su patogenicidad y por tanto, su relación con el desarrollo de la enfermedad.

De las 860 pacientes estudiados, 125 (14.5 %) presentaron variantes de significado incierto. Estas variantes de significado incierto originan un problema en el proceso de asesoramiento genético, además de incertidumbre para el paciente y su familia. Para solventar este conflicto actualmente disponemos de bases de datos de frecuencia poblacional, bases de datos de significado clínico, base de datos bibliográficos y herramientas bioinformáticas para análisis

in silico.

Estas herramientas tratan de analizar e interpretar distintos datos biológicos, así como la secuenciación genómica, la secuencia de nucleótidos y los dominios o estructuras proteicas, los cuales se encuentran almacenados en diferentes áreas y que permiten un acceso eficaz, uniforme y público a toda la comunidad científica. Las herramientas utilizados son:

- Bases de datos poblacionales (Ensemble, ExAC, 1000Genomas).
- Bases de datos de Significado Clínico (Clinvar, Umd).
- Bases de datos Bibliográficas (LOVD).
- Herramientas Bioinformáticas para análisis In Silico (Polyphen2 y Mutationtaster).

OBJETIVO

El objetivo de este proyecto es la reclasificación de todas las variantes de significado desconocido (VSD) informadas desde enero de 2012 por la unidad de Diagnóstico Molecular del Complejo Hospitalario Universitario de Canarias en cáncer de mama-ovario, con el empleo de bases de datos poblacionales, clínicas, bibliográficas y herramientas in silico, con el fin de redefinir su patogenicidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

La identificación de estas 125 familias con variantes de significado desconocido se llevó a cabo tras una búsqueda en el programa informático del laboratorio (OPENLAB) y en el de historia clínica electrónica (SAP). Con toda la información disponible de cada caso se elaboró una base de datos (Excel) que fue completada con toda la obtenida mediante el uso de las herramientas detalladas a continuación (bases de datos poblacionales, bases de datos de significado clínico, bases de datos Bibliográficas, herramientas bioinformáticas para análisis In Silico).

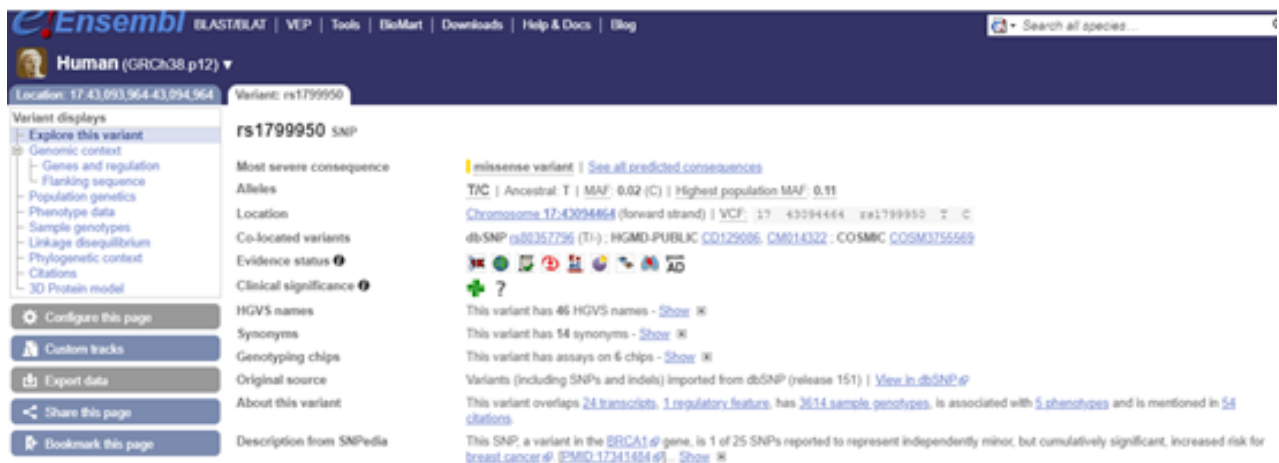
Análisis de frecuencia poblacional

-Ensemble: navegador genómico que permite la exploración de la evolución, variación de secuencia y la regulación transcripcional del genoma. Se trata de una herramienta que anota genes, calcula múltiples alineaciones, predice la función reguladora y recopila datos de

enfermedades según la frecuencia en la población. Consta de una serie de herramientas que permiten, por ejemplo, buscar genomas en la secuencia del ADN o proteína, así como analizar las variantes y predecir las consecuencias de las mismas.

- VEP (Variant Effect Predictor): determina el efecto de las variaciones de interés sobre los genes a estudiar y su transcripción y las consecuencias derivadas de la afectación de la secuencia de proteínas. Al introducir los cambios de nucleótidos encontrados, se obtienen los genes y transcripciones afectados por dichos cambios y su localización, así como la existencia de otras variantes conocidas que coincidan con la variante en cuestión.
- BLAST/BLAT: permite encontrar el genoma en la secuencia de ADN o secuencia de proteínas.

Esta herramienta permite la clasificación de las VSI según su frecuencia poblacional en baja frecuencia ($MAF < 0,01$) y alta frecuencia ($MAF > 0,01$). (10)



The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the variant rs1799950. The page is titled "Human (GRCh38 p12)" and shows the variant location as 17:43,093,964-43,094,964. The variant is identified as a missense variant with the most severe consequence being a missense variant. The alleles are T and C, and the location is on Chromosome 17 at position 43,094,464. The variant is associated with several databases, including dbSNP, HGMD-PUBLIC, and COSMIC. The clinical significance is listed as a missense variant. The description from SNPedia states that this SNP is a variant in the BRCA1 gene, associated with an increased risk for breast cancer.

Figura 1: Página web Ensembl

-ExAc: reúne datos de secuenciación obtenidos a partir de diferentes proyectos de secuenciación a gran escala, tales como datos sobre variantes individuales de nucleótidos, inserciones y deleciones y variantes del número de copias. Esto permite encontrar diversos genes y variantes de interés clínico y biológico, favoreciendo el acceso a información cualitativa y cuantitativa, además de datos estadísticos de frecuencia poblacional. Estos datos permiten discernir entre mutaciones patógenas y polimorfismos benignos. Al igual que Ensembl, permite la clasificación de las VSI según su frecuencia poblacional en baja frecuencia ($MAF < 0,01$) y alta frecuencia ($MAF > 0,01$). (11)

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA- OVARIO FAMILIAR

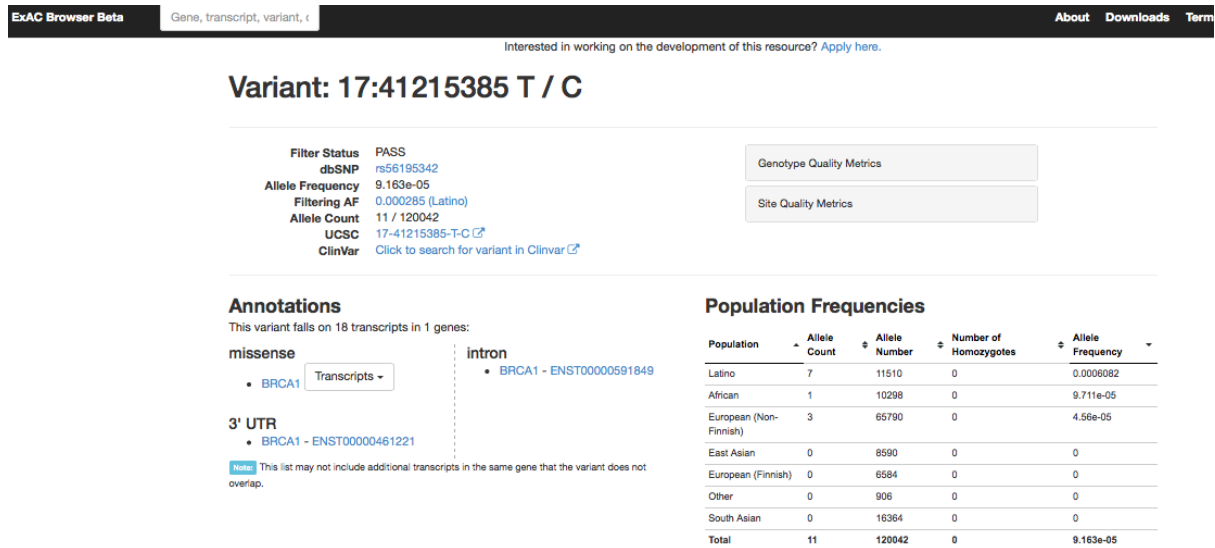


Figura 2: Página web ExAC

Análisis de Significado clínico

-Clinvar: consiste en un archivo público de acceso gratuito que contiene diversas variantes y fenotipos y permite el acceso a información detallada acerca de sus efectos sobre la salud, así como la evidencia que respalda a dicha relación causa-efecto. Facilita, por tanto, el acceso a las relaciones establecidas entre las variantes y el estado de salud observado.

Esta interfaz se basa en las descripciones fenotípicas recogidas en otras herramientas interesadas en satisfacer las necesidades de la comunidad de genética médica, así como aquellas presentaciones que contienen la misma combinación de variación / fenotipo presentes en otras bases de datos, lo cual facilita evaluar la importancia clínica de cada variante y permite informar sobre si existen interpretaciones clínicas conflictivas acerca de las mismas.

Cada variante se clasifica clínicamente: patogénica, probablemente patogénica, significado incierto, probablemente benigna y benigna; acompañada de una referencia al nivel de confianza de dicha clasificación como código de estrellas: *(Clasificación clínica respaldada por un único laboratorio o distintos laboratorios discrepan en la clasificación de la variante), **(Clasificación clínica respaldada por varios laboratorios de forma independiente), ***(Panel de expertos designado por ClinVar ha revisado la clasificación clínica), ****(Clasificación clínica está universalmente reconocida e incorporada en las guías de manejo clínico). En caso de conflicto, se tiene en cuenta el número de suscriptores que clasifican estas variantes como benignas (B), probablemente benignas (PB), significado incierto (SI), probablemente patogénicas (PP), y patogénicas (P). (12)

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA- OVARIO FAMILIAR

NCBI Resources How To

ClinVar Search ClinVar for gene symbols, HGVS expressions, conditions, and Advanced

Home About Access Help Submit Statistics FTP

NEW Click here to see the new Variation Report design!

NM_007294.3(BRCA1):c.5158A>G (p.Thr1720Ala)

Variation ID: 55438

Review status: reviewed by expert panel

Interpretation Go to

Clinical significance: Benign

Last evaluated: Aug 10, 2015

Number of submission(s): 10

Condition(s):

- Breast-ovarian cancer, familial 1 [MedGen - OMIM]
- Hereditary breast and ovarian cancer syndrome [MeSH - MedGen - Orphanet - OMIM]
- Hereditary cancer-predisposing syndrome [MedGen]

See supporting ClinVar records

Figura 3: Página web ClinVar

-UMD: es un software desarrollado para crear bases de datos específicas de locus (LSDB). Esta herramienta asegura la entrada de datos para conseguir una amplia gama de información clínica. Además, ha diseñado específicamente varias herramientas de análisis con el objetivo de ser útiles en la práctica clínica como correlaciones fenotipo-genotipo, distribución y frecuencia de mutaciones, dominios estructurales, epidemiología molecular...

Gracias a la flexibilidad del software UMD, este ha podido adaptarse a muchos genes implicados en el cáncer (APC, BRCA1, BRCA2, MEN1...) o enfermedades genéticas.

Las variantes se clasifican en neutral (clase 1), probablemente neutral (clase 2), significado incierto (clase 3), probablemente patogénicas (clase 4), y patogénicas (clase 5). (13)

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

BRCA Share™ (formerly UMD-BRCA1 mutations database)
Most recent 25 variations with a validated classification

genomic	cDNA	Exon	Protein	Functional domain	Biological significance	Validated by	Date	Records
g.201_481dup	c.-481_-201dup	-	p.Leu95TrpfsX22	-	3 - UV	GGC	7/03/17	1
g.41276093C>T	c.21C>T	2	p.Arg7Arg	-	1 - Neutral*	GGC	26/04/17	19
g.41275996A>G	c.IVS2+38A>G (c.80+38A>G)	2-3	-	-	2 - Likely Neutral	GGC	7/03/17	1
g.41267794T>C	c.83T>C	3	p.Leu28Pro	Ring finger+NES1	3 - UV	COVAR	17/03/17	1
g.41256084_41256098del	c.IVS7+41del15 (c.441+41del15)	7	-	-	2 - Likely Neutral	GGC	7/03/17	13
g.41251943A>C	c.IVS7-46A>C (c.442-46A>C)	8	-	-	3 - UV	GGC	7/03/17	1
g.41251750G>A	c.IVS8+42G>A (c.547+42G>A)	8-9	-	-	2 - Likely Neutral	GGC	7/03/17	2
g.41249258G>A	c.IVS9+3G>A (c.593+3G>A)	9-10	-	-	2 - Likely Neutral	GGC	16/06/17	10
g.41247988C>T	c.IVS9-49C>T (c.594-49C>T)	9-10	-	-	2 - Likely Neutral	GGC	7/03/17	1
g.41248006G>T	c.IVS9-67G>T (c.594-67G>T)	9-10	-	-	3 - UV	GGC	7/03/17	1

Go to page: 1 Show rows: 10 1-10 of 25

Figura 4: Página web UMD

Análisis de bibliografía

-**LOVD**: *Leiden Open Variation Database* es una base de datos que recopila las variantes en la secuencia del DNA. A diferencia de otras bases de datos del genoma humano que muestran información sobre todas las variantes de DNA, LOVD incluye información sobre los individuos en los que se encontraron las variantes. Por tanto, con esta herramienta se puede realizar una revisión bibliográfica sobre multitud de variantes documentadas y su posible relación causal con la enfermedad.

Actualmente, en LOVD se pueden encontrar más de 515500 variantes en 162000 pacientes. (14)

LOVD³ Global Variome shared LOVD
Leiden Open Variation Database THE HUMAN VARIOME PROJECT BRCA1 (breast cancer 1, early onset)

1678 entries on 17 pages. Showing entries 601 - 700.

100 per page Legend << First < Prev 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 N

Effect	Exon	DNA change (cDNA)	RNA change	Protein
?.	11	c.2773A>C	-	p.Ile925Leu
-/.	11	c.2773A>C	-	p.Ile925Leu
+./.	11	c.2818G>T	-	p.Asp940Tyr
?.	11	c.2899A>T	-	p.Thr967Ser
?.	11	c.2935C>T	-	p.Arg979Cys
-/.	11	c.3022A>G	-	p.Met1008Val
-/.	11	c.3022A>G	-	p.Met1008Val
-/.	11	c.3022A>G	-	p.Met1008Val
-/.	11	c.3022A>G	-	p.Met1008Val
-/.	11	c.3024G>A	-	p.Met1008Ile
-/.	11	c.3024G>A	-	p.Met1008Ile
-/.	11	c.3024G>A	-	p.Met1008Ile
-/.	11	c.3024G>A	-	p.Met1008Ile
-/.	11	c.3024G>A	-	p.Met1008Ile

Figura 5: Página web LOVD

Análisis mediante Herramientas Bioinformáticas para análisis In Silico

-Polyphen2: predice el efecto de una sustitución de aminoácido en la estructura y función de una proteína usando secuencias homólogas, anotaciones Pfam, estructuras 3D, y una serie de otras bases de datos y herramientas. Para cada sustitución de aminoácido en el que hemos sido capaces de calcular una predicción, se ofrece tanto una predicción cualitativa (“probablemente perjudicial”, “posiblemente perjudicial”, “benigno”, o “desconocido”) y una puntuación, que representa la probabilidad de que un cambio sea perjudicial, por lo que los valores más cercanos a 1 tienen una mayor predicción de que sea deletéreo. (15)

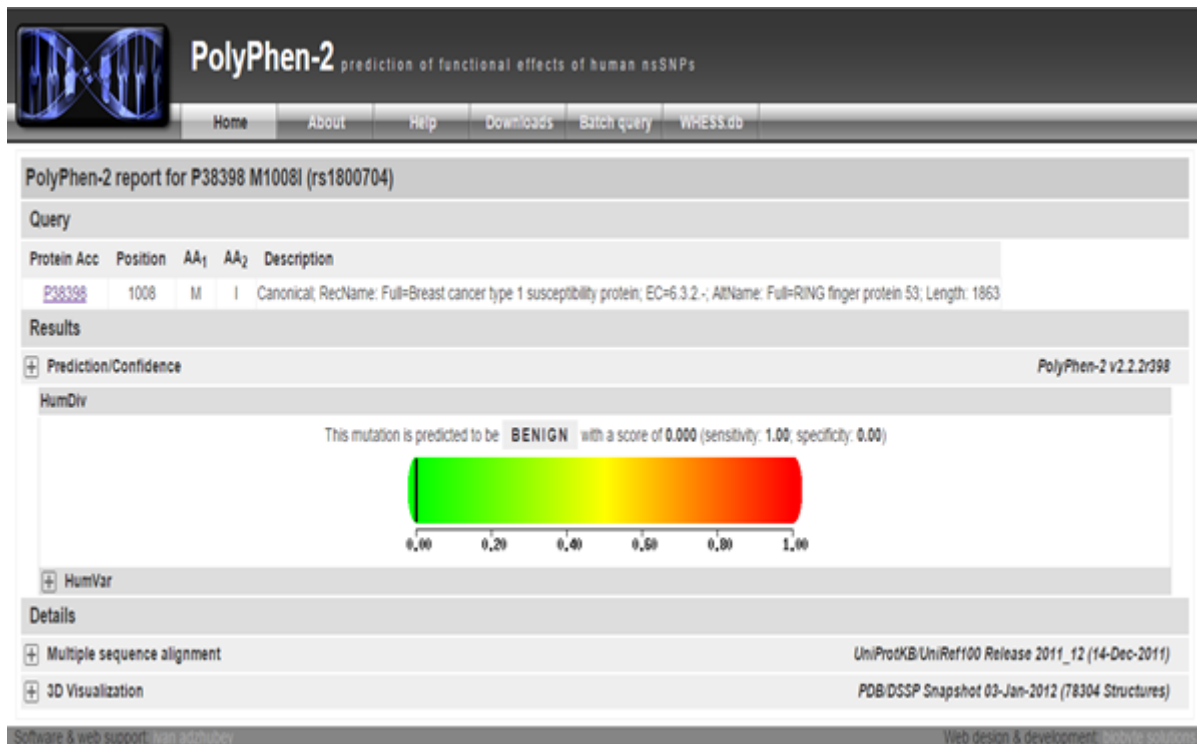


Figura 6: Página web PolyPhen-2

-MutationTester: aplicación online y gratuita que permite la evaluación rápida de las potenciales enfermedades causadas por alteraciones en la secuencia de DNA. Esta herramienta integra información de diferentes bases de datos biomédicas y utiliza diversas herramientas de análisis. Estos análisis comprenden la conservación evolutiva, cambios en sitios de empalme, pérdida de las características de las proteínas y cambios que puedan afectar a la cantidad de mRNA. Los resultados de los test, entonces, nos predicen el potencial de la enfermedad. Dependiendo de la naturaleza de la alteración, el programa elige entre tres modelos de predicción que son alteraciones “silenciosas sinónimas” o “intrónicas”, alteraciones que afectan a un aminoácido o alteraciones que causan cambios complejos en la

secuencia de aminoácidos. Se obtiene así, una predicción sobre un posible polimorfismo sin mayores consecuencias en la producción de enfermedad, o un cambio de DNA que predice una potencial enfermedad. Cada predicción se acompaña de una puntuación. (16)

Prediction polymorphism Model: simple_ase, prob: 0.972101511058595 (explain)

Summary

- amino acid sequence changed
- listed as SNP
- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr17:41256927A>C
HGNC symbol	BRCA1
Ensembl transcript ID	ENST00000357654
UniProt peptide	P38398
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.259T>G cDNA,378T>G g.65364T>G
AA changes	L87V Score: 32 (explain score(s))
position(s) of altered AA if AA alteration in CDS	87
frameshift	no
dbSNP / TGP / HGMD(public) / ClinVar	Reference ID: rs80357091; Chromosome: 17; Position on chromosome: 41256927 Note that although there is a SNP at this location, it does not necessarily have to have the same alleles as your alteration. Please inspect dbSNP for details.

Figura 7: Página web MutationTaster

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El alto porcentaje de variantes de significado desconocido es un problema recurrente y concordante con la bibliografía consultada especialmente desde el advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva, de ahí la extendida preocupación de la mayor parte de los laboratorios moleculares en intentar esclarecer de alguna manera la probable patogenicidad de estos cambios.

En nuestro estudio, tras la búsqueda de los resultados de las 860 familias que cumplían criterios de inclusión y cuyo caso índice fue estudiado en la Unidad de Diagnóstico Molecular mediante secuenciación masiva, 125 fueron seleccionadas por ser aquellas con Variantes de Significado Incierto como resultado (14,5% del total de las familias estudiadas).

En el siguiente Excel se muestra un ejemplo de la recolección de las variantes con su número de historia correspondiente, sexo, edad, gen (BRCA1 o BRCA2) y exón, junto con los resultados obtenidos para cada variante en las distintas herramientas empleadas.

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA- OVARIO FAMILIAR

N°ANALÍTICA	N° HISTORIA	SEXO	EDAD	GEN	EXÓN	VARIANTE	RS	ENSEMBLE	ExAC	CLINVAR	UMD.BE	LOVD	POLYPHEN2	MUTATIONTESTER	CONCLUSIÓN
XXXXXXXX	XXXXXXXX	M	45	1	19	c.5158A>G p. T1720A	rs56195342	<0,01	<0,01	benigno+++	Neutral 1	?/-	0.126	polimorfismo	Clase 1
XXXXXXXX	XXXXXXXX	M	55	2	3	c.223G>C p. A756P	rs28897701	<0,01	<0,01	benigno+++	Neutral 1	?/-	0.437	disease causing	Clase 1
XXXXXXXX	XXXXXXXX	M	47	1	11	c.1067A>G p. Q356R	rs1799950	>0,01	>0,01	benigno+++	Neutral 1	contradictorio	0.998	polimorfismo	Clase 1
XXXXXXXX	XXXXXXXX	M	43	2	11	c.3262C>T p. P1088S	rs80358572	<0,01	<0,01	conflicto+ (B2 PB6 S13)	Neutral 1	NotFound	0.11	polimorfismo	clase 2
XXXXXXXX	XXXXXXXX	M	62	2	11	c.3262C>T p. P1088S	rs80358572	<0,01	<0,01	conflicto+ (B2PB6S13)	Neutral 1	NotFound	0.11	polimorfismo	clase 2
XXXXXXXX	XXXXXXXX	M	47	2	19	c.8350 C>T p. R2784W	rs80359075	<0,01	<0,01	conflicto+ (PP2 S13)	VSI 3	?	1	disease causing	Clase 3
XXXXXXXX	XXXXXXXX	M	52	1	11	c.2002C>T p. L668F	rs80357250	<0,01	NotFound	benigno+++	VSI 3	?/-	0.812	polimorfismo	clase 3
XXXXXXXX	XXXXXXXX	M	59	2	11	c.2987T>G p. L996R	rs80358545	<0,01	<0,01	conflicto+ (PB5 S14)	VSI 3	NotFound	0.437	polimorfismo	clase 3

Tabla 6: Ejemplo de recolección de variantes

En los 125 pacientes seleccionados se encontraron un total de 55 VSI diferentes ya que 22 de ellas se repetían en más de un paciente (*tabla 7*).

De las 55 variantes, 46 (84%) pudieron ser reclasificadas, con estas nuevas herramientas, en distinto o en el mismo sentido y 9 (16%) no pudieron serlo por no encontrar datos que nos permitieran cambiar o reafirmar su clasificación, optando en este caso por seguir considerándolas como VSI:

- Clase 1: 24 variantes (52,17%)
- Clase 2: 3 variantes (6,52%)
- Clase 3: 19 variantes (41,30%)
- Clase 4: 0 variantes (0%)
- Clase 5: 0 variantes (0%)

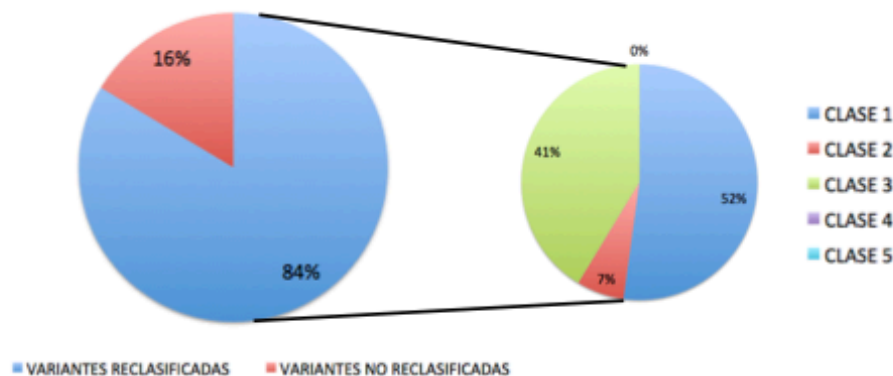


Figura 8: Variantes reclasificadas y no reclasificadas

Por lo tanto, de las 55 variantes, 27 fueron reclasificadas a clase 1 ó 2 (49%), de tal manera que pasan de ser VSI a una categoría benigna o probablemente benigna, y 28 (10 reevaluadas y 9 sin posible reevaluación) no pudieron ser reclasificadas (51%), manteniéndose como VSI. Ninguna de las variantes estudiadas aumentó a categoría 4 o 5.

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA- OVARIO FAMILIAR

■ VARIANTES QUE CAMBIAN DE CLASE
■ VARIANTES QUE NO CAMBIAN DE CLASE

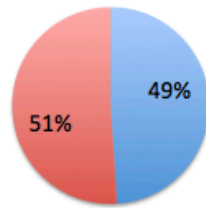


Figura 9: Variantes que cambian de clase y variantes que no cambian de clase

De las herramientas utilizadas, la de mayor evidencia a la hora de clasificar las variantes fueron las de frecuencia poblacional. Si estas presentan una prevalencia superior al 1% de la población, este criterio por sí mismo hace que la variante sea clasificada como benigna (clase 1). De las 24 variantes clasificadas como clase 1, 6 (25%) fueron reclasificadas mediante la herramienta de frecuencia poblacional, mientras que 18 (75%) al estar presentes en menos del 1% de la población, se reclasificaron en función de las herramientas de significado clínico, segundas en evidencia.

Las 3 variantes clasificadas como clase 2 (6,52%) y las 19 variantes clase 3 (41,30%), fueron reclasificadas por las herramientas de significado clínico, pues estaban presentes en menos del 1% de la población.

La reclasificación con herramientas de significado clínico fue concordante con independencia de la herramienta utilizada (Clinvar o UMD), a excepción de 9 variantes, las 3 de clase 2 y 6 de clase 3. Este conflicto de concordancia fue resuelto adoptando una actitud conservadora hacia la clase que conlleva mayor riesgo.

En el caso de solo poder realizar la clasificación según Clinvar y/o que dentro de esta herramienta exista un conflicto a la hora de categorizar la variante, se consultan los subcriptores más reciente y se apoya esta clasificación con herramientas bioinformáticas para análisis in sílico y herramientas bibliográficas.

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

VARIANTE	Nº DE REPETICIONES	CLASE	CLINVAR Y UMD.BE	FRECUENCIA POBLACIONAL
c.1067 A>G p.Q356R	20	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	>0.01
c.3119 G>A p.S1040N	14	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	>0.01
c.6100 C>T p.R2034C	10	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	< 0.01
c.4956 G>A p.M1652I	9	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	>0.01
c.5744 C>T p.T1815M	8	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	>0.01
c.3024 G>A p.M108I	6	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.2521 C>T p.R841W	5	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.8350 C>T p.R2784W	4	<u>Clase 3</u>	Clinvar VSI .BE VSI	<0.01
c.10234 A>G	4	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	>0.01
c.2662 C>T p.H888Y	3	<u>Clase 3</u>	Clinvar VSI ++ (PB3 SI3) UMD.BE neutral 1	<0.01
c.2987 T>G p.L996R	3	<u>Clase 3</u>	Clinvar PB5 VSI4 UMD.BE VSI	<0.01
c.4039 A>G	2	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.5635 G>A p.1879K	2	<u>Clase 3</u>	Clinvar PB UMD.BE VSI	<0.01
c.5158 A>G p.T1720A	2	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.223 G>C p.A756P	2	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.6322 C>T p.R2018C	2	<u>Clase 3</u>	Clinvar PB UMD.BE VSI	<0.01
c.3061 G>A p.G1201S	2	<u>Clase 3</u>	Clinvar PB UMD.BE VSI	<0.01
c.9976 A>T p.k3326X	2	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.3262 C>T p.P1088S	2	<i>Clase 2</i>	Clinvar PB UMD.BE neutral1	<0.01
c.5411 T>A p.V1804D	2	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.3823 A>G p.I1275V	1	<u>Clase 3</u>	Clinvar VSI (PB2 SI4) UMD.BE neutral 1	<0.01
c.6323 G>A p.R2108H	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.7177 A>G p.M2393V	1	<u>Clase 3</u>	Clinvar conflicto No hay UMD.BE	<0.01

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

c.7319 A>G p.H2440R	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.3869 G>A p.O1290Y	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c. 7469 T>C p.I2490T	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	>0.01
c.10045 A>G p.T3349A	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.8850 G>T p.K2950N	1	Clase 2	Clinvar PB9 SI2 UMD.BE neutral	<0.01
c.8830 A>T p.I2944F	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.6220 C>A	1	Clase 2	Clinvar benigno +++ UMD.BE PB	<0.01
c.5882 G>A p.S1961N	1	Clase 3	Clinvar VSI UMD.BE VSI	<0.01
c.536 A>G p.Y179C	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.1456 T>C p.F486L	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c. 1648 A>C p.N5550H	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.2002 C>T p.L996R	1	Clase 3	Clinvar benigno+++ UMD.BE VSI	<0.01
c.5729 A>G p.N1910S	1	Clase 3	Clinvar VSI UMD.BE VSI	No hay
c.8351 G>A p.R2784Q	1	Clase 3	Clinvar VSI UMD.BE VSI	<0.01
c.3299 A>T p.N1100I	1	Clase 3	Clinvar VSI UMD.BE VSI	<0.01
c.9442 G>T p.A3148S	1	Clase 3	Clinvar VSI UMD.BE VSI	<0.01
c.1343 G>A	1	Clase 3	Clinvar VSI UMD.BE VSI	<0.01
c.8918 G>A p.R2973H	1	Clase 3	Clinvar PB6 VSI2 UMD.BE VSI	<0.01
c.4643 C>T p.T1548M	1	Clase 3	Clinvar VSI UMD.BE VSI	<0.01
c.1631 A>C p.Q544P	1	Clase 3	Clinvar VSI UMD.BE VSI	No hay
c.3055 C>G p.L1019V	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	
c.9292 T>C p.Y3098H	1	Clase 1	Clinvar benigno +++ UMD.BE neutral 1	<0.01
c.5897 A>G	1	Clase 3	Clinvar PB3 VSI3 UMD.BE VSI	<0.01
c.7379 C>T p.A2466V	4	No reclasificable	Clinvar no hay UMD.BE neutral 1	No hay
c.2458 A>G	2	No	Clinvar no hay	No hay

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

		reclasificable	UMD.BE no hay	
c.6767 G>A p.C2256Y	1	No reclasificable	Clinvar no hay UMD.BE no hay	No hay
c.8902 A>C p.T2968A	1	No reclasificable	UMD.BE VSI	No hay
c.9247delT	1	No reclasificable	-	<0.01
c.1796 A>G p.N599S	1	No reclasificable	UMD.BE VSI	No hay
c.3018 T>G p.H1006Q	1	No reclasificable	Clinvar no hay UMD.BE no hay	No hay
c.701 C>A p.T234K	1	No reclasificable	Clinvar no hay UMD.BE no hay	No hay
c.730 G>A p.D244N	1	No reclasificable	Clinvar no hay UMD.BE no hay	No hay

Tabla 7: Total de variantes estudiadas

Si extrapolamos la información de las variantes reclasificadas a las familias:

- 1.- De los 125 pacientes estudiados 122 (97.5%) son mujeres y 3 (2.5%) son hombres.
- 2.- De estas 122 mujeres, 107 presentan una sola variante que fue reclasificada como sigue:
 - Clase 1 → 65
 - Clase 2 → 2
 - Clase 3 → 27
 - Clase 4 y 5 → 0
 - No clasificable → 13

Las 15 restantes tienen más de una variante. En cinco de ellas (33%) ambas variantes presentan distinta clasificación por lo que se decide conservar sólo la variante de mayor riesgo para seguimiento futuro.

VARIANTES DE CADA PACIENTE	CLASIFICACION DE LA VARIANTE	CLASIFICACION FINAL
c.3024 G>A p.M108I c.4956 G>A p.M1652I	Clase 1 Clase 1	Clase 1
c.5744 C>T p.T1915M c.8902 A>C p.T2968A	Clase 1 No reclasificable	Clase 3
c.1067 A>G p.Q356R c.6100 C>T p.R2034C	Clase 1 Clase 1	Clase 1
c.2521 C>T p.R841W	Clase 1	Clase 1

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-
OVARIO FAMILIAR

c.3119 G>A p.S1040N	Clase 1	
c.7177 A>G p.M2393V c.3024 G>A p.M108I	Clase 3 Clase 1	Clase 3
c.6323 G>A p.R2108H c.7319 A>G p.H2440R	Clase 1 Clase 1	Clase 1
c.5411 T>A p.V1804D c.5744 C>T p.T1915M	Clase 1 Clase 1	Clase 1
c.536 A>G p.V179C c.1456 T>C p.F486L c.1648 A>C p.N5550H	Clase 1 Clase 1 Clase 1	Clase 1
c.3262 C>T p.P1088S c.701 C>A p.T234K	Clase 2 No reclasificable	Clase 3
c.1631 A>C p.Q544P c.4956 G>A p.M1652I	Clase 3 Clase 1	Clase 3
c.1067 A>G p.Q356R c.4956 G>A p.M1652I	Clase 1 Clase 1	Clase 1
c.1067 A>G p.Q356R c.3119 G>A p.S1040N c.9976 A>T p.K3326X	Clase 1 Clase 1 Clase 1	Clase 1
c.1067 A>G p.Q356R c.10234 A>G	Clase 1 Clase 1	Clase 1
c.1067 A>G p.Q356R c.3119 G>A p.S1040N	Clase 1 Clase 1	Clase 1
c.10234 A>G c.3119 G>A p.S1040N c.2521 C>T p.R841W	Clase 1 Clase 1 Clase 1	Clase 1

Tabla 8: Pacientes mujeres con más de una variante

3.- Del total de 125 pacientes, tan solo 3 eran varones y sus variantes se clasificaron como sigue:

c.5635 G>A p.E1879K	Clase 3
c.10045 A>G p.T3349A	Clase 1
c.6220 C>A	Clase 2

Tabla 9: Variantes de pacientes varones

De los 125 pacientes, 66 (52,8%) resultaron pertenecer a la clase 1 (variante benigna) y 3 (2,4%) a la clase 2 (probablemente benigna), lo que hace un total de 69 (55.2%) pacientes reclasificados a categorías benignas. Esto implica que las variantes estudiadas no son la causa del cáncer en la familia aunque se la siga considerando de alto riesgo y continuando su seguimiento a la espera de futuros análisis de otros genes implicados en el CMOH (ofertados por el laboratorio en la actualidad).

Un total de 56 pacientes (44.8%) no pudo cambiar de categoría y se mantuvo como VSI. En estos casos no se puede descartar que se trate de la variante causante del síndrome CMOH, por lo que se continúa el seguimiento anual de la familia, con el objetivo de poder reclasificar dicha variante con el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas, además de ampliar el estudio de otros genes que pudiesen estar implicados.

Son muchos los estudios, que al igual que nuestro trabajo, exponen los resultados de la reclasificación de variantes. Pastrello et al (17), usando un método bayesano llevaron a cabo el estudio de 35 VSD recogidas en sus bases de datos para los genes MSH2, MLH1, PMS2 y MSH6, el 46% de las variantes no pudieron ser reclasificadas Thompson et al (18), en un estudio de 2360 variantes, entre las que se incluyeron 483 VSD, sólo el 32% de estas VSD no se lograron reclasificar.

CONCLUSIONES

- La identificación de una VSI nunca es deseable, pero suponen una realidad y aparecen con mucha frecuencia en los análisis genéticos. Son muchos los esfuerzos que se centran para lograr una clasificación segura de estas variantes, lo que permite una evaluación de riesgos más precisa y mejora el asesoramiento genético en el grupo de familias afectadas.
- La AMCG en la última guía publicada de 2015, estableció los criterios para la categorización de variantes según diferentes niveles de evidencia, teniendo en cuenta diferentes factores como la frecuencia poblacional, las evidencias clínicas recogidas en bases de datos, el tipo de alteración genética y su localización, los estudios de

segregación y la predicción acerca de su patogenicidad según diferentes herramientas bioinformáticas.

- El estudio exhaustivo de las VSI mediante herramientas bioinformáticas ha permitido reclasificar variantes y por ende a los pacientes, permitiendo mejorar el proceso de asesoramiento genético y disminuir la incertidumbre para el paciente y su familia.
- En nuestro estudio 27 de las 55 (49.09%) variantes y 69 de los 125 pacientes (55.2%) pudieron ser reclasificados a una categoría benigna lo que nos permitió demostrar que ese cambio no era el responsable del fenotipo en la familia, contribuir al bienestar de las familias y evaluar otras estrategias de diagnóstico genético.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Aalfs CM, Abugattas J, Adlard J, Agata S, Aittomäki Andrews L et al. Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations. *Hum Mutat.* 2018 mayo;39(5):593-620. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29446198>
- (2) De la Hoya Mantecón Miguel, Sánchez de Abajo Ana María. Manejo de las variantes genéticas sin clasificar en una consulta de consejo genético. *Ed Cont Lab Clín.* 2015-2016; 27:77-93. Disponible en: <http://www.seqc.es/download/tema/9/3880/961381320/917430/cms/tema-8-manejo-de-las-variante-geneticas-sin-clasificar-en-una-consulta-de-consejo-genetico.pdf/>
- (3) Balmanya Judith, Blanco Guillermo Ignacio, Pérez Segura Pedro, Stjepanovic Neda, Teulé Alex. Cáncer de Mama y Ovario Hereditario y nuevas aproximaciones terapéuticas. Curso SEOM online en Cáncer Hereditario VI Edición. 2018; Disponible en: https://www.institutoroche.es/formacion/cursos/201/vi_ed_curso_seom_online_en_cancer_hereditario
- (4) Berry Michael, Buys Sandra S., Farmer Meagan, Friedman Susan, Garber Judith, Hutton Mollie L. et al. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian Version 1.2018. *NCCN Guidelines.* 2018 octubre. Disponible en: https://www2.trikobe.org/nccn/guideline/gynecological/english/genetic_familial.pdf

- (5) Andrea Gehrig, Andreas Rump, Alfons Meindl, Bárbara Wappenschmidt, Bernd Auber, Bernd Dwomiczak et al. Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Med.* 2018 abril; 7(4): 1349–1358. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5911592/>
- (6) illumina.com [Internet]. EEUU: Illumina; 1998 [actualizado 2019; citado 14 mayo 2019]. Disponible en: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>
- (7) Briceño-Balcázar I, Casas-Gómez MC, Díaz-Dussán, Díaz-Rincón D NA, Gómez-Gutiérrez A, Noguera-Santamaría MC. Mutational spectrum in breast cancer associated BRCA1 and BRCA2 genes. *Colomb Med (Cali)*. 2017 Jun 30;48(2):58-63. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29021639>
- (8) Eccles DM, Mitchell G, Monteiro AN; ENIGMA Clinical Working Group. BRCA1 and BRCA2 genetic testing-pitfalls and recommendations for managing variants of uncertain clinical significance. *Ann Oncol.* 2015;26(10):2057-65. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26153499>
- (9) David Bick, M, Elaine Lyon, Elaine Spector, Heidi L. Rehm, Julie Gastier-Foster, Karl Voelkerding et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25741868>
- (10) Ensembl Genome Browser [Internet]. *Nucleic Acids Research* 2002 30(1):38-41. *Genome Research* 2004 14(5):988-995 [citado 18 de enero 2019]. Disponible en: <https://www.ensembl.org>
- (11) ExAC Browser [Internet]. *Nucleic Acids Res.* 2017 enero 4; 45. exac.broadinstitute.org. [citado 20 de mayo 2018]. Disponible en: <http://exac.broadinstitute.org>
- (12) ClinVar [Internet]. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Research.* 2016; 4 de enero;44(D1):D862-8 [citado 20 de diciembre 2018] Disponible en: [ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/)
- (13) The UMD central website [Internet]. *Nucleic Acids Research.* 4 de enero 2018;44(D1):D862-8 [citado 20 de diciembre 2018] Disponible en: <http://umd.be/>

- (14) LOVD [Internet]. LOVD software Leiden University Medical Center 2004-2019 [citado 20 de diciembre 2018] Disponible en: <https://www.lovd.nl>
- (15) Polyphen2 [Internet]. Nat Methods 7(4):248-249. 2010. [citado 20 de diciembre 2018] Disponible en: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>
- (16) MutationTaster [Internet]. Nat Methods. 2014abril ;11(4):361-2. Mutationtaster.org. [cited 20 Dec 2018]. Disponible en: <http://www.mutationtaster.org>
- (17) Bedin C, Fornasarig M, Marroni F, Pastrello C, Pin E, Tibiletti MG, et al. Integrated analysis of unclassified variants in mismatch repair genes. Genet Med Off J Am Coll Med Genet. febrero de 2011;13(2):115-24. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21239990>
- (18) Al-Mulla F, Akagi K, Greenblatt MS, Plazzer J-P, Spurdle AB, Thompson BA et al. Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. Nat Genet. febrero de 2014;46(2):107-15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24362816>

¿QUÉ HEMOS APRENDIDO REALIZANDO EL TFG?

En el transcurso de la elaboración de este trabajo hemos aprendido, sobre todo, a manejar los programas de historia clínica electrónica del HUC (SAP), el sistema informático interno del laboratorio del laboratorio de HUC (OPENLAB), diferentes herramientas bioinformáticas para obtener la información necesaria sobre cada variante que nos permita su clasificación.. Además, hemos aprendido cómo se realiza la selección de familias con criterios de cáncer familiar y casos índice así como la gestión posterior de los mismos.

En definitiva, hemos aprendido cómo es el proceso desde que se selecciona una familia dentro del grupo de cáncer familiar, cómo se escoge el probando idóneo, qué genes y cómo se estudian y finalmente como se clasifican hasta la obtención de los resultados de la variante para después poder darle un correcto consejo genético al caso y a la familia en su conjunto.

RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA- OVARIO FAMILIAR

Trabajo Fin de Grado Conformidad para la presentación de la memoria y defensa

Dra. Felicitas Díaz-Flores Estévez, tutora del trabajo realizado por las alumnas Carmen Rodríguez Barrios, Paula Arbelo Pérez y Helena Martín Ávila, con el título RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES DE SIGNIFICADO DESCONOCIDO EN CÁNCER DE MAMA-OVARIO FAMILIAR damos nuestra aprobación para la presentación de la memoria y a su defensa como Trabajo Fin de Grado.

La Laguna, 14 de Mayo de 2019.

Firmado
DIAZ FLORES ESTEVEZ
FELICITAS MARIA -
42077911D
Fecha: 2019.05.14 17:05:51
+0100

Firmado digitalmente por
DIAZ FLORES ESTEVEZ
FELICITAS MARIA -
42077911D
Fecha: 2019.05.14 17:05:51
+0100