

DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE PROCEDIMIENTOS GENÓMICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE SUSCEPTIBILIDAD HEREDITARIA AL CÁNCER DE MAMA Y OVARIO EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO.

Cayota A.¹, Delgado L.², Artagaveytia N.¹, Silveyra N.², Ximenez S.², Manrique G.¹, Simoes C.³, Spangenberg L.³, Naya H.³, Sanguinetti J.⁴, Blanco V.⁴, Possi T.⁴, Camejo N.², Castillo C.², Cataldi S.⁵

- (1) Departamento Básico de Medicina, Hospital de Clínicas, UdelaR
- (2) Servicio de Oncología Clínica, Hospital de Clínicas, UdelaR
- (3) Unidad de Bioinformática, Instituto Pasteur de Montevideo
- (4) Unidad de Genómica Funcional, Instituto Pasteur de Montevideo
- (5) Instituto Nacional del Cáncer, ASSE

RESUMEN

Al igual que en el mundo occidental, en nuestro país el cáncer de mama es el más frecuente y la primera causa de muerte por cáncer en la mujer con un promedio de más de 1900 casos nuevos por año representando el 28% de todos los cánceres. El cáncer de mama da cuenta de casi 680 muertes anuales con una tasa ajustada de mortalidad de 20,66, lo que representa el 18,6 % de todas las muertes por cáncer.

Las evidencias muestran que un 10% a 15% de los cánceres de mama se desarrollan en portadores de una predisposición hereditaria asociada a variantes genéticas patogénicas en genes de susceptibilidad de transmisión autosómica dominante, siendo los genes BRCA1 y BRCA2 (BRCAst CAncer 1 y 2) los más frecuentemente involucrados. Estos genes pueden aumentar 10 a 20 veces el riesgo de cáncer de mama lo que resulta en un riesgo acumulado que puede alcanzar un 85% a los 70-80 años. Sin embargo, las mutaciones en genes BRCA sólo explican entre un 25 y 30% de los cánceres de mama hereditario.

Dado el impacto en la prevención del cáncer mamario que posee la detección de familias con riesgo hereditario elevado y el asesoramiento genético a familias de riesgo, este grupo, liderado por la Prof. Dra. Lucía Delgado creó la Unidad de Oncogenética del Hospital de Clínicas en el año 2002 con el fin de ofrecer por primera vez en el país este tipo de servicios.

El advenimiento de nuevas tecnologías de secuenciado, que permiten secuenciar desde grupos de genes hasta el genoma completo de un individuo asociado al desarrollo de la bioinformática, han permitido en pocas horas y a bajo costo el análisis de otros genes involucrados en el riesgo hereditario al cáncer. A partir del año 2013 y, con el fin de promover el desarrollo de procedimientos propios que aseguren una amplia accesibilidad a este tipo de estudios, hemos retomado la iniciativa de incorporar tecnologías genómicas de última generación para implementar este tipo de estudios en el ámbito del Hospital Universitario.

Los objetivos primarios fueron: a) implementar capacidades genómicas diagnósticas en el Hospital de Clínicas; b) desarrollar procedimientos moleculares propios con tecnologías de última generación que aseguren procedimientos de alta sensibilidad y exactitud; c) asegurar una reducción significativa de los costos para universalizar el acceso; d) conocer las características y variabilidad genéticas propias de nuestra población; e) aportar asesoramiento genético a familias con predisposición hereditaria al cáncer de mama y ovario; f) contribuir a la prevención y tratamiento del cáncer de mama y ovario.

A través de este trabajo hemos estudiado 104 familias con historia personal y/o familiar compatibles con predisposición hereditaria utilizando distintas herramientas genómicas que incluyeron: secuenciado masivo de un panel de 11 genes con evidencia experimental de contribuir al riesgo hereditario al cáncer de mama, estudios de detección de grandes deleciones de genes BRCA1 y BRCA2 y secuenciado del exoma completo (secuenciado de 180.000 exones de 20.000 genes).

En 23 de los 104 casos (22.1%), nuestros estudios identificaron la presencia de variantes patogénicas en genes BRCA1 y BRCA2 con un claro predominio de variantes de BRCA2.

Sobre un total de 42 casos con resultado negativo en genes BRCA, identificamos 12 casos (28,6%) de portadores de variantes patogénicas o probablemente patogénicas en otros genes diferentes a BRCA1 y BRCA2.

De todas las variantes con potencial patogénico hemos identificado una variante recurrente en el gen CHEK2 de inusual alta frecuencia en nuestra población y otra variante en el gen de Ataxia Teleangiectasia (ATM) no descrita en repositorios públicos internacionales.

Con el fin de identificar otros genes o causas genéticas en los casos negativos por estudio del panel genético, seleccionamos un grupo de 24 casos para analizar probables deleciones de genes BRCA por amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) o bien secuenciado del exoma completo.

El estudio del exoma completo en casos seleccionados reveló variantes genéticas con alto potencial patogénico en genes adicionales, algunos de los cuales no han sido asociados actualmente al riesgo hereditario al cáncer mamario. Estos genes podrían representar nuevas vías moleculares en cáncer y eventualmente contribuir al desarrollo nuevas estrategias terapéuticas antineoplásicas.

Palabras clave: Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario; diagnóstico genético; genes de predisposición hereditaria al cancer; secuenciado NGS; mutaciones germinales, asesoramiento genético

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the primary cause of female deaths worldwide, as well as being the most common malignancy in women. In Uruguay, breast cancer is the leading cause of mortality for cancer in women with more than 680 deaths per year representing 18,6% of cancer deaths. The age-standardized incidence rate is 73,6, accounting for more than 1900 new cases per year. The lifetime risk in women is 12%, revealing that 1 in 8 women will develop a breast cancer throughout her lifetime.

Approximately 85 to 90% of breast cancers are sporadic while 10 to 15% are thought to be hereditary in an autosomal dominant inheritance fashion where mutations in BRCA1 and BRCA2 genes account for 25-30% of total inherited breast cancers.

The advent of new technologies for genetic sequencing and the development of bioinformatics has allowed the inclusion of low-cost genetic studies in clinical practice to identify individuals at risk for developing cancer.

Due the impact and relevance of genetic testing in breast cancer prevention and with the commitment to promote the implementation of in-house procedures assuring a wide accessibility, this initiative was intended to include genetic testing facilities at the University Hospital.

In this work, we included different genomic procedures to study 104 families who met the clinical criteria of hereditary breast and ovarian syndrome to identify and characterize genetic variants with the potential of inducing an increased risk.

Analysis by next generation sequencing of BRCA1 and BRCA2 genes revealed that 23 out of 104 cases studied carried known and unknown pathogenic/probably pathogenic genetic variants in BRCA genes with a strong predominance of BRCA2 variants (18 out of 23).

In 42 cases negative for BRCA mutations we included the sequencing of an extended genetic panel including nine additional genes (ATM, BARD1, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, PTEN, STK11 y TP53) with experimental evidence showing their association with increased risk of breast cancer but at lower frequency and genetic penetrance than BRCA genes. Our results revealed the identification of pathogenic/probably pathogenic variants in 12 out of 42 (28.8%) cases studied. Some of these genetic variants were unusually frequent in our cohort when compared with public databases as was the case of a recurrent CHEK2 variant and other were novel variants as was the case of a truncating variant in the ATM gene.

The analysis of large deletions in BRCA1 and BRCA2 in 24 cases without mutations in genetic panels were negative for multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) testing, suggesting that large deletions of BRCA are not a major cause of cancer susceptibility in this cohort.

For this reason and to identify novel non-canonical causative genes, we extended our analysis to a complete exome sequencing which included more than 180.000 exons from about 20.000 genes. Results from representative patients revealed novel genes whose mutation are strong candidates for increased hereditary risk for breast cancer in our population. These novel mutated genes could afford new molecular pathways in cancer and contribute with new therapeutic strategies.

Keywords: hereditary breast-ovarian cancer syndrome; germline mutations; genetic testing; cancer susceptibility genes; next generation sequencing; genetic counseling

INTRODUCCIÓN

Epidemiología del cáncer mamario.

A pesar de los avances en la prevención, control y tratamiento del cáncer durante los últimos años, las tasas de incidencia y mortalidad permanecen extremadamente altas, dando cuenta de la segunda causa de muerte en la población adulta a nivel mundial. Al año 2020, la tasa de incidencia ajustada por edad del cáncer mamario fue de 47,8 y el riesgo acumulado a los 74 años de 5,20, siendo el sitio de mayor incidencia seguido de pulmón, colo-recto y próstata respectivamente. Representa la segunda causa de muerte por cáncer a nivel global con una tasa de mortalidad ajustada por edad de 13,6⁽¹⁾.

En Uruguay, actualmente el cáncer de mama es el cáncer más frecuente en la mujer con una tasa de incidencia ajustada por edad de 73,63 con más de 1900 casos nuevos por año representando el 28% de todos los cánceres. Constituye la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, dando cuenta de casi 680 muertes anuales con una tasa ajustada de mortalidad de 20,66, lo que representa el 18,6 % de todas las muertes por cáncer. En el contexto global, Uruguay ocupa el segundo quintil superior en relación a las tasas de incidencia pero el primero en relación a las tasas de mortalidad por cáncer⁽²⁾. Estos datos revelan un riesgo acumulado a los 80 años del 12 %, permitiendo estimar que 1 de cada 8 mujeres desarrollará la enfermedad.

De todos los cánceres de mama se estima que un 85-90% son esporádicos, sin agregación familiar ni alteración genética de línea germinal demostrable, mientras que el 10-15% restantes se caracterizan por tener una alta frecuencia en familiares cercanos con un claro patrón hereditario de transmisión autosómica dominante de alta penetrancia genética⁽³⁾.

La primera descripción genealógica caracterizando el cáncer de mama familiar, fue publicada por el cirujano francés Paul Broca en 1866 en su trabajo “Traité des Tumeurs”⁽⁴⁾. Paul Broca analizó las causas de muerte de 38 miembros de la familia de su esposa a través de 5 generaciones entre 1788 y 1856, encontrando que de 24 mujeres estudiadas 10 murieron de cáncer mamario. Él mismo postuló que el cáncer de mama en esta familia se heredaba en “estado latente” hasta que por alguna causa se desarrollaba y malignizaba en algún momento de la vida.

Trabajos posteriores de Lane-Clayton en la década de 1920, reconocida como la fundadora de la epidemiología moderna, demostró una mayor incidencia y mortalidad por cáncer de mama en mujeres cuyas madres habían fallecido por la misma causa sugiriendo el concepto de cáncer hereditario⁽⁵⁾.

Estudios de Lynch y Krush en 1971 en 3 familias con cancer de mama y ovario proponen por primera vez una etiología genética como responsable de la susceptibilidad al cáncer de mama y ovario consistente con una herencia autosómica dominante⁽⁶⁾.

La causa genética del cancer de mama y ovario hereditario fue finalmente establecida por los trabajos pioneros de Marie Claire King en 1990, quien mediante procedimientos de ligamiento genético logró identificar una región genética del cromosoma 17 (17q21) asociada significativamente a la susceptibilidad hereditaria que denominó BRCA1⁽⁷⁾. En febrero de 1994, un grupo de investigadores liderados por Mark Skolnick de Myriad Genetics Inc. en colaboración con investigadores del NIH, clonaron y secuenciaron el gen BRCA1 localizado en esta región cuyas mutaciones eran responsables de un aumento del riesgo a desarrollar cáncer de mama y ovario^(8,9).

La existencia de más del 50% de familias con cáncer de mama familiar que no pudieron ser asociadas a mutaciones en BRCA1, guió a Michael Stratton y Richard Wooster a la identificación de un segundo locus genómico fuertemente ligado a la susceptibilidad en la región 13q12 que denominaron BRCA2, el cual fue también clonado y secuenciado^(10,11). Estos trabajos concluyeron que las mutaciones en BRCA2 confieren la misma susceptibilidad que BRCA1 para el cáncer de mama aunque el riesgo para el cáncer de ovario fue menor y el de cáncer mamario masculino mayor para mutaciones de BRCA2.

La participación de investigadores de Myriad Genetics Inc. en la identificación y secuenciado de genes BRCA, llevó a esta empresa biotecnológica a solicitar la patente de uso de los mismos con fines diagnósticos. Así, en 1998 Myriad Genetics Inc. obtuvo la patente en Estados Unidos de uso exclusivo de BRCA1 y BRCA2⁽¹²⁾. Myriad Genetics Inc, fue la única compañía que ofreció comercialmente el test genético de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario hasta 2013, año en el cuál las patentes fueron invalidadas por la corte suprema norteamericana por considerar que los genes naturales no pueden ser patentados⁽¹³⁾. La ausencia actual de patentes para el uso diagnóstico del secuenciado de genes BRCA asociado al advenimiento y desarrollo de tecnologías de secuenciado masivo, biología computacional y

bioinformática, han permitido una disminución significativa de los costos, mejorando la accesibilidad como método de tamizaje del riesgo genético al cáncer de mama y ovario.

Al presente, las mutaciones de los genes BRCA1 y BRCA2 son consideradas la principal causa de susceptibilidad al cáncer mamario, explicando hasta un 25-30% de cánceres de mama hereditarios⁽¹⁴⁾. La herencia de un alelo mutado en alguno de estos genes confiere un riesgo extremadamente elevado de padecer la enfermedad. En efecto, mientras que en la población general el riesgo acumulado es del orden del 10-12%, en las portadoras de una mutación de línea germinal en BRCA1/2 puede alcanzar el 85%. A su vez, las mujeres portadoras de mutaciones de BRCA1 y BRCA2 que desarrollan un cáncer mamario tienen un riesgo aumentado de cáncer secundario. El riesgo a 10 años de cáncer mamario contralateral para portadoras de variantes patogénicas de BRCA1 y BRCA2 se ha estimado en 20 y 30%⁽¹⁵⁾ respectivamente y de 12,7% y 6,8% para el cáncer de ovario⁽¹⁶⁾.

Los genes BRCA1 y BRCA2

Luego de más de 20 años de su identificación hoy sabemos que, a pesar de diferir en sus secuencias, tanto BRCA1 como BRCA2 son genes supresores tumorales de gran tamaño que tienen un papel clave en la reparación del ADN frente al daño genético, regulación del ciclo celular, mantenimiento de la estabilidad genómica y regulación de la expresión génica⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾.

El gen BRCA1 se localiza en el cromosoma 17q21 y codifica para una proteína de 220 kDa con 1863 aminoácidos distribuidos en 24 exones abarcando una amplia región cromosómica de aproximadamente 81 kilobases. El gen BRCA2 se localiza en el cromosoma 13q12-13 y codifica para una proteína de 384 kDa con 3418 aminoácidos distribuidos en 27 exones abarcando una amplia región cromosómica de 84 kilobases⁽¹⁹⁾. Ambos genes tienen un rol central en el mantenimiento de la integridad y estabilidad genómica a través de la reparación de rupturas doble hebra del ADN por un proceso altamente regulado denominado recombinación homóloga. La pérdida o disminución de función de los genes BRCA debido a mutaciones germinales resulta en inestabilidad genómica la cual es capaz de promover la transformación oncogénica⁽²⁰⁾.

A octubre de 2020, la base de datos "BRCA exchange", en colaboración con el consorcio de expertos internacionales "ENIGMA", reportan un total de 2228 variantes de BRCA1 y 2672 variantes de BRCA2 anotadas como patogénicas que alteran los mecanismos de reparación del ADN provocando un aumento del riesgo al desarrollo del cáncer de mama, ovario y otros tumores⁽²¹⁾.

Otros genes asociados al cáncer de mama y ovario hereditario (CMOH)

El conocimiento de que las mutaciones germinales de BRCA1/2 explican aproximadamente un 25-30% de todos los cánceres de mama hereditarios, condujo a la identificación de otros genes, para algunos de los cuales existe suficiente evidencia de inducir un aumento variable del riesgo para el desarrollo del cáncer de mama y ovario. Gran parte de estos genes codifican para proteínas que interactúan y/o participan en la estabilización o función fisiológica de los genes BRCA como ATM, CHEK2, p53, BARD1, BRIP, PALB2 y RAD51. Otros genes capaces de inducir un aumento del riesgo se relacionan con vías no relacionadas a los genes BRCA, como CDH1, PTEN, NBN y STK11 los cuales participan en vías de regulación del ciclo celular y migración celular⁽²²⁾. El riesgo relativo que aportan las variantes patogénicas de estos genes es variable y depende de su penetrancia y frecuencia poblacional⁽²³⁾.

Los biomarcadores de riesgo para el desarrollo de cáncer se consideran de baja penetrancia cuando su riesgo relativo está entre 1 y 1,5, moderado riesgo cuando es mayor de 1,5 y menor de 5 y de alto riesgo cuando es superior a igual o superior a 10.

Los genes cuyas mutaciones confieren un alto riesgo relativo incluyen a BRCA1, BRCA2, PTEN, STK11, p53 y CDH1, mientras que el resto son considerados de moderada penetrancia aunque, debido a las variaciones del mismo de familia a familia y entre las diferentes variantes, hace difícil establecer un valor exacto^(22,23).

Variaciones del número de copias de genes BRCA en el cáncer de mama y ovario hereditarios.

La gran mayoría de las mutaciones genéticas germinales con valor patogénico en los genes BRCA1 y BRCA2, son variantes de uno a pocos nucleótidos, las cuales son detectadas con alta sensibilidad por tecnologías de secuenciado de última generación.

Sin embargo, más recientemente se ha demostrado que una fracción significativa de alteraciones genéticas de los genes BRCA, la constituyen pérdidas totales o casi totales de uno de los genes BRCA

correspondiente a uno de los alelos, las cuales suelen pasar inadvertidas por las tecnologías convencionales de secuenciado ⁽²⁴⁾.

Con el advenimiento de procedimientos de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) para estudiar grandes deleciones alélicas o aumento de número de copias de un gen (CNV, “copy number variation”), se ha observado que la pérdida total o parcial de uno de los alelos de genes supresores tumorales se asocian significativamente a una gran fracción de síndromes hereditarios de susceptibilidad al cáncer ^(25,26).

El desarrollo de la tecnología basada en amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA; Multiplex Ligation-Dependent Amplification), permite identificar estos defectos específicamente, especialmente en individuos con fuertes antecedentes de cáncer familiar hereditario en los cuales no se han detectado variantes patogénicas puntuales por secuenciado de nueva generación de genes BRCA ⁽²⁴⁾. Según diferentes estudios entre 1 a 30% de los defectos con consecuencias patogénicas en genes BRCA se explican por amplios reordenamientos genéticos incluyendo variaciones en el número de copias o grandes deleciones ⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾.

Estudios del exoma completo en el CMOH.

Un reciente análisis meta-analítico de 21.400 casos de síndrome de predisposición hereditaria al cáncer de mama y ovario, reveló que las variantes patogénicas de BRCA1 y BRCA2 son responsables de aproximadamente un 25-30% de los casos de cáncer de mama y ovario hereditario ⁽²⁹⁾. Los estudios genómicos extendidos a otros genes de alta y moderada penetrancia permitieron la identificación de mutaciones en genes como ATM, BRIP1, CDH1, PALB2, PTEN, RAD51C, STK11 y TP53, entre otros ⁽²²⁾. Sin embargo, para un 50-60% de los casos de síndromes de cáncer de mama y ovario hereditarios (CMOH) estos paneles son negativos, por lo que no se ha podido demostrar una causa genética ⁽³⁰⁾.

El desarrollo de procedimientos de secuenciado masivo de la mayoría de exones que codifican los diferentes genes identificados en el genoma humano (Whole-exome sequencing) ha permitido secuenciar cerca de 180.000 exones correspondientes a unos 20.000 mil genes en forma simultánea ⁽³¹⁾. Estos estudios han identificado recientemente nuevos genes cuyas variantes genéticas germinales los posiciona como potenciales causas genéticas del cancer de mama y ovario hereditario tales como FANCC (Fanconi Anemia Complementation Group C), BLM (Bloom Syndrome Protein), FANCM (Fanconi Anemia Complementation Group M), MDM1 (microtubule-binding protein 1) y RECQL (RecQ Like Helicase) entre otros ⁽³²⁾.

Actualmente, diversos laboratorios a nivel global están aplicando estudios exómicos en distintos síndromes cáncer hereditario a fines de identificar nuevos genes de susceptibilidad en cáncer.

Desarrollo de procedimientos genómicos para el cáncer de mama y ovario hereditarios (CMOH) en poblaciones latinoamericanas.

En países latinoamericanos incluyendo Uruguay, los primeros estudios de prevalencia de mutaciones de genes BRCA en familias con una historia de cáncer de mama y/o ovario hereditario se realizaron mediante tecnologías de PTT (Protein Truncation Test) o HDA (Heteroduplex analysis) o SSCP (Single-strand conformational polymorphism) para el caso de los estudios en México ⁽³³⁾, Chile ^(34,35), Colombia ⁽³⁶⁾, Uruguay ^(37,38), mientras que tecnologías de amplificación seguida de secuenciado completo de los genes por método de Sanger fueron implementadas en Argentina y Venezuela ^(39,40) y por secuenciado masivo por Brazil ⁽⁴¹⁾. El análisis de estos reportes revela que el servicio de oncogenética del Hospital de Clínicas fue uno de los grupos pioneros en implementar este tipo de estudios en Sudamérica.

Un relevamiento más reciente ⁽⁴²⁾, identificó 14 grupos en países latinoamericanos que desarrollaron procedimientos propios de secuenciado masivo de genes BRCA o paneles genéticos usando plataformas de secuenciado masivo o de nueva generación (NGS) de Illumina y Ion-Torrent distribuidos en Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, México, Guatemala y Uruguay.

Adicionalmente, existen limitados reportes de estudios de MLPA para estudiar grandes pérdidas o duplicaciones de genes BRCA en Sudamérica ^(42,43) al igual que estudios exómicos en portadoras de cáncer de mama y ovario hereditarios de los cuales se destacan recientes iniciativas generadas por grupos chilenos y brasileros ^(32,44).

La experiencia uruguaya en la implementacion de procedimientos genómicos. A partir del año 2000 un grupo de investigadores básicos y clínicos del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina, liderado por la Prof. Dra. Lucía Delgado, tomaron la iniciativa de incorporar por primera vez en el país

la determinación de mutaciones germinales de genes BRCA y proveer asesoramiento genético a familias uruguayas. En dicho proceso se creó la Unidad de Oncogenética del Hospital de Clínicas con una integración multidisciplinaria que logró asesorar a más de 300 familias con síndrome de predisposición hereditaria al cáncer de mama y ovario. A través de esta iniciativa este equipo logró completar la determinación molecular de mutaciones germinales de BRCA1/2 en varias de estas familias

Uno de estos trabajos describió por primera vez la presencia de una inserción de 6 nucleótidos en el exón 11 del gen BRCA2 que provocó la generación de un codón de terminación prematuro generando una proteína disfuncional. Lo relevante de este trabajo fue la descripción de la misma variante de BRCA2 en dos gemelas monocigóticas de 49 años que presentaron un cáncer mamario de características clínicas similares ⁽³⁷⁾.

En un reporte posterior del grupo de trabajo ⁽³⁸⁾, se estudiaron 42 familias que cumplían con los criterios de cáncer mamario hereditario mediante el test de proteína truncada para el exón 11 de BRCA1 y exones 10 y 11 de BRCA2. En dicho trabajo se reportó un 17% de portadores de mutaciones BRCA1/2 incluyendo la identificación de dos variantes patogénicas de BRCA1 y otra en BRCA2 que no habían sido reportadas hasta ese momento. Un hecho también llamativo fue la predominancia de mutaciones en BRCA2 sobre BRCA1, en contraste con la mayor parte de estudios reportados a la fecha, donde se identifica un claro predominio de mutaciones en BRCA1.

Dada la ausencia de tecnologías de secuenciado masivo y escaso desarrollo de la bioinformática en esa época, el equipo recurrió a procedimientos experimentales basados en la combinación de dos tecnologías: test de proteína truncada (PTT) y heterodúplex de ADN, seguido del secuenciado directo por técnica de secuenciado por electroforesis capilar utilizando el método Sanger de los fragmentos alterados. Se debe destacar que tales procedimientos eran muy complejos y laboriosos requiriendo reactivos importados de alto costo y equipamiento de secuenciado por electroforesis capilar que obligaba a enviar muestras a secuenciar al exterior sumado a un contexto de escasos recursos económicos para la investigación y desarrollo en el área de la medicina molecular.

Es importante destacar que la Unidad de Oncogenética del Hospital de Clínicas, fue el único centro en Uruguay en realizar el test mutacional de BRCA aunque por su altos costos, alto requerimiento de RRHH capacitados y precariedad de cargos docentes, esta actividad diagnóstica pionera en el país debió discontinuarse.

En el año 2013, en colaboración con el recientemente creado Instituto Pasteur, el Prof. Dr. Alfonso Cayota, Director del Departamento Básico de Medicina, promueve la recuperación de las capacidades de procedimientos genéticos diagnósticos con la incorporación de tecnologías de última generación en el marco de la Unidad de Oncogenética del Servicio de Oncología Clínica del Hospital Universitario junto a su Directora, la Prof. Dra. Lucía Delgado.

Este marco colaborativo entre diferentes unidades tecnológicas del Instituto Pasteur de Montevideo (Bioinformática, Genómica Funcional y Biología Molecular) y diferentes servicios del Hospital de Clínicas (Servicio de Oncología Clínica y Dpto. Básico de Medicina) permitió la conformación de un grupo multidisciplinario que incorporó bioinformáticos, biólogos moleculares, bioquímicos y profesionales de la Salud con capacidad para diseñar un procedimiento experimental de secuenciado masivo (NGS) para el secuenciado completo de los genes BRCA1 y BRCA2 y asegurar asesoramiento genético a dichas familias. La propuesta contó en ese momento con las plataformas tecnológicas del Instituto Pasteur que incorporó el primer equipamiento de secuenciado de última generación en nuestro país, la cual contó con el apoyo financiero inicial del Programa de Investigación aplicada del Fondo María Viñas de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) a través de fondos concursables.

El desarrollo de esta iniciativa tuvo como principales cometidos: a) implementar capacidades genómicas diagnósticas en el Hospital de Clínicas; b) desarrollar procedimientos moleculares propios con tecnologías de última generación que aseguren procedimientos de alta sensibilidad, cobertura y exactitud; c) asegurar una reducción significativa de los costos para universalizar el acceso a este tipo de estudios; d) conocer las características y variabilidad genéticas propias de nuestra población a través del análisis e identificación de variantes poblacionales propias, recurrentes o no reportadas; e) aportar asesoramiento genético a familias con predisposición hereditaria al cáncer de mama y ovario y f) contribuir a la prevención y tratamiento del cáncer de mama y ovario.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Población estudiada

La selección de pacientes, familias y de los casos probandos, así como el asesoramiento genético se realizaron en la consulta de la Unidad de Oncogenética del Servicio de Oncología Clínica del Hospital de Clínicas. Como toda prueba genética, dadas las implicancias psicológicas, médicas, éticas y sociales que implican, es imprescindible el asesoramiento genético en forma previa y posterior a la realización eventual del estudio, según criterios y pautas pre-establecidas ⁽⁴⁵⁾.

La selección de pacientes para estudio genético fueron adaptados a partir de los criterios de selección de la “National Comprehensive Cancer Network” ⁽⁴⁶⁾ detallados en la Tabla 1.

Cuando de la entrevista inicial, surgió indicación de estudio genético por cumplir con los criterios de sospecha de predisposición hereditaria al cáncer, se realizó el correspondiente asesoramiento genético y firma de consentimiento informado. Este estudio y el correspondiente consentimiento informado fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República.

En total se incluyeron para este estudio 104 casos que según su historia familiar y/o personal cumplieron con los criterios de sospecha de síndrome cáncer de mama y ovario hereditario.

TABLA 1: CRITERIOS PARA INDICACIÓN DE PRUEBA GENÉTICA DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO (NCNN 2019)
<ul style="list-style-type: none">• Individuo cuya familia ha sido diagnosticada con variante patogénica conocida de BRCA1/2 u otro gen de susceptibilidad
<ul style="list-style-type: none">• Individuo con historia de cáncer de mama más uno o más de los siguientes:<ul style="list-style-type: none">- Diagnosticado \leq 45 años- Diagnosticado entre 45-50 años con:<ul style="list-style-type: none">✎ Otro cáncer de mama a cualquier edad (bilateral o ipsilateral sincrónico o asincrónico)✎ \geq 1 familiar cercano con cáncer de mama a cualquier edad✎ \geq 1 familiar cercano con cáncer de próstata de alto grado (Gleason \geq 7)✎ Historia familiar de cáncer no conocida total o parcialmente- Diagnosticado \leq 60 años con:<ul style="list-style-type: none">✎ Cáncer de mama triple negativo- Diagnosticado a cualquier edad con:<ul style="list-style-type: none">✎ \geq 1 Familiar cercano (primer, segundo o tercer grado de consanguinidad de misma rama familiar) con:<ul style="list-style-type: none">+ Cáncer de mama \leq 50 años, o+ Carcinoma de ovario, o+ Cáncer de mama masculino, o+ Cáncer de páncreas✎ \geq 2 Cánceres de mama en el mismo individuo o familiar cercano- Ascendencia Judío-Askenazi
<ul style="list-style-type: none">• Antecedente personal de carcinoma de ovario epitelial (no mucinoso)
<ul style="list-style-type: none">• Antecedente personal de cáncer de mama masculino
<ul style="list-style-type: none">• Antecedente personal de cáncer de páncreas
<ul style="list-style-type: none">• Antecedente personal de cáncer de próstata de alto grado (Gleason \geq 7) a cualquier edad con:<ul style="list-style-type: none">- \geq 1 familiar cercano con carcinoma de ovario, cáncer de páncreas o cáncer de próstata metastásico a cualquier edad, o cáncer de mama $<$ 50 años o- \geq familiar cercano con cáncer de mama o prostático de cualquier grado a cualquier edad, o- Ascendencia judío-askenazi
<ul style="list-style-type: none">• Presencia de variante patogénica/probablemente patogénica somática en cualquier tumor en ausencia de estudio genético de línea germinal
<ul style="list-style-type: none">• Individuos con tumores relacionados a mutaciones en BRCA pasibles de beneficiarse de terapias dirigidas independientemente de historia familiar de cáncer
<ul style="list-style-type: none">• Todo individuo que sin satisfacer ninguno de los criterios previos tiene \geq 1 familiar de primer o segundo grado de consanguinidad que tenga uno o más de los criterios anteriores

2. Procedimientos de aislamiento de ADN y Secuenciado genético

Aislamiento de ADN. A partir de 5 ml de muestras sanguíneas obtenidas por punción venosa periférica en tubos citratados, se procedió al aislamiento de fracción enriquecida en células mononucleares periféricas mediante centrifugación a 2.500 rpm por 15 min. El ADN genómico fue purificado mediante kit comercial de Qiagen (QIAmp DNA Blood). Luego de su cuantificación fluorométrica (Qubit,

Invitrogen) el ADN se fragmentó mecánicamente en fragmentos de 300-350 pb por ultrasonido (Covaris M220). Los fragmentos fueron enriquecidos utilizando microesferas basadas en tecnologías de fase de inmovilización reversible (Phase Reversible Immobilization, SPRIselect, Beckman Coulter) que permite una purificación rápida, eficiente y de bajo costo.

Reparación de extremos 5' y 3' y ligación de adaptadores

Luego de la reparación enzimática de los extremos del ADN fragmentado, se procedió a la ligación de adaptadores 5' y 3' necesarios a la individualización de cada muestra (“barcoding” o “indexing”), su amplificación y su secuenciado. Los adaptadores 5' y 3' se ligaron por reacción con la T4 DNA ligasa. Los adaptadores fueron diseñados en nuestro laboratorio para lograr mayor eficiencia y reducir costos de procedimiento. Los mismos constan de una secuencia de 6 nucleótidos que será específica para cada muestra o paciente designada “index” o “barcode” para poder secuenciar en paralelo más de un paciente o muestra biológica por ronda de secuenciado. Asimismo, poseen sitios de unión a cebadores específicos para su amplificación y secuenciado asociado a secuencias de unión a los “chips” (flow cells) de secuenciación; P5 y P7 específicos para secuenciado en plataforma Illumina (Figura 1)

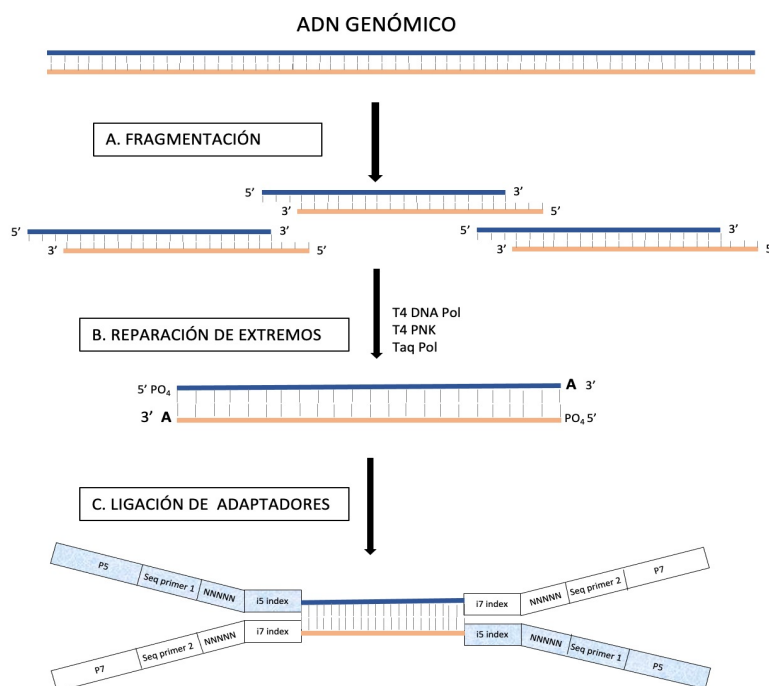


Figura 1. Esquema de fragmentación del ADN genómico, reparación de extremos, ligación y estructura de adaptadores

Purificación de fragmentos de ADN conteniendo secuencias de genes de interés mediante captura por hibridación con sondas complementarias de ARN biotinilado

Las librerías de ADN de cada muestra, identificadas individualmente por los índices o “código de barras” de los adaptadores respectivos fueron mezcladas y sometidas al enriquecimiento en regiones codificantes para los genes de interés. Para lo mismo se diseñaron sondas de ARN biotinilado complementarias a las regiones exónicas e intrónicas proximales de BRCA1 y BRCA2 únicamente, las regiones codificantes para un panel extendido de 9 genes adicionales (ATM, BARD1, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, PTEN, STK11, TP53), o bien para el exoma completo el cual incluye las regiones codificantes de 20.000 genes. El panel extendido incluyó genes asociados con susceptibilidad hereditaria al cáncer de mama y ovario, los cuales fueron seleccionados en base a su asociación

reportada con el cáncer de mama hereditario y de su penetrancia genética.

Las sondas de ARN biotilado usadas para la captura de regiones de genes de interés se diseñaron y seleccionaron mediante la aplicación “on line” “Agilent SureSelect design tool” (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign>).

Luego de la hibridización con las sondas de ARN biotilado, los híbridos conteniendo las regiones de interés son purificados mediante el uso nanoesferas magnéticas con jugadas a estreptavidina mediante el uso de imanes. Las muestras fueron entonces secuenciadas en paralelo utilizando el kit de secuenciado de Illumina MiSeq Reagent V2 kit.

En nuestro sistema se estima una capacidad de secuenciado de 15-20 muestras en paralelo con una cobertura >500x. Esto quiere decir que cada base o región será secuenciada o “leída” por lo menos 500 veces en promedio.

3. Procesamiento y análisis de datos de secuenciado

Luego de agrupar los datos crudos de secuenciado según los índices de identificación utilizados (“demultiplexing”) y eliminar las secuencias de los adaptadores, la calidad de las secuencias obtenidas fueron chequeadas usando FastQ⁽⁴⁷⁾. Las secuencias fueron luego mapeadas contra el genoma humano de referencia con parámetros por defecto (hg19, GRCh37), usando el programa BWA⁽⁴⁸⁾. Se consideraron sólo aquellas secuencias que mapeen de forma única al genoma, lo cual se realizó con la herramienta SAMtools⁽⁴⁹⁾.

El análisis de variantes se realizó con el recurso informático GATK⁽⁵⁰⁾ y la anotación de las mismas mediante ANNOVAR⁽⁵¹⁾. La cobertura promedio de las regiones genómicas de interés fue > 92% y la profundidad de lectura \geq 500x.

La descripción y nomenclatura de las variantes encontradas se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la “Human Genome Variation Society, HGVS”⁽⁵²⁾.

La frecuencia poblacional de cada variante fue obtenida de bases de datos públicas (1000 genomes, ExAC, GnomAD) y los identificadores para identificar las mismas, en caso de haber sido reportadas, fueron tomadas de la base de datos “dbSNP” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

El significado clínico de cada variante fue obtenido de la base de datos ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) y categorizadas como Benignas, Probablemente Benignas, de Significado Incierto (VUS), Probablemente Patogénicas o Patogénicas.

Para el caso de las variantes de significado incierto, de las cuales no existen datos suficientes como para asignarles una clara consecuencia clínica, tomamos en consideración recursos bioinformáticos de predicción *in silico* con el fin de evaluar el potencial impacto que las variantes con sustitución de aminoácidos pudieran ejercer en la estructura o función de la proteína respectiva (SIFT, Polyphen2). Dichas predicciones también tuvieron en cuenta el grado de conservación de cada variante de significado incierto a través del recurso REVEL (Rare Exome Variant Ensemble Learner) el cual integra una gama de predictores dando un score de patogenicidad unificado (FATHMM, VEST, PolyPhen-2, SIFT, PROVEAN, MutationAssessor, MutationTaster, LRT, GERP++, SiPhy, phyloP y phastCons). De acuerdo a estos predictores, se consideraron que aquellas variantes con sustitución de aminoácidos tendrán un alto poder deletéreo o patogénico cuando SIFT <0.05, Polyphen2 >0.9 y Revel >0.5⁽⁵³⁾.

La información de los scores de predicción fueron evaluados en asociación a la frecuencia poblacional y tipo de variantes (generación de codón de terminación prematuro, cambio de aminoácido, cambio del marco de lectura, etc).

El conjunto de estos datos nos permitió realizar consideraciones acerca del grado de patogenicidad potencial de las variantes de significado incierto. Tomando en cuenta estas clasificaciones *in silico*, cuando una variante de significado incierto (VUS) arrojó scores compatibles con un alto potencial de patogenicidad fueron reclasificadas como VUS+.

La identificación de variantes clasificadas como patogénicas, probablemente patogénicas o como VUS+, fueron siempre confirmadas mediante secuenciado por método de Sanger a partir de amplicones obtenidos por PCR de nuevas muestras de sangre.

4. Procedimientos de variación del número de copias de genes BRCA1 y BRCA2 (MLPA) y secuenciado del exoma completo.

Para el estudio de eventuales pérdidas totales o parciales de genes BRCA1 o BRCA2 se desarrolló la tecnología basada en amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA; Multiplex

Ligation-Dependent Amplification), la cual permite identificar estos defectos específicamente, especialmente en individuos con fuertes antecedentes de cáncer familiar hereditario en los cuales no se han detectado variantes patogénicas puntuales por secuenciado de nueva generación de genes BRCA. De cada paciente se procesaron en paralelo dos muestras de ADN purificado a partir de células mononucleares periféricas para análisis de BRCA1 y BRCA2.

Inicialmente 50-100 ng de ADN fueron desnaturalizados 5 min a 98°C seguido de hibridación con sondas complementarias a cada uno de los exones del gen BRCA correspondiente a 60°C por 16-20 horas. Para BRCA1 se utilizaron 48 sondas con un largo diferente para cada exón (SALSA MLPA probemix P002 BRCA1, MRC-Holland) y 50 sondas específicas de BRCA2 (SALSA MLPA probemix P090 BRCA1, MRC-Holland) también con un tamaño definido para cada exón.

Luego de la hibridización se procedió a la ligación y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cada uno de los exones.

Los fragmentos generados por PCR para cada gen se procesaron mediante electroforesis capilar en secuenciador ABI-3500 (Applied Biosystems) y el análisis de los mismos se realizó mediante el programa "Coffalyser.Net" (MRC-Holland). Los resultados fueron analizados en comparación con muestra control de ADN de sujetos sanos.

Para el secuenciado del exoma completo, las muestras de ADN procesado fueron enviadas a secuenciar el exterior (Macrogen Inc., Korea) debido a la necesidad de utilizar la plataforma de alta capacidad de secuenciado "HiSeq 2500" de Illumina no disponible en Uruguay.

El análisis bioinformático de datos se realizó de igual forma que la descrita para secuenciado de paneles y genes BRCA.

RESULTADOS

Frecuencia y tipo de variantes genéticas de genes BRCA1 y BRCA2 identificadas

En una primera fase, se diseñó un procedimiento para analizar la secuencia total de las regiones exónicas e intrónicas proximales completas de genes BRCA1 y BRCA2. Se incluyeron un total de 104 pacientes que consultaron en la unidad de oncogenética del Hospital de Clínicas con historia personal y/o familiar compatible con síndrome de predisposición hereditaria para cáncer de mama y ovario. Luego del asesoramiento genético correspondiente e información sobre el procedimiento, las/los pacientes firmaron su consentimiento para la realización del test genético correspondiente.

De los 104 casos estudiados, 86 (82,7 %) tenían historia personal de cáncer de mama u ovario mientras que 18 casos (17,3 %) fueron personas sanas sin antecedentes oncológicos que consultaron por historia familiar significativa de cáncer hereditario de mama y ovario sin familiar afectado vivo o accesible para estudio genético (Tabla II).

Tabla II. Distribución y características de las variantes genéticas patogénicas identificadas de BRCA1/2 (N=104)

Tipo de variantes genéticas	Historia personal cáncer (N)	Nº de Variantes patogénicas (BRCA1-BRCA2)
VARIANTES BENIGNAS	NO (16)	---
	SI (65)	---
VARIANTES PATOGENICAS - Codón de terminación prematuro - Alteración del marco de lectura - Pérdida de codón de inicio de transcripción - Cambio de aminoácido con potencial patogénico (VUS+)	NO (2)	2 en BRCA2
	SI (21)	5 en BRCA1 - 16 en BRCA2
TOTALES	104	18 BRCA2 (78%) – 5 BRCA1 (22%)

Un análisis global de los 104 casos detectó un total de 23 casos de portadores de variantes genéticas patogénicas en genes BRCA representando un 22,1 % de positividad.

De las 23 variantes patogénicas de BRCA1/2, 21 de ellas se detectaron en pacientes con diagnóstico de cáncer de mama y/o ovario y sólo 2 variantes se registraron en casos sanos al momento de la consulta, representando un 24,4 % y 11,1 % de positividad respectivamente (Tabla III). Las medias de edad al momento del diagnóstico del grupo con historia de cáncer de mama-ovario fue de 38.9 ± 9.1 años con un rango etario de 21 a 69 años.

De las 23 variantes genéticas patogénicas, 5 correspondieron al gen BRCA1 (22%) y 18 (78%) a BRCA2. Las variantes patogénicas se describen en la Tabla III. Las mismas producen codones de terminación prematuros, corrimiento del marco de lectura debido a inserciones y/o deleciones de una o más bases y cambios de aminoácidos con afectación de la estructura/función de la proteína.

Las características clínicas y antecedentes oncológicos de los casos positivos a mutaciones en genes BRCA1 y BRCA2 se muestran en la Tabla IV

Tabla III. Variantes genéticas patogénicas de genes BRCA1 y BRCA2 identificadas (N=104)

ID	Edad	Gene/Exón	Cambio en cDNA	Cambio en proteína	Código de referencia	Tipo de Variante	Significado clínico
1	39	BRCA2/11	NM_000059.4: c.4131_4132insTGAGG A	p.Thr1378Ter	rs80359429	Stop gained	Patogénica
2	39	BRCA2/11	NM_000059.4: c.4131_4132insTGAGG A	p.Thr1378Ter	rs80359429	Stop gained	Patogénica
5	37	BRCA2/23	NM_000059.4: c.9078 G>C	p.Gln3026His	rs1359207910	Missense	VUS+
7	32	BRCA2/11	NM_000059.4: c.3881T>G	p.Leu1294Ter	rs80358632	Stop gained	Patogénica
11	39	BRCA1/19	NM_007294.4: c.5266dupC	p.Gln1756fs	rs80357906	Frameshift	Patogénica
13	28	BRCA2/2	NM_000059.4: c.2T>G	p.Met1Arg	rs80358547	Initiator codon variant	Patogénica
14	42	BRCA2/11	NM_000059.4: c.3879_3883delATTAC	p.Ile1293fs	rs1566229335	Frameshift	Patogénica
18	37	BRCA2/11	NM_000059.4: c.5345dupA	p.Gln1782fs	rs80359507	Frameshift	Patogénica
19	40	BRCA2/2	NM_000059.4: c.2T>G	p.Met1Arg	rs80358547	Initiator codon variant	Patogénica
21	42	BRCA1/10	NM_007294.4: c.1772T>C	p.Ile591Thr	rs80356859	Missense	VUS+
28	38	BRCA2/11	NM_000059.4: c.5345dupA	p.Gln1782fs	rs80359507	Frameshift	Patogénica
39	28	BRCA2/11	NM_000059.4: c.2806_2809delAAAC	p.Lys936fs	rs80359351	Frameshift	Patogénica
42	52	BRCA1/10	NM_007294.4: c.1504_1507delAATT	p.Leu502fs	rs886039955	Frameshift	Patogénica
50	51	BRCA2/15	NM_000059.4: c.7580_7583dupGTAG	p.Gly2529fs	rs1555286296	Frameshift	Patogénica
53	35	BRCA2/11	NM_000059.4: c.5946delT	p.Ser1982fs	rs80359550	Frameshift	Patogénica
54	32	BRCA2/15	NM_000059.4: c.7558C>T	p.Arg2520Ter	rs80358981	Stop gained	Patogénica
68	36	BRCA1/12	NM_007294.4: c.4327C>T	p.Arg1443Ter	rs41293455	Stop gained	Patogénica
71	38	BRCA1/10	NM_007294.4: c.3101delA	p.Asn1034fs	No reportada	Frameshift	Patogénica
78	44	BRCA2/11	NM_000059.4: c.2806_2809delAAAC	p.Lys936fs	rs80359351	Frameshift	Patogénica
86	21	BRCA2/11	NM_000059.4: c.3062_3066delAACAT	p.His1022Ter	rs80359369	Stop gained	Patogénica
103	44	BRCA2/27	NM_000059.4: c.9976A>T	p.Lys3326Ter	rs11571833	Stop gained	Patogénica
105	38	BRCA2/25	NM_000059: c.9381G>A	p.W3127Ter	rs876661242	Stop gained	Patogénica
109	30	BRCA2/25	NM_000059: c.A8119C	p.K2707Q	No reportada	Missense	VUS+

Missense = Cambio de aminoácido; Frameshift = Corrimiento de marco de lectura; Stop gained = generación de un codón de terminación prematuro; Initiator codon variant = pérdida del codón de inicio de la transcripción (VUS+). Variante de significado clínico incierto en la cual los predictores indican un alto potencial de patogenicidad (SIFT, PolyPhen2, Revel, PhyloP, etc)

Análisis de panel extendido de genes en casos de predisposición hereditaria sin mutaciones en genes BRCA1 y BRCA2

A los casos que fueron negativos para variantes genéticas patogénicas de BRCA1 y BRCA2, se les ofreció estudiar un grupo adicional de genes de alta y moderada penetrancia que han sido reportados más recientemente como potenciales causas genéticas de susceptibilidad de menor frecuencia al cáncer de mama hereditario.

En función del análisis de reportes internacionales y bases de datos públicas se seleccionaron 9 genes de interés a secuenciar: ATM (Ataxia Teleangiectasia Mutated), BARD1 (BRCA1 Associated RING Domain 1), CDH1 (Cadherin 1), CHEK2 (Checkpoint Kinase 2), NBN (Nibrin), PALB2 (Partner And Localizer Of BRCA2), PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog), STK11 (Serine/Threonine Kinase 11) y TP53 (Tumor Protein P53).

Tabla IV. Antecedentes clínico-oncológicos de casos con test BRCA positivo (ver Tabla III)

ID	Probando		Perfil Biológico Tumoral			Historia Familiar ^a	Ascendenci a Ashkenazi
	Tipo de Cáncer - Edad de Diagnóstico		RE	RP	HER2		
1	Sana	27	n/c	n/c	n/c	CM (39, 39, 44, 58, 61)	No
2	CM	39	+	-	-	CM (39, 44, 58, 61)	No
M5	CM	37	+	+	-	CM (37), CPanc (59)	No
M7	CM	32	?	?	?	CM (33,50), CP (68)	No
M11	CM/CO	39/41	-	-	-	CM(25), CO (45)	No
M13	CM	28	+	+	-	CM (33), CPanc (70)	No
M14	CM	42	?	?	?	CM (45), CCR (>50)	No
M18	CM	37	-	-	-	CM (39, <50)	No
M19	CM	40	+	-	-	CM (40)	No
M21	CM	42	+	+	-	CM (42, 36, 24, 80)	Si
M28	Sano	32	n/c	n/c	n/c	CM (37, 39, <50)	No
M39	CM	28	+	+	?	CM (48, 35, 73, 60, 23, 35, 34)	No
M42	CM/CO	52/53	+	+	-	CM (64, 38, 42), CO (38)	No
M50	CMbilat/CO	51/65	+	+	-	CM bilateral (?)	No
M53	CM	35	+	+	?	CM 34, CPanc (?)	No
M54	CM	32	+	+	-	CM (52) familia pequeña	No
M68	CO	36	n/c	n/c	?	CO (<50, <50), CBP (44)	No
M71	CM	38	+	+	-	Desconoce	No
M78	CM	44	+	+	+++	CG (62), CP (?), CM hombre (38)	No
M86	CG	21	N C	NC	NC	CM(<50), CO (<50)	No
103	CM	44	-	-	-	CM (50)	No
105	CM bilt	38/38	+	+	-	Sin antecedentes	No
109	CM	30	+	+	-	CM bilat (?). CM (?)	No

(a) Antecedentes oncológicos en familiares de 1er y 2do grado de consanguinidad, CM: Cáncer de Mama, CO: Cáncer de Ovario, CP: Cáncer de próstata, CG: Cáncer gástrico, CPanc: Cáncer de páncreas, CBP: Cáncer bronco-pulmonar, CCR: Cáncer colo-rectal.

(?) Se desconoce dato o edad; (NC): No corresponde

Se estudiaron 42 casos, en 12 de los cuales (28,6%) se identificaron variantes patogénicas o de significado clínico incierto al momento actual (VUS) las cuales, de acuerdo al análisis “in silico” de su potencial patogénico, se clasificaron como de alto potencial patogénico (Tabla V).

Nueve de los 12 portadores identificados correspondieron a pacientes con historia personal de cáncer de mama y/o ovario y 3 casos a mujeres sanas con historia familiar de riesgo hereditario significativa.

Teniendo en cuenta las variantes genéticas patogénicas y probablemente patogénicas en la población total estudiada incluyendo las 23 variantes en BRCA y 12 variantes en otros genes de susceptibilidad, el número de casos con probable riesgo genético asciende a un total de 35 en 104 casos estudiados (33,6%).

Como se observa en la Tabla V, se identificaron 7 casos con una misma variante recurrente en el exón 12 del gen CHEK2 dando cuenta de un porcentaje del 16,7 % del total de casos estudiados con el panel extendido de genes.

Tabla V. Análisis de variantes genéticas patogénicas o probablemente patogénicas en panel de genes extendido sobre 42 casos con test BRCA negativo (ATM, BARD1, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, PTEN, STK11, TP53)

ID	CMO	Gene/Exon	Cambio en cDNA	Cambio en Proteína	Código referencia	Tipo de variante	Significado clínico
61	++	CHEK2/12	NM_007194:c.1333T>C	p.Tyr445His	rs587778194	Missense	VUS
62	++	CHEK2/12	NM_007194:c.1333T>C	p.Tyr445His	rs587778194	Missense	VUS
63	--	CHEK2/12	NM_007194:c.1333T>C	p.Tyr445His	rs587778194	Missense	VUS
65	++	CHEK2/12	NM_007194:c.1333T>C	p.Tyr445His	rs587778194	Missense	VUS
66	++	CHEK2/12	NM_007194:c.1333T>C	p.Tyr445His	rs587778194	Missense	VUS
67	--	ATM/18	NM_000051:c.2726C>T	p.Thr909Ile	rs1555083259	Missense	VUS
		CHEK2/12	NM_007194:c.1333T>C	p.Tyr445His	rs587778194	Missense	VUS
76	++	CHEK2/12	NM_007194:c.1333T>C	p.Tyr445His	rs587778194	Missense	VUS
83	--	ATM/6	NM_000051:c.614T>G	p.Leu205Ter	No reportada	Stop gained	Patogénica
90	++	NBN/3	NM_002485:c.283G>A	p.Asp95Asn	rs61753720	Missense	VUS
95	++	PALB2/1	NM_024675:c.G7T	p.Glu3Ter	rs878855123	Stop gained	Patogénica
98	++	P53/4	NM_000546:c.245insT	p.Pro82fs	No reportada	Frameshift	Patogénica
101	++	PALB2	NM_024675:c.2186insA	p.Pro729fs	rs1597089845	Frameshift	Patogénica

- Para el caso de la presencia de variantes con sustitución de aminoácidos (missense) cuyo significado clínico es aún incierto (VUS), se incluyeron sólo aquellas para las cuales los predictores “in silico” determinaron una alta probabilidad de patogénica (SIFT>0.05, Polyphen2 >0.9 y Revel >0.5).
- CMO: Casos con antecedente previo o actual de cáncer de mama y/o ovario
- “Missense” variante que provoca un cambio de aminoácido en la proteína
- “Stop Gained” variante que provoca la generación de un codón de terminación prematuro de la proteína (Proteína truncada)
- “Frameshift” variante genética que provoca un corrimiento del marco de lectura del gen

El análisis de frecuencia de esta variante, a través del acceso a bases de datos de más de 125.000 exomas y más de 15.000 genomas de la “Genome Aggregation Database” (gnomAD, <https://gnomad.broadinstitute.org/>) y del recurso “ALFA” (Allele Frequency Aggregation, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/) que agrupa variantes de más de 100.000 sujetos provenientes de diferentes regiones geográficas y etnias, reveló una frecuencia casi nula a nivel mundial.

Si bien, estas bases de datos incluyen poblaciones latinoamericanas, especialmente centroamericanas, existe la posibilidad que sea una variante de alta frecuencia en la población uruguaya. Para analizar esta posibilidad se investigó la presencia de la misma en las secuencias de 30 genomas uruguayos aportados por el proyecto “Urugenomes” (<http://urugenomes.org/>), cuya frecuencia fue nula. Por tanto, esta variante de CHEK2 tiene una frecuencia significativamente elevada en nuestra población de familias con historia de cáncer de mama y/o ovario. Su importancia como causa de riesgo genético deberá ser analizada en profundidad con un tamaño muestral mayor asociado a un detallado estudio de antecedentes oncológicos familiares.

Con respecto al significado clínico de esta variante, la misma se considera de significado incierto dado la ausencia de reportes y/o evidencias científicas suficientes. Sin embargo, el análisis *in silico* de esta variante con el fin de estudiar el potencial patogénico, le asignan un alto potencial de patogénica.

Estudio de la agregación familiar y familiograma oncológico de una nueva variante del gen ATM con alto potencial predictivo de patogénica.

El hallazgo de variantes genéticas patogénicas o con alto potencial deletéreo, conlleva en la mayoría de los casos un estudio de antecedentes tanto personales del probando (individuo que consulta y es estudiado del punto de vista genético) como familiares. Así, la realización de un familiograma o árbol genealógico de antecedentes oncológicos permite, no sólo profundizar en la probabilidad de riesgo, sino también identificar a otros miembros del grupo familiar que puedan beneficiarse del estudio y asesoramiento genético. En el caso en cual se identificó la variante genética probablemente patogénica

y no reportada en el gen ATM causante de un codón de terminación prematuro de la proteína en el exón 6 (Tabla V, ID 83), se colectó la información aportada por el probando (Nivel III caso N° 12, indicado con flecha) y se realizó el estudio de la presencia de la variante ATM/6 mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa y posterior secuenciado por método de Sanger. Los familiares en quienes se realizó la determinación, fueron aquellos que pudieron ser contactados por el probando y que expresaron su voluntad de recibir asesoramiento y dieron su consentimiento informado para estudiarse.

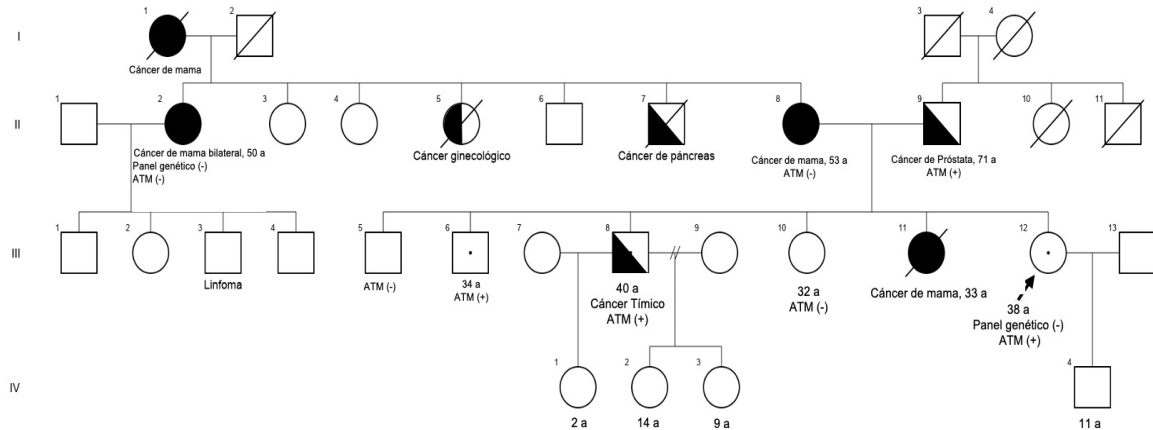


Figura 2. Familiograma de antecedentes oncológicos de un caso con variante probablemente patogénica en el gen ATM (caso 83, Tabla V)

Como se observa, el probando (indicado por una flecha en la figura 2) no tenía antecedentes personales de cáncer al momento de la consulta pero presentaba en la rama materna antecedentes compatibles con una probable susceptibilidad hereditaria al cáncer de mama, lo que motivo su consulta en la Unidad de Oncogenética del Hospital de Clínicas. Como se observa en el familiograma, existen varios casos de cáncer mamario (madre, hermana, abuela materna y tía). Asimismo, existen en la familia otros cánceres incluyendo linfoma y cáncer tímico en hermanos, cáncer pancreático en un tío y una tía con un cáncer ginecológico cuyo sitio primario aún no se ha podido aclarar. Por la rama paterna, si bien es un grupo menos numeroso, sólo existe el antecedente de cáncer de próstata de reciente diagnóstico en el padre (Nivel II N° 9) cuyos otros datos clínicos-patológicos se desconocen y que a su vez presenta la misma mutación en el gen ATM que el caso probando.

Estudios adicionales de esta mutación identificaron la presencia de la misma en un hermano con diagnóstico de carcinoma tímico (Nivel III N° 8), en otro hermano (Nivel III N°6) y una hermana (Nivel III N°12), siendo todos sanos al momento de la consulta.

Una análisis global de esta familia sugiere que existe una agregación familiar de cáncer mamario y otros cánceres probablemente relacionados en la rama materna que en los casos que se pudieron estudiar por panel genético no mostraron ninguna variante patogénica. Con respecto a la variante ATM, se asoció a un caso de carcinoma tímico y otro de próstata mientras que en otros dos casos no hubo historia personal de cáncer. Estos resultados sugieren que existe una variante del gen ATM probablemente patogénica heredada por la rama paterna y una agregación familiar de cáncer mamario por vía materna sin mutaciones genéticas que la justifiquen al momento actual.

Estos resultados y su análisis no permiten por el momento, asignarle un valor clínico de riesgo a la variante ATM. El mismo podría surgir durante el seguimiento clínico evolutivo de esta familia.

Variaciones en el número de copias de genes BRCA (MLPA).

Como forma de profundizar en la búsqueda de nuevas variantes genéticas que eventualmente puedan contribuir con un aumento de riesgo heredado para el desarrollo de cáncer de mama y/o ovario, utilizamos una tecnología basada en amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA;

Multiplex Ligation-Dependent Amplification, MLPA), como forma de identificar pérdidas totales o parciales de alguno de los alelos de genes BRCA, las cuales suelen pasar inadvertidas por tecnologías de secuenciado masivo.

Para el estudio de MLPA se seleccionaron 24 casos incluidos en nuestro estudio, para los cuales tanto el estudio de genes BRCA y del panel de 9 genes adicionales fueron negativos. Nuestros resultados fueron negativos en todos ellos por lo que la delección total o parcial de uno de los alelos de BRCA1/2 no contribuyó en esta cohorte de estudio al riesgo genético hereditario (resultados no mostrados).

Contribución del análisis exómico en la identificación de nuevos genes con potencial de contribuir al riesgo de cáncer de mama hereditario

En función de nuestros resultados y dadas las capacidades técnicas y financieras, se seleccionaron 22 de casos con estudios de BRCA, paneles genéticos y MLPA negativos para estudios exómicos con el fin de identificar nuevos genes que puedan eventualmente contribuir al riesgo genético en nuestra población.

El secuenciado de los exones de cerca de 20.000 genes, constituye una nueva herramienta de análisis genético con el potencial de identificar nuevas variantes genéticas que permitan identificar causas genéticas adicionales en familias negativas en estudios de paneles genéticos o de MLPA.

Dado que el cúmulo de información y su análisis pormenorizado hacen dificultoso la inclusión de todos los casos en este trabajo, aportamos como resultados representativos aquellos mas relevantes.

Como resultados representativos del potencial y aporte de este tipo de estudios, se describen en la Tabla VI seis casos representativos con los principales hallazgos que permiten evaluar el potencial diagnóstico de esta herramienta de análisis.

Entre varios tipos de variantes identificadas se incluyen 16 de ellas que generan codones de terminación prematura de la proteína (Stopgain en Tabla VI) y 2 que generan pérdida del codón de terminación de la proteína (Stoploss en Tabla VI), lo que sugiere un alto potencial de patogenicidad. Asignarles un eventual significado clínico requerirá el uso de estudios poblacionales y análisis de diferentes bases de datos relativamente complejas que consumirán tiempos significativos para asignarles un eventual significado clínico.

Tabla VI. Variantes de alto potencial patogénico identificadas a nivel exómico. Análisis de seis casos representativos con resultado negativo o indeterminado en secuenciado de genes BRCA, panel de genes y variación del número de copias de BRCA (MLPA)

ID	Historia Personal (edad diagnóstico)	Historia familiar ^a (edad diagnóstico)	Gen	Tipo de variante – rs reportado – Fenotipo ^b		
21	CM (42)	CM (42, 36, 24, 80)	HLA-DRB1 METTL21C C21orf58	Stopgain Stopgain Stopgain	rs17882084 NR NR	Sarcoidosis susceptibility NA NA
60	CM (33)	CM (38)	WRAPP53 FTCDNL1 CEP135 ZNF260 GSN ZNF717	Stopgain Stoploss Stopgain Stopgain Stopgain Stopgain	rs773908331 NR rs200221082 NR NR rs373780316	Li-Fraumeni Li-Fraumeni NA NA NA NA
65	CM (33)	CP (?)	ZNF717 PRKAR1A KIAA0753	Stopgain Stoploss Stopgain	rs373780316 NR rs370840009	NA NA Síndrome orofaciocigital
75	CM (31)	CM (39, 50) CG (62) CP (70)	FOCAD	Stopgain	NR	NA
97	CM (24)	CM (45)	TAS1R1 FAM114A2 KMT2C	Stopgain Stopgain Stopgain	rs61740593 rs781759624 rs58528565	NA Ectopia lentis Kleefstra syndrome
100	CM (39)	CO (45)	PSG2 CEP162	Stopgain Stopgain	NR NR	NA NA

(a) Antecedentes oncológicos en familiares de 1er y 2do grado de consanguinidad, CM: Cáncer de Mama; CO: Cáncer de Ovario; CP: Cáncer de Próstata; CG: Cáncer gástrico

(b) Stopgain: generación de codón de terminación prematuro de la proteína; NR: no reportado; NA: no asignado; Stopgain: codón de terminación prematuro; Stoploss: pérdida del codón de terminación.

Algunos ejemplos llamativos están representados por el gen PSG2 que codifica para una proteína que fisiológicamente se expresa selectivamente en el trofoblasto placentario durante la gestación y es liberada a la circulación materna y que pertenece a la familia de antígenos carcinoembrionarios ⁽⁵⁴⁾.

La familia génica CEP (Centrosomal proteins CEP162 y CEP135) fueron identificadas en 2 de los casos estudiados. Codifican para proteínas citoplasmática requeridas para una división celular normal a través de su acción a nivel de los microtúbulos del huso mitótico ⁽⁵⁵⁾.

Otra familia de proteínas ZNF (Zinc finger proteins) representada por ZNF17 y ZNF260 también fue identificadas en 2 de los 7 casos representativos mostrados en la Tabla VI. Las mismas están involucradas en procesos de reparación de ADN, regulación de la transcripción y migración celular entre otros ⁽⁵⁶⁾.

Varios de estos genes participan en vías de proliferación celular, reparación de ADN, adhesión celular, apoptosis, etc lo que sugiere que podrían tener un rol relevante en la susceptibilidad al cáncer.

Estos ejemplos representativos demuestran claramente el potencial de estos hallazgos a través de la identificación de nuevos genes cuyas variantes genéticas sugieren un gran potencial en el riesgo hereditario al cáncer.

Sin embargo, el significado clínico de las variantes genéticas con potencial patogénico de estos genes no puede ser validado al momento actual debido a la extremadamente baja frecuencia poblacional y ausencia de suficientes reportes de su estudio en familias portadoras de síndromes de predisposición hereditaria al cáncer. Su inclusión en los paneles genéticos en el futuro cercano permitirá evaluar su valor predictivo.

DISCUSIÓN

La Medicina Genómica tiene como objetivo primordial, la incorporación de tecnologías de secuenciación de última generación de ADN (Genómica) y ARN (Transcriptómica) que contribuyan a descifrar la estructura y la variación del genoma humano a fin de relacionarlos con la salud y la enfermedad.

El desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos, permite actualmente secuenciar en pocas horas desde un genoma completo hasta el perfil de ARNs de células, tejidos o de fluidos biológicos. El desarrollo asociado de la bioinformática permitió acompasar estos avances generando herramientas capaces de analizar e interpretar con alta precisión, el cúmulo de datos generados por estos estudios.

Estas tecnologías, constituyen nuevas herramientas de identificación de alteraciones genómicas con alto impacto no sólo en el diagnóstico y pronóstico en medicina, sino también en la predicción de respuestas terapéuticas y riesgo de enfermedad. Adicionalmente, contribuyen con una investigación clínica de alto impacto, una comprensión profunda de los procesos patológicos a nivel molecular y con la búsqueda de nuevos biomarcadores diagnósticos.

Actualmente, el conocimiento de la información genética contenida en el ADN asociado a las diferentes variantes genéticas individuales ha permitido contribuir en la toma de decisiones clínicas. Así, hoy conocemos una serie de regiones genéticas o grupos de genes que determinan una mayor susceptibilidad o riesgo individual para ciertas enfermedades, conocer las bases moleculares de diversos procesos patológicos, reclasificar enfermedades según sus perfiles moleculares e incluso predecir las respuestas terapéuticas y personalizar tratamientos. Surge así una nueva concepción de la enfermedad en términos genéticos y moleculares, estableciendo que la susceptibilidad a la enfermedad, su evolución, pronóstico y la eficacia de los tratamientos, depende en gran medida del perfil genético y molecular de cada individuo, representando la base de lo que hoy conocemos como Medicina Personalizada orientada a una medicina preventiva más eficaz.

La oncología, representa una de las áreas que más se ha beneficiado con el desarrollo de la Medicina Genómica a través de la identificación de nuevos marcadores pronósticos y predictivos y el desarrollo de terapias antineoplásicas dirigidas a las alteraciones que están en la base de la carcinogénesis. Esto ha permitido ofrecer terapias con mayor probabilidad de beneficio a nivel individual, evitando sobretamientos y tratamientos ineficaces generadores de toxicidad y altos costos.

A la fecha de este trabajo, hemos realizado un total de 104 estudios de genes BRCA1 y BRCA2 en personas con historia personal o familiar de cáncer de mama u ovario. Nuestro estudio reveló un 22,1 % de variantes patogénicas, las cuales, cuando tomamos en cuenta el grupo de casos con historia personal de cáncer, el porcentaje fue de 24,4% comparado con un 11,1% para los casos sin historia personal de cáncer de mama/ovario que consultaron por pertenecer a familias con fuerte agregación familiar de casos de cáncer mamario. Estas diferencias pueden explicarse debido a que las pacientes con historia personal de cáncer tienen una mayor probabilidad de ser portadores de variantes patogénicas heredadas en genes BRCA.

El porcentaje de casos positivos es similar a lo reportado en la literatura tanto a nivel global con una prevalencia del 10% al 50%⁽⁵⁷⁾, como de países sudamericanos donde la prevalencia se sitúa entre un 15% y 25% incluyendo estudios iniciales de nuestro grupo utilizando tecnologías sin uso de secuenciado masivo^(38-41,58).

Con respecto a la prevalencia de variantes patogénicas de ambos genes, un 78% se identificaron en el gen BRCA2 mientras que las variantes patogénicas de BRCA1 representaron un 22%. Si bien esta frecuencia tiene algunas variaciones según la etnia, tipo de cáncer, edad de aparición del cáncer o la zona geográfica, la frecuencia de variantes patogénicas en BRCA1 suelen representar entre un 35 al 60%^(57,59). En nuestro caso observamos un inusual predominio de mutaciones en BRCA2, marcando un característica diferencial de nuestra población de estudio. Esos resultados, obtenidos por secuenciado

de última generación, confirman resultados previos de nuestro grupo utilizando otras tecnologías previas al desarrollo de tecnologías basadas en secuenciado masivo ^(37,38).

Dentro de las variantes patogénicas de genes BRCA1 y BRCA2 identificadas en el presente estudio se destacan dos variantes con alto potencial patogénico que no han sido reportadas al momento actual. Una de ellas se identificó en el caso número 71 con una delección de una adenina en la posición 3101 del transcripto primario de BRCA1 localizado en el exón 10 provocando un corrimiento del marco de lectura. Una segunda variante no reportada fue identificada en el caso 109 donde identificamos una variante que provoca la sustitución del aminoácido lisina en posición 2707 de la proteína BRCA2 por una glutamina. En este caso los predictores *in silico* indicaron un alto potencial de patogenicidad.

Junto a distintos rasgos genéticos característicos de la población estudiada, es de destacar también una inusual frecuencia de una variante genética recurrente de significado incierto en el exón 12 del gen CHEK2 que provoca la sustitución de una tirosina en la posición 445 de la proteína por una Histidina y cuyos predictores indican un alto potencial de patogenicidad.

El análisis de frecuencia poblacional de esta variante en base de datos públicas (ClinVar y dsSNP) reveló una sola descripción de la variante sobre un total de más de 125.000 exomas y 15.000 genomas (Genome Agregation Database, GnomAD) ⁽⁶⁰⁾. Similarmente, esta variante no ha sido identificada en colecciones de datos que agrupan variantes descritas en más de 100.000 estudios (ALFA dataset from Allele Frequency Agregation) ⁽⁶¹⁾.

La proteína CHEK2 es una quinasa de serina y treonina reguladora de los puntos de control del ciclo celular y considerada un supresor tumoral. La misma es activada en respuesta a lesiones del ADN inhibiendo la progresión en el ciclo celular y activando los mecanismos de reparación de ADN a través de la regulación de ATM, BRCA1 y BRCA2 ⁽⁶²⁾.

Diferentes mutaciones del gen CHEK2 han sido asociadas a susceptibilidad hereditaria de diferentes cánceres incluyendo cáncer de mama ⁽⁶³⁾.

Otra variante no reportada, con alto potencial de patogenicidad y que identificamos en nuestra población, está representada por la generación de un codón de terminación prematuro de la proteína ATM (caso 83 en Tabla V).

El gen ATM (Ataxia Telangiectasia-Mutated) se localiza en el cromosoma 11 y consiste de 66 exones que codifican para una quinasa de 350 kDa ⁽⁶⁴⁾. Una de sus funciones más relevantes es la reparación de rupturas del ADN inducidas por radiación ionizante a través de la activación de BRCA1.

Diversas mutaciones en el gen ATM causan el síndrome autosómico recesivo denominado Ataxia Telangiectasia caracterizado por alta sensibilidad a radiación ionizante, neurodegeneración cerebelosa, inmunodeficiencia y un aumento marcado de riesgo al cáncer especialmente cáncer mamario ⁽⁶⁵⁾.

Dada la evidencia de la asociación de mutaciones en el gen de ATM con un aumento del riesgo al cáncer mamario y otros tumores, realizamos un familiograma de antecedentes oncológicos y estudios moleculares en la búsqueda de esta variante en aquellos familiares que consintieron voluntariamente a realizarse el test genético. Nuestros resultados al momento actual no nos permiten sugerir asociación con la alta frecuencia de cáncer mamario y/o ginecológico en dicha familia ni con otros tipos de cáncer identificados como carcinoma prostático, tímico y pancreático. Algunas respuestas podrán surgir prospectivamente con el seguimiento clínico evolutivo de esta familia y la eventual aparición de nuevos reportes a nivel internacional.

En este estudio también se incluyeron procedimientos moleculares (MLPA; Multiplex Ligation-Dependent Amplification) tendientes a identificar delecciones totales o parciales de genes BRCA1 o BRCA2 las cuales suelen pasar inadvertidas por procedimientos de secuenciado masivo. Según diferentes reportes internacionales, las delecciones de un alelo de BRCA1 o BRCA2 explican entre un 1 y un 30 % de los casos de susceptibilidad hereditaria al cáncer de mama u ovario ^(27,28). En este trabajo estudiamos un total de 24 casos con fuerte agregación personal y/o familiar de cáncer mamario sin mutaciones detectables por secuenciado masivo de un panel de 11 genes incluyendo BRCA1 y BRCA2. Todos los casos fueron negativos por lo que no podemos concluir acerca de su frecuencia real en nuestra población. Estos estudios deberán proseguirse con el fin de aumentar el tamaño muestral poblacional para poder arribar a conclusiones sobre su frecuencia en nuestra población y el eventual beneficio de su inclusión como procedimiento diagnóstico de rutina.

Nuestros resultados, al igual que resultados a lo largo del mundo, permiten estimar que más del 50% de personas que cumplen con los criterios de la “National Comprehensive Cancer Network” (NCCN) para

la indicación de test genéticos, poseen una alta probabilidad de mutaciones en genes no incluidos en los test genéticos actualmente utilizados ⁽⁶⁶⁾.

Por este motivo, en los últimos años, distintos grupos a nivel internacional han introducido el secuenciado del exoma completo (Whole-Exome Sequencing) con el objetivo de identificar genes candidatos no canónicos contribuyendo a un aumento de riesgo heredado al cáncer de mama y ovario ^(32,67).

En línea con estos avances, recientemente extendimos nuestras capacidades al estudio del exoma completo por secuenciado masivo. Las capacidades actuales nos permitieron incluir 22 casos para un estudio del exoma total que no evidenciaron variantes genéticas deletéreas en paneles genéticos ni tampoco grandes deleciones de genes BRCA1 o BRCA2. Dicho análisis incluyó cerca de 180.000 exones pertenecientes a un promedio de 20.000 genes.

Como se observa en el caso N° 21 de la tabla VI, se identificaron alelos mutados generadores de codones de terminación prematura en los genes HLA-DRB1 (HLA Class II Histocompatibility Antigen, DR-1 Beta Chain), METTL21C (Methyltransferase 21C, AARS1 Lysine) y C21orf58 (Chromosome 21 Open Reading Frame 58) mientras que en el caso 100 este tipo de variante se identificó en los genes PSG2 (Pregnancy Specific Beta-1-Glycoprotein 2) y CEP162 (Centrosomal Protein 162).

El gen HLA-DRB1 codifica para la subunidad beta más prevalente de HLA-DR con rol fisiológico en la respuesta inmune adaptativa y ha sido asociado a un aumento del riesgo de enfermedades autoinmunes como Artritis Reumatoide, Sarcoidosis y Esclerosis Múltiple ⁽⁶⁸⁾. Se ha sugerido una eventual asociación con el cáncer de mama como consecuencia de afectación de la inmunovigilancia antitumoral ⁽⁶⁹⁾.

Otro caso interesante es el gen C21orf58, el cual codifica para una proteína de localización nuclear de función desconocida, aunque estudios exómicos recientes sugieren que variantes patogénicas de este gen se asocian con el cáncer mamario hereditario, lo cual lo posiciona como un nuevo candidato en la susceptibilidad hereditaria ⁽⁷⁰⁾. Adicionalmente, mutaciones de este gen han sido asociados con la anemia de Fanconi (grupo de complementación E, FANCE) caracterizada por un desorden genético recesivo que provoca inestabilidad genética y defectos en los mecanismos de reparación del ADN que clínicamente cursan con hematopoyesis insuficiente, malformaciones congénitas y aumento de susceptibilidad al cáncer ⁽⁷¹⁾.

El gen PSG2 codifica para una proteína que fisiológicamente se expresa selectivamente en el trofoblasto placentario durante la gestación y es liberada a la circulación materna y que pertenece a la familia de antígenos carcinoembrionarios ⁽⁵⁴⁾. No hemos identificado reportes publicados de esta proteína asociados con cáncer.

La familia génica CEP (CEP162 y CEP135) codifican para proteínas citoplasmática requeridas para una división celular normal a través de su acción a nivel de los microtúbulos del huso mitótico. Una deficiencia de esta proteína en líneas celulares de cáncer mamario humano (MCF-7) llevan a una distorsión del huso mitótico y alteración de la división celular ⁽⁵⁵⁾ y ha sido asociada a predisposición al cáncer de mama recientemente ⁽⁷²⁾.

Otra familia de proteínas ZNF (Zinc finger proteins) está representada por ZNF17 y ZNF260 en 2 de los casos estudiados. Las mismas están involucradas en procesos de reparación de ADN regulacion de la transcripción y migración celular entre otros las cuales han sido asociadas a cáncer y sensibilidad a lesiones de ADN por radiación ionizante ⁽⁵⁶⁾.

El gen METTL21C codifica para una metil transferasa cuya función fisiológica es la metilación de proteínas no histónicas ⁽⁷³⁾ y para la cual no hay reportes que indiquen su vinculación con cáncer. Sin embargo, mutaciones somáticas en otro gen identificado que codifica para una metil transferasa de lisina (KMT2C), ha sido recientemente asociado con el cáncer de mama metastásico ⁽⁷⁴⁾.

El gen TAS1R1 (Taste 1 Receptor Member 1), que codifica para un receptor acoplado a proteínas G ha sido asociado al cáncer mamario en edades tempranas ⁽⁷⁵⁾.

El gen FOCAD (focadhesin) es una proteína de adhesión celular que ha sido descrita como supresor tumoral en gliomas ⁽⁷⁶⁾.

Nuestros resultados identificaron una serie de variantes genéticas generadoras de proteínas disfuncionales o truncadas en genes sin evidencia actual de asociación con el cáncer de mama y ovario hereditario y en algunos casos han sido reportadas con muy baja frecuencia en otros estudios ^(32,67,77).

Sin duda, el análisis prospectivo de variantes patogénicas en nuevos genes no canónicos e identificadas por estudios exómicos en nuestra población, abre nuevos desafíos para identificar individuos con riesgo hereditario al cáncer. El estudio de estos genes cuyas mutaciones tienen el potencial de asociarse con el

cáncer de mama hereditario permitirá también identificar nuevas vías en la iniciación y progresión del cáncer con el potencial de generar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A través de esta iniciativa multidisciplinaria, hemos logrado generar infraestructuras, procedimientos experimentales y RRHH capacitados a nivel local que permitieron la incorporación de herramientas genómicas de diseño propio en el diagnóstico de predisposición genética al cáncer de mama y ovario.

Más allá de los logros científico-tecnológicos, esta propuesta ha permitido instalar estas capacidades en el ámbito del Hospital Universitario, lo que ha permitido una amplia accesibilidad a dichos procedimientos dotando al Hospital de Clínicas con nuevas tecnologías para el diagnóstico genético.

El análisis genómico se ha transformado en una herramienta de alto impacto en la medicina moderna que no sólo ha contribuido en la toma de decisiones clínicas sino también en una poderosa herramienta de investigación clínica de impacto. En este sentido, hemos descrito variantes genéticas recurrentes propias de nuestra población, nuevas variantes genéticas con potencial patogénico y nuevos genes candidatos en vías de iniciación y progresión del cáncer de mama, que abren nuevas avenidas en la comprensión de la transformación maligna, en la generación de nuevas estrategias terapéuticas, y como nuevos candidatos en la susceptibilidad heredada al cáncer.

Este trabajo no sólo ha permitido el estudio de más de 100 familias con historia personal y/o familiar de cáncer de mama y ovario sino que también ha creado el ámbito adecuado para la aplicación de herramientas genómicas en otras áreas de la medicina.

En este sentido hemos creado recientemente una Unidad de Medicina Genómica en el Hospital de Clínicas que han permitido el desarrollo de paneles genéticos mieloides orientados a la estadificación molecular y diseño de terapias personalizadas en síndromes mieloproliferativos. Adicionalmente se encuentran en desarrollo el diseño de paneles genéticos para el despistaje de la susceptibilidad al cáncer colorectal hereditario y también de metagenómica para el análisis de poblaciones microbianas de interés biomédico a nivel hospitalario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon FIA for R on C. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Published 2020. Accessed July 16, 2021. <https://gco.iarc.fr/today>
2. Barrios, E.; Garau, M.; Alonso, R.; Musetti C. V Atlas de Incidencia del Cáncer en el Uruguay. Periodo 2012-2016 [Internet]. Montevideo: Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. Published 2020. Accessed July 17, 2021. <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/V-Atlas-de-Incidencia-del-Cancer-en-el-Uruguay-Periodo-2012-2016-uc250>
3. Larsen MJ, Thomassen M, Gerdes AM, Kruse TA. Hereditary breast cancer: Clinical, Pathological and molecular characteristics. *Breast Cancer Basic Clin Res*. 2014;8. doi:10.4137/BCBCR.S18715
4. Broca P. *Traité Des Tumeurs*. P. Asselin; 1866.
5. Lane-Claypon JE. *A Further Report on Cancer of the Breast with Special Reference to Its Associated Antecedent Conditions.*; 1926.
6. Lynch HT, Krush AJ. Carcinoma of the breast and ovary in three families. *Obstet Gynecol Surv*. 1972;27(3). doi:10.1097/00006254-197203000-00014
7. Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science (80-)*. 1990;250(4988). doi:10.1126/science.2270482
8. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science (80-)*. 1994;266(5182). doi:10.1126/science.7545954
9. Goldgar DE, Fields P, Lewis CM, et al. A large kindred with 17q-linked breast and ovarian cancer: Genetic, phenotypic, and genealogical analysis. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(3). doi:10.1093/jnci/86.3.200
10. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science (80-)*. 1994;265(5181). doi:10.1126/science.8091231
11. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995;378(6559). doi:10.1038/378789a0
12. Williams-Jones B. History of a gene patent: tracing the development and application of commercial BRCA testing. *Health Law J*. 2002;10.
13. Bakshi AM. Gene patents at the Supreme Court: Association for molecular pathology V. Myriad genetics. *J Law Biosci*. 2014;1(3). doi:10.1093/jlb/lisu007
14. Liebens FP, Carly B, Pastijn A, Rozenberg S. Management of BRCA1/2 associated breast cancer: A systematic qualitative review of the state of knowledge in 2006. *Eur J Cancer*. 2007;43(2). doi:10.1016/j.ejca.2006.07.019
15. Narod SA. BRCA mutations in the management of breast cancer: The state of the art. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(12). doi:10.1038/nrclinonc.2010.166
16. Metcalfe KA, Lynch HT, Ghadirian P, et al. The risk of ovarian cancer after breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol Oncol*. 2005;96(1). doi:10.1016/j.ygyno.2004.09.039
17. Venkitaraman AR. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science (80-)*. 2014;343(6178). doi:10.1126/science.1252230
18. Welsh PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet*. 2000;16(2). doi:10.1016/S0168-9525(99)01930-7
19. Varol U, Kucukzeybek Y, Alacacioglu A, et al. BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *J BUON*. 2018;23(4).
20. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovskaya A. BRCA genes: The role in genome stability, cancer stemness and therapy resistance. *J Cancer*. 2019;10(9). doi:10.7150/jca.30410
21. Cline MS, Liao RG, Parsons MT, et al. BRCA Challenge: BRCA Exchange as a global resource for variants in BRCA1 and BRCA2. *PLoS Genet*. 2018;14(12). doi:10.1371/journal.pgen.1007752
22. Nielsen FC, Van Overeem Hansen T, Sørensen CS. Hereditary breast and ovarian cancer: New genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9). doi:10.1038/nrc.2016.72
23. Mahdavi M, Nassiri M, Kooshyar MM, et al. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. *J Cell Physiol*. 2019;234(5). doi:10.1002/jcp.27464
24. Ewald IP, Ribeiro PLI, Palmero EI, Cossio SL, Giugliani R, Ashton-Prolla P. Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review. *Genet Mol Biol*. 2009;32(3). doi:10.1590/S1415-47572009005000049

25. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12). doi:10.1093/nar/gnf056
26. Shlien A, Malkin D. Copy number variations and cancer. *Genome Med.* 2009;1(6). doi:10.1186/gm62
27. Hansen TVO, Jønson L, Albrechtsen A, Andersen MK, Ejlersen B, Nielsen FC. Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115(2). doi:10.1007/s10549-008-0088-0
28. Lips EH, Laddach N, Savola SP, et al. Quantitative copy number analysis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1-associated breast cancer regions identifies BRCAness. *Breast Cancer Res.* 2011;13(5). doi:10.1186/bcr3049
29. Kast K, Rhiem K, Wappenschmidt B, et al. Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J Med Genet.* 2016;53(7). doi:10.1136/jmedgenet-2015-103672
30. Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. Two decades after BRCA: Setting paradigms in personalized cancer care and prevention. *Science (80-).* 2014;343(6178). doi:10.1126/science.1251827
31. Berberich AJ, Ho R, Hegele RA. Whole genome sequencing in the clinic: Empowerment or too much information? *CMAJ.* 2018;190(5). doi:10.1503/cmaj.180076
32. Felicio PS, Grasel RS, Campacci N, et al. Whole-exome sequencing of non-BRCA1/BRCA2 mutation carrier cases at high-risk for hereditary breast/ovarian cancer. *Hum Mutat.* 2021;42(3). doi:10.1002/humu.24158
33. Ruiz-Flores P, Sinilnikova OM, Badzioch M, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis of early-onset and familial breast cancer cases in Mexico. *Hum Mutat.* 2002;20(6). doi:10.1002/humu.9084
34. Jara L, Ampuero S, Santibáñez E, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in a South American population. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;166(1). doi:10.1016/j.cancergencyto.2005.08.019
35. Gallardo M, Silva A, Rubio L, et al. Incidence of BRCA1 and BRCA2 mutations in 54 Chilean families with breast/ovarian cancer, genotype-phenotype correlations. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;95(1). doi:10.1007/s10549-005-9047-1
36. Torres D, Rashid MU, Gil F, et al. High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;103(2). doi:10.1007/s10549-006-9370-1
37. Delgado L, Fernández G, González A, et al. Hereditary breast cancer associated with a germline BRCA2 mutation in identical female twins with similar disease expression. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;133(1). doi:10.1016/S0165-4608(01)00541-6
38. Delgado L, Fernández G, Grotiuz G, et al. BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Uruguayan breast and breast-ovarian cancer families. Identification of novel mutations and unclassified variants. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(1). doi:10.1007/s10549-010-1320-2
39. Solano AR, Aceto GM, Delettieres D, et al. BRCA1 and BRCA2 analysis of argentinean breast/ovarian cancer patients selected for age and family history highlights a role for novel mutations of putative south-American origin. *Springerplus.* 2012;1(1). doi:10.1186/2193-1801-1-20
40. Lara K, Consigliere N, Pérez J, Porco A. BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Venezuela. *Biol Res.* 2012;45(2). doi:10.4067/S0716-97602012000200003
41. Gomes MCB, Costa MM, Borojevic R, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;103(3). doi:10.1007/s10549-006-9378-6
42. Solano AR, Palmero EI, Delgado L, et al. Sequencing technology status of BRCA1/2 testing in Latin American Countries. *npj Genomic Med.* 2020;5(1). doi:10.1038/s41525-020-0126-3
43. Oliver J, Quezada Urban R, Franco Cortés CA, et al. Latin American Study of Hereditary Breast and Ovarian Cancer LACAM: A Genomic Epidemiology Approach. *Front Oncol.* 2019;9. doi:10.3389/fonc.2019.01429
44. Abul-Husn NS, Soper ER, Ogdig JA, et al. Exome sequencing reveals a high prevalence of BRCA1 and BRCA2 founder variants in a diverse population-based biobank. *Genome Med.* 2019;12(1). doi:10.1186/s13073-019-0691-1
45. Patch C, Middleton A. Genetic counselling in the era of genomic medicine. *Br Med Bull.*

- 2018;126(1). doi:10.1093/bmb/ldy008
46. Daly MB, Pal T, Berry MP, et al. Genetic/familial high-risk assessment: Breast, ovarian, and pancreatic, version 2.2021. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2021;19(1). doi:10.6004/JNCCN.2021.0001
 47. Andrews S. FastQC - A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. *Babraham Bioinforma*. Published online 2010.
 48. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14). doi:10.1093/bioinformatics/btp324
 49. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16). doi:10.1093/bioinformatics/btp352
 50. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9). doi:10.1101/gr.107524.110
 51. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(16). doi:10.1093/nar/gkq603
 52. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016;37(6). doi:10.1002/humu.22981
 53. McLaren W, Gil L, Hunt SE, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol*. 2016;17(1). doi:10.1186/s13059-016-0974-4
 54. Streydio C, Lacka K, Swillens S, Vassart G. The human pregnancy-specific β 1-glycoprotein (PS β G) and the carcinoembryonic antigen (CEA)-related proteins are members of the same multigene family. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;154(1). doi:10.1016/0006-291X(88)90660-2
 55. Leon A, Omri B, Gely A, Klein C, Crisanti P. QN1/KIAA1009: A new essential protein for chromosome segregation and mitotic spindle assembly. *Oncogene*. 2006;25(13). doi:10.1038/sj.onc.1209215
 56. Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, et al. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov*. 2017;3(1). doi:10.1038/cddiscovery.2017.71
 57. Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(12). doi:10.1038/nrc2054
 58. Alvarez C, Tapia T, Perez-Moreno E, et al. BRCA1 and BRCA2 founder mutations account for 78% of germline carriers among hereditary breast cancer families in Chile. *Oncotarget*. 2017;8(43). doi:10.18632/oncotarget.18815
 59. Hu C, Hart SN, Gnanaolivu R, et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2021;384(5). doi:10.1056/nejmoa2005936
 60. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020;581(7809). doi:10.1038/s41586-020-2308-7
 61. Bodian DL, McCutcheon JN, Kothiyal P, et al. Germline variation in cancer-susceptibility genes in a healthy, ancestrally diverse cohort: Implications for individual genome sequencing. *PLoS One*. 2014;9(4). doi:10.1371/journal.pone.0094554
 62. Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol*. 2014;6(6). doi:10.1093/jmcb/mju045
 63. Apostolou P, Papisotiriou I. Current perspectives on CHEK2 mutations in breast cancer. *Breast Cancer Targets Ther*. 2017;9. doi:10.2147/BCTT.S111394
 64. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science (80-)*. 1995;268(5218). doi:10.1126/science.7792600
 65. Moslemi M, Moradi Y, Dehghanbanadaki H, et al. The association between ATM variants and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2021;21(1). doi:10.1186/s12885-020-07749-6
 66. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer*. 2017;123(10). doi:10.1002/cncr.30498
 67. Doddato G, Valentino F, Giliberti A, et al. Whole Exome Sequencing in BRCA1-2 Candidate Families: The Contribution of Other Cancer Susceptibility Genes. *Front Oncol*. 2021;11. doi:10.3389/fonc.2021.649435

68. Furukawa H, Oka S, Tsuchiya N, et al. The role of common protective alleles HLA-DRB1*13 among systemic autoimmune diseases. *Genes Immun.* 2017;18(1). doi:10.1038/gene.2016.40
69. Aureli A, Canossi A, Del Beato T, et al. Breast Cancer Is Associated with Increased HLA-DRB1*11:01 and HLA-DRB1*10:01 Allele Frequency in a Population of Patients from Central Italy. *Immunol Invest.* 2020;49(5). doi:10.1080/08820139.2020.1737539
70. Zhang B, Chen MY, Shen YJ, et al. A large-scale, exome-wide association study of han chinese women identifies three novel loci predisposing to breast cancer. *Cancer Res.* 2018;78(11). doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1721
71. Michl J, Zimmer J, Tarsounas M. Interplay between Fanconi anemia and homologous recombination pathways in genome integrity. *EMBO J.* 2016;35(9). doi:10.15252/embj.201693860
72. Sankaran DG, Stemm-Wolf AJ, Pearson CG. CEP135 isoform dysregulation promotes centrosome amplification in breast cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2019;30(10). doi:10.1091/mbc.E18-10-0674
73. Cloutier P, Lavallée-Adam M, Faubert D, Blanchette M, Coulombe B. A Newly Uncovered Group of Distantly Related Lysine Methyltransferases Preferentially Interact with Molecular Chaperones to Regulate Their Activity. *PLoS Genet.* 2013;9(1). doi:10.1371/journal.pgen.1003210
74. Bertucci F, Ng CKY, Patsouris A, et al. Genomic characterization of metastatic breast cancers. *Nature.* 2019;569(7757). doi:10.1038/s41586-019-1056-z
75. Yi S, Zhou W. Tumorigenesis-related key genes in adolescents and young adults with HR(+)/HER2(-) breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2020;13(10).
76. Brockschmidt A, Trost D, Peterziel H, et al. KIAA1797/FOCAD encodes a novel focal adhesion protein with tumour suppressor function in gliomas. *Brain.* 2012;135(4). doi:10.1093/brain/aws045
77. Weitzel JN, Neuhausen SL, Adamson A, et al. Pathogenic and likely pathogenic variants in PALB2, CHEK2, and other known breast cancer susceptibility genes among 1054 BRCA-negative Hispanics with breast cancer. *Cancer.* 2019;125(16). doi:10.1002/cncr.32083