



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

**“Prevalencia de mutaciones germinales en genes de  
susceptibilidad de cáncer en pacientes con cáncer de mama  
y/o ovario y riesgo genético”.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

Luis Leonardo Flores Lagunes

**TUTOR PRINCIPAL:**

Dra. Carmen Aláez Versón

Instituto Nacional de Medicina Genómica

**CO-TUTORES:**

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dra. Patricia Alanís López

Instituto Mexicano del Seguro Social- Centro Médico Nacional La Raza

Ciudad de México 21 de Marzo del 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este trabajo fue realizado en el  
Laboratorio de Diagnóstico Genómico del  
Instituto Nacional de Medicina Genómica**



## Tabla de contenido

Abreviaturas .....	7
Resumen .....	11
Introducción.....	12
Síndromes de predisposición hereditaria a cáncer .....	13
Genes Asociados a la Predisposición Genética a Cáncer de Mama y/o Ovario	14
Criterios de evaluación para el riesgo genético .....	22
Estudios moleculares para la identificación de variantes asociadas a riesgo genético .....	24
Planteamiento del Problema .....	26
Justificación.....	27
Hipótesis.....	28
Objetivo General .....	29
Objetivos particulares.....	29
Metodología.....	30
Diseño del estudio: .....	30
Instituciones participantes.....	30
Cálculo del tamaño de la muestra .....	30
Población de estudio .....	31
Criterios de selección .....	32
Criterios de inclusión.....	32
Criterios de exclusión.....	32
Criterios de eliminación.....	32
Aspectos éticos.....	33

Flujo general de trabajo .....	34
Purificación del ADN .....	36
Evaluación de la cantidad y calidad del ADN obtenido .....	37
Preparación de bibliotecas para secuenciación masiva .....	37
Análisis bioinformático .....	40
Evaluación del impacto de la variante sobre el procesamiento del RNAm .....	42
Identificación de pérdidas o ganancias de material genético (CNVs del inglés Copy Number Variations).....	42
Clasificación clínica final de las variantes identificadas .....	44
Análisis estadístico .....	45
Resultados .....	47
Distribución de los criterios de riesgo genético entre los individuos estudiados. ....	49
Análisis estratificado por la presencia o ausencia de historia familiar respecto a diferentes criterios de riesgo.....	49
Distribución de los pacientes por tipo de resultado: positivo, negativo o no concluyente.....	50
Distribución de las variantes deletéreas por gen .....	51
Variantes deletéreas identificadas en BRCA1, BRCA2 y otros genes.....	53
Variantes de significado clínico incierto .....	57
Distribución de los resultados por grupo de edad.....	57
Distribución de los casos positivos por criterio de riesgo genético .....	58
Influencia del contenido genético del panel sobre la proporción de los resultados positivos, negativos y de significado clínico incierto .....	61
Discusión.....	63

Criterios de riesgo genético .....	63
Otros genes diferentes de BRCA1 y BRCA2 con variantes patogénicas .....	66
Análisis de las pérdidas o ganancias de material genético en los genes: BRCA1, BRCA2, PALB2, TP53, MSH2, EPCAM, PMS2, MLH1, MSH6, y RAD51C, RAD51D.....	71
Variantes de significado clínico incierto .....	72
Distribución de resultados clínicos por edad y criterios de riesgo genético .....	74
Influencia del contenido genético del panel sobre la proporción de los resultados positivos, negativos y de significado clínico incierto .....	75
Conclusiones.....	77
Perspectivas.....	78
Referencias .....	78

## **Abreviaturas**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico tipo mensajero
<b>ATM</b>	Nombre oficial del gen Ataxia telangiectasia mutated gene
<b>BAP1</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína BRCA1-associated protein 1;
<b>BLM1</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína BLM RecQ like helicase
<b>BRCA1</b>	Nombre oficial del gen Breast Cancer 1 gene
<b>BRCA2</b>	Nombre oficial del gen Breast Cancer 2 gene
<b>BRIP1</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína BRCA1-interacting protein 1
<b>CA</b>	California
<b>CDH1</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Cadherin 1
<b>CDK4</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Cyclin Dependent Kinase 4
<b>CDKN1C</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Cyclin- Dependent Kinase Inhibitor 1C
<b>CDKN2A</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Cyclin- Dependent Kinase Inhibitor 2A
<b>CDMX</b>	Ciudad de México
<b>CHEK2</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Checkpoint Kinase 2, C. Pombe, homolog of
<b>CMTN</b>	Cáncer de mama triple negativo
<b>DDB2</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína DNA Damage-binding protein 2



<b>DICER1</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína dicer 1, ribonuclease III
<b>EE. UU.</b>	Estados Unidos de Norte América
<b>EMA</b>	Entidad Mexicana de Acreditación
<b>EPCAM</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Epithelial Cellular Adhesion Molecule
<b>ERCC2</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Excision Repair, Complementing defective, in Chinese Hamster 2
<b>ERCC3</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Excision Repair, Complementing defective, in Chinese Hamster 3
<b>ERCC4</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Excision Repair, Complementing defective, in Chinese Hamster 4
<b>ERCC5</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Excision Repair, Complementing defective, in Chinese Hamster 5
<b>FANCA</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Fanconi Anemia, Complementation Group A
<b>FANCB</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Fanconi Anemia, Complementation Group B
<b>FANCC</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Fanconi Anemia, Complementation Group C
<b>FANCD2</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Fanconi Anemia, Complementation Group D2
<b>FANCE</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Fanconi Anemia, Complementation Group E
<b>FANCF</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Fanconi Anemia, Complementation Group F
<b>FANCG</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Fanconi Anemia, Complementation Group G
<b>FANCI</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Fanconi Anemia, Complementation Group I
<b>FANCL</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Fanconi Anemia, Complementation Group L
<b>FANCM</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Fanconi Anemia, Complementation Group M

<b>GLOBOCAN</b>	Por sus siglas en inglés Global Cancer Observatory
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
<b>INMEGEN</b>	Instituto Nacional de Medicina Genómica
<b>MA</b>	Massachusetts
<b>MLH1</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Homolog of MutL 1, E. Coli
<b>MRE11</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína MRE11 homolog, double strand break repair nuclease
<b>MSH2</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Homolog of MutS 2, E. Coli
<b>MSH6</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Homolog of MutS 6, E. Coli
<b>MUTYH</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína MutY, E. coli, Homolog of
<b>NBN</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Nibrina
<b>NBS1</b>	Por sus siglas en inglés Nijmegen Breakage Syndrome 1,
<b>NCCN</b>	Por sus siglas en inglés National Comprehensive Cancer Network
<b>NF1</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Neurofibromina 1
<b>PALB2</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Partner And Localizer of BRCA2
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PEMEX</b>	Petróleos de México
<b>PMS1</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Homolog Postmeiotic Segregation Increased 1, S. Cerevisae
<b>PMS2</b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Homolog Postmeiotic Segregation Increased 2, S. Cerevisae.

<b><i>PTCH1</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Patched 1, Drosophila, Homolog of , 1
<b><i>PTEN</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Phosphatase and Tensin Homolog
<b><i>RAD50</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína RAD50, S. cerevisiae, Homolog of
<b><i>RAD51C</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína, S. cerevisiae, Homolog of, C;
<b><i>RAD51D</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína RAD51, S. cerevisiae, Homolog of D;
<b>RAS</b>	Por sus siglas en inglés Rat Sarcoma
<b><i>RECQL4</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína RecQ like helicase 4
<b><i>SLX4</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína SLX4, S. cerevisiae, Homolog of
<b><i>STK11</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Serine/Threonine protein Kinase 11
<b><i>TP53</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Tumor Protein p53
<b><i>WRN</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Werner syndrome RecQ like helicase
<b><i>XPA</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Xeroderma Pigmentosum, complementation group A
<b><i>XPC</i></b>	Nombre oficial del gen que codifica la proteína Xeroderma Pigmentosum, complementation group C

## **Resumen**

La predisposición hereditaria para el cáncer de mama y/o ovario puede identificarse mediante características clínicas personales y familiares que principalmente se asocian a variantes con pérdida o disminución de función (nulinórficas o hipomórficas, respectivamente) en genes de reparación de ADN (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, etc.). En México, el estudio de la predisposición hereditaria se ha enfocado principalmente al uso de paneles de mutaciones específicas (p. Ej.: HISPANEL) o secuenciación y análisis de variación en número de copias de *BRCA1* y *BRCA2* lo que limita la capacidad de detectar otras variantes alélicas y genéticas que contribuyen a esta predisposición. En las últimas décadas se han identificado otros genes (*TP53*, *STK11*, *PALB2*, *PTEN*, etc.) que contribuyen a esta susceptibilidad de lo cual no existe información en nuestra población a nuestro conocimiento.

Se diseñó un estudio observacional, transversal y descriptivo, para la inclusión de mujeres seleccionadas con diagnóstico de cáncer de mama y/o ovario y al menos un criterio de riesgo genético. Se registró la historia familiar mediante genealogía y valoración clínica, se obtuvo una muestra de sangre periférica previo consentimiento informado para el análisis de secuenciación masiva de un panel de 64 genes asociados a predisposición genética de cáncer y análisis de variación en número de copias de 11 de ellos. Para determinar la prevalencia de variantes germinales patogénicas o probablemente patogénicas en estos genes.

Se analizaron 201 mujeres mexicanas mestizas identificando 40 variantes patogénicas, 16 probablemente patogénicas, que corresponde al 27.8 % y 85 con variantes de significado clínico incierto (42 %) y 61 con variantes benignas (30.2%). Los principales genes afectados fueron *BRCA1* (48.2 %), *BRCA2* (19.6 %), que juntos representan el 67.8 %, el 32.2 % restante corresponde a los genes *CHEK2*, *MSH6*, *TP53*, *BRIP1*, *RAD51D*, *ATM*, *CDKN2A* y *PTCH1*, todos ellos accionables clínicamente. No se identificaron variantes deletéreas en los genes de alta penetrancia: *PALB2*, *PTEN*, *STK11* y *CDH1*.

## ***Introducción***

El cáncer de mama es el principal tumor maligno en el mundo. Durante 2015, constituyó el 13.7 % del total de casos de cáncer, lo que representó 2.4 millones de individuos, la mayoría mujeres. El cáncer de mama en varones representó sólo el 0.018% del total de casos (44,000 individuos)(Fitzmaurice et al., 2017).

Desde el año 2006, el cáncer de mama es el principal tumor maligno en mujeres mexicanas, sobrepasando al cáncer cervicouterino, a pesar del subregistro existente. La mayoría de los casos se identifican por auto-detección y menos del 10 % en etapas tempranas. Para el 2020 se estiman 16,500 casos nuevos en México (Knaul et al., 2008).

Los datos de incidencia y prevalencia en México son limitados, por lo que la mortalidad es el parámetro epidemiológico de referencia más empleado para estimar el impacto de la enfermedad. Esta fue de 10 por cada 100,000 mujeres en el año 2005, mientras que, de acuerdo a los datos de GLOBOCAN, en el año 2012 la incidencia estimada a partir de la mortalidad fue de 35.4 casos por 100,000 personas por año (Soto-Perez-de-Celis & Chavarri-Guerra, 2016). La morbilidad y mortalidad asociada al padecimiento supone una gran carga social y económica, ya que afecta principalmente a mujeres que se encuentran entre los 30 y 59 años, etapa de productividad económica y formación del núcleo familiar (Knaul et al., 2008) (Chavarri-Guerra et al., 2012).

El incremento en la mortalidad obedece a diferentes factores: la limitación en el acceso a los servicios de salud, el incremento gradual entre la población de estilos de vida poco saludable (p.ej. tabaquismo, alcoholismo, obesidad), la reducción en la lactancia materna, la disminución en el número de embarazos y el uso de anticonceptivos, entre otros (Elwood et al., 2018; Rizo-Ríos, González-Rivera, Sánchez-Cervantes, & Murguía-Martínez, 2015). Adicionalmente, se ha sugerido que existe una predisposición familiar o genética propia de la población mexicana, ya que la edad de presentación es menor que en otras poblaciones (< 50 años) y con alta prevalencia de tumores triple negativo (expresión de receptor de estrógeno, receptor de progesterona y receptor del factor de crecimiento

epidérmico 2 negativa), lo que sugiere la participación de factores genéticos (Villarreal-Garza, Alvarez-Gomez, et al., 2015).

La incidencia mundial de cáncer de ovario, en 2015 fue de 251 404 casos, ocupando el séptimo lugar de prevalencia entre las neoplasias malignas (Fitzmaurice et al., 2017). En nuestro país, corresponde al octavo lugar de acuerdo con su tasa de mortalidad aunque la información epidemiológica sobre este padecimiento es escasa (Arteaga-Gómez AC, 2011; Rivas-Corchado, Gonzalez-Geroniz, & Hernandez-Herrera, 2011). De acuerdo al registro de cáncer del Instituto Nacional de Cancerología, entre los años 2000 y 2004, el cáncer de ovario representó el 3.9% las neoplasias malignas en mujeres, lo que le ubicó en el tercer lugar, en el sub-grupo de cánceres ginecológicos (Arteaga-Gómez AC, 2011)

Este tipo de cáncer es de difícil tamizaje en la población general, se detecta generalmente en estadios avanzados y tiene una letalidad alta. Por estas características, no existen campañas de detección oportuna. La identificación de individuos con variantes patogénicas germinales permite establecer medidas de vigilancia entre la población con mayor riesgo de desarrollar esta neoplasia.

#### *Síndromes de predisposición hereditaria a cáncer*

El cáncer es una enfermedad multifactorial en la que participan factores ambientales y genéticos. Factores ambientales como son el consumo de alcohol, la actividad física, el índice de masa corporal, dieta y el tabaquismo influyen en el riesgo de desarrollar cáncer. Estos factores han sido identificados y confirmados en grandes estudios poblacionales prospectivos (Elwood et al., 2018).

Entre los factores genéticos que contribuyen al cáncer se encuentran diferentes síndromes que incrementan el riesgo de desarrollarlo. Se han descrito más de 200, la mayoría se hereda en forma autosómica dominante, aunque existen algunos con modelo de herencia autosómica recesiva o ligada al X. En la mayoría, la causa genética es la existencia en el individuo de una o más variantes germinales deletéreas. La penetrancia es, generalmente, incompleta por lo que el

resultado clínico es un incremento en el riesgo relativo para desarrollar algún tipo particular de cáncer o tumores benignos. Sin embargo, en algunos de ellos la penetrancia, puede llegar a ser completa a los 70 años. (Nagy, Sweet, & Eng, 2004) (Lapunzina et al., 2014). La identificación de alguno de estos síndromes es fundamental en el manejo y vigilancia multidisciplinaria de cualquier paciente diagnosticado con cáncer.

Algunos síndromes de predisposición presentan malformaciones congénitas, sobre-crecimiento, alteraciones de la vía RAS o inestabilidad cromosómica lo que facilita su identificación clínica (Lapunzina et al., 2014). Sin embargo, en otros, no existen alteraciones evidentes y la sospecha clínica se genera a partir de la historia familiar y personal de cáncer. En estos pacientes el estudio molecular permite confirmar la sospecha diagnóstica, si se identifica una variante deletérea en alguno de los genes relacionados con los síndromes conocidos, como ocurre con la predisposición genética hereditaria a cáncer de mama u ovario asociada a *BRCA1* y *BRCA2*.

#### *Genes Asociados a la Predisposición Genética a Cáncer de Mama y/o Ovario*

En 1990, mediante análisis de ligamiento, se identificaron variantes de pérdida de función en el gen *BRCA1*, que aumentaban el riesgo de padecer cáncer de mama, en los individuos portadores (Hall et al., 1990). Este estudio abrió la posibilidad de reconocer variantes genéticas que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer en una población, y dio inicio a la identificación de la etiología genética de los síndromes de cáncer familiar o hereditario (Velasquez-Manoff, 2015).

Recientemente, se ha corroborado que variantes de pérdida de función y alelos hipomórficos en otros genes, también confieren susceptibilidad a cáncer de mama u ovario. Entre estos se encuentran los genes que codifican proteínas que participan en la reparación de rupturas en la doble cadena o en la cadena sencilla del ADN, los relacionados con la vía de BRCA-Fanconi, como por ejemplo *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, y los que codifican proteínas que participan en la reparación de bases mal apareadas (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM* o *PMS2*), cuyas variantes

patogénicas originan el Síndrome de Lynch. Lin y colaboradores realizaron secuenciación masiva de 68 genes en una serie de 133 pacientes con cáncer de mama de inicio temprano o con antecedentes familiares e identificaron variantes deletéreas en el 22.6 % de los casos, 15% fueron en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y el 7.6 % restante en *RAD50*, *TP53*, *ATM*, *BRIP1*, *FANCI*, *MSH2* y *MUTYH*; lo que demuestra que existe una importante heterogeneidad genética en la susceptibilidad hereditaria a este padecimiento (Lin et al., 2016).

Los estudios epidemiológicos han demostrado que el riesgo para el desarrollo de cáncer de mama u ovario varía en función del gen afectado, de la variante identificada y de la propia historia familiar del sujeto. Las variantes en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *TP53*, se asocian a un riesgo alto de cáncer de mama (riesgo relativo >10), mientras que otros se asocian a un riesgo intermedio como *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1* y *PALB2* (Turnbull & Rahman, 2008).

La Tabla 1, resume el conocimiento actual sobre el riesgo conferido por diferentes genes para cáncer de mama, ovario u otros tipos de cáncer. Sin embargo, es importante considerar que no todos los alelos de estos genes se comportan de la misma manera ni están presentes en todas las poblaciones.

Gen	Riesgo para cáncer de mama	Riesgo para cáncer de ovario	Riesgo para otros tipos de cáncer
<i>ATM</i> <sup>§</sup>	Incremento intermedio a alto	Sin incremento	Evidencia insuficiente o desconocida para cáncer de páncreas o próstata
<i>BRCA1</i>	Incremento alto	Incremento alto	Riesgo para cáncer de próstata
<i>BRCA2</i> <sup>#</sup>	Incremento alto	Incremento alto	Riesgo para cáncer de próstata, páncreas y melanoma
<i>BRIP1</i> <sup>#</sup>	Sin incremento	Incremento alto	Información insuficiente
<i>CDH1</i>	Incremento para carcinoma lobulillar	Sin incremento	Incremento para cáncer gástrico difuso
<i>CHEK2</i>	Incremento alto	Sin incremento	Incremento para cáncer de colón
<i>MSH2</i> , <i>MLH1</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i> , <i>EPCAM</i>	Evidencia insuficiente	Incremento alto	Incremento para cáncer colo-rectal



<i>NBN</i> *	Incremento intermedio	Evidencia insuficiente	Evidencia insuficiente
<i>NF1</i>	Incremento intermedio	Sin incremento	Tumores malignos de nervio periférico, Tumor gastrointestinal estromal, glioma del nervio óptico, cerebelar y de tallo cerebral y leucemia, entre otros
<i>PALB2</i> <sup>#</sup>	Incremento intermedio	Evidencia insuficiente	Evidencia insuficiente
<i>PTEN</i>	Incremento alto	Sin incremento	Incremento para cáncer de endometrio, cáncer renal, cáncer de tiroides y cáncer de colón
<i>RAD51C</i> <sup>#</sup>	Evidencia insuficiente	Incremento intermedio a alto	Evidencia insuficiente
<i>RAD51D</i>	Evidencia insuficiente	Incremento intermedio a alto	Evidencia insuficiente
<i>STK11</i>	Incremento intermedio a alto	Incremento intermedio o alto para cáncer de ovario no epitelial	Incremento de riesgo para cáncer de colón, cáncer de intestino delgado, páncreas, cervicouterino endometrio y pulmonar.
<i>TP53</i>	Incremento alto	Sin incremento	Incremento de riesgo para sarcomas, tumores de sistema nervioso central, carcinoma adreno-cortical, entre otros.

Información adaptada de NCCN Guidelines Genetic/Familial Risk Assessment v1 2018 y Turnbull & Rahman, 2008

\* Riesgo calculado para variantes de pérdida de función.

<sup>§</sup> Confiere riesgo reproductivo para enfermedad autosómica recesiva: Ataxia Telangiectasia

<sup>#</sup> Confiere riesgo reproductivo para enfermedad autosómica recesiva: Anemia de Fanconi

Tabla 1. Riesgo para cáncer de mama, ovario y otros sitios anatómicos de acuerdo al gen afectado.

Hasta septiembre de 2018, se habían descrito 2658 mutaciones para *BRCA1* y 2693 para *BRCA2* de acuerdo a la base de datos Human Gene Mutation Database Profesional 2018.3 (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/>). Algunas producen un codón de terminación prematuro, que origina pérdida de función por una proteína trunca o por decaimiento en la síntesis del RNA (Acido Ribonucleico), otras cambian el residuo de aminoácido, mientras que otras no cambian

el aminoácido (variantes sinónimas) pero modifican el procesamiento del RNA, lo que afecta la cantidad o el funcionamiento de la proteína codificada.

Las variantes en *BRCA1* y *BRCA2*, causantes de predisposición hereditaria para cáncer de mama u ovario, explican un 25 % de los casos con cáncer de mama familiar (Melchor & Benitez, 2013). Aunque esta cifra puede variar en función de la población analizada y de las características clínicas de los pacientes estudiados, desde el 5% hasta el 90%. Este último valor corresponde a población judía ashkenazi en la que se ha identificado un efecto fundador de tres variantes patogénicas dos en *BRCA1* y una en *BRCA2* (Nagy et al., 2004) (Walsh et al., 2017).

La prevalencia de mutaciones germinales deletéreas en *BRCA1* o *BRCA2*, se evaluó en 190 pacientes mexicanas con tumor de mama triple negativo. Se identificaron variantes deletéreas en el 23% de ellas, la mayoría en el gen *BRCA1* (Villarreal-Garza, Weitzel, et al., 2015). Sin embargo, estudios previos, que evaluaron pacientes con cáncer de mama y criterios de riesgo genético como edad de inicio temprano o agregación familiar reportaron prevalencias del 5 % (Vidal-Millan et al., 2009) y del 12 % (Vaca-Paniagua et al., 2012). La delección de los exones 9 al 12 del gen *BRCA1*, se considera una mutación fundadora en población mexicana. Fue identificada por primera vez en población mexicana residente de Los Angeles, California (Weitzel et al., 2007), y fue corroborada en el 35 % de los casos con cáncer de ovario y en el 29% de las mujeres con cáncer de mama relacionados a *BRCA1/2* (Villarreal-Garza, Alvarez-Gomez, et al., 2015). Por último, Torres-Mejía y colaboradores, publicaron en 2015 una serie de 810 mujeres con cáncer de mama no seleccionadas por criterios de riesgo, identificando 4.3 % de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* (Torres-Mejia et al., 2015). Las mutaciones en *TP53* ocasionan el Síndrome de Li-Fraumeni, un síndrome de predisposición a cáncer, poco frecuente, de alta penetrancia asociado a una gran morbilidad y mortalidad. Clínicamente se caracteriza por el desarrollo de ciertos tumores a edades tempranas como son: carcinoma de mama de inicio temprano, sarcoma de tejido blando, osteosarcoma, leucemia, linfoma, tumores de sistema

nervioso central, carcinoma adreno-cortical, y otros tumores malignos relacionados con la exposición a radiación (Sorrell, Espenschied, Culver, & Weitzel, 2013). La prevalencia de este síndrome en pacientes con cáncer de mama se ha reportado entre el 1 y 6% en diferentes series, aunque algunos de estos individuos no cumplen los criterios clínicos clásicos del Síndrome de Li-Fraumeni (Rana et al., 2018). En el Reino Unido se estima que 6% de las mujeres menores de 31 años con cáncer de mama son portadoras de una mutación en *TP53*. El riesgo acumulado, para cáncer de mama, conferido por variantes patogénicas en este gen es del 80-90%, mientras que el conferido por las de *BRCA1/2*, es del 40-85 %. Identificar a estos individuos permite tomar medidas especiales como evitar el uso de radiación durante el tratamiento lo que disminuye el riesgo de un segundo cáncer inducido por la radiación en el sitio de exposición (Arcand et al., 2015). El único reporte publicado sobre *TP53* asociado a cáncer de mama en una mujer mexicana fue descrito por Taja-Chayeb y colaboradores, en 2009, se trataba de una inserción de 7 nucleótidos en el exón 4 que genera un cambio en el marco de lectura y un codón de terminación prematura en el residuo de aminoácido 150 de la proteína (Taja-Chayeb et al., 2009), lo que sugiere que este gen también contribuye a la predisposición para cáncer de mama en mujeres mexicanas.

Los genes *PTEN*, *STK11* y *CDH1* confieren un riesgo moderado-alto para cáncer de mama, sin embargo las alteraciones en estos genes tienen muy baja prevalencia. Las variantes deletéreas de *PTEN*, se asocian al desarrollo de los síndromes de Cowden, Bannayan-Riley-Ruvalcaba y Proteus debido a la superposición de ciertas características clínicas, algunos autores prefieren el término Síndrome tumoral hamartomatoso asociado a *PTEN*. Los individuos con estos síndromes presentan rasgos clínicos distinguibles como macrocefalia, múltiples hamartomas y alteraciones muco-cutáneas características (Stuckey & Onstad, 2015). Adicionalmente, tienen alto riesgo de desarrollar cáncer de mama, endometrio, colon y tiroides (Antoniou et al., 2002). El riesgo ajustado por edad es de 85.2 % para carcinoma de mama, 35.2% para carcinoma de tiroides, 28.2%

para cáncer de endometrio y 9.0 % carcinoma colorrectal, siendo el de mama el principal tumor maligno. (Tan et al., 2012).

El síndrome de Peutz-Jeghers se asocia a variantes patogénicas en *STK11*, se caracteriza por poliposis gastro-intestinal, pigmentación muco-cutánea, y predisposición a cáncer. Se sugiere que el riesgo para cáncer de mama es similar al de las mujeres portadoras de *BRCA1* y *BRCA2*. El riesgo acumulado se calcula entre 32 y 54 %, con una edad promedio de presentación entre 37 y 59 años de edad, (McGarrity, Amos, & Baker, 1993; Syngal et al., 2015)(GeneReviews, Capítulo: Peutz-Jeghers Syndrome, consultado en línea: 22/05/18). Mutaciones en este gen se han asociado también con tumores de ovario no epitelial (p. ej.: tumor de células de cordón sexual y de células de Sertoli) (van Lier et al., 2010).

El fenotipo denominado como síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario tiene un patrón de herencia autosómico dominante y se asocia a variantes de pérdida de función en el gen *CDH1*, sin embargo también confiere riesgo de desarrollar cáncer de mama lobulillar. El riesgo acumulado para las portadoras es del 42%, con una edad promedio de presentación de 53 años (Hansford et al., 2015; Pharoah, Guilford, & Caldas, 2001).

Además de los genes descritos previamente, se ha demostrado que variantes deletéreas en otros genes, que codifican proteínas de la vía FANC-BRCA, también incrementan el riesgo para cáncer de mama y/o ovario. Estas proteínas están involucradas en la respuesta al daño en el ADN sobre núcleos *foci* de BRCA1, BRCA2 y RAD51, ya que forman parte del complejo octamérico (A, B, C, E, F, L y M) que se encarga de la activación de D2 a través de mono-ubiquitinización, para su posterior translocación intra-nuclear. (Véase Figura 1 modificada de Walsh et al, 2007).

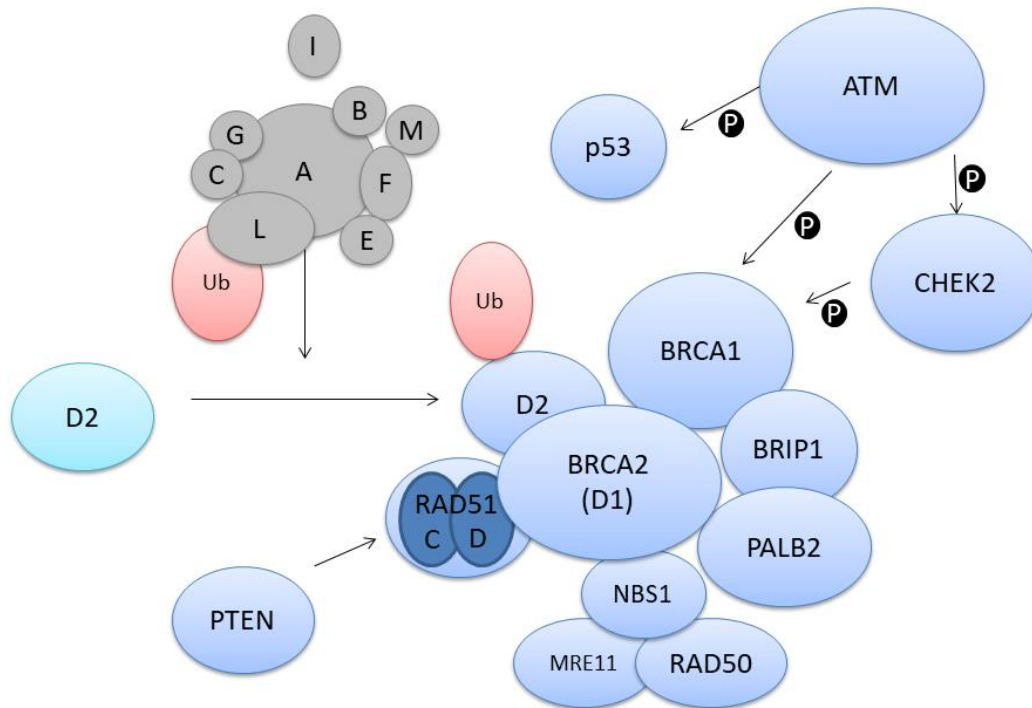


Figura 1. Complejo octamérico de FANCD1/FANCD2 en color gris en la parte superior de la imagen, D2 es monoubiquitinizado para su translocación nuclear e interacción con RAD51, BRCA1, BRCA2. BRCA2 interactúa a su vez con nibrina (NBS1), RAD50 y MRE11A.

La asociación con el riesgo de cáncer de mama de mutaciones en los genes *BRCA2*, *PALB2* y *BRIP1*, que codifican algunas de las proteínas del octámero, es bien conocida. Así como la asociación de *RAD51C* y *RAD51D* con cáncer de ovario epitelial. Los portadores de variantes patogénicas en *PALB2*, tienen un riesgo entre 8 y 9 veces mayor de cáncer de mama si son menores de 40 años, entre 6 y 8 veces mayor si están entre los 40 y 60 años y 5 veces mayor si tienen más de 60 años. El riesgo acumulado de cáncer de mama para mujeres portadoras se ha estimado en 14%. En población finlandesa y franco-canadiense se han identificado mutaciones fundadoras para este gen que, en algunas series,

explican del 0.6% al 3.9 % de las familias con historia de cáncer de mama (Antoniou, Foulkes, & Tischkowitz, 2014).

Algunos genes de la vía de Fanconi como por ejemplo *BRIP1/FANCI* se asocian principalmente con riesgo para cáncer de ovario, mientras que el riesgo que confieren para cáncer de mama es controversial. En un estudio en población europea, principalmente de origen alemán, las variantes en este gen confirieron un riesgo de 20.97 para desarrollar cáncer de ovario antes de los 50 años, el riesgo fue aún mayor para la presentación tardía (Odd Ratios o razón de momios= 29.91). Sin embargo, no se identificó asociación con cáncer de mama (Weber-Lassalle et al., 2018). Por el contrario, variantes de pérdida de función en *BRIP1* fueron identificadas en el 0.5 % de los casos en una serie de pacientes con cáncer de mama triple negativo (CMTN) de diferentes orígenes étnicos (Couch et al., 2015). Este resultado sugiere poca contribución de este gen al riesgo de cáncer de mama o incluso existe la posibilidad de que se trate de una asociación espuria.

Como se mencionó previamente las proteínas RAD51C y RAD51D, que forman parte del complejo BCDX2 y CX3, que participa en la reparación de DNA por recombinación homóloga, también son reconocidos principalmente como genes de predisposición a cáncer de ovario (Meindl et al., 2010) (Loveday et al., 2011). Actualmente su participación en cáncer de mama es controversial por lo que no pueden ser descartados como contribuyentes a este fenotipo.

El estudio de esta vía también ha permitido identificar nuevos genes candidatos como *FANCM*, en el cual la presencia de variantes heterocigotas de pérdida de función se ha asociado a predisposición para cáncer de mama en familias alemanas con riesgo alto para predisposición hereditaria (Neidhardt et al., 2017). El fenotipo homocigótico se ha asociado con predisposición para leucemia, cáncer escamoso de aritenoides y toxicidad a la quimioterapia. Variantes de pérdida de función de *FANCD2* se han asociado a un riesgo relativo de 7.5 para cáncer de mama en población finlandesa. El análisis de estos genes en otras poblaciones permitirá esclarecer el significado de estos hallazgos (Mantere et al., 2017)

Las mutaciones bi-alélicas en alguno de estos genes producen anemia de Fanconi, por ello es importante identificar a los portadores de variantes en la vía de Fanconi, ya que si la pareja también es portadora existe riesgo en la descendencia de padecer esta enfermedad. Este fenotipo es un trastorno autosómico recesivo, poco frecuente, caracterizado por fragilidad cromosómica, anemia aplásica, malformaciones congénitas y riesgo alto para el desarrollo de cánceres de tipo hematológico o carcinomas (Walsh & King, 2007).

Las variantes de *ATM* confieren riesgo intermedio para cáncer de mama y están presentes en 1 al 5% de las familias con susceptibilidad hereditaria a cáncer de mama, pero también en casos familiares de cáncer de páncreas (N. J. Roberts et al., 2012). La asociación entre variantes de *ATM* y la susceptibilidad a cáncer de mama fue identificada desde 1998 en las madres de niños con Ataxia-telangiectasia, (enfermedad recesiva causada por mutaciones en *ATM*). Desde esa fecha, hasta 2006, los resultados de diferentes estudios que evaluaban la susceptibilidad conferida por las variantes en *ATM* eran controversiales. En 2006, se confirmó la susceptibilidad mediante un estudio de casos y controles, el riesgo conferido por las variantes deletéreas de *ATM* fue 2 a 3 veces mayor que el de la población general (Tavtigian et al., 2009).

#### *Criterios de evaluación para el riesgo genético*

La NCCN (del inglés National Comprehensive Cancer Network) publica regularmente criterios para la referencia, el diagnóstico y el manejo de los individuos con predisposición hereditaria a cáncer de mama y/o ovario. Estos individuos y sus familias requieren una valoración por un médico especialista en genética con experiencia en el diagnóstico de síndromes de predisposición hereditaria a cáncer.

Los criterios de riesgo para evaluación genética de más reciente publicación (NCCN 2017.1, en línea) son:

- Individuo con cáncer de ovario, o de trompas de Falopio o peritoneal primario de tipo histológico epitelial.

Individuo con tumor de ovario germinal, de los tipos: tumor estromal del cordón sexual, tumor de células anulares-tubulares (ambos fenotipos asociados a síndrome de Peutz-Jeghers, *STK11*), fibroma de ovario (fenotipo asociado a síndrome de Gorlin, *PTCH1*) o tumor de células de Sertoli-Leydig (fenotipo asociado a mutaciones en el gen *DICER1*).

- Un individuo con cáncer de mama y alguno de los siguientes criterios:
  - Cáncer de mama de inicio temprano (antes de los 50 años)
  - Tumor triple negativo antes de los 60 años
  - Dos tumores de mama primarios en un individuo
  - Varón con cáncer de mama
  - Cáncer de mama a cualquier edad y
    - 1 familiar de primer grado con cáncer de mama menor de 50 años o
    - 1 familiar con cáncer de ovario invasivo a cualquier edad
    - 2 familiares de primer grado con cáncer de mama y/o cáncer de páncreas a cualquier edad o

- Una persona con historia personal y/o familiar de 3 o más de los siguientes cánceres:

Carcinoma de mama, páncreas, próstata (Gleason >7), melanoma, sarcoma, carcinoma adreno-cortical, tumor de cerebro, leucemia, cáncer gástrico difuso, cáncer de colón, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer renal, alteraciones dermatológicas (p. Ej.: lesiones hiperpigmentadas en mucosa oral o palmas de las manos, múltiples triquilemomas, queratosis acral, neuromas mucocutáneos, papilomas orales) y/o macrocefalia, pólipos hamartomatosos de tracto gastrointestinal.

A partir de estos criterios se han construido los de indicación del estudio molecular de *BRCA1* y *BRCA2*, también disponibles en las guías de la NCCN.



### *Estudios moleculares para la identificación de variantes asociadas a riesgo genético*

Con el advenimiento de la tecnología de secuenciación masiva y su implementación en la práctica clínica, se ha generalizado el uso de paneles multi-gen que permiten secuenciar y analizar simultáneamente un gran número de genes. Este abordaje resulta en una reducción en el costo y el tiempo necesarios para arribar al diagnóstico definitivo, respecto al requerido para analizar exón por exón de cada gen candidato mediante secuenciación de Sanger.

Los paneles son especialmente útiles en padecimientos con gran heterogeneidad alélica y de *loci*, cuando la historia familiar no es concluyente o cuando hay un solapamiento fenotípico que dificulta predecir, con certeza, el gen afectado a partir de las manifestaciones clínicas. Un ejemplo de ellos son los estudios moleculares en pacientes con riesgo genético a cáncer de mama u ovario o a cáncer colorrectal (con o sin poliposis o poliposis atenuada)(Easton et al., 2015; Lerner-Ellis, Khalouei, Sopik, & Narod, 2015; Stoll et al., 2016; Stuckey & Onstad, 2015)

No existe un consenso general sobre el contenido genético mínimo que debe tener un panel utilizado para evaluación del riesgo de cáncer de mama u ovario algunos países como Inglaterra ya han emitido recomendaciones puntuales de genes basadas en un consenso de expertos de este país (Taylor et al., 2018). Los paneles tienen un número variable de genes, agrupados según diferentes criterios y estrategias comerciales. Algunos paneles incluyen genes para los que existe poca información sobre las medidas de vigilancia o reducción de riesgo que se deben establecer al encontrar variantes patogénicas, lo que dificulta el asesoramiento genético (Lerner-Ellis et al., 2015; Stoll et al., 2016; Stuckey & Onstad, 2015). .

La identificación de un número creciente de variantes de significado clínico incierto ha sido uno de los aspectos considerados negativos en el uso de paneles. La posibilidad de este resultado debe ser comunicado al paciente en la consulta de asesoramiento pre-prueba. Muchas de estas variantes podrán ser reclasificadas

en un futuro, en la medida en que se acumule información epidemiológica que permita esclarecer su contribución al riesgo y establecer medidas de vigilancia y reducción de riesgo basadas en evidencia. Desde el punto de vista de la investigación las variantes de significado clínico incierto representan una fuente de nuevas hipótesis de trabajo (Cheon, Mozersky, & Cook-Deegan, 2014).

La identificación de variantes genéticas que confieren riesgo a cáncer de mama u ovario tiene un gran impacto en el manejo clínico de los pacientes y sus familiares portadores, ya que permite la implementación de medidas personalizadas de reducción de riesgo y la elaboración de un plan de vigilancia encaminado a la detección temprana, además permite el asesoramiento genético a las familias así como la toma de decisiones reproductivas con un conocimiento preciso de la predisposición genética de cáncer y síndromes malformativos.

## ***Planteamiento del Problema***

En población mexicana la susceptibilidad genética hereditaria al cáncer de mama y ovario sólo ha sido explorada para variantes de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, sin embargo estos genes explican menos del 25% de los casos. La contribución de variantes patogénicas o probablemente patogénicas en otros genes es desconocida. Un abordaje genómico que incluya la secuenciación de las regiones codificantes y la evaluación de pérdidas o ganancias de material genético permitirá identificar alelos de pérdida de función en otros genes que potencialmente contribuyen al riesgo genético en nuestra población.

## ***Justificación***

La ASCO (American Society of Clinical Oncology) reconoce que la identificación y manejo de individuos con susceptibilidad hereditaria a cáncer es primordial en la práctica oncológica (Robson et al., 2015). Por lo que la identificación de variantes patogénicas en otros genes, diferentes de *BRCA1* o *BRCA2*, permitirá ampliar el conocimiento de las bases genéticas del cáncer en nuestra población y reducir las comorbilidades mediante la mejora en la atención, permitiendo una vigilancia y manejo clínico personalizado, en función de la alteración presente. Lo que permitirá la identificación temprana de otros de sujetos en riesgo en las familias proporcionando a las familias un asesoramiento genético preciso. Adicionalmente, este estudio generará evidencia epidemiológica preliminar que permitirá en un futuro el diseño de estudios poblacionales para esclarecer la participación de alguna de las variantes identificadas.

## ***Hipótesis***

Variantes deletéreas en otros genes, diferentes de *BRCA1/2*, contribuyen a la susceptibilidad genética hereditaria al cáncer de mama y ovario en pacientes mexicanas.

## ***Objetivo General***

Determinar la frecuencia y proporción de variantes deletéreas en genes asociados con susceptibilidad a cáncer en individuos con cáncer de mama y/o ovario que cumplan criterios de riesgo genético

## ***Objetivos particulares***

- Identificar las variantes germinales patogénicas y probablemente patogénicas en genes de susceptibilidad a cáncer en pacientes con diagnóstico confirmado de cáncer de mama y/o ovario que cumplan criterios de riesgo genético.
- Determinar la distribución por gen de las variantes germinales patogénicas, probablemente patogénicas y de significado incierto en los genes analizados.
- Realizar la correlación de los diferentes criterios de riesgo con la presencia de un resultado positivo.
- Evaluar el impacto del contenido genético del panel sobre la proporción de casos positivos identificados.

## **Metodología**

### *Diseño del estudio:*

Observacional, transversal y descriptivo.

### *Instituciones participantes.*

Los pacientes incluidos en el estudio, provienen de alguna de las siguientes instituciones:

Servicio de Oncología Ginecológica. Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, “Dr. Víctor Manuel Espinoza de los Reyes Sánchez” Centro Médico Nacional “La Raza”. CDMX

Departamento de Genética. Hospital Central Sur, PEMEX, CDMX

Centro de Cáncer de Mama del Hospital Zambrano Hellion. Monterrey, NL

Clínica Mastológica Lomas, CDMX

### *Cálculo del tamaño de la muestra*

Se calculó un tamaño de muestra de 179 individuos utilizando la Ecuación 1 (en línea: <http://bioestadistico.com>) que se aplica cuando el tamaño de la población es conocido. El tamaño de la muestra calculado se consideró el número mínimo de individuos a analizar.

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Ecuación 1. Expresión para el cálculo del tamaño de muestra para una población conocida finita.

Para el cálculo se emplearon los siguientes parámetros:

N=1950, tamaño de la población. Este número representa el total de pacientes con cáncer de mama u ovario, atendidos, por año, en las diferentes instituciones participantes y se distribuye de la siguiente forma:

1000 pacientes atendidos en el Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, “Dr. Víctor Manuel Espinoza de los Reyes Sánchez”, Centro Médico Nacional “La Raza”. CDMX

400 pacientes atendidos en el Centro de Cáncer de Mama del Hospital Zambrano Hellion. Monterrey, NL,

450 pacientes atendidos en el Hospital Central Sur, PEMEX, CDMX

100 pacientes atendidos en la Clínica Mastológica Lomas

Z<sub>α</sub>= 1.96 (coeficiente Z alfa, se emplea el valor de 1.96 valor para una confianza del 95%)

p= 0.15 (proporción de pacientes esperados con cáncer hereditario del total de pacientes)

q= 1- p = 0.85

d= 5 % precisión de la investigación

#### *Población de estudio*

Se estudiaron un total de 201 mujeres mexicanas, de las cuales 183 tuvieron diagnóstico de cáncer de mama, 17 tuvieron diagnóstico de cáncer ovario y una tuvo diagnóstico de cáncer de mama y ovario sincrónico. En todos los casos el diagnóstico de cáncer de mama u ovario fue realizado en las instituciones de procedencia y confirmado mediante estudio histopatológico del tejido obtenido por biopsia incisional o excisional.

Las personas se auto-denominaron como mexicanas si los abuelos maternos y paternos nacieron en el territorio nacional. No se realizó algún estudio de ancestría para definir este criterio operacional.

Para la selección de los pacientes se emplearon los siguientes criterios de inclusión y exclusión mencionados a continuación:



### *Criterios de selección*

#### *Criterios de inclusión*

Pacientes femeninas, de cualquier edad, mexicanas, con diagnóstico histopatológico confirmatorio de cáncer de mama u ovario, que cumplieran uno o más de los criterios clínicos que se enlistan a continuación:

- Cáncer de mama de inicio temprano (definido como cáncer de presentación antes de los 50 años)
- Tumor de mama triple negativo antes de los 60 años
- Dos tumores de mama primarios (metacrónicos o sincrónicos)
- Cáncer de ovario o de trompas de Falopio o peritoneal primario.
- Cáncer de mama a cualquier edad con:
  - Un familiar de primer grado con cáncer de mama, menor de 50 años o
  - Un familiar con cáncer de ovario de estirpe epitelial diagnosticado a cualquier edad o
  - Dos familiares de primer grado con cáncer de mama y/o cáncer de páncreas diagnosticado a cualquier edad.

Estos criterios fueron adaptados de los publicados en la guía de la NCCN, 2017.1, 2017-2, 2017-3 (National Comprehensive Cancer Network) para la evaluación de riesgo genético para cáncer de mama u ovario.

#### *Criterios de exclusión*

- Paciente con una variante patogénica o probablemente patogénica previamente identificada en ella o en un familiar de primer grado.
- Pacientes que después de la consulta de asesoramiento genético decidan no participar en el estudio.

#### *Criterios de eliminación*

- Pacientes decidan retirar el consentimiento durante el desarrollo del estudio.

- Pacientes en las que no sea posible obtener una muestra de sangre periférica.
- Pacientes en las que no sea posible obtener DNA en la cantidad y calidad adecuada para el estudio de secuenciación masiva.
- Pacientes que decidan retirar el consentimiento durante la realización del proyecto.

### *Aspectos éticos*

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica con número de dictamen: CEI 2017/17.

Todos los pacientes recibieron una consulta de asesoramiento por un médico genetista familiarizado con el proyecto durante la cual, adicionalmente al asesoramiento, se les explicó el proyecto, se les invitó a participar, se explicó el documento de consentimiento informado y se aclararon las dudas.

Los pacientes que aceptaron participar en la investigación firmaron el documento de consentimiento informado el cual se muestra en el Anexo 1. Se recabaron los datos clínicos y la historia familiar de cáncer. Se elaboró un árbol genealógico, se realizó la evaluación de riesgo y se les explicó el estudio molecular y sus posi

a) positivo, donde se identifica una o más variantes patogénicas o probablemente patogénicas;

b) negativo: un resultado donde sólo se identifican variantes benignas o probablemente benignas para los genes analizados. Este resultado no excluye la posibilidad de que existan alteraciones en otros genes no analizados u otros mecanismos moleculares que pudieran contribuir al riesgo incrementado de cáncer;

c) no concluyente, este tipo de resultado se refiere a identificar una o más variantes genéticas que actualmente tienen la clasificación de variante de significado incierto, ya que la información actual sobre ellas no es suficiente para su clasificación como benigna o patogénica.

Beneficio al paciente: La secuenciación masiva se efectuó en el LDG que es un laboratorio acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA), para la realización de estudios de biología molecular encaminados a la evaluación del riesgo genético de cáncer. Esto permitió elaborar y entregar a cada paciente un reporte de resultados, con validez clínica. La entrega del reporte se efectuó en una consulta de asesoramiento genético, en la cual se explicó el resultado en el contexto de la historia personal y familiar de cáncer, se ofrecieron recomendaciones de vigilancia clínica de acuerdo a los hallazgos del resultado y la búsqueda dirigida de la mutación en los familiares en riesgo.

#### *Flujo general de trabajo*

El flujo de trabajo utilizado se esquematiza en la Figura 2. Los pacientes preseleccionados en cada una de las instituciones recibieron una consulta de asesoramiento genético. Aquellos referidos por el servicio de Oncología Ginecológica del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3, “Dr. Víctor Manuel Espinoza de los Reyes Sánchez” Centro Médico Nacional “La Raza” y por la Clínica Mastológica Lomas; recibieron el asesoramiento genético por el autor de esta tesis, el resto de los pacientes fueron asesorados por el médico genetista de su institución.

Durante la consulta de asesoramiento se verificó que el sujeto cumpliera con los criterios de inclusión y se les invitó a participar en el estudio. Se le explicaron las bases biológicas de la predisposición genética para el cáncer de mama y cáncer de ovario, las pruebas genómicas basadas en el uso de paneles multi-genes y los posibles resultados del estudio. Los pacientes que aceptaron participar firmaron el documento de consentimiento informado, en el que se explica el objetivo del estudio y los posibles resultados del análisis molecular.

Para la elaboración del árbol genealógico se emplearon las plataformas en línea Progeny Genetics (<http://www.progenygenetics.com/>) e Invitae Family History Tool (<https://www.invitae.com/en/familyhistory/>). En algunos casos el árbol se elaboró de forma manual y posteriormente se capturó en alguna de las plataformas

mencionadas. Siempre que la información estuvo disponible, se registraron el tipo histológico, los resultados de la inmuno-histoquímica, la edad al diagnóstico y sitio del primer tumor primario (cáncer de mama, ovario u ambos) y sitio anatómico del segundo tumor primario (en su caso).

Una vez firmado el consentimiento, se procedió a la toma de la muestra de sangre para la extracción del ADN. A partir de este se efectuó la secuenciación masiva de un panel de 64 genes. Una vez concluido el análisis bioinformático, las variantes identificadas en cada paciente se clasificaron clínicamente y se elaboró el reporte de resultados. El reporte se entregó al paciente durante una consulta de asesoramiento genético.

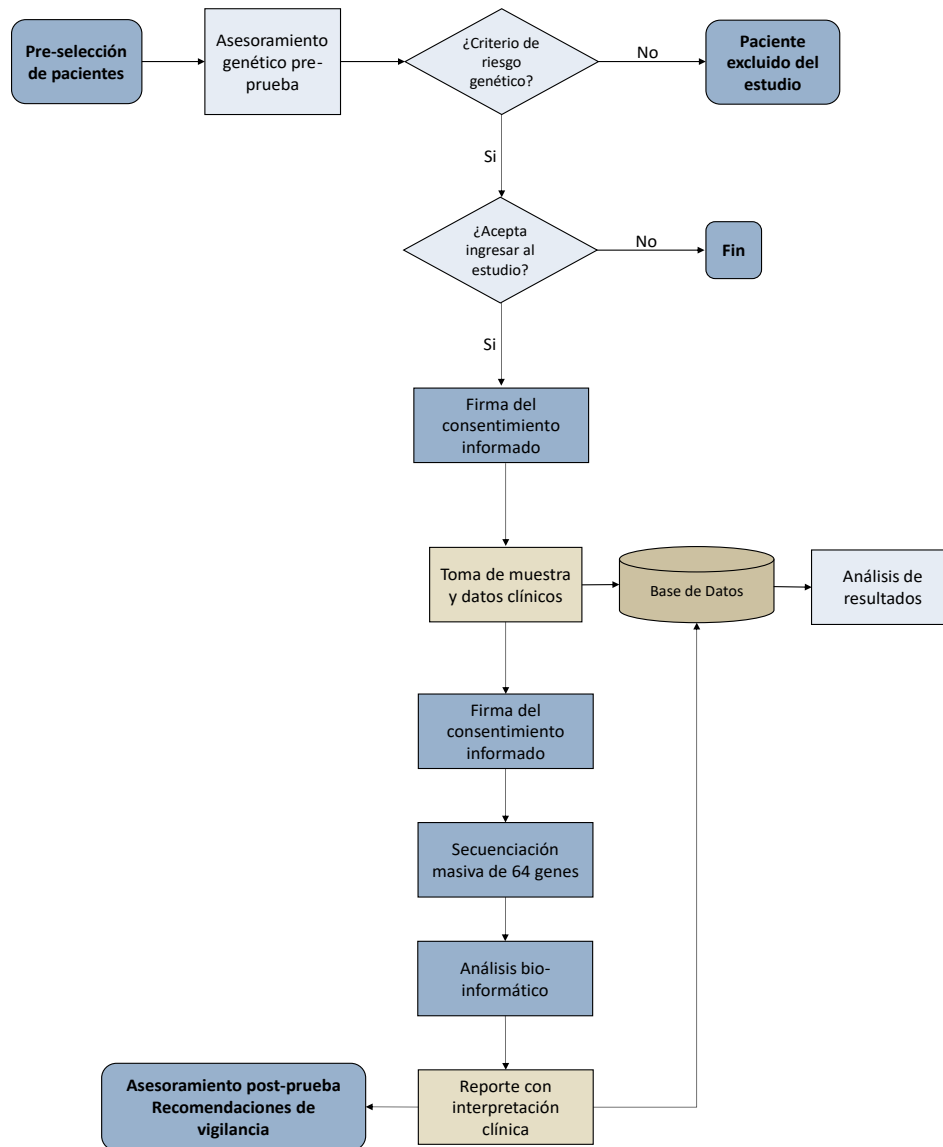


Figura 2. Flujo de trabajo utilizado durante el desarrollo del proyecto.

### *Purificación del ADN*

Se obtuvieron de 3 a 5 mL de sangre mediante punción venosa utilizando EDTA como anticoagulante. La sangre se centrifugó a 3,000 rpm para obtener la capa leuco-plaquetaria. Para la extracción del ADN genómico se empleó el equipo automatizado Maxwell 16 (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y el estuche de reactivos AS1010, de acuerdo al protocolo desarrollado por el fabricante (Maxwell® 16 DNA Purification Kits AS1010, AS1020 and AS1030 User Manual). La

purificación comenzó con la lisis de la muestra en presencia de un agente caotrópico y detergente, posteriormente el ADN liberado se unió a partículas de sílice magnetizadas. Las partículas con el ADN unido, fueron separadas físicamente de la muestra lisada y lavadas para eliminar los restos de otros componentes celulares. Finalmente el ADN purificado se eluyó de la partícula de sílice, por cambio de fuerza iónica del medio y calor. El ADN purificado se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , en tubos tipo Eppendorf de 0.6 mL previamente rotulados con el identificador correspondiente al individuo.

#### *Evaluación de la cantidad y calidad del ADN obtenido*

La cantidad y calidad del ADN se evaluó espectrofotométricamente utilizando el equipo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual). Se midió la absorbancia a A260 y A280. A partir de estos valores se calculó la concentración del ADN y el coeficiente A260/280, como una medida de la pureza del ADN. El ADN se consideró adecuado cuando la concentración fue igual o mayor a  $10\text{ng}/\mu\text{L}$  y el valor de la relación A260/280 entre 1.8 y 2.

#### *Preparación de bibliotecas para secuenciación masiva*

Para la preparación de las bibliotecas para la secuenciación de los 64 genes se empleó el estuche comercial TruSight Cancer (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.). Este estuche comercial contiene oligonucleótidos que permiten la captura de los exones y regiones de empalme de 94 genes, cuyas variantes patogénicas se han asociado a un incremento en el riesgo de desarrollar diferentes tumores. Algunos de estos genes se asocian a fenotipos clínicos bien identificados y nunca han sido reportados, a nuestro conocimiento, como causantes de predisposición para cáncer de mama u ovario, por lo que se eliminaron del análisis.

Los genes seleccionados, para este estudio, se muestran en la Tabla 2.

Las proteínas codificadas por estos genes participan en los procesos de transducción de señales, reparación de DNA de cadena sencilla y de doble

cadena, procesos mitocondriales, control del ciclo celular o actúan como factores de transcripción, entre otros.

Genes	Principal actividad biológica asociada a predisposición para cáncer
<i>BAP1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, PALB2, RAD51C, RAD51D y NBN</i>	Reparación de rupturas de DNA de doble cadena, por recombinación homóloga
<i>DDB2, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, SLX4, XPA y XPC</i>	Reparación por escisión de nucleótidos
<i>MUTYH</i>	Reparación por escisión de bases
<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 y PMS2</i>	Reparación de bases mal apareadas
<i>ATM, CDK4, CDKN1C, CDKN2A y CHEK2</i>	Ciclo celular: puntos de control
<i>DICER1, BLM, WRN y RECQL4</i>	Reparación y Replicación: Helicasas de DNA y RNA
<i>CDH1 y EPCAM*</i>	Proteína unión celular
<i>TP53, CEBPA, RUNX1, GATA2, MAX, EZH2 y NSD1</i>	Factores de transcripción con actividad en control del ciclo celular y reparación de DNA
<i>CEP57</i>	Proteína centrosómica
<i>FLCN, NF1, NF2, PTCH1, PTEN, APC, STK11 y SUFU</i>	Vías de señalización celular
<i>SDHAF2, SDHB, SDHC y SDHD</i>	Función mitocondrial (complejo succinato deshidrogenasa)
<i>SMARCB1</i>	Remodelación de cromatina

\*sólo deleciones en la región 3' del gen *EPCAM* o intergénicas con *MSH2* que resultan en silenciamiento de este último son causales de Síndrome de Lynch.

Tabla 2. Listado de genes analizados en este estudio.

La preparación de bibliotecas con el estuche TruSight Cancer se realizó utilizando el protocolo recomendado por el fabricante (TruSight Rapid Capture, Reference

Guide, Illumina) que utiliza el enriquecimiento por captura de las regiones de interés.

El proceso de preparación de las bibliotecas se resume en la Figura 3. La primera etapa consistió en fragmentar enzimáticamente el ADN genómico empleando el transposoma Nextera que, simultáneamente, fragmenta el ADN genómico y añade las secuencias de los adaptadores en ambos extremos de cada fragmento, a este proceso se le denomina “tagmentación”.

Concluida la tagmentación, los fragmentos se purificaron para eliminar el transposoma, los fragmentos purificados se sometieron a una primera reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante el cual se añaden los índices i5 o i7 y los adaptadores P5 o P7 a los extremos de cada fragmento. Cada índice es una secuencia única de 8 bases, la combinación de i5 e i7 es única para cada muestra y permite identificar, inequívocamente, el conjunto de fragmentos provenientes de esta. Los adaptadores P5 y P7 son secuencias que permiten la unión de los fragmentos de ADN a la celda de flujo que es el primer paso para la generación de clústeres durante el proceso de secuenciación.

Una vez concluida esta etapa, se limpió la biblioteca con perlas magnéticas eliminando productos indeseados. En este punto del proceso, pueden combinarse, las librerías provenientes de 12 muestras distintas en un solo tubo, siempre y cuando la combinación de los índices i5 e i7 sea diferente para cada librería. Una vez combinadas las librerías se procede a la primera ronda de hibridación con oligonucleótidos, marcados con biotina, que se unen a los exones de cada gen incluido en el panel. Las sondas hibridadas se capturaron con perlas cubiertas de estreptavidina. Posteriormente, mediante dos etapas de lavado con calor, se removieron los oligonucleótidos unidos inespecíficamente.

La biblioteca enriquecida se eluyó de la perla y se preparó para una segunda ronda de hibridación y captura, la cual se realizó de forma similar a la primera. La doble captura mejora el enriquecimiento de la biblioteca en las regiones de interés. Una vez finalizada la segunda captura se eluyó la biblioteca de las perlas y se



preparó para una segunda PCR. Este sólo consta de 12 ciclos, y permite incrementar la cantidad de la biblioteca enriquecida.

La biblioteca amplificada se purificó, validó y cuantificó para propósitos de control de calidad. Cuando la biblioteca cumplió con los parámetros de calidad establecidos en el protocolo, se procedió al ajuste de concentración y a la realización de la secuenciación masiva. Esta se llevó a cabo en los equipos MiSeq o Next Seq 500 (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). La conveniencia de usar uno u otro equipo se determinó en función del número de muestras a analizar en cada corrida.

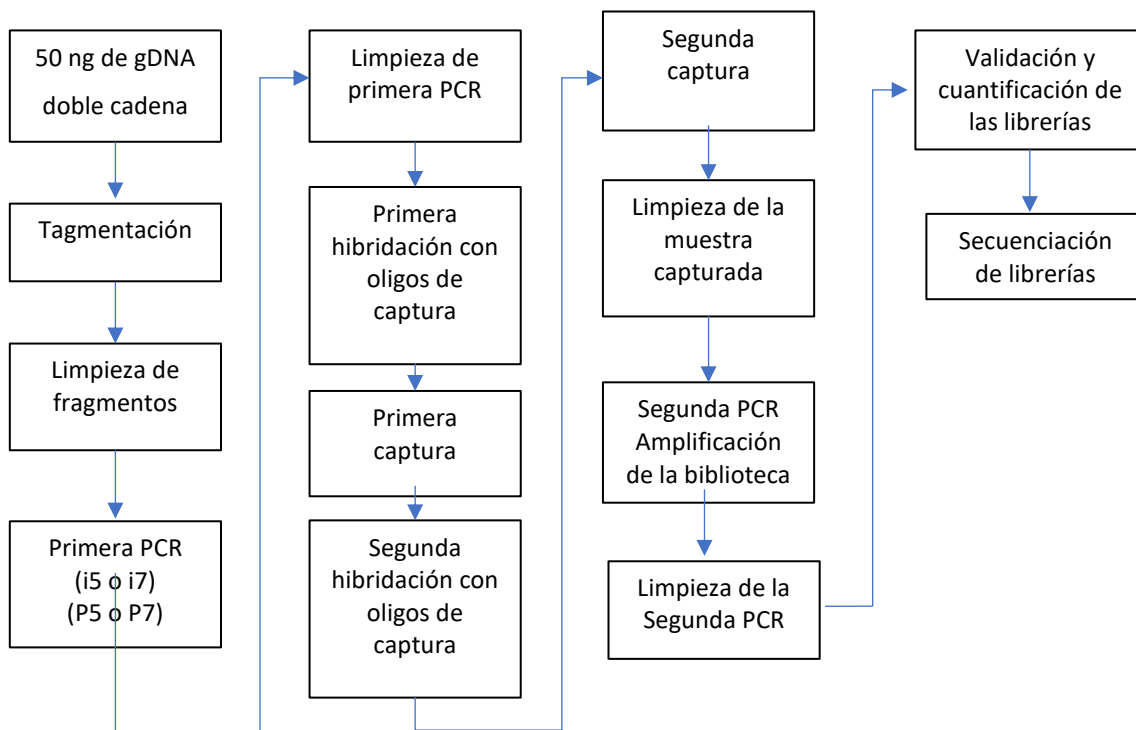


Figura 3. Etapas del proceso de preparación de bibliotecas

### *Análisis bioinformático*

El diagrama de flujo del análisis bioinformático y el proceso de clasificación clínica final de las variantes se muestra en la Figura 4.

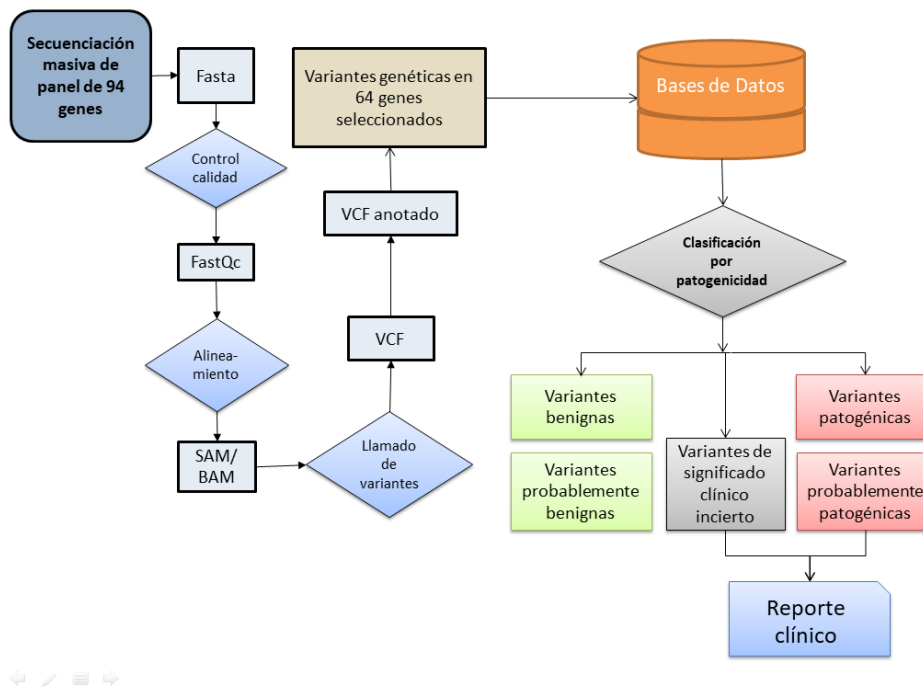


Figura 4. Diagrama de flujo del análisis bioinformático realizado.

Una vez concluida la corrida en el secuenciador, se obtuvieron los archivos de secuencia en formato FASTA descargándolos de la plataforma BaseSpace de Illumina (<https://basespace.illumina.com/>).

Los archivos FASTA se incorporaron a la plataforma de análisis bioinformático de la compañía Sophia Genetics DDM (Data-Driven Medicine) ® Versión 4.7.6. (Saint-Sulpice, Suiza). Esta plataforma cuenta con las certificaciones de calidad ISO 13485 (Medical Devices Quality Management) que permite su aplicación para el diagnóstico genómico con fines clínicos e ISO 27001 (Information Security Management), que garantiza la protección de los datos genómicos de los pacientes cuyas secuencias se analizan con la plataforma.

Con esta plataforma se realizó el análisis de calidad, la alineación de las secuencias y el llamado de las variantes. Se generaron los archivos BAM y VCF. Las variantes fueron anotadas utilizando el transcrito canónico del gen, se

identificaron la coordenada cromosómica, el número del exón, el tipo de variante de acuerdo a la consecuencia sobre la proteína (corrimiento del marco de lectura, variante sinónima o de cambio de sentido, etc.), la identificación en dbSNPs y la sustitución de codones. Adicionalmente se evaluó el posible efecto de la variante con los predictores Sift (<http://sift.jcvi.org/>), PolyPhen Version 2 Hum Var (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) y Mutation Taster (<http://mutationtaster.org/>) integrados a la plataforma y se consultó la frecuencia de la variante en las bases de datos: ExAC ([exac.broadinstitute.org](http://exac.broadinstitute.org)), ESP (Exome Sequencing Project <https://esp.gs.washington.edu>) y 1000 genomas ([www.internationalgenome.org/](http://www.internationalgenome.org/)) así como la anotación de la variante en la base de datos de ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Mediante algoritmos de inteligencia artificial y utilizando la información anotada sobre la variante, la plataforma de Sophia realizó una pre-clasificación clínica de las variantes identificadas en cada paciente de acuerdo a las categorías: benigna, de significado clínico incierto, probablemente patogénica o patogénica. Adicionalmente la plataforma categoriza cada variante de acuerdo a la recomendaciones del Colegio Americano de Genética y Genómica (Richards et al., 2015).

#### *Evaluación del impacto de la variante sobre el procesamiento del RNAm*

Para la predicción de las posibles alteraciones originadas por la variante sobre el procesamiento del RNAm se utilizaron la predicción de Mutation Taster (<http://mutationtaster.org/>) y el programa en línea Human Splicing Finder 3.1 (<http://umd.be/HSF3/>). Este análisis se realizó sólo para las variantes localizadas en la unión exón-intrón y en variantes sinónimas con muy baja frecuencia alélica poblacional en ExAC o The 1000 Genomes Project (<5%).

#### *Identificación de pérdidas o ganancias de material genético (CNVs del inglés Copy Number Variations).*

A partir de los datos de secuenciación masiva y utilizando el algoritmo para

identificación de CNVs incorporado a la plataforma de análisis bioinformático Sophia Genetics DDM® Versión 4.7.6 (Saint-Sulpice, Suiza) se determinaron las posibles pérdidas o ganancias de material genético en 11 genes: *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *RAD51C*, *RAD51D*, *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *MSH6* y *EPCAM*.

Las posibles pérdidas o ganancias de material genético identificadas a partir de los datos de secuenciación masiva se corroboraron mediante la técnica denominada MLPA (del inglés Multiplex Ligation Probe Amplification) (MRC, Holland, Amsterdam, Holanda) siguiendo el protocolo desarrollado por el fabricante (MLPA DNA Protocol, version-006; revisada el 23/marzo/2018). En cada caso se seleccionó el coctel de sondas específico para el gen en el cual se identificó una posible alteración. El análisis de resultados se efectuó empleando el programa Coffalyser desarrollado por el fabricante, que permite obtener una representación gráfica de la alteración. En la Figura 5 se muestra el ejemplo de la delección de los exones 9 al 12 en el gen *BRCA1* identificado a partir de los datos de secuenciación masiva y confirmado por MLPA.

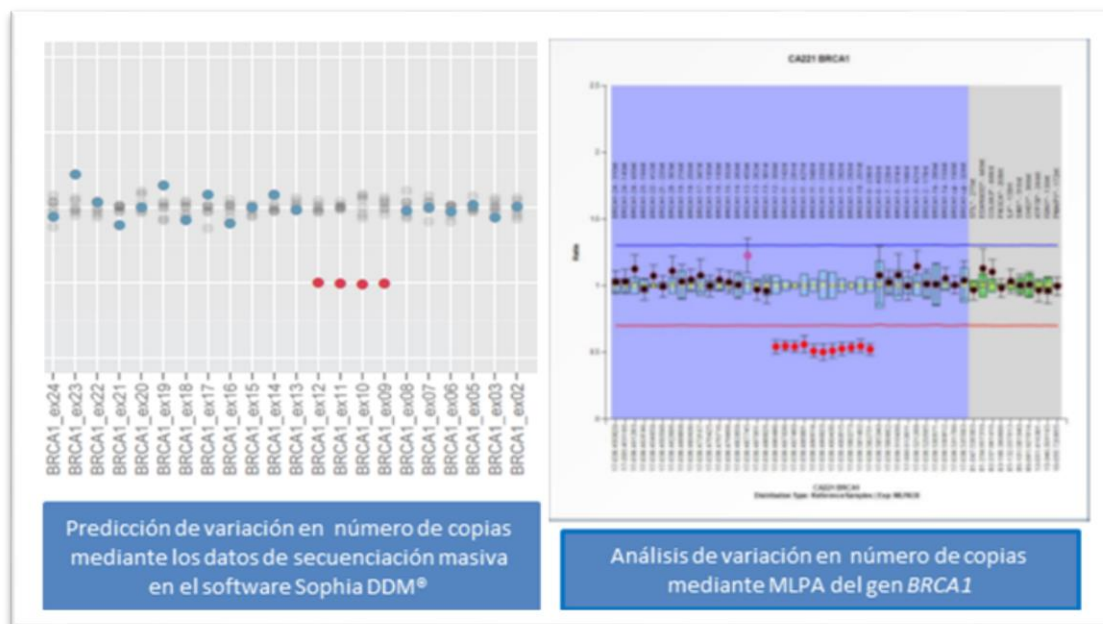


Figura 5. Ejemplo de la delección de los exones 9 al 12 en el gen *BRCA1*. Panel izquierdo, predicción de la delección por el algoritmo de Sophia DDM®. Panel derecho, confirmación mediante MLPA.

### *Clasificación clínica final de las variantes identificadas*

Las variantes que fueron pre-clasificadas como patogénicas, probablemente patogénicas o de significado clínico incierto fueron evaluadas utilizando la herramienta VarSome (<https://varsome.com/>) y la información disponible sobre la variante en bases de datos y la literatura internacional.

VarSome es un motor de búsqueda de información sobre variantes genéticas humanas en más de 35 bases de datos. Adicionalmente conjunta el resultado de diferentes algoritmos que evalúan el impacto de la variante como son Mutation Taster (<http://mutationtaster.org/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), PolyPhen Version 2 Hum Var (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), DANN (Deep learning annotation, Anotación de variantes mediante aprendizaje profundo (Quang, Chen, & Xie, 2015)), MutationAssessor, FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Models, Análisis funcional mediante modelos ocultos de Markov), MetaSVM (Support Vector Machine, máquina de soporte vectorial), MetaLR (Logistic Regression, regresión logística) que integra 9 predictores y su regresión logística, PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer, analizador del efecto en la variación de una proteína), LRT (Likelihood ratio test, prueba de tasa de probabilidad). La herramienta Varsome muestra una anotación detallada sobre la variante y una representación gráfica de la misma en su contexto genómico, mostrando otras variantes descritas para la misma región del gen, así como la clasificación de cada una de ellas. Además, permite consultar la opinión de la comunidad de usuarios sobre la variante y agregar la opinión propia.

Finalmente la herramienta permite realizar una evaluación automatizada de la posible patogenicidad de la variante de acuerdo a los criterios establecidos en las guías del Colegio Americano de Genética y Genómica, con fines educativos (ACMG) (Richards et al., 2015)

Adicionalmente se consultaron las siguientes bases de datos que no están integradas en Varsome:

- ✓ Human Gene Mutation Database Profesional 2017.2, 2017.3, y 2017.4 (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/human-gene-mutation-database/>). Repositorio curado a mano de variantes para diferentes genes asociado a información de la literatura sobre la variante.
- ✓ Breast Cancer Information Core (BIC) (<https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic>) del National Institute of Health (NIH) para los genes *BRCA1* y *BRCA2*.
- ✓ BRCA Mutation Database (<http://arup.utah.edu/database/BRCA>) de la Universidad de Utah para los genes *BRCA1* y *BRCA2*.
- ✓ Base de datos para el gen *WRN*: <http://www.pathology.washington.edu/research/werner/database/>
- ✓ Leiden Open (Source) Variation Database (<http://www.lovd.nl/3.0/home>) que es un repositorio de variantes para diferentes genes.

Toda la información recopilada sobre la variante, así como la clasificación, de acuerdo los criterios del ACMG, se consideraron para la clasificación final de la variante. Las variantes de significado incierto, probablemente patogénicas o patogénicas se incluyeron en el reporte de resultados que se entregó al paciente, donde se explicó detalladamente la evidencia que soporta la clasificación final.

#### *Análisis estadístico*

Se calcularon las frecuencias absolutas y las proporciones porcentuales dividiendo el número de individuos con una característica determinada entre el número total de individuos en el grupo, para las variables cualitativas (M. A. Martínez-Gonzalez, Irala-Estevez J., 2006).

Para la evaluación de las diferencias entre proporciones en diferentes grupos se empleó la prueba de Z (M. A. Martínez-Gonzalez, Irala-Estevez J., Bes-Rastrollo M., 2006). Esta prueba compara las diferencias porcentuales para distinguir diferencias no causadas por el azar y atribuibles a las variables independientes (Ecuación 2). Se trata por lo tanto de una prueba similar a la ji cuadrada pero con la característica de que sólo permite un grado de libertad, esta consiste en dividir

la diferencia de proporciones por su error estándar. La ecuación para su cálculo es la siguiente;

$$Z = \frac{DP}{EDDP} = \frac{p_1 - p_2}{\sqrt{\frac{pq}{n_1} + \frac{pq}{n_2}}}$$

Z= prueba Z,

DP= diferencia de proporciones,

EDDP= error estándar de la diferencia de proporciones,

p1= proporción de expuestos o positivos,

p2= proporción de no expuestos o negativos,

p= proporción global,

q= 1- p

n1= tamaño de muestra grupo 1,

n2= tamaño de muestra del grupo 2,

Ecuación 2. Fórmula para el cálculo de prueba Z.

## **Resultados**

Se analizaron un total de 201 casos, seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión establecidos. La edad promedio al diagnóstico del primer tumor fue de 41.24 años (rango de 22 a 77 años) con una desviación estándar de 36.72 años. Las características clínicas e histopatológicas de los pacientes analizados se muestran en la

Tabla 3. En relación al sitio anatómico del primer tumor, el 91.5 % de los casos (184/201) tuvieron cáncer de mama, el 8 % (17/201 casos) cáncer de ovario y sólo 1 paciente presentó cáncer de mama y ovario sincrónico.

En cáncer de mama el tipo histológico más frecuente, fue el ductal infiltrante, presente en el 75.5 % de los casos, seguido por el ductal in situ y el lobulillar infiltrante, con frecuencias muy similares del 12 % y 4.9 %, respectivamente. El inmunofenotipo luminal A estuvo presente en el 40.2 % de los casos seguido del luminal B con una frecuencia del 35.3 %. El tipo triple negativo o basal sólo se presentó en el 17.4 % de los casos. El tipo histológico más frecuente en los tumores de ovario fue cistoadenocarcinoma seroso alto grado, presente en el 88.4 % de los pacientes.



<b><i>Distribución individuos por grupo de edad al diagnóstico de primer tumor</i></b>	<b>N</b>	<b>%</b>
≤ 30 años	24	12.0
31 – 40 años	88	43.7
41 – 50 años	57	28.4
51- 60 años	24	12.0
≥ 61 años	8	3.9
<b>Total</b>	<b>201</b>	
<b><i>Sitio anatómico del primer cáncer</i></b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Cáncer de mama	184	91.5
Ovario	17	8.0
Mama y ovario sincrónico	1	0.5
<b>Total</b>	<b>201</b>	
<b><i>Tipo histológico de cáncer de mama</i></b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Ductal infiltrante	139	75.5
Ductal in situ	22	12.0
Lobulillar infiltrante	9	4.9
Mixto	4	2.1
Mucinoso	4	2.1
Tubulo-lobulillar	2	1.1
Comedocarcinoma	1	0.6
Apocrino	1	0.6
No especificado	2	1.1
<b>Total</b>	<b>184</b>	
<b><i>Inmunofenotipo del cáncer de mama</i></b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Luminal A	74	40.2
Luminal B	65	35.3
Triple Negativo	32	17.4
Her2 +	10	5.4
No especificado	3	1.7
<b>Total</b>	<b>184</b>	
<b><i>Tipo histológico del cáncer de ovario</i></b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Cistoadenocarcinoma seroso alto grado	15	88.4
Carcinoma endometroide	1	5.8
Tumor de las células de la granulosa	1	5.8
<b>Total</b>	<b>17</b>	

Tabla 3. Características clínicas e histopatológicas de los pacientes analizados

*Distribución de los criterios de riesgo genético entre los individuos estudiados.*

Se analizó la frecuencia con la que se presentaron los diferentes criterios de riesgo genético entre los pacientes analizados. Algunos pacientes presentaron más de un criterio. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

<b><i>Criterio de riesgo</i></b>	<b><i>N</i></b>	<b><i>%<sup>a</sup></i></b>
Cáncer de mama de inicio temprano	127	63.2
Historia de cáncer en familiares de primer grado	91	45.3
Cáncer de mama triple negativo	32	15.9
Cáncer de mama bilateral	23	11.4
Cáncer de ovario	17	8.4
Cáncer de mama postmenopáusico e historia familiar de primer grado	11	5.5

**N:** total de individuos, <sup>a</sup>% representa el porcentaje de individuos con el criterio, respecto a los 201 casos analizados, independientemente de si tenía o no un segundo criterio de riesgo

Tabla 4. Frecuencia de los diferentes criterios de riesgo en el grupo de pacientes

El cáncer de mama de inicio temprano fue el criterio de riesgo más frecuentemente identificado, seguido de historia familiar de cáncer en familiares de primer grado. Los tumores que se presentaron entre los familiares de primer grado incluyeron cáncer de mama, ovario, colon, páncreas y próstata.

*Análisis estratificado por la presencia o ausencia de historia familiar respecto a diferentes criterios de riesgo.*

Se realizó un análisis estratificado respecto a la presencia o ausencia de historia de cáncer en familiares de primer grado, en relación con otros criterios de riesgo genético como son: cáncer de mama de inicio temprano, cáncer de ovario, cáncer de mama bilateral y cáncer de mama triple negativo. Se calcularon las

proporciones porcentuales en cada grupo y se evaluó la significancia estadística de las diferencias observadas utilizando el estadístico Z, los resultados se muestran en la Tabla 5.

<b>Criterio de riesgo</b>	<b>N</b>	<b>HF positiva N (%)</b>	<b>HF negativa N (%)</b>	<b>Valor Z una cola (Valor de P)</b>
Cáncer de mama de inicio temprano	127	50 (39.3)	77 (61.1)	<b>-3.5277 (0.00021*)</b>
Cáncer de mama triple negativo	32	12 (37.5)	20 (62.5)	<b>-2(0.022*)</b>
Cáncer de mama bilateral	23	10 (45.4)	13 (54.5)	-0.8847 (0.18943)
Cáncer de ovario	17	11 (64.7)	6 (35.2)	<b>1.715 (0.0043*)</b>

*N*: total de individuos; *HF*: historia de cáncer en familiares de primer grado hasta el momento de la elaboración del árbol genealógico; *P* significancia estadística, \*valor de P estadísticamente significativo para un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 5. Estratificación respecto a la presencia o ausencia de historia de cáncer en familiares de primer grado para diferentes criterios de riesgo genético.

Se identificaron diferencias significativas respecto a la presencia o ausencia de historia familiar para los siguientes criterios de riesgo: cáncer de mama de inicio temprano, cáncer de ovario y cáncer de mama triple negativo. De estos, el cáncer de ovario fue el único asociado positivamente con la presencia de historia familiar de cáncer, la cual estuvo presente en el 64.7 % de los casos. Para los otros dos criterios (inicio temprano y triple negativo) la mayor parte de los pacientes no tuvieron historia familiar de cáncer. No hubo diferencia respecto a la historia de cáncer en el grupo con cáncer de mama bilateral.

*Distribución de los pacientes por tipo de resultado: positivo, negativo o no concluyente*

El resultado del estudio se consideró positivo para la existencia de riesgo genético hereditario cuando se identificó una variante deletérea clasificada como patogénica o probablemente patogénica, se consideró negativo cuando sólo se

identificaron variantes benignas o probablemente benignas, y como no concluyente cuando el individuo tenía una o más variantes de significado incierto, (NOTA: cuando los casos positivos portaban además una o más variantes de significado incierto, el caso fue contabilizado sólo en la categoría de positivos). La distribución de los pacientes en cada categoría se muestra en la Figura 6. En el 28 % (56/201) de los casos se identificó una variante causal del riesgo genético hereditario.

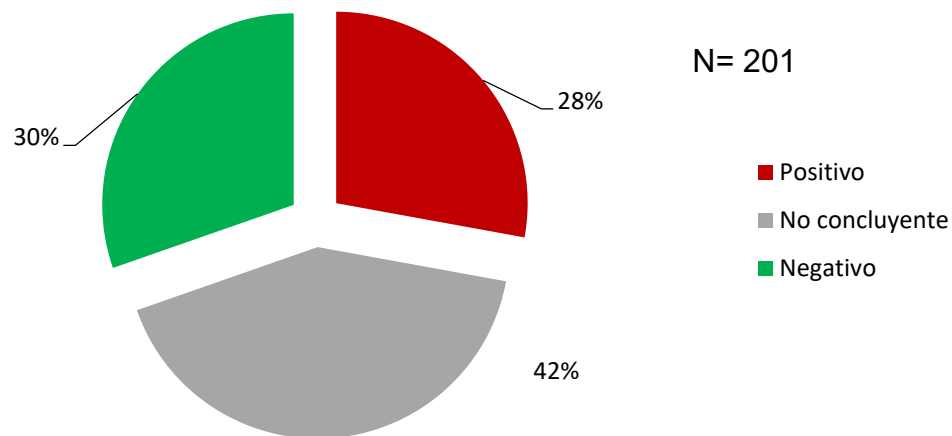


Figura 6. Distribución de los pacientes por tipo de resultados positivos (variantes patogénicas o probablemente patogénicas), negativos (sólo variantes benignas o probablemente benignas), no concluyentes (una o más variantes de significado clínico incierto).

#### *Distribución de las variantes deletéreas por gen*

En la Figura 7, se muestra la distribución de variantes por gen en los 56 individuos positivos. El gen más frecuentemente mutado fue *BRCA1* (27/56, 48.2%), seguido de *BRCA2* (11/56, 19.6 %). Estos dos genes explican aproximadamente el 68% de los casos positivos, quedando el resto de los casos distribuidos entre los genes *CHEK2* y *MSH6* (4/56 cada uno, 7.14 %), *TP53* y *CDKN2A* (3/56 cada uno, 5.35

%) y los genes *ATM*, *BRIP1*, *PTCH1* y *RAD51D* con un caso cada uno que representan el 1.78 % del total.

Sólo identificaron pérdidas o ganancias de material genético en *BRCA1*, este tipo de alteración corresponde al 18.5% del total de variantes identificadas para este gen. La delección del exón 9 al 12 se identificó en 3 individuos, lo que representa el 11.1 % del total de individuos positivos para variantes patogénicas en *BRCA1*. Se identificaron también una delección de los exones 18 y 19 y una duplicación del exón 13, cada una en un paciente, lo que representa una frecuencia del 3.7 % respectivamente. No se identificaron pérdidas o ganancias de material genético en los genes *RAD51C*, *RAD51D*, *MSH2*, *EPCAM*, *PMS2*, *BRCA2*, *MLH1*, *PALB2*, *TP53* y *MSH6* en ninguno de los pacientes analizados.

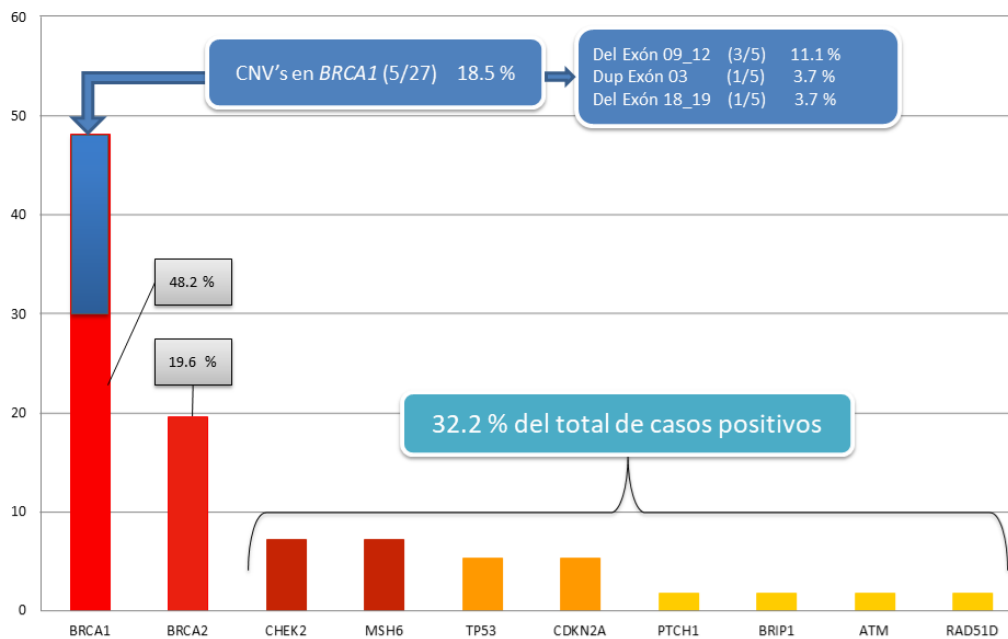


Figura 7. Distribución de las variantes deletéreas por gen. La barra correspondiente a *BRCA1* se muestra la proporción de variantes tipo CNV's (del inglés copy number variation) identificadas.

*Variantes deletéreas identificadas en BRCA1, BRCA2 y otros genes.*

En las tablas siguientes se resume la información de las variantes genéticas identificadas en *BRCA1* (Tabla 6), *BRCA2* (Tabla 7) y de los genes *CHEK2*, *MSH6*, *TP53*, *CDKN2A*, *PTCH1*, *BRIP1* *RAD51D* y *ATM* (Tabla 8), con la clasificación actual de estas, y el consenso sobre su patogenicidad.

Variante genética		Proteína		Anotación en bases de datos				Frecuencia Poblacional		Clasificación clínica				
BRCA1 NM_007294.3, # NC_000017.10	Tipo	Variante NP_009231.2	Consecuencia	N	dbSNP	ID ClinVar	ID HGMD	Frec ExAC	Frec 1000G	ClinVar	Estado ClinVar	ACMG	HGMD	Clasificación final
c.211A>G	CDN	p.Arg71Gly	CDA, pérdida Ex 5	4	rs80357382	17693	CM994455	-	-	P/PP	CP, MR	P	DM	Patogénica
c.548-?_4185+7del	Del Ex	p.?*160?	CDPP	3	NR	219772	CG077025	NA	NA	P	CP, MR, SC	NA	DM	Patogénica
c.815_824dupAGCCATGTG	Dup Nut	p.Thr276Alafs*14	CML, CDPP	2	rs387906563	55723	CI972550	-	-	P	RPE	PP	DM	Patogénica
c.68_69delAG	Del Nut	p.Glu23Valfs*17	CML, CDPP	2	rs386833395	17662	CD951600	0.0004216 (ENF)	-	P	RPE	PP	DM	Patogénica
c.2433delC	Del	p.Lys812Argfs*3	CML, CDPP	2	rs80357524	37469	CD056791	0.00008643 (TOT)	-	P	RPE	PP	DM	Patogénica
c.5030_5033delCTAA	Del	p.Thr1698Ilefs*2	CML, CDPP	1	rs80357580, antes	37623	CD972066	0.00008643 (LAT)	-	P	RPE	PP	DM	Patogénica
c.3759_3760delTA	Del	p.Lys1254Gluifs*12	CML, CDPP	1	rs80357520	37544	CD077775	0.0000824 (TOT)	-	P	RPE	PP	DM	Patogénica
c.4327C>T	CDN	p.Arg1443*	CDPP	1	rs41293455	17675	CM940180	0.0001512 (ENF)	-	P	RPE	P	DM	Patogénica
c.3331_3334delCAAG	Del	p.Gln1111Asnfs*5	CML, CDPP	1	rs80357701	37523	CD961838	0.00008637 (LAT)	-	P	RPE	PP	DM	Patogénica
c.2551G>T	CDN	p.Glu851*	CDPP	1	rs398122662	266279	NR	-	-	P	RPE	PP	NR	Patogénica
c.135-1G>T	CDN, AP RNA	No descrito	pérdida exón 5	1	rs80358158	37404	CS011027	-	-	P	CP, MR	PP	DM	Patogénica
c.981_982delAAT	Del	p.Cys328*	CDPP	1	rs80357772	55772	CD961826	0.0000165 (ENF)	-	P	RPE	PP	DM	Patogénica
c.784C>T	CDN	p.Gln262*	CDPP	1	rs886037979	254380	CM1610119	-	-	P	RPE	PP	DM	Patogénica
c.122A>T	CDN	p.His41Leu	CDA	1	rs80357276	230862	CM1516762	-	-	CIP	CP, CIP	PP	DM	Probablemente patogénica
c.5165C>T	CDN	p.Ser1743Phe	CDA	1	rs80357104	55441	CM1010524	-	-	CIP	CP, CIP	CSI	DM	Probablemente patogénica
c.5453A>G	CDN, RNA	p.(Asp1839Gly), p.Gly1803Glnfs*11	CDA, pérdida Ex23	1	rs80357477	37672	NR	-	-	CIP	CP, CIP	CSI	NR	Probablemente patogénica
c.5363G>A	CDN	p.Gly1809Asp	CDA	1	rs80357069	55551	CM041723	0.00006076 (ADS)	Aus	CIP	CP, CIP	PP	DM?	Probablemente patogénica
#g.(P_-41267737)_(4126780_2_?)dup	Dup Ex 3	No descrito	No descrito	1	NR	462211	CM103507	NA	NA	SCI	CP, UR	NA	DM	Probablemente patogénica
c.5075-?_5193+7del	Del Ex 18-19	No descrito	No descrito	1	NR	417598	CG104392 CG146559	NA	NA	P	CP, UR	NA	DM	Probablemente patogénica

Tabla 6. Variantes genéticas probablemente patogénicas o patogénicas en el gen *BRCA1* identificadas en los individuos analizados. CDN = cambio de nucleótido, NR= No registrado, AP RN= alteración en el procesamiento del RNA mensajero, CDA = cambio de aminoácido, Del Ex= Delección exónica, CDPP= codón de paro prematura, Dup Ex= Duplicación exónica, CML= cambio de marco de lectura, Del Nut= delección de menos de 20 nucleótidos, CP= Criterios positivos, Dup nut= duplicación de menos de 20 nucleótidos, MR= múltiples registros, SC= sin conflicto, NA= No aplica, RPE= Revisado por panel de expertos, UR= Único registro, CIP= Conflicto en la interpretación patogénica, SCI= significado clínico incierto, ENF= europeos no finlandeses, LAT= latinos, EUR= Europeos, ADE= Asia del Este, ADS= Asia del Sur, Aus= Ausente, TOT= Total.

Variante genética		Proteína		Anotación en bases de datos			Frecuencia Poblacional		Clasificación clínica					
BRCA2 NM_000059.3	Tipo	Variante NP_000050.2	Consecuencia	N	dbSNP	ID ClinVar	ID HGMD	Frec ExAC	Frec 1000G	ClinVar	Estado ClinVar	ACMG	HGM D	Clasificación final
c.145G>T	CDN	p.Glu49*	CDPP	1	rs80358435	51129	CM011914	-	-	P	RPE	P	DM	Patogénica
c.7525dupA	Dup	p.Ser2509Lysfs*30	CML, CDPP	1	rs80359656	91481	NR	-	-	P	RPE	P	NR	Patogénica
c.9699_9702delTATG	Del	p.Cys3233rptfs*15	CML, CDPP	1	rs80359775	38260	CD063469	-	-	P	RPE	P	DM	Patogénica
c.8535_8538delAGAG	Del	p.Glu2846Lysfs*16	CML, CDPP	1	rs80359715	52615	CD119542	-	-	P	RPE	P	DM	Patogénica
c.7480C>T	CDN	p.Arg2494*	CDPP	1	rs80358972	38099	CM002245	0.0004537 (ENF)	-	P	RPE	P	DM	Patogénica
c.7653_7656delAATT	Del	p.Ile2552Thrfs*95	CML, CDPP	1	rs80359669	52378	CD023499	-	-	P	RPE	P	DM	Patogénica
c.5112_5115delAATA	Del	p.Asn1706Leufs*5	CML, CDPP	1	rs27617485 <sub>3</sub>	51773	CD063454	-	-	P	RPE	P	DM	Patogénica
c.2224C>T	CDN	p.Gln742*	CDPP	1	rs80358494	51257	CM056530	0.00008697	-	P	RPE	P	DM	Patogénica
c.6486_6489delACAA	Del	p.Lys2162Asnfs*5	CML, CDPP	1	rs80359598	38048	CD982506	-	-	P	RPE	P	DM	Patogénica
c.3264dupT	Dup	p.Gln1089Serfs*10	CML, CDPP	1	rs80359380	37830	CI020600	-	-	P	RPE	P	DM	Patogénica
c.8242G>A	CDN	p.Gly2748Ser	CDA	1	rs56371528	4E+05	NR	-	-	SCI	CP, CIP	SCI	NR	Probablemente patogénica

Tabla 7. Variantes genéticas probablemente patogénicas o patogénicas en el gen *BRCA2* identificadas en los individuos analizados. CDN = cambio de nucleótido, NR= No registrado, AP RN= alteración en el procesamiento del RNA mensajero, CDA = cambio de aminoácido, Del Ex= Delección exónica, CDPP= codón de paro prematura, Dup Ex= Duplicación exónica, CML= cambio de marco de lectura, Del Nut= delección de menos de 20 nucleótidos, CCDA= Cambio complejo de aminoácidos, CP= Criterios positivos, Dup nut= duplicación de menos de 20 nucleótidos, MR= múltiples registros, SC= sin conflicto, NA= No aplica, RPE= Revisado por panel de expertos, UR= Único registro, CIP= Conflicto en la interpretación patogenicidad, SCI= significado clínico incierto, ENF= europeos no finlandeses, Lat= latinos, Eur= Europeos, ADE= Asia del Este, ADS= Asia del Sur, Aus= Ausente.



Variante genética		Proteína		Anotación en bases de datos				Frecuencia Poblacional			Clasificación clínica				
Gen / transcrito	Tipo	Variante	Consecuencia	N	dbSNP	ID ClinVar	ID HGMD	Frec ExAC	Frec 1000G	ClinVar	Estado ClinVar	ACMG G	HGMD	Clasificación final	
<b>CHEK2 NM_001005735.1</b>															
<b>NP_001005735.1</b>															
c.478A>G	CDN	p.Arg160Gly	CDA	2	rs28909982	128071	CM023898	Aus		P/PP	CP, CIP	CSI	DM	Probablemente Patogénica	
c.758_761delCAGT	Del	p.Ser210Phefs*6	CML, CDPP	1	rs7566131136	265588	CD160108	Aus		PP	CP, CIP	PP	DM	Probablemente Patogénica	
c.745_746delGT	Del	p.Val1249Argfs*2	CML, CDPP	1	NR	460846	NR	Aus		P	CP, MR, SC	PP	NR	Probablemente Patogénica	
<b>MSH6 NM_000179.2</b>															
<b>NP_000170.1</b>															
c.2150_2153delTCAG	Del	p.Val171Alafs*18	CML, CDPP	1	rs267608058	89256	CD992754	-		P	RPE	PP	DM	Patogénica	
c.1696G>A	CDN	Gly566Arg	CDA	1	rs63749973	89217	CM992637	0.002418 (LAT)		CSI	RPE	CSI	DM	Probablemente Patogénica	
c.1295T>C	CDN	p.Phe432Ser	CDA	1	rs750528093	183760	CM1410484	-		CIP	CP, CIP	CSI	DM	Probablemente Patogénica	
c.3253_3254insC	Ins	p.Phe1088Leufs*5	CML, CDPP	1	rs267608087	89364	CI972618	-		P	RPE	PP	DM	Probablemente Patogénica	
<b>TP53 NM_000546.5</b>															
<b>NP_000537.3</b>															
c.529_546delCCTCCACCAT GAGCGCTGC	Del	p.Pro177_Cys182delin sdel	CCDA	1	NR	NR	NR	-		Aus	NR	PP	NR	Probablemente Patogénica	
c.742C>T	CDN	p.Arg248Trp	CDA	1	rs121912651	12347	CM900211	0.0000149 (ENF)		P	CP, MR, SC	P	DM	Patogénica	
c.637C>T	CDN	p.Arg213Ter	CPP	1	rs397516436	43590	CM951226	0.0000015 (ENF)		P	CP, MR	P	DM	Patogénica	
<b>CDKN2A NM_001195132.1</b>															
<b>NP_001182061.1</b>															
c.146T>C	CDN	p.Ile49Thr	CDA	3	rs199907548	127523	CM942332	0.004595 (LAT)	0.0002 (Tot), 0.0078 (Mex de LA)	CIP	CP, CIP	CSI	DM?	Probablemente Patogénica	
<b>PTCH1 NM_001083603.1</b>															
<b>NP_001077072.1</b>															
c.91delT	Del	p.Y31Tfs*48	CML, CDPP	1	NR	NR	NR	-		Aus	NR	P	NR	Patogénica	
<b>BRIP1 NM_032043.2</b>															
<b>NP_114432.2</b>															
c.1066C>T	CDN	p.Arg356Ter	CDPP	1	rs730881633	182345	CM1617598	-		Aus	P	CP, MR, SC	P	DM	Patogénica
<b>ATM NM_000051.3</b>															
<b>NP_000042.3</b>															
c.366G>A	CDN	p.Trp1221Ter	CDPP	1	rs864622490	220358	CM990209	-		Aus	P	CP, MR, SC	P	DM	Patogénica
<b>RAD51 NM_001142571.1</b>															
<b>NP_001136043.1</b>															
c.817C>T	CDN	p.Arg273Ter	CDPP	1	rs137886232	30288	CM116849	-		Aus	P	CP, MR, SC	PP	DM	Patogénica

### Variantes de significado clínico incierto

El 42 % de las mujeres analizadas tuvieron una o más variantes clasificadas actualmente como de significado incierto. La distribución por gen de estas variantes de acuerdo a su frecuencia se muestra en la Figura 10. En el gen *ATM* se identificaron 10 variantes de significado incierto, seguido de *BRCA2* y *CHEK2* con 6, *APC*, *ERCC5* y *SLX4* con 4 variantes, *DICER1*, *FANCD2*, *FANCI*, *MSH6*, *RUNX1* con 3 variantes cada uno, *BRCA1*, *CEP57*, *ERCC3*, *FANCM*, *MTYH* y *NSD1* con 2 variantes, y el resto de genes con una sola variante.

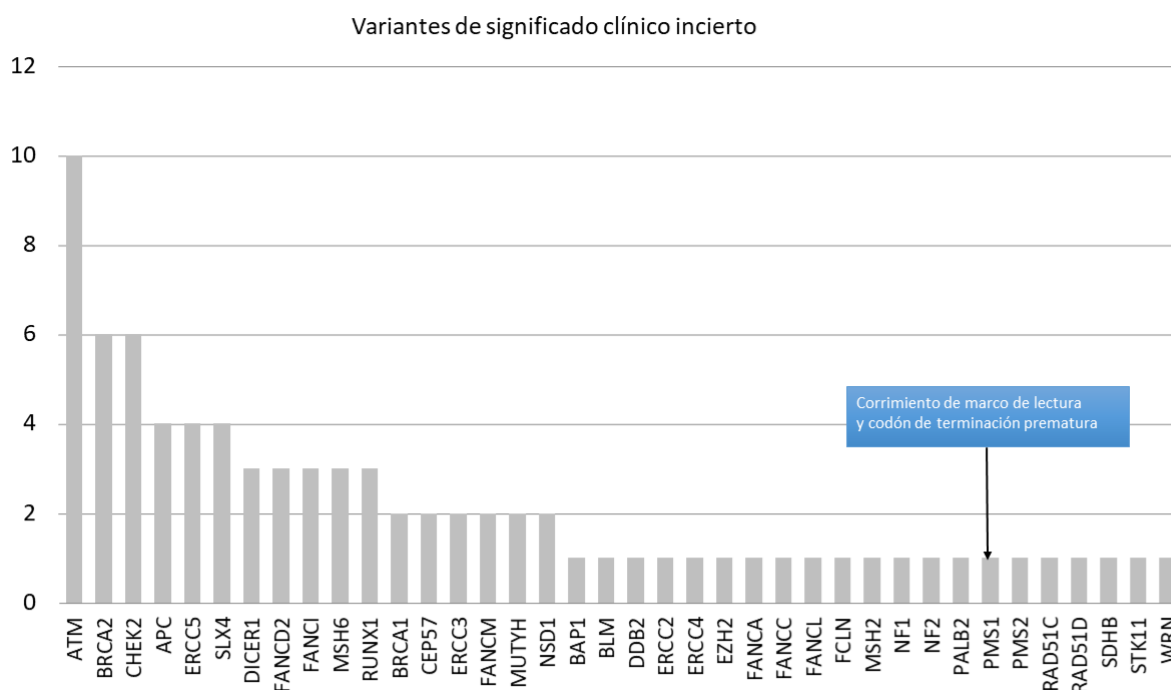


Figura 8. Número de variantes de significado clínico incierto identificadas en cada gen (números absolutos).

### Distribución de los resultados por grupo de edad

Se analizó la distribución de resultados positivos negativos y no concluyentes por décadas, considerando la edad al diagnóstico del primer tumor. Los resultados se muestran en la Figura 9. Para evaluar si existían diferencia significativa se empleó la prueba de Z para diferencias entre porcentajes.

La mayor proporción de resultados positivos (37.50%) se encontró entre las pacientes menores de 30 años mientras que el menor porcentaje (20.83%) estuvo en las pacientes diagnosticada entre los 51-60 años. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de edad en relación con la distribución de casos positivos.

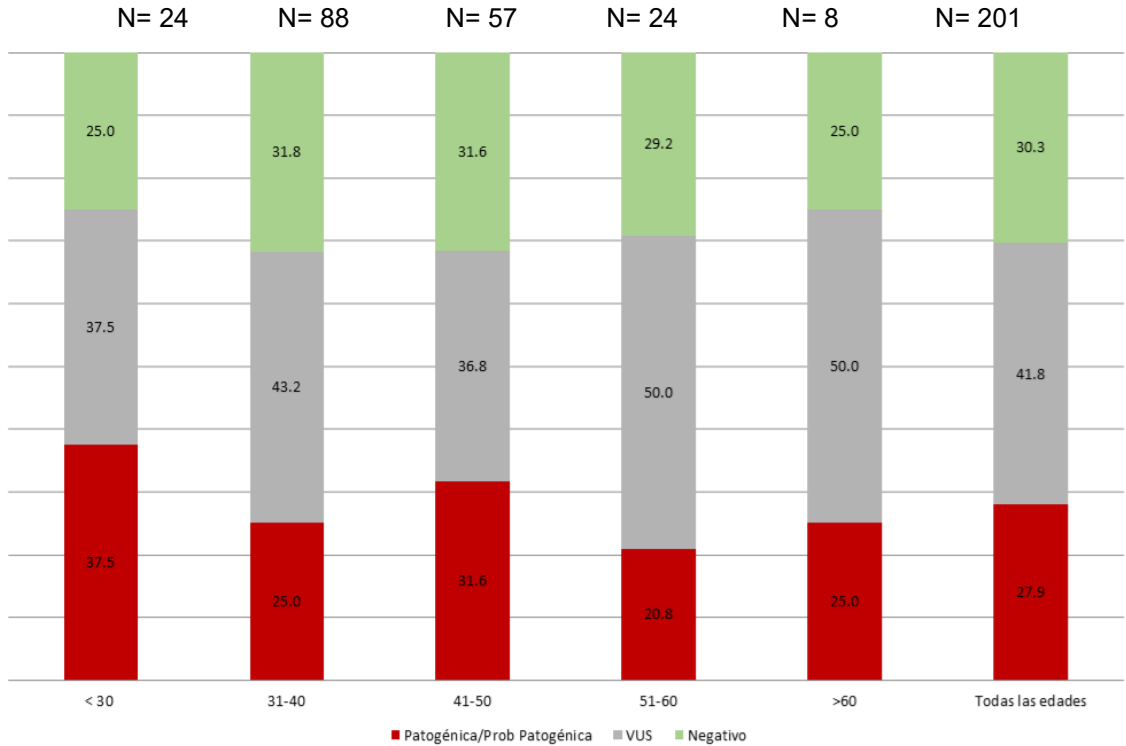


Figura 9. Porcentaje de resultados reportados como positivos, no concluyentes y negativos agrupados por decenio considerando la edad al diagnóstico del primer tumor primario.

*Distribución de los casos positivos por criterio de riesgo genético*

Una indicación clínica frecuente para el estudio genético es la agregación familiar de cáncer, principalmente en familiares de primer grado. Esto sugiere la existencia de un factor en común entre los familiares afectados (p. ej.: una variante genética de alta o media penetrancia o un factor ambiental común, etc.). El 45.5% (N=91)

de los pacientes analizados presentaban agregación familiar, la distribución por tipo de resultado en este subgrupo se muestra en la figura 11, se identificó una variante deletérea en el 37 % de casos que presentaban agregación familiar.

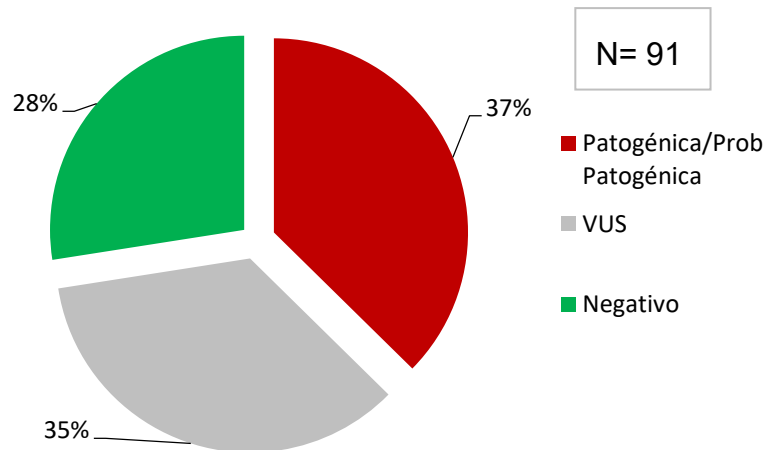


Figura 10. Porcentaje de casos positivos (variantes patogénicas/probablemente patogénicas), de significado clínico incierto (VUS) y negativos (variantes benignas) en casos con historia familiar de cáncer en familiares de primer grado (N= 91).

Se analizó también la proporción de casos positivos para otros criterios de riesgo genético. Los casos positivos en cada categoría se estratificaron de acuerdo con la presencia o ausencia de historia de cáncer en familiares de primer grado. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 4. La indicación de riesgo genético con mayor proporción (53.1%) de casos positivos fue la presencia de cáncer de mama triple negativo, en donde la mitad de los casos son portadores de una variante causal en *BRCA1* o *BRCA2*, aunque variantes patogénicas en otros genes como *CDKN2A* y *TP53* también se asociaron a la presentación de este inmunofenotipo.

El cáncer de ovario fue la segunda indicación con mayor proporción de casos positivos (47.05%) y una asociación significativa ( $Z_{una\ cola}=3$  ( $p=0.00125$ ))\* con la presencia de historia familiar, ya que el 87.5% de los casos la presentaban. Mientras que el resultado fue positivo en el 27.2% de los casos con cáncer de

mama bilateral e historia familiar y en el 20% de los casos con cáncer de mama post-menopaúsico e historia familiar de primer grado. Se calculó el valor de chi cuadrado para los sub-grupos mencionados: se encontró una asociación estadísticamente significativa entre obtener un resultado negativo o no concluyente en el estudio genético y la presencia de cáncer de mama de inicio temprano sin historia familiar de primer grado. Lo mismo ocurrió en el grupo de cáncer de mama triple negativo, donde los resultados negativos se asociaron significativamente a la ausencia de historia familiar.

Criterio de riesgo genético	Total N	Positivos N (%)	HF positiva N (%)	HF negativa N (%)	Valor de Z a una cola (Valor de P)	$\chi^2$ (Valor de P)
		Negativos o no concluyentes N (%)	HF positiva N (%)	HF negativa N (%)		
Cáncer de mama de inicio temprano	127	33 (25.9)	18 (54.5)	15 (45.45)	0.738 (0.22)	<b>4.3015</b> <b>(0.03808)*</b>
		94 (74.1)	32 (34.04)	62 (65.9)	-4.3759 (0)	
Cáncer de mama triple negativo	32	17 (53.1)	10 (58.8)	7(41.1)	1.029 (0.151)	<b>7.0358</b> <b>(0.00799)*</b>
		15 (46.9)	2 (13.3)	13 (86.6)	-4.016 (0)	
Cáncer de mama bilateral	23	7 (30.4)	3 (42.8)	4 (57.1)	-0.53 (0.3)	0.35 (0.55409)
		16 (69.6)	7 (43.5)	9 (56.2)	-0.7071 (0.23885)	
Cáncer de ovario	17	8 (47.05)	7 (87.5)	1 (12.5)	<b>3</b> <b>(0.00125)*</b>	3.4379 (0.0637)
		9 (52.9)	4 (44.4)	5 (55.5)	-0.4714 (0.31918)	

*N*: total de individuos; *HF*: historia de cáncer en familiares de primer grado hasta el momento de la elaboración del árbol genealógico; *P* significancia estadística,

\*valor de P estadísticamente significativo para un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 4. Proporción de resultados positivos y negativos o no concluyentes, para diferentes criterios de riesgo genético, estratificados respecto a la existencia o no de historia familiar de cáncer.

*Influencia del contenido genético del panel sobre la proporción de los resultados positivos, negativos y de significado clínico incierto*

Debido a la variabilidad de paneles disponibles en el mercado, decidimos evaluar cómo influye el contenido genético del panel en el porcentaje de cada tipo de resultado y especialmente sobre el porcentaje de casos positivos identificados. Para ello se diseñaron tres paneles virtuales con diferentes contenido genético a partir de los 64 genes analizados: uno que sólo contenía a los genes *BRCA1* y *BRCA2* (denominado “**BRCA**”), un panel de 6 genes que comprende a los que confieren mayor susceptibilidad *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1* y *TP53* (llamado “**RIESGOALTO**”)(Gomez-Flores-Ramos, Alvarez-Gomez, Villarreal-Garza, Wegman-Ostrosky, & Mohar, 2017; Turnbull & Rahman, 2008), y un panel de 20 genes (“**20GENES**”) que comprende a los de alta susceptibilidad y a genes de penetrancia intermedia: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, *PALB2*, *PMS2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *ATM*, *BRIP1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*, *CDH1*, *NBN*, *NF1* y *CDKN2A*. Al panel conformado por todos los genes secuenciados en este estudio le denominamos “**AMPLIO**” (ver Tabla 2). Para cada uno de ellos se calculó la distribución por tipo de resultado y se evaluaron las diferencias observadas en la proporción de resultados positivos mediante el estadístico Z. Los resultados se muestran en la Figura 11.

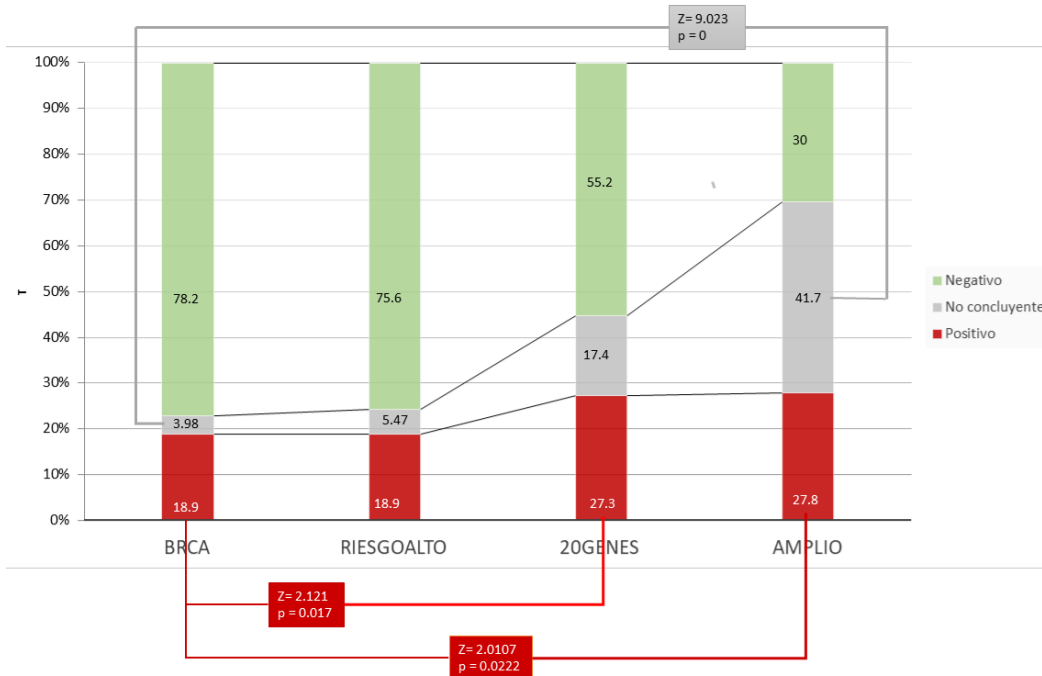


Figura 11. Distribución de resultados positivos, no concluyentes y negativos para cada panel virtual de acuerdo a su contenido genético.

No existen diferencias significativas en la proporción de casos positivos identificados entre el panel “BRCA” y el panel “RIESGOALTO” (18.9 % vs 18.9% respectivamente). Lo mismo ocurre entre el panel “20GENES” y el panel “AMPLIO” (27.3 % vs 27.8 % respectivamente), esta pequeña diferencia se debe a un caso con una variante deletérea en *PTCH1* identificado sólo con el panel AMPLIO

Sin embargo, la proporción de casos positivos identificados es significativamente diferente entre con el panel “BRCA” y el panel “20GENES” ( $Z_{una\ cola}=2.121$ ;  $p=0.017$ ) o entre el panel BRCA y el panel AMPLIO [ $Z_{una\ cola}= 2.0107$  ( $p=0.0222$ )]. El porcentaje de casos positivos se incrementa en un 8.4 % al pasar del panel “BRCA” al panel “20GENES” y en 8.9 % al pasar del “BRCA” al panel “AMPLIO”. Las variantes de significado incierto se incrementan al aumentar el número de genes analizados.

## ***Discusión***

El presente trabajo, aborda la posible participación de otros genes, además de *BRCA1* y *BRCA2* en la susceptibilidad hereditaria a cáncer de mama y ovario en pacientes mexicanas.

Para ello analizamos un grupo de 201 mujeres mexicanas, seleccionadas por cumplir uno o más de los criterios de riesgo genético establecidos actualmente en las guías internacionales de la NCCN (Daly et al., 2017).

La edad promedio al diagnóstico del primer tumor fue de 41.1 años, muy similar a la reportada en otras series de mujeres mexicanas seleccionadas de acuerdo a criterios de riesgo genético (Quezada Urban et al., 2018; Vaca-Paniagua et al., 2012; Vidal-Millan et al., 2009; Villarreal-Garza, Alvarez-Gomez, et al., 2015). Aunque el rango de edad abarcó desde los 22 hasta los 77 años, el 81 % de los pacientes se encontraban en la cuarta o quinta década de la vida al momento del diagnóstico. El diagnóstico a una edad temprana, en que la mujer se encuentra aun consolidando su carrera profesional y con hijos menores de edad, contribuye al impacto socio económico negativo de este padecimiento en nuestra población y enfatiza la necesidad de identificar oportunamente a estas mujeres para disminuir la morbi mortalidad asociada al riesgo de ocurrencia y recurrencia de cáncer.

La mayoría (91.8 %) de los casos fueron afectadas por cáncer de mama como primer tumor, por lo que nuestra serie explora mucho más la participación del componente genético en la presentación de cáncer de mama que en la del cáncer de ovario. La distribución de tipos histológicos y el inmuno-fenotipo para cáncer de mama, así como la histología de cáncer de ovario fue similar a la descrita en otras series (Kurian et al., 2014; Lin et al., 2016; Tung et al., 2015)

### *Criterios de riesgo genético*

El cáncer de mama de inicio temprano fue el criterio de riesgo más frecuentemente identificado en nuestro grupo de pacientes (63.18%) (Tabla 2). Es posible que la alta proporción de mujeres con este criterio de riesgo refleje un



sesgo en la selección de los pacientes que fueron invitados a participar en el estudio por los oncólogos tratantes de las diferentes instituciones. En nuestro medio, los criterios considerados como sugestivos de riesgo genético han sido poco difundidos entre los oncólogos clínicos o quirúrgicos. Sin embargo, el diagnóstico de cáncer de mama en una mujer joven es un evento que no pasa desapercibido y que para su identificación no requiere un interrogatorio intencionado para identificar historia familiar, ni la elaboración de un árbol genealógico.

La historia familiar de cáncer se considera un importante predictor del riesgo genético y es uno de los criterios más conocidos que originan el envío del paciente a evaluación por el servicio de genética y la realización de un estudio molecular (Daly et al., 2017; Moyer, 2014; Riley et al., 2012). En nuestra serie el 44.7% de los casos fueron positivos a este criterio de riesgo. Sin embargo al estratificar cada uno de los criterios de riesgo respecto a la presencia de historia familiar, encontramos que sólo el cáncer de ovario estuvo significativamente asociado con la presencia de historia familiar de cáncer que estuvo presente en el 64.7% de los casos ( $z= 1.715$ ,  $p= 0.0043$ ). Aunque el número de pacientes con cáncer de ovario analizados es pequeño, los resultados indican que la contribución de factores genéticos hereditarios es mayor en esta presentación que en la de cáncer de mama y apoyan la necesidad de explorar el componente genético para cáncer de ovario con paneles multigen en un grupo mucho mayor de pacientes.

En el grupo de mujeres con cáncer de mama de inicio temprano, una proporción significativamente mayor de casos (61.1%) carecían de historia familiar de cáncer (en familiares en primer grado) ( $Z=-3.5277$   $p= 0.00021$ ). Esto apoya la posible participación de factores no genéticos en el desarrollo del cáncer a edades tempranas.

Otras posibles explicaciones son: a) la contribución de otros genes conocidos para predisposición de cáncer de mama y/o ovario no analizados en este estudio (p. ej.: *MRE11*, *RAD51B*, *RAD50*, *XRCC2*, *BARD1*, entre otros), o de otros genes

recientemente identificados (p. ej.: *PHIP* (Jiao et al., 2017), b) otros modos de herencia como son: autosómica recesiva o ligada al cromosoma X por ejemplo: *MAGEC3* (Eng et al., 2018), los cuales no han sido explorados extensivamente hasta el momento c) así como los modelos de estimación de riesgo para cáncer de mama de inicio temprano (< 50 años) y cáncer de mama a cualquier edad, que requieren el análisis de múltiples *loci* (Scannell Bryan et al., 2018). En este estudio los resultados son ligeramente superiores al usar los datos genéticos contra el uso de datos no-genéticos [0.636 (95% CI 0.614-0.659) vs 0.609 (95% CI: 0.587-0.632), respectivamente], cuando se evalúa el área bajo la curva. Y cuando se combinan ambos factores de riesgo (genéticos y no genéticos) se alcanza una predicción más robusta: 0.662 (95% CI, 0.640-0.684). Este abordaje del riesgo se analizó excluyendo a las mujeres portadoras de variantes en los genes de alta penetrancia *BRCA1* y *BRCA2* en el estudio reciente de Scannell Bryan y colaboradores en 2018, y reafirma el rol importante del riesgo poligénico para este criterio de selección.

Interesantemente en nuestro estudio la presencia de cáncer de mama triple negativo (CMTN) también se asoció con historia familiar negativa (62.5%) ( $Z=-2$ ,  $p=0.022$ ). Este resultado contrasta con los datos de la literatura internacional en los que este inmunofenotipo es el más frecuente en mujeres con variantes patogénicas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, las cuales generalmente también presentan historia familiar del padecimiento (Couch et al., 2015; Engel et al., 2018; Villarreal-Garza, Weitzel, et al., 2015).

En el 28% (N=56/201) de los casos analizados fue posible identificar una variante patogénica o probablemente patogénica (Figura 6). Esta proporción de casos positivos es mayor a la reportada en otros estudios realizados en población mexicana, (del 4.3 al 23.2 % de casos positivos) en los que se analizaron una menor cantidad de genes.(Torres-Mejia et al., 2015; Vaca-Paniagua et al., 2012; Vidal-Millan et al., 2009; Villarreal-Garza, Alvarez-Gomez, et al., 2015; Villarreal-Garza, Weitzel, et al., 2015). El resultado de este estudio apoya el uso de paneles multigen para la evaluación del riesgo genético en nuestra población. Los paneles

multigen permiten la identificación de un mayor número de individuos que pueden beneficiarse de medidas de vigilancia encaminadas a la identificación temprana o de medidas encaminadas a la reducción de riesgo.

Existe una contribución importante de otros genes, a la susceptibilidad genética hereditaria a cáncer de mama u ovario en la población mexicana ya que en el 32% de los casos positivos la variante patogénica no fue identificada en los genes *BRCA1* o *BRCA2*. Las variantes identificadas se distribuyeron en los siguientes genes *CHEK2*, *MSH6*, *TP53*, *CDKN2A*, *PTCH1*, *BRIP1*, *ATM* y *RAD51D*. (Figura 7).

#### *Otros genes diferentes de BRCA1 y BRCA2 con variantes patogénicas*

A nuestro conocimiento este es el primer reporte que demuestra la contribución de *CHEK2* al riesgo hereditario de cáncer de mama u ovario en población mexicana. Las variantes deletéreas identificadas en nuestra serie de pacientes fueron un cambio de aminoácido, y dos deleciones de nucleótidos que generan corrimiento del marco de lectura y codón de terminación prematuro. Este último tipo de cambio (variante nulimórfica) se consideran de alto riesgo en cuanto a la penetrancia, de acuerdo a las recomendaciones del grupo de Genética del Cáncer en Inglaterra (Taylor et al., 2018). Interesantemente la variante conocida como *CHEK2-1100delC* (NM\_007194.3:c.1100delC o NM\_001005735.1:c.1229delC) que ha sido identificada en múltiples poblaciones alrededor del mundo (Abud, Koehler-Santos, Ashton-Prolla, & Prolla, 2012; Weischer et al., 2012; Yang, Zhang, Wang, & Liu, 2012), no fue identificada en ninguno de los pacientes en nuestro estudio.

También se identificaron variantes deletéreas en el gen *MSH6* en 4 pacientes, dos de ellas con diagnóstico de cáncer de mama pero sin historia familiar de algún tipo de cáncer del espectro conocido para síndrome de Lynch. En ninguno de los dos casos se realizó la segregación de la variante en los padres por lo que no pudimos establecer si eran *de novo* o no. La contribución del síndrome de Lynch al riesgo de cáncer de mama no está claramente establecida, y es un tema controversial

actualmente (Win, Lindor, & Jenkins, 2013). Por ejemplo, se ha identificado un riesgo aumentado para cáncer de mama en ciertas poblaciones y para un gen específico, Harkness y colaboradores, en el 2015 reportaron un riesgo acumulado a los 70 años de 18.6 %, en mujeres inglesas con variantes deletéreas en *MLH1* (Harkness et al., 2015). La asociación de variantes de *MSH6*, fue evaluada por Roberts y colaboradores en 2018, quienes compararon la tasa de incidencia estandarizada para cáncer de mama entre un grupo de pacientes con variantes deletéreas en los genes asociados a síndrome de Lynch (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, y *PMS2*) y la población general proveniente del programa de vigilancia, epidemiología, encontrando asociación entre el riesgo para cáncer de mama y los genes *MSH6* y *PMS2* (M. E. Roberts et al., 2018).

Los otros dos casos con variantes en *MSH6* identificados en nuestra serie tuvieron diagnóstico de cáncer de ovario, que es un tumor del espectro del síndrome de Lynch. Uno de ellos con historia familiar de primer grado para cáncer gástrico y leucemia (madre y padre, respectivamente) y el otro se presentó como caso único de ovario, con el padre posiblemente afectado de cáncer de próstata, sin embargo este antecedente no pudo ser confirmado con pruebas objetivas.

*TP53*, se considera un gen de alta penetrancia para cáncer de mama asociado, frecuentemente a una presentación temprana e historia familiar positiva. Sin embargo, a pesar de que nuestra serie presenta una alta proporción de casos con cáncer de mama de inicio temprano, de los cuales el 39.3% (50 casos) presentaban historia familiar, sólo se identificaron 3 casos positivos para variantes deletéreas en este gen. Todos ellos con diagnóstico de cáncer de mama a edades muy tempranas: 22, 33 y 41 años. En dos de los casos existía historia familiar de cáncer sugestiva de síndrome de Li-Fraumeni. La otra paciente no tenía historia familiar, por lo que es posible que la variante fuera una mutación *de novo*, no fue posible estudiar a los padres para esclarecer esta posibilidad, sin embargo se ha reportado que al menos 14 % de las variante de *TP53* son *de novo* (Renaux-Petel et al., 2018).

En uno de los casos positivos con historia familiar se identificó una variante patogénica nueva para *TP53*. La delección de 18 nucleótidos. (NM\_000546.5c.529\_546delCCCCACCATGAGCGCTGC) que origina una delección-inserción como se muestra a continuación: NP\_000537.3:p.(Pro177\_Cys182delinsdel). Esta variante no ha sido reportada hasta la fecha como variante germinal, pero está reportada como variante somática en la base de datos de ICGC con el siguiente identificador: MU69630. La variante ha sido identificada como mutación somática en carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma esofágico y adenocarcinoma ductal de páncreas.

La variante *CDKN2A* c.146T>C que origina el cambio Ile49Thr en la proteína fue identificada en 3 de los casos positivos con cáncer de mama de inicio temprano (menores de 46 años de edad) sin historia familiar. Esta variante fue reportada previamente en una paciente hispanica con cáncer de mama de inicio temprano (36 años)(Kurian et al., 2014). De acuerdo a la información de las bases de datos poblacionales, esta variante ha sido identificada solamente en latinos con una frecuencia alélica de 0.4497% de acuerdo a los datos de exomas de la base de datos gnomAD, (último acceso julio de 2018). En la base de datos de ClinVar existen conflictos sobre la clasificación de la misma ya que ha sido clasificada como benigna, patogénica y de significado clínico incierto en diferentes ocasiones.

Sin embargo, algunos hechos apoyan la probable patogenicidad de esta variante: la variante ha sido identificada en un estudio poblacional que incluía individuos con múltiples melanomas primarios así como individuos con un melanoma primario único (Orlow et al., 2007), también ha sido identificada en melanoma familiar (Ruas & Peters, 1998). Estudios experimentales que evaluaron el impacto de este cambio sobre el funcionamiento de la proteína codificada por *CDKN2A*, reportan un efecto deletéreo en cultivo celular (Walker et al., 1998). Otros dos estudios describen que este cambio afecta moderadamente la interacción entre *CDKN2A* y *CDK4* en un modelo con levadura(Koh, Enders, Dynlacht, & Harlow, 1995; Parry & Peters, 1996). Adicionalmente la variante ha sido identificada por el Laboratorio de

Diagnóstico Genómico del INMEGEN en dos familias mexicanas con historia de cáncer de páncreas y melanoma (comunicación personal, datos no publicados). La variante se encuentra en una región del gen donde 12 de las 18 variantes clasificadas, son patogénicas, lo que corresponde al 66.7 % de las variantes (Varsome, julio de 2018) Adicionalmente una variante en la misma posición (c.146T>G) que origina el cambio de isoleucina por serina, se encuentra clasificada como probablemente patogénica para melanoma familiar y cáncer pancreático (Lal et al., 2000), lo que apoya el carácter deletéreo de los cambios en esta posición. Se requieren estudios epidemiológicos y funcionales para esclarecer la contribución de la misma al riesgo de cáncer de mama.

*BRIP1* y *RAD51D* contribuyen a la predisposición genética de cáncer de mama en nuestra población. Estos genes han sido identificados en otras poblaciones y se considera que contribuyen principalmente al desarrollo de cáncer de ovario (Lin et al., 2016; Tung et al., 2015; Walsh et al., 2017; Weber-Lassalle et al., 2018).

Sin embargo en nuestro estudio, la variante de *BRIP1* fue identificada en una mujer con cáncer de mama de histología papilar intraquístico. Se trata de un codón de terminación prematura a los 356 aminoácidos, que origina la pérdida del dominio de unión ATP necesario para la actividad de helicasa y su posterior interacción con pBRCA1. La variante está clasificada como patogénica en la bases de datos, asociada al desarrollo de cáncer de ovario (dbSNP y ClinVar: rs730881633).

La variante deletérea en *RAD51D*, se identificó en una mujer con cáncer de mama bilateral, sin historia familiar de ningún tipo de cáncer. La variante origina un codón de terminación prematura y la pérdida de 73 aminoácidos, está clasificada como patogénica en ClinVar con el siguiente ID: rs137886232.

En una paciente se identificó una variante de pérdida de función en el gen *PTCH1*. Las variantes de pérdida de función en *PTCH1* se asocian al síndrome de Gorlin, un síndrome de predisposición genética a carcinoma de células basales, queratoquistes de mandíbula, que se hereda de forma autosómica dominante. El

60% de los pacientes tienen características clínicas identificables como macrocefalia, abombamiento frontal, facies tosca y milia facial, además de anomalías esqueléticas como costillas bífidas, y vertebras en cuña, calcificación de la hoz del cerebro (hasta el 90% de los casos) (Evans & Farndon, 1993). La paciente no presentaba estas características clínicas en la exploración física, por lo que se solicitaron estudios de imagen. Nuestra revisión de la literatura para los fenotipos de “Síndrome de nevo basal”, “Síndrome de Gorlin”, “PTCH1” y “cáncer de mama” no arrojaron resultados de casos, o series de casos con asociación entre cáncer de mama y síndrome de Gorlin. Tampoco se han registrado fenotipos asociados a cáncer de mama, neoplasma de mama u otros fenotipos similares y variantes patogénicos o probablemente patogénicos en este gen en la base Human Gene Mutation Database Profesional 2018.1. La variante no se encuentra reportada en la base de LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/PTCH1/unique>). Por lo que no es claro si la variante de *PTCH1* puede haber contribuido al riesgo de cáncer en esta paciente.

No se identificaron variantes deletéreas en los genes: *PALB2*, que contribuye a la susceptibilidad principalmente en población franco-canadiense, ni en los genes de alta penetrancia: *PTEN*, *STK11*, y *CDH1* a pesar de que en esta serie no se identificaron variantes de *PALB2*, estas han sido identificadas en dos mujeres mexicanas referidas para diagnóstico de rutina del Laboratorio de Diagnóstico Genómico (comunicación personal, Septiembre de 2018). Lo que apoya la inclusión de este gen en los paneles multigenes que se apliquen al estudio de la susceptibilidad en mujeres mexicanas y enfatiza la necesidad de evaluar un número mayor de individuos.

*Análisis de las pérdidas o ganancias de material genético en los genes: BRCA1, BRCA2, PALB2, TP53, MSH2, EPCAM, PMS2, MLH1, MSH6, y RAD51C, RAD51D*

En este trabajo se explora por primera vez la posible contribución de las pérdidas o ganancias de material genético (CNV's) al riesgo de cáncer de mama y ovario en los genes: *BRCA1, BRCA2, PALB2, TP53, MSH2, EPCAM, PMS2, MLH1, MSH6, y RAD51C, RAD51D*, utilizando los datos de secuenciación masiva y el algoritmo bioinformático integrado en la plataforma de Sophia Genetics DDM.

Este tipo de alteración fue identificada en 5 individuos, todos ellos en el gen *BRCA1*. Las alteraciones de tipo CNV representaron el 18.5% de las variantes deletéreas identificadas para este gen.

La frecuencia de la delección de los exones 9 al 12 en nuestra serie es mucho menor que la reportada en otros estudios realizados en población mexicana (Torres-Mejia et al., 2015; Villarreal-Garza, Weitzel, et al., 2015) donde esta variante estuvo presente en el 33% de los casos positivos con variantes patogénicas en los genes *BRCA1/2* (Villarreal-Garza, Alvarez-Gomez, et al., 2015). Esta diferencia puede ser explicada probablemente por el empleo de diferentes criterios de selección en los estudios. En nuestra serie esta delección representó el 11.1% de las mutaciones de *BRCA1* y fue identificada solamente en 3 pacientes con cáncer de mama de inicio temprano de inmuno-fenotipo triple negativo o basal o luminal B. Mientras que en el estudio realizado por (Villarreal-Garza, Alvarez-Gomez, et al., 2015) , esta alteración se asoció más al desarrollo de cáncer de ovario ya que 69 % (9/13) de los casos con la delección tenían este padecimiento.

Adicionalmente se identificaron en un paciente con cáncer de ovario la delección de los exones 18 y 19 y en otro la duplicación del exón 13 de *BRCA1* en otra. Estas variantes no habían sido reportadas previamente en población mexicana y demuestran que, además de la delección 9-12, existen otras alteraciones de número de copias que es necesario considerar.



Las alteraciones tipo CNV están presentes en el 2.48% del total de los individuos analizados, y corresponden al 8.9% de los casos positivos identificados. La presencia de una alteración de número de copias en casi el 9% de los individuos positivos, indica que es imprescindible la identificación de este tipo de alteración rutinariamente en los estudios moleculares que se realicen en sujetos en riesgo en nuestra población.

En años recientes el desarrollo de algoritmos bioinformáticos que predicen la posible presencia de una alteración de CNV, a partir de los datos de secuenciación masiva y su incorporación a los algoritmos bioinformáticos implementados en la práctica clínica, ha facilitado la identificación de CNV y disminuido el costo y el tiempo necesario para identificarlos, ya que se ha reducido considerablemente el número de estudios de MLPA. Si no hubiéramos contado con un algoritmo de detección de CNVs, hubiera sido necesario realizar estudios de MLPA, al menos para *BRCA1* y *BRCA2*, en 74.62% de las muestras (150 individuos) lo que significa alrededor de 300 reacciones de MLPA (una para cada gen: *BRCA1* y *BRCA2*). El algoritmo utilizado por la plataforma de Sophia ha sido evaluado con muestras de referencia mostrando un valor predictivo negativo del 100% (datos de validación experimental), por lo que se puede confiar que en los casos donde no se predice un CNV este no está presente. El estudio MLPA, debe ser realizado como técnica ortogonal confirmatoria en todos los casos que resulten positivos a CNVs a partir del análisis bioinformático de los datos de secuenciación.

#### *Variantes de significado clínico incierto*

La probabilidad de identificar variantes de significado clínico incierto se incrementa con el número de genes analizados en el panel. En nuestro estudio, con un panel de 64 genes estas se identificaron en el 42% de los pacientes. Esta proporción es ligeramente mayor a la identificada en otras publicaciones en las que se emplearon paneles más pequeños. En una serie de pacientes con diagnóstico de algún cáncer ginecológico o gastro-intestinal (n= 7,428) analizados con un panel que contenía 29 genes, se identificaron un 34.5 % de VUS. Interesantemente

para los casos de individuos con ancestría hispánica fue sólo del 20.4 % (Susswein et al., 2016). Este último dato contrasta con el resultado de un estudio en el que se analizaron 85 mujeres colombianas con el panel myRisk de Myriad (25 genes) donde la frecuencia de VUS fue del 35% (Cock-Rada, Ossa, Garcia, & Gomez, 2018). Cuando se analizan las variantes genéticas empleando exoma clínico la frecuencia de resultados con VUS llega incluso al 95 % (Maxwell et al., 2016).

Los genes con mayor número de variantes de significado clínico incierto en nuestro grupo de pacientes fueron *ATM*, *BRCA2* y *CHEK2* (Figura 8). Interesantemente, una de las variantes de significado clínico incierto de *CHEK2* fue identificada en 5 de los casos, lo que corresponde al 2.4 % de los pacientes. Esta variante es exclusiva de población latina y su frecuencia poblacional es sólo del 0.235%, de acuerdo a lo reportado en los exomas de la base de datos gnomAD, (septiembre de 2018). Estos resultados sugieren la variante pudiera contribuir al riesgo de cáncer en nuestra población. Sin embargo se requieren estudios epidemiológicos para identificar la frecuencia poblacional de la misma, realizar la segregación de la variante en las familias afectadas y estudios funcionales para lograr la reclasificación de la misma como benigna o patogénica (Richards et al., 2015) ya que la predicción *in silico* no es suficiente para la reclasificación este tipo de variantes (Kerr et al., 2017)

La identificación recurrente de una variante de significado clínico incierto en un cierto gen y padecimiento representa una nueva oportunidad para la investigación genética y epidemiológica que permitirá esclarecer su participación en la enfermedad. Las variantes de significado clínico incierto reflejan la falta de conocimiento sobre el espectro de variantes genéticas que han sido mucho menos evaluados en relación al riesgo de cáncer de mama y ovario, o que han sido menos evaluados en general en ciertas poblaciones o grupos étnicos.

La probabilidad de identificar variantes de significado clínico incierto es aún mayor para poblaciones latinas, que tienen un gran mestizaje, originando heterogeneidad genética (Silva-Zolezzi et al., 2009) y pobre representación en las bases de datos

poblacionales, como sucede con la población mestiza de México. La frecuencia alélica de la variante es un criterio que se toma en cuenta en la evaluación de una posible patogenicidad (Richards et al., 2015), por lo que polimorfismos relativamente frecuentes en grupos étnicos poco representados y que tengan predicción de probablemente deletéreos por los algoritmos bioinformáticos serán clasificados como variantes de significado clínico incierto. Algunas variantes de significado clínico incierto pueden representar polimorfismos privados presentes en una familia única que difícilmente podrán ser reclasificadas a partir de estudios epidemiológicos poblacionales.

#### *Distribución de resultados clínicos por edad y criterios de riesgo genético*

El análisis de la distribución de los resultados positivos, negativos y de significado clínico incierto por décadas de acuerdo a la edad al diagnóstico del primer tumor (Figura 9), mostró que la mayor proporción de resultados positivos se encuentra en el grupo menor de 30 años mientras que la menor proporción corresponde al período entre 51-60 años. Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo que pudiera deberse al pequeño de número de individuos en cada categoría.

En cuanto al criterio de riesgo cáncer de mama inicio temprano (<50 años), sólo el 25.9 % de los casos con este criterio se identificó una variante deletérea, siendo este el de menor proporción de casos positivos. Interesantemente el 60.9% (N=76/127) de los casos no tenían historia de cáncer en familiares en primer grado, lo que concuerda con la no identificación de una variante deletérea de alta penetrancia en la mayoría de estas mujeres. El estadístico chi cuadrado en este sub-análisis demuestra que la combinación de cáncer de mama de inicio temprano sin historia familiar, se asocia significativamente a un resultado negativo o no concluyente en estudio genético ( $\chi^2 = 4.3015$ , valor de  $p = 0.03808$ ).

El criterio con mayor proporción de resultados positivos es el cáncer de mama triple negativo (CMTN), el cual ha sido explorado previamente en pacientes mexicanas (Villarreal-Garza, Weitzel, et al., 2015). El porcentaje de resultados

positivos en nuestra serie es mayor que el obtenido en otras series de pacientes mexicanos (54.8 % vs 23.2%) (Villarreal-Garza, Weitzel, et al., 2015). Nuestros resultados demuestran que no solo *BRCA1* y *BRCA2* participan en la predisposición genética, ya que identificamos variantes en los genes *CDKN2A* y *TP53* en pacientes con este tipo de tumor, lo que expande el espectro de genes asociados a cáncer de mama triple negativo en nuestra población. La heterogeneidad genética en CMTN ha sido corroborada, en otras poblaciones donde se han identificado variantes deletéreas en *TP53*, *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, etc.(Couch et al., 2015); en este estudio no se incluyó a *CDKN2A*. Estos hallazgos apoyan el uso de paneles multigen para la evaluación de riesgo genético aun en pacientes con CMTN, el cual clásicamente se ha considerado más frecuentemente asociado con variantes deletéreas en los genes *BRCA1* y *BRCA2*

El cáncer de ovario es el segundo con mayor proporción de casos positivos (45.8 %), de los cuales el 87.5% tiene historia familiar positiva. Aunque la predisposición para cáncer de ovario comparte bases genéticas con la predisposición hereditaria a cáncer de mama (p.ej. variantes deletéreas en *BRCA1* y *BRCA2*), se ha identificado la contribución de otros genes a esta presentación, como por ejemplo algunos de los asociados al síndrome de Lynch y más recientemente *MAGEC3*, un gen ubicado en el cromosoma X, y que posiblemente confiere riesgo para cáncer de ovario y próstata (Eng et al., 2018).

*Influencia del contenido genético del panel sobre la proporción de los resultados positivos, negativos y de significado clínico incierto*

Actualmente los paneles de múltiples genes son utilizados rutinariamente en la práctica clínica con el propósito de identificar la variante causal en individuos con un posible riesgo genético para cáncer de mama u ovario. Diferentes compañías comerciales ofrecen paneles basados en evidencia internacional, principalmente de poblaciones anglo-sajonas. Agencias y grupos de consenso recomiendan la

inclusión de ciertos genes para el análisis de los pacientes con criterios de riesgo en sus países (Daly et al., 2017; Taylor et al., 2018).

En nuestro país no existen estudios encaminados a establecer el contenido genético mínimo necesario para la evaluación de riesgo genético en población mexicana. Por ello en este trabajo evaluamos la influencia del contenido genético del panel sobre el porcentaje de casos positivos identificados. Los resultados mostraron que un panel que contenga al menos, los siguientes 20 genes: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, *PALB2*, *PMS2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *ATM*, *BRIP1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*, *CDH1*, *NBN*, *NF1* y *CDKN2A*, permite la detección de la mayoría de los pacientes positivos. Este número de genes representa un tamaño eficiente que maximiza la relación costo beneficio y que es escalable al sector público. De acuerdo a nuestros resultados, al incluir los 64 genes sólo se identificó un caso más con una variante en *PTCH1*, de la que no podemos afirmar que esté relacionada con la predisposición hereditaria a cáncer de mama de acuerdo a la evidencia epidemiológica existente en la literatura internacional, hasta el momento. El panel de 64 genes incrementa considerablemente el número de variantes de significado clínico incierto y el costo del estudio, sin un aumento significativo del número de casos positivos identificados.

## Conclusiones

- Este estudio demuestra que los genes *CHEK2*, *MSH6*, *TP53*, *CDKN2A*, *BRIP1*, *ATM* y *RAD51D* se asocian al riesgo hereditario de cáncer de mama y/o ovario en pacientes mexicanas. De acuerdo a los resultados es posible que *PTCH1* sea un gen novedoso asociado al riesgo genético para cáncer de mama.
- El análisis utilizando un panel multigen es superior al análisis convencional limitado a *BRCA1* y *BRCA2*, para identificar la variante genética causal en mujeres con criterios de riesgo genético positivos ya que el 32.2 % de los casos positivos no tienen variantes en *BRCA1* o *BRCA2*.
- El contenido genético mínimo que permite identificar la mayor proporción de casos positivos es: *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CHEK2*, *PALB2*, *PMS2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *ATM*, *BRIP1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM*, *CDH1*, *NBN*, *NF1* y *CDKN2A*. Este panel pudiera ser actualizado a medida que se generen nuevo conocimiento a partir de estudios en población mexicana
- Las alteraciones de tipo CNV se encuentran principalmente en *BRCA1*, no se limitan a la delección de los exones 9-12, constituyen el 8.9% de los casos positivos por lo que deben ser identificadas de forma rutinaria y obligatoria.
- Las indicaciones clínicas con mayor probabilidad de identificar una variante patogénica o probablemente patogénica son la de cáncer de mama triple negativo con historia familiar, seguido de cáncer de ovario con historia familiar.
- No se identificaron variantes deletéreas en *PALB2*, *PTEN*, *STK11*, y *CDH1* considerados genes de alta penetrancia. La contribución de estos genes no puede ser absolutamente descartada y es probable que pueda ser demostrada en estudios que involucren un mayor número de individuos.

## **Perspectivas**

### **Referencias**

- Abud, J., Koehler-Santos, P., Ashton-Prolla, P., & Prolla, J. C. (2012). CHEK2 1100DEL C germline mutation: a frequency study in hereditary breast and colon cancer Brazilian families. *Arq Gastroenterol*, *49*(4), 273-278.
- Antoniou, A. C., Foulkes, W. D., & Tischkowitz, M. (2014). Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med*, *371*(17), 1651-1652. doi:10.1056/NEJMc1410673
- Antoniou, A. C., Pharoah, P. D., McMullan, G., Day, N. E., Stratton, M. R., Peto, J., . . . Easton, D. F. (2002). A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer*, *86*(1), 76-83. doi:10.1038/sj.bjc.6600008
- Arcand, S. L., Akbari, M. R., Mes-Masson, A. M., Provencher, D., Foulkes, W. D., Narod, S. A., & Tonin, P. N. (2015). Germline TP53 mutational spectrum in French Canadians with breast cancer. *BMC Med Genet*, *16*, 24. doi:10.1186/s12881-015-0169-y
- Arteaga-Gómez AC, M.-G. D. (2011). Cáncer de ovario: Diagnóstico y Tratamiento. *Guía de Practica Clínica, COMEGO*.
- Cock-Rada, A. M., Ossa, C. A., Garcia, H. I., & Gomez, L. R. (2018). A multi-gene panel study in hereditary breast and ovarian cancer in Colombia. *Fam Cancer*, *17*(1), 23-30. doi:10.1007/s10689-017-0004-z
- Couch, F. J., Hart, S. N., Sharma, P., Toland, A. E., Wang, X., Miron, P., . . . Fasching, P. A. (2015). Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol*, *33*(4), 304-311. doi:10.1200/JCO.2014.57.1414
- Chavarri-Guerra, Y., Villarreal-Garza, C., Liedke, P. E., Knaul, F., Mohar, A., Finkelstein, D. M., & Goss, P. E. (2012). Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol*, *13*(8), e335-343. doi:10.1016/s1470-2045(12)70246-2
- Cheon, J. Y., Mozersky, J., & Cook-Deegan, R. (2014). Variants of uncertain significance in BRCA: a harbinger of ethical and policy issues to come? *Genome Med*, *6*(12), 121. doi:10.1186/s13073-014-0121-3

- Daly, M. B., Pilarski, R., Berry, M., Buys, S. S., Farmer, M., Friedman, S., . . . Darlow, S. (2017). NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw*, *15*(1), 9-20.
- Easton, D. F., Pharoah, P. D., Antoniou, A. C., Tischkowitz, M., Tavtigian, S. V., Nathanson, K. L., . . . Foulkes, W. D. (2015). Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med*, *372*(23), 2243-2257. doi:10.1056/NEJMSr1501341
- Elwood, P. C., Whitmarsh, A., Gallacher, J., Bayer, A., Adams, R., Heslop, L., . . . Roberts, Z. E. (2018). Healthy living and cancer: evidence from UK Biobank. *Ecancermedicalscience*, *12*, 792. doi:10.3332/ecancer.2018.792
- Eng, K. H., Szender, J. B., Etter, J. L., Kaur, J., Poblete, S., Huang, R. Y., . . . Odunsi, K. O. (2018). Paternal lineage early onset hereditary ovarian cancers: A Familial Ovarian Cancer Registry study. *PLoS Genet*, *14*(2), e1007194. doi:10.1371/journal.pgen.1007194
- Engel, C., Rhiem, K., Hahnen, E., Loibl, S., Weber, K. E., Seiler, S., . . . Schmutzler, R. K. (2018). Prevalence of pathogenic BRCA1/2 germline mutations among 802 women with unilateral triple-negative breast cancer without family cancer history. *BMC Cancer*, *18*(1), 265. doi:10.1186/s12885-018-4029-y
- Evans, D. G., & Farndon, P. A. (1993). Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews((R))*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle
- University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.
- Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R. M., Barregard, L., Bhutta, Z. A., Brenner, H., . . . Naghavi, M. (2017). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, *3*(4), 524-548. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688
- Gomez-Flores-Ramos, L., Alvarez-Gomez, R. M., Villarreal-Garza, C., Wegman-Ostrosky, T., & Mohar, A. (2017). Breast cancer genetics in young women: What do we know? *Mutat Res*, *774*, 33-45. doi:10.1016/j.mrrev.2017.08.001
- Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., & King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, *250*(4988), 1684-1689.
- Hansford, S., Kaurah, P., Li-Chang, H., Woo, M., Senz, J., Pinheiro, H., . . . Huntsman, D. G. (2015). Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncol*, *1*(1), 23-32. doi:10.1001/jamaoncol.2014.168
- Harkness, E. F., Barrow, E., Newton, K., Green, K., Clancy, T., Lalloo, F., . . . Evans, D. G. (2015). Lynch syndrome caused by MLH1 mutations is associated with an increased



- risk of breast cancer: a cohort study. *J Med Genet*, 52(8), 553-556. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103216
- Jiao, X., Aravidis, C., Marikkannu, R., Rantala, J., Picelli, S., Adamovic, T., . . . Lindblom, A. (2017). Phip - a novel candidate breast cancer susceptibility locus on 6q14.1. *Oncotarget*, 8(61), 102769-102782. doi:10.18632/oncotarget.21800
- Kerr, I. D., Cox, H. C., Moyes, K., Evans, B., Burdett, B. C., van Kan, A., . . . Eggington, J. M. (2017). Assessment of in silico protein sequence analysis in the clinical classification of variants in cancer risk genes. *J Community Genet*, 8(2), 87-95. doi:10.1007/s12687-016-0289-x
- Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., & Frenk, J. (2008). Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reprod Health Matters*, 16(32), 113-123. doi:10.1016/s0968-8080(08)32414-8
- Koh, J., Enders, G. H., Dynlacht, B. D., & Harlow, E. (1995). Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature*, 375(6531), 506-510. doi:10.1038/375506a0
- Kurian, A. W., Hare, E. E., Mills, M. A., Kingham, K. E., McPherson, L., Whittemore, A. S., . . . Ford, J. M. (2014). Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. *J Clin Oncol*, 32(19), 2001-2009. doi:10.1200/jco.2013.53.6607
- Lal, G., Liu, L., Hogg, D., Lassam, N. J., Redston, M. S., & Gallinger, S. (2000). Patients with both pancreatic adenocarcinoma and melanoma may harbor germline CDKN2A mutations. *Genes Chromosomes Cancer*, 27(4), 358-361.
- Lapunzina, P., Lopez, R. O., Rodriguez-Laguna, L., Garcia-Miguel, P., Martinez, A. R., & Martinez-Glez, V. (2014). Impact of NGS in the medical sciences: Genetic syndromes with an increased risk of developing cancer as an example of the use of new technologies. *Genet Mol Biol*, 37(1 Suppl), 241-249.
- Lerner-Ellis, J., Khalouei, S., Sopik, V., & Narod, S. A. (2015). Genetic risk assessment and prevention: the role of genetic testing panels in breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 15(11), 1315-1326. doi:10.1586/14737140.2015.1090879
- Lin, P. H., Kuo, W. H., Huang, A. C., Lu, Y. S., Lin, C. H., Kuo, S. H., . . . Huang, C. S. (2016). Multiple gene sequencing for risk assessment in patients with early-onset or familial breast cancer. *Oncotarget*, 7(7), 8310-8320. doi:10.18632/oncotarget.7027
- Loveday, C., Turnbull, C., Ramsay, E., Hughes, D., Ruark, E., Frankum, J. R., . . . Rahman, N. (2011). Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet*, 43(9), 879-882. doi:10.1038/ng.893
- Mantere, T., Tervasmaki, A., Nurmi, A., Rapakko, K., Kauppila, S., Tang, J., . . . Pylkas, K. (2017). Case-control analysis of truncating mutations in DNA damage response

- genes connects TEX15 and FANCD2 with hereditary breast cancer susceptibility. *Sci Rep*, 7(1), 681. doi:10.1038/s41598-017-00766-9
- Martínez-Gonzalez, M. A., Irala-Estevez J. (2006). *Métodos descriptivos* (M. A. Martínez-Gonzalez Ed. Second ed.). España: Diaz de Santos.
- Martínez-Gonzalez, M. A., Irala-Estevez J., Bes-Rastrollo M. (2006). *Datos categóricos y porcentajes: Comparación de proporciones* (M. A. Martínez-Gonzalez Ed. Second ed.). España: Diaz de Santos.
- Maxwell, K. N., Hart, S. N., Vijai, J., Schrader, K. A., Slavin, T. P., Thomas, T., . . . Nathanson, K. L. (2016). Evaluation of ACMG-Guideline-Based Variant Classification of Cancer Susceptibility and Non-Cancer-Associated Genes in Families Affected by Breast Cancer. *Am J Hum Genet*, 98(5), 801-817. doi:10.1016/j.ajhg.2016.02.024
- McGarrity, T. J., Amos, C. I., & Baker, M. J. (1993). Peutz-Jeghers Syndrome. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews((R))*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle
- University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.
- Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., . . . Hanenberg, H. (2010). Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*, 42(5), 410-414. doi:10.1038/ng.569
- Melchor, L., & Benitez, J. (2013). The complex genetic landscape of familial breast cancer. *Hum Genet*, 132(8), 845-863. doi:10.1007/s00439-013-1299-y
- Moyer, V. A. (2014). Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*, 160(4), 271-281. doi:10.7326/m13-2747
- Nagy, R., Sweet, K., & Eng, C. (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*, 23(38), 6445-6470. doi:10.1038/sj.onc.1207714
- Neidhardt, G., Hauke, J., Ramser, J., Gross, E., Gehrig, A., Muller, C. R., . . . Hahnen, E. (2017). Association Between Loss-of-Function Mutations Within the FANCM Gene and Early-Onset Familial Breast Cancer. *JAMA Oncol*, 3(9), 1245-1248. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5592
- Orlow, I., Begg, C. B., Cotignola, J., Roy, P., Hummer, A. J., Clas, B. A., . . . Berwick, M. (2007). CDKN2A germline mutations in individuals with cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol*, 127(5), 1234-1243. doi:10.1038/sj.jid.5700689
- Parry, D., & Peters, G. (1996). Temperature-sensitive mutants of p16CDKN2 associated with familial melanoma. *Mol Cell Biol*, 16(7), 3844-3852.

- Pharoah, P. D., Guilford, P., & Caldas, C. (2001). Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*, *121*(6), 1348-1353.
- Quang, D., Chen, Y., & Xie, X. (2015). DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics*, *31*(5), 761-763. doi:10.1093/bioinformatics/btu703
- Quezada Urban, R., Diaz Velasquez, C. E., Gitler, R., Rojo Castillo, M. P., Sirota Toporek, M., Figueroa Morales, A., . . . Vaca Paniagua, F. (2018). Comprehensive Analysis of Germline Variants in Mexican Patients with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Susceptibility. *Cancers (Basel)*, *10*(10). doi:10.3390/cancers10100361
- Rana, H. Q., Gelman, R., LaDuca, H., McFarland, R., Dalton, E., Thompson, J., . . . Garber, J. E. (2018). Differences in TP53 Mutation Carrier Phenotypes Emerge From Panel-Based Testing. *J Natl Cancer Inst*. doi:10.1093/jnci/djy001
- Renaux-Petel, M., Charbonnier, F., Thery, J. C., Fermey, P., Lienard, G., Bou, J., . . . Bougeard, G. (2018). Contribution of de novo and mosaic TP53 mutations to Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet*, *55*(3), 173-180. doi:10.1136/jmedgenet-2017-104976
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., . . . Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, *17*(5), 405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
- Riley, B. D., Culver, J. O., Skrzynia, C., Senter, L. A., Peters, J. A., Costalas, J. W., . . . Trepanier, A. M. (2012). Essential elements of genetic cancer risk assessment, counseling, and testing: updated recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns*, *21*(2), 151-161. doi:10.1007/s10897-011-9462-x
- Rivas-Corchado, L. M., Gonzalez-Geroniz, M., & Hernandez-Herrera, R. J. (2011). [Epidemiological profile of ovarian cancer]. *Ginecol Obstet Mex*, *79*(9), 558-564.
- Rizo-Ríos, P., González-Rivera, A., Sánchez-Cervantes, F., & Murguía-Martínez, P. (2015). Trends in cancer mortality in Mexico: 1990–2012. *Revista Médica Del Hospital General De México*, *78*(2), 85-94. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.03.010>
- Roberts, M. E., Jackson, S. A., Susswein, L. R., Zeinomar, N., Ma, X., Marshall, M. L., . . . Chung, W. K. (2018). MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med*. doi:10.1038/gim.2017.254

- Roberts, N. J., Jiao, Y., Yu, J., Kopelovich, L., Petersen, G. M., Bondy, M. L., . . . Klein, A. P. (2012). ATM mutations in patients with hereditary pancreatic cancer. *Cancer Discov*, 2(1), 41-46. doi:10.1158/2159-8290.cd-11-0194
- Robson, M. E., Bradbury, A. R., Arun, B., Domchek, S. M., Ford, J. M., Hampel, H. L., . . . Lindor, N. M. (2015). American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol*, 33(31), 3660-3667. doi:10.1200/jco.2015.63.0996
- Ruas, M., & Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*, 1378(2), F115-177.
- Scannell Bryan, M., Argos, M., Andrulis, I. L., Hopper, J. L., Chang-Claude, J., Malone, K. E., . . . Ahsan, H. (2018). Germline Variation and Breast Cancer Incidence: A Gene-Based Association Study and Whole-Genome Prediction of Early-Onset Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 27(9), 1057-1064. doi:10.1158/1055-9965.epi-17-1185
- Silva-Zolezzi, I., Hidalgo-Miranda, A., Estrada-Gil, J., Fernandez-Lopez, J. C., Uribe-Figueroa, L., Contreras, A., . . . Jimenez-Sanchez, G. (2009). Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(21), 8611-8616. doi:10.1073/pnas.0903045106
- Sorrell, A. D., Espenschied, C. R., Culver, J. O., & Weitzel, J. N. (2013). Tumor protein p53 (TP53) testing and Li-Fraumeni syndrome : current status of clinical applications and future directions. *Mol Diagn Ther*, 17(1), 31-47. doi:10.1007/s40291-013-0020-0
- Soto-Perez-de-Celis, E., & Chavarri-Guerra, Y. (2016). National and regional breast cancer incidence and mortality trends in Mexico 2001-2011: Analysis of a population-based database. *Cancer Epidemiol*, 41, 24-33. doi:10.1016/j.canep.2016.01.007
- Stoll, J., Weissman, S. M., Hook, N., Selkirk, C., Johnson, A. K., Newlin, A., & Vogel Postula, K. J. (2016). Evaluation of laboratory perspectives on hereditary cancer panels. *Fam Cancer*, 15(4), 689-696. doi:10.1007/s10689-016-9880-x
- Stuckey, A. R., & Onstad, M. A. (2015). Hereditary breast cancer: an update on risk assessment and genetic testing in 2015. *Am J Obstet Gynecol*, 213(2), 161-165. doi:10.1016/j.ajog.2015.03.003
- Susswein, L. R., Marshall, M. L., Nusbaum, R., Vogel Postula, K. J., Weissman, S. M., Yackowski, L., . . . Chung, W. K. (2016). Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med*, 18(8), 823-832. doi:10.1038/gim.2015.166
- Syngal, S., Brand, R. E., Church, J. M., Giardiello, F. M., Hampel, H. L., & Burt, R. W. (2015). ACG Clinical Guideline: Genetic Testing and Management of Hereditary

- Gastrointestinal Cancer Syndromes. *Am J Gastroenterol*, 110(2), 223-263. doi:10.1038/ajg.2014.435
- Taja-Chayeb, L., Vidal-Millan, S., Gutierrez-Hernandez, O., Trejo-Becerril, C., Perez-Cardenas, E., Chavez-Blanco, A., . . . Duenas-Gonzalez, A. (2009). Identification of a novel germ-line mutation in the TP53 gene in a Mexican family with Li-Fraumeni syndrome. *World J Surg Oncol*, 7, 97. doi:10.1186/1477-7819-7-97
- Tan, M. H., Mester, J. L., Ngeow, J., Rybicki, L. A., Orloff, M. S., & Eng, C. (2012). Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res*, 18(2), 400-407. doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-2283
- Tavtigian, S. V., Oefner, P. J., Babikyan, D., Hartmann, A., Healey, S., Le Calvez-Kelm, F., . . . Chenevix-Trench, G. (2009). Rare, evolutionarily unlikely missense substitutions in ATM confer increased risk of breast cancer. *Am J Hum Genet*, 85(4), 427-446. doi:10.1016/j.ajhg.2009.08.018
- Taylor, A., Brady, A. F., Frayling, I. M., Hanson, H., Tischkowitz, M., Turnbull, C., & Side, L. (2018). Consensus for genes to be included on cancer panel tests offered by UK genetics services: guidelines of the UK Cancer Genetics Group. *J Med Genet*, 55(6), 372-377. doi:10.1136/jmedgenet-2017-105188
- Torres-Mejia, G., Royer, R., Llacuachaqui, M., Akbari, M. R., Giuliano, A. R., Martinez-Matsushita, L., . . . Narod, S. A. (2015). Recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexican women with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24(3), 498-505. doi:10.1158/1055-9965.epi-13-0980
- Tung, N., Battelli, C., Allen, B., Kaldate, R., Bhatnagar, S., Bowles, K., . . . Hartman, A. R. (2015). Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer*, 121(1), 25-33. doi:10.1002/cncr.29010
- Turnbull, C., & Rahman, N. (2008). Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9, 321-345. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164339
- Vaca-Paniagua, F., Alvarez-Gomez, R. M., Fragoso-Ontiveros, V., Vidal-Millan, S., Herrera, L. A., Cantu, D., . . . Perez-Plasencia, C. (2012). Full-exon pyrosequencing screening of BRCA germline mutations in Mexican women with inherited breast and ovarian cancer. *PLoS One*, 7(5), e37432. doi:10.1371/journal.pone.0037432
- van Lier, M. G., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E. M., Kuipers, E. J., Steyerberg, E. W., & van Leerdam, M. E. (2010). High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am J Gastroenterol*, 105(6), 1258-1264; author reply 1265. doi:10.1038/ajg.2009.725
- Velasquez-Manoff, M. (2015). Genetics: Relative risk. *Nature*, 527(7578), S116-117. doi:10.1038/527S116a

- Vidal-Millan, S., Taja-Chayeb, L., Gutierrez-Hernandez, O., Ramirez Ugalde, M. T., Robles-Vidal, C., Bargallo-Rocha, E., . . . Duenas-Gonzalez, A. (2009). Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Mexican breast cancer patients. *Eur J Gynaecol Oncol*, *30*(5), 527-530.
- Villarreal-Garza, C., Alvarez-Gomez, R. M., Perez-Plasencia, C., Herrera, L. A., Herzog, J., Castillo, D., . . . Weitzel, J. N. (2015). Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. *Cancer*, *121*(3), 372-378. doi:10.1002/cncr.29058
- Villarreal-Garza, C., Weitzel, J. N., Llacuachaqui, M., Sifuentes, E., Magallanes-Hoyos, M. C., Gallardo, L., . . . Narod, S. A. (2015). The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among young Mexican women with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *150*(2), 389-394. doi:10.1007/s10549-015-3312-8
- Walker, G. J., Flores, J. F., Glendening, J. M., Lin, A. H., Markl, I. D., & Fountain, J. W. (1998). Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer*, *22*(2), 157-163.
- Walsh, T., & King, M. C. (2007). Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell*, *11*(2), 103-105. doi:10.1016/j.ccr.2007.01.010
- Walsh, T., Mandell, J. B., Norquist, B. M., Casadei, S., Gulsuner, S., Lee, M. K., & King, M. C. (2017). Genetic Predisposition to Breast Cancer Due to Mutations Other Than BRCA1 and BRCA2 Founder Alleles Among Ashkenazi Jewish Women. *JAMA Oncol*, *3*(12), 1647-1653. doi:10.1001/jamaoncol.2017.1996
- Weber-Lassalle, N., Hauke, J., Ramser, J., Richters, L., Gross, E., Blumcke, B., . . . Hahnen, E. (2018). BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Res*, *20*(1), 7. doi:10.1186/s13058-018-0935-9
- Weischer, M., Heerfordt, I. M., Bojesen, S. E., Eigentler, T., Garbe, C., Rocken, M., . . . Nordestgaard, B. G. (2012). CHEK2\*1100delC and risk of malignant melanoma: Danish and German studies and meta-analysis. *J Invest Dermatol*, *132*(2), 299-303. doi:10.1038/jid.2011.303
- Weitzel, J. N., Lagos, V. I., Herzog, J. S., Judkins, T., Hendrickson, B., Ho, J. S., . . . Scholl, T. (2007). Evidence for common ancestral origin of a recurring BRCA1 genomic rearrangement identified in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *16*(8), 1615-1620. doi:10.1158/1055-9965.epi-07-0198
- Win, A. K., Lindor, N. M., & Jenkins, M. A. (2013). Risk of breast cancer in Lynch syndrome: a systematic review. *Breast Cancer Res*, *15*(2), R27. doi:10.1186/bcr3405
- Yang, Y., Zhang, F., Wang, Y., & Liu, S. C. (2012). CHEK2 1100delC variant and breast cancer risk in Caucasians: a meta-analysis based on 25 studies with 29,154 cases and 37,064 controls. *Asian Pac J Cancer Prev*, *13*(7), 3501-3505.

