



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma  
de Barcelona

Tesis Doctoral

# COMPRESIÓN DE LAS BASES GENÉTICAS DEL CÁNCER HEREDITARIO

Agostina Stradella Trucco





**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

Departamento de Medicina  
Programa de Doctorado en Medicina

**COMPRENSIÓ DE LAS BASES GENÉTICAS DEL  
CANCER HEREDITARIO**

Tesis doctoral para optar al Grado de Doctor de:

**Agostina Stradella Trucco**

Directores: Dra. Conxi Lázaro – Dr. Joan Brunet

Tutora: Dra. M. Isabel Bielsa

Barcelona, 2022



## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo es la culminación de una bonita etapa de mi carrera profesional y al mismo tiempo refleja del trabajo continuo desde el momento que inicié mis estudios de medicina. No hubiese sido posible sin el soporte y ayuda de muchas personas que me han brindado su apoyo durante todos estos años.

Quisiera empezar agradeciendo a mis directores de tesis: Conxi Lázaro y Joan Brunet, quienes además de ser los impulsores de este proyecto han sido el verdadero motor para que llegue a buen puerto, me han ayudado a solventar los inconvenientes que han ido apareciendo y siempre con la mejor predisposición. Siempre les estaré agradecida por esta gran oportunidad que me han dado.

A la Dra. Isabel Bielsa Marsol, que amablemente aceptó ser la tutora de esta tesis.

Al equipo de la Unidad de Consejo Genético, tanto el equipo asistencial como a toda la gente del laboratorio de Diagnóstico Molecular, que siempre me han hecho sentir parte de este maravilloso equipo. Quiero agradecer en particular a Jesús, por su ayuda continua y su generosidad.

Gracias a mis compañeros del Servicio de Oncología Médica que siempre me han brindado su ayuda para que pueda cumplir con este objetivo.

A mis padres, quienes me dieron la posibilidad de estudiar esta carrera tan hermosa y que siempre me han apoyado en mis proyectos.

Gracias Geo, Luisi, por ese apoyo incondicional. A pesar de la distancia siempre están a mi lado.

Y en forma especial a MI familia: Joan y Bruc. Joan, gracias por el soporte constante a lo largo de estos años, por tu ayuda y comprensión siempre. Bruc, espero que algún día estés orgulloso de tu mamá.

**ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS**

<b>ACMG</b>	Del ingl3s <i>American College of Medical Genetics</i>
<b>AF</b>	Anemia de Fanconi
<b>ASCO</b>	Del ingl3s <i>American Society of Clinical Oncology</i>
<b>BHD</b>	S3ndrome Birt-Hogg-Dub3
<b>BRCA 1</b>	Del ingl3s <i>BReast CAncer 1gene</i>
<b>BRCA 2</b>	del ingl3s <i>BReast CAncer 2 gene</i>
<b>CCHNP</b>	C3ncer de Colon Hereditario no asociado a poliposis
<b>CCR</b>	C3ncer colorectal
<b>CGE</b>	Del ingl3s <i>Clonal Genome Evolution</i>
<b>CH</b>	C3ncer Hereditario
<b>CM</b>	C3ncer de mama
<b>CMH</b>	C3ncer de mama hereditario
<b>CMO</b>	C3ncer de mama ovario
<b>CMOH</b>	S3ndrome de C3ncer de Mama – Ovario Hereditario
<b>CMTN</b>	C3ncer de mama Triple Negativo
<b>CNVs</b>	Del ingl3s <i>copy number variations</i>
<b>CO</b>	C3ncer de ovario
<b>COCC</b>	C3ncer de ovario de c3lulas claras
<b>DNA</b>	Del ingl3s <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>F</b>	Frecuencia
<b>FIGO</b>	Del ingl3s <i>International Federation of Gynecology and Obstetric</i>
<b>GCAT</b>	Del ingl3s <i>Genomes For Life - Cohort Study of the Genomes of Catalonia</i>
<b>GWAS</b>	Estudios de asociaci3n de todo el genoma
<b>Her2</b>	Del ingl3s <i>Human Epidermal Growth factor Receptor 2</i>
<b>HR</b>	Del ingl3s <i>Hazard Ratio</i>
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>ICO</b>	Institut Catal3 d'Oncologia

<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>iPARP</b>	Inhibidores de PARP
<b>LF</b>	Li-Fraumeni
<b>LOH</b>	Pérdida de heterocigosidad, del inglés <i>Loss of Heterocigosity</i>
<b>LTR</b>	Del inglés <i>Life Time Risk</i>
<b>MAF</b>	Del inglés <i>Minor Allele Frequency</i>
<b>MEN1</b>	Síndrome de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1
<b>MINAS</b>	Del inglés <i>Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome</i>
<b>MLPA</b>	Amplificación Múltiple dependiente de la Ligación de Sondas
<b>MMR</b>	Del inglés <i>Mismatch repair genes</i>
<b>NGS</b>	Del inglés <i>Next Generation Sequencing</i>
<b>ND</b>	No datos
<b>OR</b>	Del inglés <i>Odds Ratio</i>
<b>PAF</b>	Poliposis Adenomatosa Familiar
<b>PAFA</b>	Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada
<b>PARP</b>	Del inglés <i>Poli ADP Ribosa Polimerasa</i>
<b>PCR</b>	Del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PM</b>	Paneles multigenes
<b>PP/P</b>	Probablemente patogénica/Patogénica
<b>RE</b>	Receptor de estrógenos
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>RR</b>	Riesgo Relativo
<b>RRs</b>	Riesgos relativos
<b>SEOM</b>	Sociedad Española de Oncología Médica
<b>SNPs</b>	Del inglés <i>Single-Nucleotide Polymorphisms</i>
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SOBP</b>	Salpingo-Ooforectomía Bilateral Profiláctica
<b>TN</b>	Triple negativo
<b>VHL</b>	Von Hippel Lindau
<b>VP</b>	Variante Patogénica

**VPs** Variantes Patogénicas  
**VSD** Variantes de Significado Desconocido

**ÍNDICE**

<b>RESUMEN</b>	.....	10
<b>SUMMARY</b>	.....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>		
1.1 Carcinogénesis	.....	14
1.2 Bases Moleculares del Cáncer Hereditario	.....	16
1.2.1 Genes de alta penetrancia	.....	18
1.2.2 Genes de moderada penetrancia	.....	18
1.2.3 Variantes genéticas de baja penetrancia	.....	19
1.2.4 Modelo Poligénico de susceptibilidad al cáncer	.....	19
1.3 Síndromes de predisposición hereditaria al cáncer	.....	20
1.3.1 Síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario	.....	22
1.3.2 Síndrome de cáncer de colon no polipósico hereditario	.....	26
1.4 Estudio genético mediante paneles multigenes	.....	28
1.5 Rendimiento clínico de los paneles multigenes tras un estudio inicial negativo: BRCA1 /2 como ejemplo.	.....	29
1.6 Hallazgo de nuevas asociaciones genotipo-fenotipo. <i>ERCC3</i> como posible nuevo gen relacionado al cáncer de ovario	.....	30
1.7 Identificación de portadores de más de una variante patogénica. Síndrome “MINAS”	.....	31
<b>2. HIPÓTESIS</b>	.....	33
<b>3. OBJETIVOS</b>	.....	35
<b>4. METODOLOGÍA</b>		
4.1 Diseño del estudio	.....	38
4.2 Selección de pacientes	.....	38
4.2.1 Cohorte de individuos con estudio inicial mediante panel de genes	.....	41
4.2.2 Cohorte de pacientes con estudio inicial de <i>BRCA 1/2</i> negativo, ampliación del estudio mediante panel de NGS	.....	41
4.2.3 Cohorte de pacientes para la valoración de nuevas asociaciones genotipo-fenotipo	.....	42

4.2.4	Cohorte de pacientes portadores de más de una variante patogénica. Síndrome “MINAS” .....	43
4.3	Estudio de Paneles multigenes .....	43
4.4	Secuenciación masiva de genes .....	45
4.5	Clasificación de las variantes .....	45
4.6	Análisis Estadístico .....	46
4.7	Consideraciones éticas .....	47
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
5.1	Utilidad clínica del panel multigenes como estudio genético inicial. (Objetivo 1) .....	49
5.1.1	Variantes patogénicas en pacientes con cáncer de mama y cáncer de Ovario .....	51
5.1.2	Variantes patogénicas en pacientes con cáncer de colon no asociado a poliposis .....	52
5.1.3	Variantes patogénicas en pacientes con Poliposis Adenomatosa y Síndrome de Li-Fraumeni .....	53
5.1.4	Variantes patogénicas en individuos sanos .....	53
5.1.5	Detección de variantes de significado desconocido .....	54
5.2	Rendimiento clínico y accionabilidad de la ampliación del estudio mediante panel de genes tras un estudio inicial de BRCA1/2. (Objetivo 2) .....	55
5.2.1	Rendimiento clínico del estudio mediante panel de genes .....	55
5.2.2	Accionabilidad de los resultados .....	59
5.3	Nuevas relaciones genotipo-fenotipo. Papel de ERCC3 en el Síndrome de cáncer de mama ovario hereditario. (Objetivo 3) .....	60
5.4	Pacientes portadores de dobles mutaciones. (Objetivo 4) .....	69
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	74
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	86
<b>8.</b>	<b>LINEAS DE FUTURO</b> .....	88
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	90
<b>10.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	108

10.1 Consens Catal3 en els criteris cl3nics i panels de gens per a l'estudi de les s3ndromes hereditaries de c3ncer. A3o 2019 .....	109
10.2 Art3culos publicados en el marco de esta tesis	
10.2.1 Art3culo 1 .....	117
10.2.2 Art3culo 2 .....	123

## **RESUMEN**

El cáncer hereditario representa un 5-10% de todas las neoplasias diagnosticadas. Inicialmente los estudios genéticos en pacientes con sospecha de cáncer hereditario se realizaban de forma secuencial, gen a gen, mediante secuenciación Sanger. La implementación de la técnica de secuenciación masiva ha hecho posible llevar a cabo estudios genéticos más amplios y rápidos, permitiendo la identificación de mayor número de variantes patogénicas, en muchos casos doblando el número de variantes identificadas.

Pero estos hallazgos conllevan en muchas ocasiones un aumento significativo de variantes de significado desconocido, lo que dificulta la interpretación y uso clínico de los resultados obtenidos. Ante esta situación se recomienda que los paneles destinados a la clínica incluyan únicamente aquellos genes con utilidad y accionabilidad clínicas claras para el manejo de los portadores mientras que el resto de los genes/variantes deberían estudiarse en un contexto de investigación.

En nuestra cohorte de pacientes estudiados mediante paneles basados en el fenotipo combinado con el cribado de genes oportunistas *BRCA1/2* y *MMR* identificamos un 13% de portadores de variantes patogénicas con un incremento del rendimiento del 2% al ampliarlo con el panel de investigación. Respecto a la identificación de variantes de significado desconocido fue del 30% en el estudio inicial y del 65% cuando se realizó el panel ampliado. Además, en esta serie se evidenció que un 1,37% de los pacientes son portadores en más de una variante patogénica en genes de susceptibilidad al cáncer. A día de hoy no existen suficientes evidencias para determinar la relevancia clínica de presentar más de una variante patogénica y se recomienda hacer un seguimiento personalizado para cada paciente según su historia personal y familiar.

En el análisis de la ampliación del estudio en pacientes con sospecha de cáncer de mama ovario hereditario con estudio previo de *BRCA 1/2* negativo identificamos que 10,56% de los individuos era portador de variantes patogénicas, un 40% en genes de alto riesgo y el 60% en genes de moderado riesgo.

El estudio mutacional del gen *ERCC3* en nuestra cohorte de pacientes de cáncer hereditario ha demostrado una asociación con el cáncer de ovario y sugiere una asociación con el cáncer de mama.

Con todos estos resultados consideramos que la realización de un panel de genes permite obtener resultados con utilidad clínica, permitiendo ajustar los riesgos

individuales y de esta manera ofrecer recomendaciones de seguimiento y de reducción del riesgo.

## **SUMMARY**

Hereditary cancer represents 5-10% of all neoplasms diagnosed. Initially, genetic studies in patients with suspected hereditary cancer were performed sequentially, gene by gene, by Sanger sequencing. The implementation of next generation sequencing has made it possible to carry out broader and faster genetic studies, allowing the identification of a greater number of pathogenic variants, in many cases doubling the number of variants identified.

However, these findings often lead to a significant increase in variants of unknown significance, which hinders the interpretation and clinical use of the results obtained. In view of this situation, it is recommended that only those genes with clear clinical utility and actionability for the management of carriers should be included in the panels intended for clinical use, while the remaining genes/variants should be studied in a research context.

In our cohort of patients studied using phenotype-based panels combined with *BRCA1/2* and MMR opportunistic gene screening we identified 13% of carriers of pathogenic variants with an increase in yield of 2% when expanded with the research panel. Regarding the identification of variants of unknown significance, it was 30% in the initial study and 65% when the expanded panel was performed. Furthermore, this series showed that 1.37% of patients are carriers of more than one pathogenic variant in cancer susceptibility genes. At present, there is insufficient evidence to determine the clinical relevance of having more than one pathogenic variant and it is recommended that each patient be followed up individually according to his or her personal and family history.

In the analysis of multigene panel study in patients with suspected hereditary ovarian breast cancer with previous *BRCA 1/2* negative study, we identified that 10.56% of individuals carry pathogenic variants, 40% in high-risk genes and 60% in moderate-risk genes.

The mutational study of the *ERCC3* gene in our cohort of hereditary cancer patients has demonstrated an association with ovarian cancer and suggests an association with breast cancer.

With all these results we consider that the performance of a multigene panel allows to obtain results with clinical utility, allowing to adjust individual risks and thus to offer follow-up and risk reduction recommendations.

## 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Carcinogénesis

El cáncer se ha descrito como un proceso dinámico y evolutivo impulsado por la selección natural actuando sobre mutaciones somáticas pre-existentes adquiridas de forma estocástica. La carcinogénesis es la transformación de células normales en tumorales. En este proceso están implicados múltiples factores: ambientales, genéticos y epigenéticos (1).

Hanahan y Weinberg postularon en el año 2000 las alteraciones biológicas esenciales adquiridas de las células cancerosas que posteriormente se han ido revisando hasta la última publicación en este año 2022 (2–4). Los conceptos iniciales eran: independencia de señales inductoras de proliferación, resistencia a señales inhibitoras de la proliferación, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, capacidad angiogénica y capacidad invasiva-metastásica (Figura 1).

En el año 2011 se introdujeron los conceptos de deregulación del metabolismo celular, evasión de la destrucción inmune, inestabilidad genética y pro-inflamación tumoral (Figura 2A).

A las características postuladas previamente, en la reciente edición se les añaden los conceptos de desbloqueo de la plasticidad fenotípica (lo que provocaría evadir las señales de diferenciación definitiva de la célula llevando a la transdiferenciación celular), reprogramación epigenética no mutacional, polimorfismos de la microbiota y senescencia celular (Figura 2B).

Estas características distintivas resumirían los atributos centrales responsables del desarrollo y la progresión de la mayoría de los cánceres, aunque se debe tener presente que este proceso es más complejo debido a la interacción de las células tumorales con el microambiente tumoral (2–4).

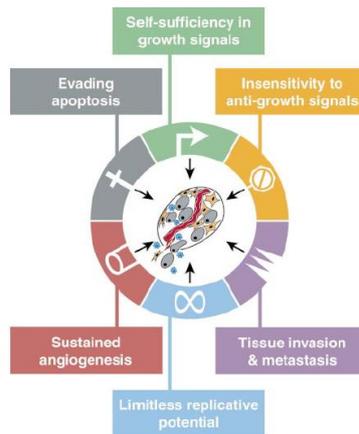


Figura 1 Hallmarks in cancer. Adaptada de Hanahan and Weinberg, Cell 2000

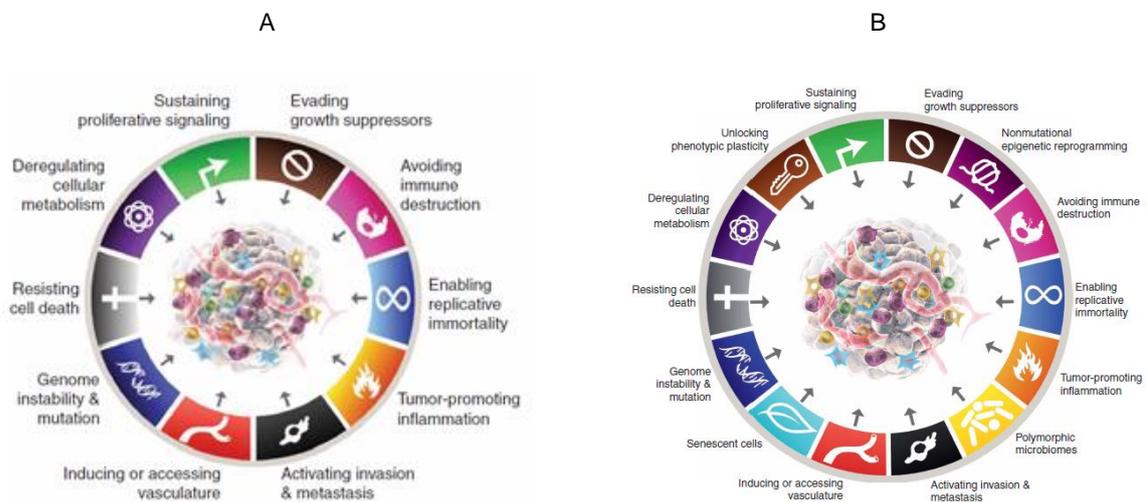


Figura 2 Hallmarks in cancer. Adaptada de Hanahan and Weinberg, Cancer Discovery 2022 (A) Hallmarks in cancer 2011, (B) Hallmarks in cancer 2022.

El modelo darwiniano de carcinogénesis (modelo CGE, del inglés *Clonal Genome Evolution*) postuló que las alteraciones genéticas identificadas en los tumores pueden clasificarse en mutaciones *drivers* y mutaciones *passenger*, en función de su papel evolutivo (5). Las mutaciones *drivers* proporcionan una ventaja adaptativa fundamental aumentando su supervivencia o la proliferación, siendo las responsables de la expansión clonal. Las mutaciones *passenger* no tiene ningún efecto sobre la aptitud de un clon, pero puede estar asociada con una expansión clonal facilitándola (como puede ser el tipo de inestabilidad genética en el tumor, o la capacidad del tumor para evolucionar en el futuro adaptándose a nuevos cambios ambientales y desarrollar poblaciones resistentes a

determinados fármacos anticancerígenos) (6). Muy pocos genes se comportan como genes *drivers*, probablemente menos de 200 (7).

Como se comenta previamente, las mutaciones *drivers* permitirían a la célula adquirir habilidades de proliferación y supervivencia celular así como también la dotarían de la capacidad metastásica (3). De acuerdo con el modelo CGE la adquisición de estas características se alcanzaría mediante un proceso secuencial de expansiones clonales, cada una de ellas motivada por la adquisición de una mutación en un gen *driver*. Actualmente está establecido que una de las características más tempranas en un tumor es la adquisición de inestabilidad genética (3).

Desde el punto de vista genético, el modelo CGE permite clasificar cualquier gen involucrado en cáncer como **oncogén** si el proceso selecciona mutaciones que implican ganancia de función o en **gen supresor** si el proceso implica una reducción o pérdida de función.

Un tercer grupo de genes consistiría en los denominados **caretakers** que son aquellos implicados en mantener la integridad genómica (8).

## **1.2 Bases moleculares del cáncer hereditario**

El cáncer se considera una enfermedad genética, habitualmente esporádica y raramente hereditaria (9). El cáncer hereditario (CH) se relaciona sólo con un 5-10% de todos los cánceres diagnosticados en la población (10–13).

En el CH la existencia de una variante patogénica (VP) en un gen en la línea germinal, bien heredada de un progenitor u ocurrida de novo en un individuo durante su desarrollo embrionario, provoca en esa persona un incremento del riesgo de desarrollar una neoplasia respecto al riesgo que tiene la población general. Habitualmente se trata de variantes en genes supresores de tumores implicados en el ciclo celular o cuya función se relacione con la reparación del DNA (del inglés *deoxyribonucleic acid*) (14,15).

El modelo darwiniano de carcinogénesis describe el proceso eminentemente estocástico pero el cáncer es una enfermedad que tiende a ocurrir en individuos genéticamente predispuestos. Numerosos estudios epidemiológicos han evidenciado que los familiares en primer grado de afectos de cáncer tienen un riesgo de desarrollar la enfermedad 2 o 3 veces superior a la población general, lo que parece implicar un componente de susceptibilidad genética al cáncer.

El trabajo publicado por Lichtenstein y colaboradores en 2000 demostró la implicación relativa de los factores ambientales y genéticos como causantes del cáncer (16). Con el análisis de gemelos monocigotos y dicigotos pudieron estimar la heredabilidad de numerosos tumores. El concepto de **heredabilidad** se define como la proporción de la variabilidad fenotípica observada en una población que puede atribuirse a una variabilidad genética en dicha población. Heredabilidad 0 equivale a la ausencia de componente genético y heredabilidad 1 equivale a un fenotipo completamente determinado genéticamente.

En el contexto del CH se utiliza el concepto de **Arquitectura Genética** que se refiere al número total de loci asociados a riesgo de desarrollar la enfermedad, la frecuencia poblacional de los alelos de riesgo existentes en cada loci, la magnitud de la asociación al riesgo para cada uno de los alelos individuales, y la existencia o no de interacciones genéticas entre loci. Cuanto mayor sea la magnitud de la asociación con el riesgo atribuida a un locus individual y cuanto mayor sea la frecuencia poblacional de los alelos de riesgo presentes en dicho locus, mayor será la contribución individual de dicho locus a la heredabilidad (Figura 3).

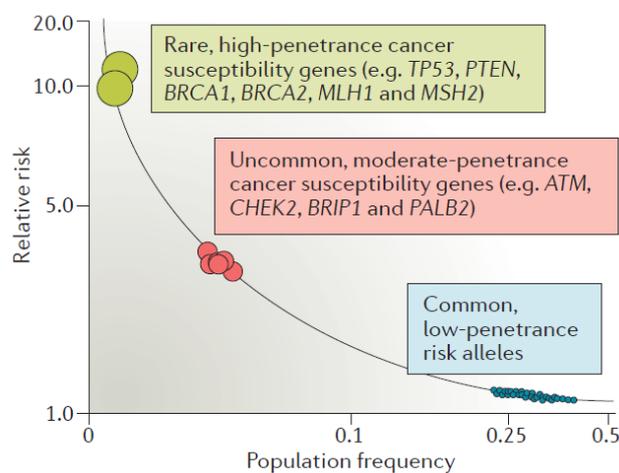


Figura 3. Arquitectura genética (adaptado de Sud et al Nature Reviews 2017). Distribución de la frecuencia alélica de variantes genéticas (eje X) y su asociación con riesgo de cáncer (eje Y)

Dependiendo del riesgo relativo asociado y de la frecuencia poblacional podemos identificar 3 situaciones: a) *loci* donde se localizan variantes genéticas muy raras en la población pero asociadas a riesgo muy elevado (a la izquierda en la Figura 3 y conocidos como genes de alta penetrancia), b) *loci* donde se localizan variantes genéticas comunes en la población asociadas a incrementos muy modestos en el riesgo de desarrollar

cáncer (a la derecha en la Figura 3 y conocidos como genes de baja penetrancia) y c) *loci* donde se localizan variantes genéticas relativamente raras de riesgo intermedio (genes de moderada penetrancia) (17).

La correlación es inversamente proporcional entre el riesgo relativo (RR) y frecuencia (f) (a mayor riesgo menor frecuencia). Esta correlación habitualmente es generalizable a todas las neoplasias.

### **1.2.1 Genes de alta penetrancia**

La penetrancia es la proporción de una población que expresa el fenotipo entre todos los que presentan un genotipo de un alelo determinado.

Se considera que un gen es de alta penetrancia cuando el portador de una variante patogénica puede tener un riesgo de desarrollar un tumor al menos 4 veces mayor que la población general. Habitualmente son infrecuentes, con una MAF (del inglés, *minor allele frequency*) en diferentes poblaciones entre <0,1-0,01% o muy raros (MAF <0,01%) (18,19). En general, en los genes de susceptibilidad al cáncer la penetrancia no es del 100%, lo que puede explicar en parte la heterogeneidad clínica observada (20).

Las alteraciones en estos genes son los responsables de los síndromes de susceptibilidad al cáncer más conocidos, como es el Síndrome de cáncer de mama – ovario hereditario (CMOH) (principales genes responsables son *BRCA1/2*), Síndrome de cáncer de colon hereditario no polipósico /Síndrome de Lynch (principales genes son los implicados en la reparación de DNA; *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*), Síndrome Li-Fraumeni (gen *TP53*) y Poliposis Adenomatosa Familiar (principal genes asociados *APC* y *MUTYH*).

### **1.2.2 Genes de moderada penetrancia**

También llamados genes de riesgo intermedio, son aquellos en los que una variante patogénica confiere a su portador un riesgo entre 2 y 4 veces más alto de desarrollar un tumor respecto a la población general (19,21). Su frecuencia es relativamente baja (MAF de 0,0001-0,05).

Este grupo suele englobar un grupo de genes de susceptibilidad al cáncer muy heterogéneo respecto a su frecuencia y también respecto a su riesgo relativo (RR). En

general suelen presentar riesgos demasiado bajos para poder ser identificados por análisis de ligamiento genético y frecuencias demasiado bajas para poder ser detectados por estudios de asociación. La determinación del riesgo relativo en muchos de ellos se ha realizado mediante el estudio de “genes candidatos” como es el caso de *PALB2* (22) que tras múltiples estudios ya se considera como gen de alta penetrancia.

Tras la implementación de la secuenciación masiva (NGS del inglés *Next Generation Sequencing*) la identificación de variantes patogénicas en estos genes se ha incrementado exponencialmente. Lamentablemente, con la evidencia actual, las estimaciones de riesgo relativo en muchos casos son imprecisas por lo que su utilidad clínica se desconoce (21). Es por esta situación que no existe una unanimidad en las guías de consenso para el manejo de estos pacientes y en la mayoría de ellas se aconseja la individualización de los casos e implementación las recomendaciones tras la oportuna discusión con los pacientes (21,23).

### **1.2.3 Variantes de baja penetrancia**

Habitualmente estas variantes corresponden a marcadores genéticos de riesgo (generalmente polimorfismos de nucleótido simple, en inglés SNPs) que pueden estar localizados en genes concretos o en regiones intergénicas. Su frecuencia es alta (MAF  $\geq 0,05$ ) y suelen denominarse variantes de bajo riesgo.

Se postula que podrían modular el riesgo de desarrollar una neoplasia mediante la interacción con otras variantes de bajo riesgo, con otros genes o con factores ambientales (24–26).

Los estudios de asociación de todo el genoma (conocidos como GWAS, por sus siglas en inglés) han permitido descubrir múltiples SNPs comunes de bajo riesgo asociados a diversas patologías, entre ellas algunos síndromes de susceptibilidad al cáncer como en CMOH relacionado a los genes de alta penetrancia *BRCA* donde actuarían como modificadores de riesgo (27,28).

### **1.2.4 Modelo Poligénico de susceptibilidad al cáncer**

El **Modelo Poligénico** de susceptibilidad al cáncer determina que para valorar con precisión el nivel de susceptibilidad genética al cáncer de un individuo se deberían

analizar no sólo los genes de alta penetrancia sino todos los *loci* implicados conocidos. Para que esto sea posible no sólo es necesario identificar todos los *loci* sino también todas las interacciones entre ellos.

En el caso del cáncer de mama se han publicado más de 90 polimorfismos de un solo nucleótido ("*single-nucleotide polymorphisms*" o SNP) que se cree que explican entre el 15 y 20% del riesgo de cáncer de mama hereditario. El riesgo asociado a un solo SNP es bajo con una odds ratio de 0,8-1,3, pero la combinación de múltiples SNP puede tener un impacto relevante clínicamente.

El modelo más sencillo considera que todos los *loci* se comportan de manera independiente y por lo tanto los riesgos relativos conferidos por cada uno simplemente se multiplican para determinar el RR del individuo. Este modelo está desarrollado para pacientes con historia familia y sin historia familiar(29).

En la actualidad, desde el punto de vista asistencial, además de considerarse si un gen de es alta o moderada penetrancia, se prefiere diferenciar entre susceptibilidad genética asociada a niveles de riesgo accionables o no accionables(19). Esta situación puede ser diferente en cada país, dependiendo de la incidencia de una neoplasia en la población general, de las opciones de manejo clínico disponibles y de las guías de consenso disponibles. (23,30–32).

### **1.3 Síndromes de predisposición hereditaria al cáncer**

El Cáncer Hereditario se asocia a un 5-10% de todos los casos de cáncer diagnosticados en la población (10–13).

Las características clínicas que pueden presentar los casos de cáncer hereditario incluyen edad temprana de presentación, presencia de múltiples tumores en un mismo órgano o en diferentes órganos, enfermedad bilateral, enfermedad multifocal y aparición de un tumor en el género no habitual (como el cáncer de mama en el varón).

Además, ciertas características clínicas de la familia nos permiten sospechar de un CH como son: 2 o más familiares de primer grado y de la misma rama con tumores en el mismo sitio, asociación de tumores que pertenecen a un síndrome de susceptibilidad al cáncer conocido, diagnóstico de tumores raros y evidencia de transmisión genética (33).

La mayoría de los síndromes de susceptibilidad al cáncer se relacionan a variantes patogénicas en genes considerados de alta penetrancia y que se heredan siguiendo un modelo mendeliano, habitualmente autosómico dominante. Se han postulado unos 200 genes que podrían estar en relación con el CH pero finalmente han sido pocos los que han demostrado relevancia clínica clara (Tabla 1) (10).

**Tabla 1.** Principales síndromes de predisposición hereditaria al cáncer y principales genes asociados

Síndrome	Gen	Incidencia
Cáncer de mama – ovario hereditario (CMOH)	<i>BRCA1/BRCA2/PALB2/ATM/CHEK2</i>	1/500-2500
Síndrome Lynch	<i>MSH2, MLH1, MSH6, PMS2</i>	1/200-1000
Neoplasia Endócrina Múltiple tipo 2 (MEN 1)	<i>MEN1</i>	2-10/100000
Neoplasia Endócrina Múltiple tipo 2 (MEN 2)	<i>RET</i>	1/25000
Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF)	<i>APC</i>	1/6000-13000
Síndrome de PTEN-Hamartomas	<i>PTEN</i>	1/200000
Síndrome de Von Hippel-Lindau	<i>VHL</i>	1/360000-45000
Retinoblastoma hereditario	<i>RB1</i>	1/13500-25000
Síndrome de Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	1/120000

Tabla adaptada de la 3ª ed. del libro de Cáncer Hereditario – SEOM 2019

El modelo de “two hit” descrito por Knudson (34) para explicar la susceptibilidad hereditaria al cáncer para el patrón de herencia autosómica dominante del retinoblastoma hereditario ha sentado las bases de una de las teorías más aceptadas mundialmente (Figura 4).

En este modelo, la mutación germinal está en uno de los alelos de un gen supresor que se hereda de forma dominante pero que actúa a nivel celular de forma recesiva, siendo necesaria la inactivación de las dos copias del gen para iniciar la progresión tumoral. Este hecho aumenta la probabilidad de que alguna célula somática llegue a tener los dos alelos de dicho gen mutados y, como consecuencia, la probabilidad de desarrollar el

tumor aumente de forma muy significativa. Además, al existir ya una mutación en un alelo el tiempo hasta el desarrollo de un tumor se acortaría, lo que podría explicar la aparición del cáncer a edades más tempranas.

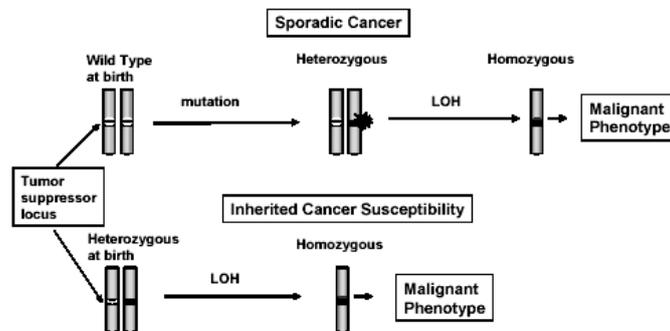


Figura 4. Adaptada de Susanna Ekholm-Reed, 2004

A continuación se describen los síndromes de CH más frecuentes:

### 1.3.1 Síndrome de cáncer de mama – ovario hereditario

El Síndrome de cáncer de mama (CM) y ovario hereditario (CO) se caracteriza por una susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama y/o cáncer de ovario con mayor frecuencia que la población general. Representa un 5% de los nuevos diagnósticos de cáncer de mama y un 10-15% de los cánceres de ovario (35).

Alteraciones genéticas en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son responsables de una cuarta parte de estos casos. Tras su descubrimiento en los años 90, numerosos estudios han aportado evidencias crecientes de la asociación de múltiples genes a dicha predisposición. Actualmente, se han asociado al CM o CO hereditario más de 25 genes. Desde un punto de vista molecular, la mayoría de ellos participan en el mantenimiento del genoma junto a *BRCA1/2* (36) (Figura 5) (Tabla 2).

Algunos de estos genes asociados también presentan un patrón de alta penetrancia, como *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1* o *PALB2*, o de penetrancia moderada, como *BRIP1*, *ATM*, *CHEK2*, *RAD51C* y *RAD51D*, entre otros, aunque para algunos de ellos, aún no se conoce con certeza el grado de riesgo asociado a cada fenotipo (19,36,37).

Existen menos evidencias o resultados discrepantes para otros genes postulados como candidatos, como algunos de los genes la vía de la Anemia de Fanconi (AF), de la familia *RAD51* o genes que interactúan con *BRCA1* o *BRCA2*. También se han postulados otros genes involucrados en la reparación del DNA, como *BARD1*.

Una tercera categoría de alelos, identificada mediante estudios pangenómicos de asociación (GWAS) comprende un gran número de variantes frecuentes en la población y asociadas a un bajo riesgo relativo, pero que conjuntamente pueden generar un aumento de riesgo o modificar el riesgo de un gen al interactuar con el mismo y con otros factores como los ambientales (28,38,39).

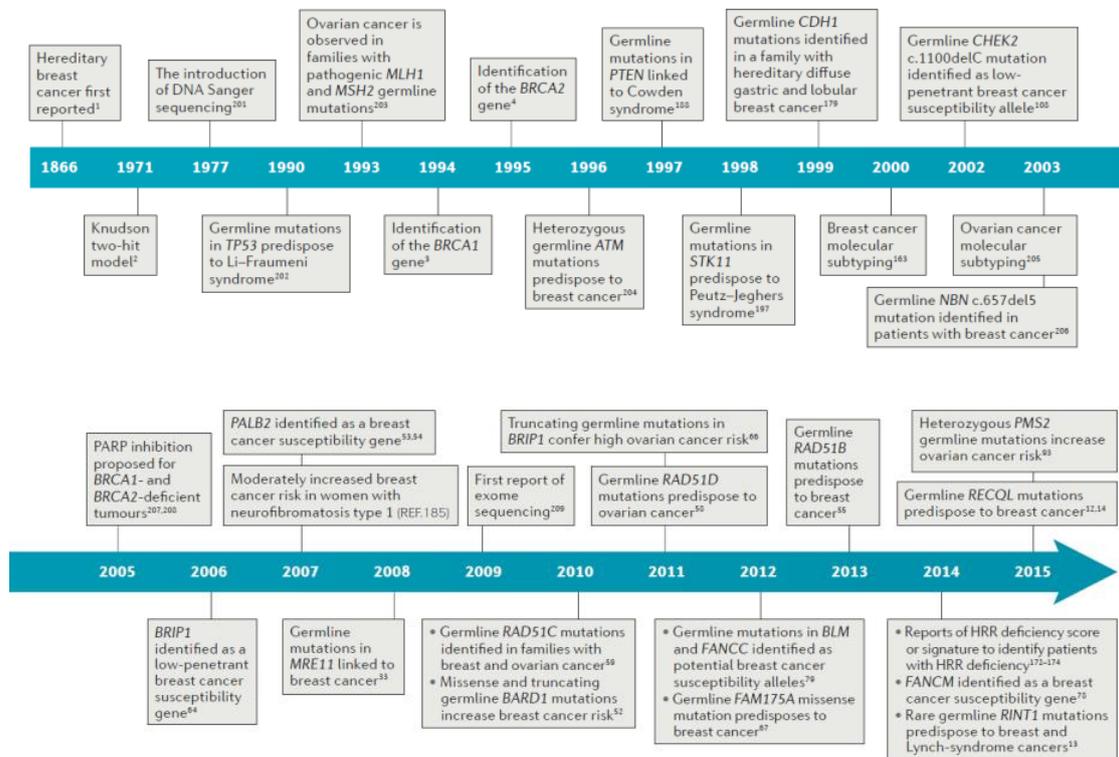


Figura 5 Cronología de los acontecimientos importantes en el descubrimiento del Síndrome de CMOH y la identificación de los genes asociados (adaptada de Nielsen et al. NATURE REVIEWS 2016).

La penetrancia de los genes *BRCA1* y *2* se han analizado en múltiples estudios con resultados muchas veces dispares en relación con el tipo de población analizada. Según las estimaciones de penetrancia valoradas en un meta-análisis en pacientes con CM o CO no seleccionadas a nivel internacional, el riesgo de CM a los 70 años es del 65% (IC

95% 44-78) para las portadoras *BRCA1* y del 45% (IC 95% 31-56) para *BRCA2*, y de CO del 39% (IC 95% 18-54) para el *BRCA1* y 11% (IC 95% 2-19) para el *BRCA2*.

Las estimaciones de riesgo para CM y CO están mejor establecidas para los demás genes de alta penetrancia, pero siguen existiendo disparidades en las diferentes series sobre el riesgo relativo asociado a los genes de moderada penetrancia. (40–43). (Tabla 2).

**Tabla 2:** Genes de riesgo para cáncer de mama y ovario

Gen	Síndrome	Riesgo cáncer de mama a los 70 años (%)	Riesgo cáncer de ovario a los 70 años (%)	Otros tumores relacionados
<b>GENES DE ALTA PENETRANCIA</b>				
<i>BRCA1</i>	CMOH	65	45	Próstata, Páncreas
<i>BRCA2</i>	CMOH	39	11	Próstata, Páncreas, Melanoma
<i>TP53</i>	Li-Fraumeni	54-90	ND	Sarcomas, Sistema nervioso central, Glándulas adrenocorticales, Colon, Pulmón, etc.
<i>PTEN</i>	Cowden	70	1%	Tiroides, Endometrio, CCR, Renal, Melanoma
<i>CDH1</i>	Cáncer Gástrico Difuso Hereditario	> 40 (lobulillar)	ND	Cáncer gástrico difuso
<i>STK11</i>	Peutz-Jeghers	57	ND	Gástrico, CCR, Páncreas, Testicular, CECC.
<i>PALB2</i>	Cáncer de mama	35	ND	Páncreas
<i>RAD51C/RAD51D</i>	Cáncer de ovario	ND	5-12	
<b>GENES DE MODERADA PENETRANCIA</b>				
<i>ATM</i>	Cáncer de mama	20	ND	
<i>CHEK2</i>	Cáncer de mama y otros	30-40	ND	
<i>BRIP1</i>	Cáncer de ovario	ND	5	

CCR: cáncer colorectal; CECC: carcinoma escamoso de cabeza y cuello; ND: no datos (tabla adaptada de 3º libro Cáncer Hereditario SEOM)

En el Síndrome de Li-Fraumeni el riesgo a los 70 años de CM es del 54% que llega a ser del 90% en algunas series publicadas. Suele presentarse a edad temprana (<30 años) y puede ocurrir sin historia familiar de cáncer de mama (44,45).

A pesar que las mutaciones en *PTEN* (Síndrome de Cowden) son responsables de <1% de CM hereditarios, las portadoras de mutación en dicho gen tiene un riesgo de 68-75% de desarrollar un CM, habitualmente a edad joven (46).

Mutaciones germinales en *CDH1* se asocian con el Síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario; pero además de poder desarrollar cáncer gástrico las mujeres portadoras tienen un riesgo de sufrir un carcinoma lobulillar de mama antes de los 50 años de hasta del 52% (47).

El Síndrome de Peutz-Jeghers se caracteriza por la presencia de poliposis gastrointestinal, pigmentación mucocutánea y elevado riesgo de cáncer a edad joven, tanto intestinal como extra-intestinal. El riesgo de cáncer de mama es de alrededor de 57% a los 70 años (48).

Las portadoras de VP en *PALB2* presentan un fenotipo semejante a las portadoras de *BRCA1/2*, tienen mayor riesgo de cáncer de mama como así también estaría incrementado el riesgo de cáncer de páncreas, pero no se ha descrito relación con el cáncer de ovario. El riesgo de CM se estima cercano al 35% a los 70 años, si bien hay series que han descrito un riesgo mayor en familias con varios antecedentes de CM (22).

La familia de genes de *RAD51* incluye los genes *RAD51C* y *RAD51D* y están involucrados en la reparación del DNA mediante su interacción con *BRCA1* y *BRCA2*. Está descrito que *RAD51C* conferiría un riesgo de cáncer de ovario del 6,7% a los 80 años y *RAD51D* del 12% (este último con diagnóstico a edad más temprana que la población general) (49–51).

Respecto a los genes de moderada penetrancia, el riesgo relativo para cáncer de mama y ovario está menos establecido; para VP en *ATM* se estima cercano al 20% (52) y para *CHEK2* del 23-48% a los 80 años (53).

Dos estudios recientes con grandes cohortes de pacientes (de 113927 y 64791 individuos respectivamente) (42,43) postulan que los genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* y *PALB2* actuarían como genes de alto riesgo para CM; mientras que *BARD1*, *RAD51C*, *RAD51D*, y *TP53* actuarían como genes de moderada penetrancia. Se debe considerar que algunos de estos genes se asociarían sólo con algún subtipo específico de cáncer de mama, como la asociación de variantes en *CHEK2* y *ATM* con el CM receptor de estrógeno (RE) positivo, *BARD1*, *RAD51C* y *RAD51D* a CM RE negativo. También exponen el caso de los genes *FANCM* y *FANCC* que se asociaría a CM RE negativo pero sin asociación estadísticamente significativa con el cáncer de mama en general.

Cabe destacar que en relación con el Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario se ha descrito susceptibilidad a otros cánceres como neoplasias digestivas (cáncer gástrico, cáncer de páncreas), melanoma cutáneo y cáncer de próstata.

Por lo tanto, la identificación de VP a nivel germinal de estos genes es clave para poder ajustar la estrategia preventiva en cada individuo, optimizando las medidas de seguimiento y la oferta de cirugías reductoras de riesgo, como así tiene una alta utilidad para implementar medidas en sus familiares (54). Hoy en día también permite ampliar las opciones terapéuticas como es el caso de la indicación de los inhibidores de *PARP* en pacientes portadoras de mutación germinal en *BRCA 1* y *BRCA2* con cáncer de mama y ovario (55–57). Otra consideración a tener en cuenta es la posibilidad que pueden tener los pacientes portadores de realizar Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP).

En la actualidad existen múltiples guías de diagnóstico y manejo de los pacientes con Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario que intentan homogeneizar el manejo de los pacientes en las Unidades de Asesoramiento Genético (23,30–32).

### **1.3.2 Síndrome de Cáncer de Colon Hereditario no polipósico – Síndrome de Lynch**

La mayoría de los casos de cáncer colorectal (CCR) son esporádicos, pero un 2-4% de desarrolla en el contexto del Síndrome de Lynch (SL) (58,59). Este síndrome está causado por variantes patogénicas en los genes reparadores del DNA (*mismatch repair genes* MMR) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Un 1% de los casos se debe a deleciones en la línea germinal de *EPCAM* que inactivan el gen *MSH2*. Otros genes implicados en la reparación del DNA como *MSH3*, *MLH3*, *EXO1*, *PMS1* y *TGFBR2* se han postulados como genes relacionados al SL pero su asociación está poco estudiada (60,61).

Se ha descrito una asociación de mayor riesgo de CCR y otras neoplasias como cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer gástrico, intestino delgado, tracto hepatobiliar, tracto urinario superior, tumores del sistema nervioso central y piel.

El International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer estableció en 1990 los primeros criterios clínicos para definir el Síndrome de Lynch: los criterios Ámsterdam. Posteriormente se modificaron para incluir otras neoplasias relacionadas (Ámsterdam II) (Figura 6), sin embargo estos criterios son poco sensibles

para detectar la mayoría de los casos con alteraciones en la línea germinal en los genes MMR (62,63).

Las guías de Bethesda se desarrollaron para seleccionar a los individuos candidatos a un cribado molecular para el SL, aunque su sensibilidad es limitada (59,64,65) (Figura 6).

Dada la baja sensibilidad de los criterios clínicos propuestos anteriormente se postularon los criterios de Jerusalén que plantearon realizar el cribado de inmunohistoquímica (IHQ) a todos los casos de cáncer de colon en menores de 70 años(66).

<p><b>Criterios de Ámsterdam II*</b> (Vasen, 1999):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tres o más individuos afectados de CCR o neoplasia relacionada (endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal), uno de ellos familiar de primer grado de los otros dos.</li> <li>• Afectación de 2 generaciones consecutivas.</li> <li>• Un caso al menos diagnosticado antes de los 50 años.</li> </ul> <p>* Se deben cumplir los 3.</p> <p><b>Criterios de Bethesda revisados**</b> (Umar, 2004):</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. CCR diagnosticado antes de los 50 años.</li> <li>2. CCR sincrónico o metacrónico, u otra neoplasia relacionada (endometrio, estómago, ovario, páncreas, urinario, cerebro, intestino delgado), con independencia de la edad.</li> <li>3. CCR con infiltración linfocitaria, células en anillo de sello o crecimiento medular diagnosticado antes de los 60 años.</li> <li>4. Paciente con CCR y uno o más familiares de 1º grado con CCR o neoplasia relacionada (endometrio, estómago, ovario, páncreas, urinario, cerebro, intestino delgado) diagnosticada antes de los 50 años</li> <li>5. Paciente con CCR y dos o más familiares de 1º o 2º grado con CCR o neoplasia relacionada (endometrio, estómago, ovario, páncreas, urinario, cerebro, intestino delgado), con independencia de la edad.</li> </ol> <p>** Se debe cumplir al menos 1</p>
---

Figura 6. Criterios de cribado para Síndrome de Lynch (adaptado de A. Alonso, Anales Sis San Navarra 2015)

En la actualidad se recomienda el estudio mediante inmunohistoquímica de las proteínas de MMR en todos los casos de cáncer de colon y cáncer de endometrio sin límites de edad (31,67,68).

El estudio se inicia con el análisis tumoral mediante IHQ de la expresión de las proteínas de MMR y de la inestabilidad de microsatélites dado que más del 90% de los casos de SL tienen pérdida de expresión de algunas de las proteínas o inestabilidad de microsatélites (69). La IHQ permite identificar el gen MMR que más probablemente presente una mutación germinal.

Las neoplasias con mayor riesgo son el cáncer de colon y el cáncer de endometrio, con un riesgo de 52-82% y del 25-60% respectivamente (59). La incidencia de neoplasias puede variar según el gen que presente la VP. Por ejemplo, los individuos con VP en *MSH6* y *PMS2* tienen un riesgo de un 15-44% de CCR y aquellos portadores de VP en

*MSH2* y *MLH1* el riesgo es entre 40-80% (70,71). El 50% de las mujeres que desarrollan cáncer de colon y cáncer de endometrio debutan con este último (72).

En la práctica clínica habitual, las recomendaciones para estos pacientes se realizan siguiendo las guías de consenso internacionales (31,32).

#### **1.4 Estudio genético mediante paneles multigenes**

Los estudios genéticos en la década de los 90 y primeros años del siglo XXI se realizaban de forma secuencial, gen a gen, mediante secuenciación Sanger. En aquellos casos con resultados no informativos en el estudio inicial se planteaba la posibilidad de realizar estudio de un nuevo gen o bien ajustar el riesgo del paciente según su historia personal de cáncer junto a la historia familiar, situación que puede plantearse como obsoleta en la actualidad.

La implementación de la técnica de secuenciación masiva (NGS por las siglas en inglés “Next Generation Sequencing”) ha hecho posible llevar a cabo estudios genéticos más amplios y rápidos, además de ser más coste-efectivos. Esta situación está permitiendo conocer mejor la biología y evolución de los tumores, lo que se traduce en nuevos marcadores diagnósticos, pronósticos y de predicción de respuesta a tratamientos. En el campo del cáncer hereditario ha permitido agilizar los estudios de aquellas personas con sospecha clínica de CH (73,74). El análisis paralelo de más de un gen es de especial interés teniendo en cuenta que muchos de los síndromes hereditarios se pueden deber a VP en diferentes genes (75).

El estudio mediante paneles multigenes (PM) ha permitido conseguir identificar mayor número de variantes patogénicas, en muchos casos doblando el número de variantes identificadas. Pero estos hallazgos se dan de la mano de un aumento significativo de hallazgos de variantes de significado desconocido (VSD)(76), lo que puede dificultar el análisis de los resultados, en ocasiones provocando un aumento en la ansiedad y angustia de las pacientes (77).

Ante la aparición de gran proporción de VSD y otros hallazgos incidentales, en la mayoría de los centros asistenciales de nuestro ámbito se ha optado por realizar un PM dirigido por el fenotipo del paciente (78). Así también, dada su utilidad clínica, se han añadido en algunos de ellos el cribado de genes oportunistas dados que sus hallazgos se pueden considerar accionables (79). La Sociedad Americana de Oncología (ASCO, por sus siglas

en inglés) considera que en paneles destinados a la clínica deberían incluirse únicamente aquellos genes con utilidad y accionabilidad clínicas claras para el manejo de los portadores mientras que el resto de genes/variantes deberían estudiarse en un contexto de investigación e incorporarse a la práctica clínica una vez validados (80).

Tras la realización de un PM en el ámbito asistencial o dentro de un proyecto de investigación podemos encontrarnos con el hallazgo de una variante que no se relaciona claramente con el fenotipo que presenta el paciente y/o su familia y en estos casos es necesaria una valoración cuidadosa del riesgo para la mejor toma de decisiones. También podemos hallar pacientes con VP en más de un gen, situación conocida con el término MINAS (siglas en inglés de *Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome*) (81). Ambas situaciones comportan un verdadero desafío para las unidades de asesoramiento genético.

### **1.5 Rendimiento clínico de los paneles multigenes tras un estudio inicial negativo: BRCA1 /2 como ejemplo.**

A pesar de la rápida implementación de los PM y su generalización posterior desde hace ya más de 5 años, la incertidumbre persiste sobre qué pacientes con un estudio genético previo negativo podría beneficiarse de realizar un nuevo estudio más extenso y cuál sería la accionabilidad de sus resultados.

El concepto de utilidad clínica o accionabilidad es crucial cuando se decide a qué pacientes se ofrece un nuevo estudio y el estudio a realizar. Utilidad clínica/accionabilidad se refiere a aquellos hallazgos que conducirán a un cambio en el manejo de los pacientes, tanto con respecto a las opciones de seguimiento como a la posibilidad de ofrecer cirugías reductoras de riesgo. En muchas ocasiones estos resultados refuerzan las indicaciones de medidas de cribado ya implementadas en los portadores y permiten reducir medidas de seguimiento en aquellas personas de la familia que no son portadores (82,83).

Múltiples estudios han analizado el rendimiento de re-testear a pacientes con un estudio genético inicial negativo (80,82,84–90). A destacar que tanto las poblaciones incluidas como los estudios realizados siempre han sido muy heterogéneos. Muchos de los estudios partieron de un estudio de *BRCA 1/2* parcial por lo que estos genes se incluyen nuevamente en el panel. Sólo pocos trabajos se focalizan en pacientes con cáncer con

resultado indeterminado de *BRCA* y amplían el estudio en busca de variantes patogénicas en nuevos genes de alta y moderada penetrancia.

La incidencia de variantes patogénicas o posiblemente patogénicas (VP) en otros genes varía según las series publicadas entre 3,8% y 11% en genes de moderada/alta penetrancia (80,82,84–89). La accionabilidad de estos hallazgos es también variable, entre el 2,5% y el 85%. Estas diferencias se pueden explicar principalmente a los criterios de realización del estudio, al número de genes analizados, al tamaño de las cohortes y a los criterios de accionabilidad que se utilizan.

### **1.6 Hallazgo de nuevas asociaciones genotipo-fenotipo. ERCC3 como posible nuevo gen relacionado al cáncer de ovario.**

A pesar del avance tecnológico que se ha presentado en el ámbito del cáncer hereditario, en un porcentaje no despreciable de pacientes con sospecha clínica de síndrome de susceptibilidad al cáncer no se halla ninguna variante patogénica en los genes descritos como responsables del CH en la actualidad.

Un ejemplo de esta situación es el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, donde los genes *BRCA1* y *BRCA2* se han relacionado con sólo una cuarta parte de los casos y los nuevos genes de moderada penetrancia serían responsables del 5% de todos los casos (19), lo que implica que un porcentaje importante del riesgo familiar permanece sin explicación (91).

Uno de los objetivos que ha tenido la implementación de los estudios de secuenciación masiva es la identificación de nuevas relaciones fenotipo-genotipo que puedan explicar los casos de pacientes con gran carga familiar de neoplasias o casos de presentación atípica (edad de diagnóstico temprana o evolución no habitual).

En el síndrome de CMOH la búsqueda se ha centrado principalmente en genes que interactúan directamente con *BRCA1/2* o que están implicados en la reparación homóloga (RH) del DNA, especialmente los genes *FANC*, de la vía de Anemia de Fanconi. Hasta la fecha se han identificado 22 genes asociados con AF, su patrón de herencia es heterogéneo, la mayoría suele seguir un patrón autosómico recesivo, aunque también se ha descrito una herencia dominante y ligada al cromosoma X (92). Algunos genes de AF son genes relacionados con el Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario como *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2* y *RAD51C*; por lo tanto, puede resultar

lógico que otros genes de esta misma familia se postulasen como genes de susceptibilidad al cáncer.

Genes como *FANCC*, *FANCM*, *RECQL* han sido estudiados exhaustivamente pero los resultados no son concluyentes (93,94).

También se han estudiado como genes candidatos los genes de la familia de *RAD51*. A esta familia, pertenecen *RAD51C* y *RAD51D*, con asociaciones confirmadas a un aumento de riesgo de CO mayoritariamente, y los genes *RAD51B*, *XRCC2* y *XRCC3*, para los cuales no hay evidencias claras en estos momentos (95,96).

En otros casos, los genes candidatos se han seleccionado porque sus proteínas colaboran o forman complejos con las de genes ya conocidos. Por ejemplo, *BARD1* o *RAP80* y Abraxas, cuyas proteínas forman multicomplejos con *BRCA1*. La contribución de estos genes al aumento de riesgo está aún por determinar o descartar (97–100).

En este escenario *ERCC3*; gen implicado en la reparación por escisión de nucleótidos al codificar una proteína ATPasa/helicasa involucrada en la reparación del DNA; emergió como un buen candidato para analizar en pacientes con cáncer de mama ovario hereditario (CMOH). Variantes bialélicas en *ERCC3* han sido descritas como causa del Xeroderma Pigmentoso/Síndrome Cockayne y también del Transtorno de tricodistrofia fotosensible tipo 2 (101).

La variante truncante en *ERCC3* en heterocigosis recurrente c.325C>T p.Arg109\*(R109X), fue relacionada con un incremento del riesgo de CM en individuos con ascendencia judía Ashkenazi (102).

Otros estudios también han identificado variantes truncantes germinales en *ERCC3* en pacientes con CM y CO (86,103–106).

## **1.7 Identificación de portadores de más de una variante patogénica.** **Síndrome “MINAS”**

El término MINAS derivado de las siglas en inglés de *Multilocus Inherited Multilocus Neoplasia Alleles Syndrome* se definió para describir los casos de pacientes con variantes patogénicas en más de un gen de susceptibilidad al cáncer (81). Si bien previamente ya se habían observado casos de VP en más de un gen (como *BRCA1* y *BRCA2*) era un hecho muy infrecuente, pero desde la implementación de la

secuenciación masiva esta situación se ha hecho más frecuente y plantea un nuevo escenario en el CH.

Desde el conocimiento de esta situación se ha postulado que las VP podrían tener un efecto sinérgico o aditivo y los pacientes presentar un fenotipo más agresivo, como podría ser el diagnóstico de una neoplasia a edad más joven o la aparición de múltiples neoplasias que no estén descritas en los síndromes ya conocidos.

Whitworth y colaboradores (81) publicaron en 2016 su experiencia que constaba de 5 casos y además hicieron una revisión de la literatura donde describieron 82 casos de MINAS. Lamentablemente no pudieron llegar a ninguna conclusión clara y crearon una base de datos para registrar todos los casos. Recientemente, el mismo grupo publicó una nueva revisión de la literatura reportando 385 casos (107); si bien algunos casos presentaban neoplasias múltiples o fenotipos atípicos no se pudo determinar con claridad un patrón general, evidenciando posiblemente una interacción compleja entre las VP.

Esta situación continúa siendo un escenario complejo que requiere de la valoración individual de cada caso para plantear la indicación de estudios de co-segregación para la familia y así, de esta manera, ajustar las recomendaciones a realizar. De todos modos, la realización de estudios de secuenciación masiva puede ser una oportunidad para conocer mejor la prevalencia de los casos y una oportunidad para conocer mejor como la presencia de dos mutaciones puede interferir en el fenotipo de los pacientes.

## 2. HIPÓTESIS

Un estudio exhaustivo mediante un panel de genes en una cohorte grande de pacientes permite identificar más variantes patogénicas en uno o más genes, así como nuevas asociaciones genotipo-fenotipo.

### 3. OBJETIVOS

**Objetivo Principal:**

Mejorar la comprensión de las bases genéticas del cáncer hereditario con la finalidad última de personalizar el riesgo de los pacientes y sus familiares para individualizar las medidas de seguimiento, tratamiento y recomendaciones profilácticas.

**Objetivos Secundarios:**

1. Analizar el rendimiento del estudio genético mediante paneles multigenes basado en el fenotipo, incluyendo el cribado de genes oportunistas y la ampliación del panel con un grupo de genes en el entorno de investigación. **(Objetivo 1)**
2. Estudiar el rendimiento obtenido y la accionabilidad clínica al ampliar el estudio genético en aquellas familias con sospecha de Síndrome de cáncer de mama ovario hereditario y con estudio previo de *BRCA1/2* con resultado no informativo. **(Objetivo 2)**
3. Identificar nuevas relaciones fenotipo-genotipo en el Síndrome de Cáncer Mama Ovario Hereditario. **(Objetivo 3)**
4. Conocer la prevalencia y las características fenotípicas de portadores de más de una variante patogénica en genes de susceptibilidad al cáncer. **(Objetivo 4)**

## 4. METODOLOGÍA

#### 4.1 Diseño del estudio

Esta tesis es un estudio de cohorte, observacional y retrospectivo, realizado en una población de pacientes con sospecha de cáncer hereditario a quienes se les realizó un estudio genético mediante panel multigenes.

#### 4.2 Selección de pacientes

Se han estudiado todos los pacientes con historia personal y/o familiar sugestiva de cáncer hereditario que han sido visitados de manera consecutiva en la Unidad de Consejo Genético desde el año 2015.

Los individuos incluidos fueron valorados por personal especializado en el asesoramiento genético y la indicación del estudio genético se determinó siguiendo los criterios clínicos consensuados en el Programa de Cáncer Hereditario dentro de la red de Centros Catalanes (Anexo 1). Previo a la implementación de este consenso en 2019, para la indicación del estudio genético se siguieron los criterios clínicos recogidos en las guías de manejo del cáncer hereditario vigentes (23,31,32,108–110).

Se incluyeron pacientes con sospecha de síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (CMOH) (Tabla 3), cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP) (Tabla 4), Li-Fraumeni (Tabla 5), poliposis adenomatosa familiar (PAF) (Tabla 6). Así mismo, se incluyeron algunos pacientes con sospecha de entidades menos frecuentes como Síndrome MEN tipo 1, Esclerosis Tuberosa, Síndrome de Reeds y Síndrome de Birt-Hogg-Dubé (estos casos representan un 7% de la población analizada).

**Tabla 3.** Criterios clínicos de estudio por sospecha de Síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario

Criterios clínicos
Cáncer de mama diagnosticado a los 40 años o más joven
Cáncer de mama triple negativo diagnosticado a los 60 años o más joven
Cáncer de mama en el varón
Tres o más familiares de primer grado afectas de cáncer de mama (al menos un caso en paciente premenopáusica)
Dos casos de cáncer de mama en la misma rama en menores de 50 años.
Un caso de cáncer de mama bilateral y otro casi de cáncer de mama (uno en paciente menor de 50 años)
Cáncer de ovario epitelial invasivo no mucinoso (En los tumores de bajo grado se individualizará en función de la edad, historia familiar y posible beneficio a los familiares)

**Tabla 4.** Criterios clínicos de estudio por sospecha de Síndrome de cáncer de colon hereditario no polipósico.

<b>Criterios clínicos</b>
Inestabilidad de Microsatélites (MSI) o Inmunohistoquímica alterada
Cáncer colorectal a los 50 años o más joven o criterios de Ámsterdam

**Tabla 5.** Criterios de estudio Li-Fraumeni (LFS) – Criterios de Chompret

<b>Criterios clínicos (deben cumplirse cualquiera de ellos)</b>
Probando con tumor del espectro LFS* diagnosticado con menos de 46 años y al menos un familiar de primer/segundo grado con tumor del espectro (excepto Cáncer de mama si el probando tiene cáncer de mama) menores de 56 años o con tumores múltiples.
Probando con múltiples tumores malignos (excepto dos cáncer de mama), de los cuales al menos dos son del espectro de LFS* diagnosticado con menos de 46 años
Probando con carcinoma adrenocortical, carcinoma de plexo coroideo o rabdomiosarcoma subtipo anaplásico embrionario.
Cáncer de mama diagnosticada a una edad menor de 31 años.

\* Tumores del espectro Li-Fraumeni: cáncer de mama, sarcomas de tejidos blandos y huesos, tumores cerebrales, carcinoma adrenocortical, leucemia.

**Tabla 6.** Criterios de estudio de Poliposis Adenomatosa Familiar

<b>Criterios clínicos</b>
Existencia de más de 20 adenomas colónicos
Diagnóstico de 10 o más adenomas colónicos si edad inferior a 40 años o familiar con cáncer colorectal antes de los 60 años.

Un 3% (31) de los casos son personas sanas, familiar de primer grado pertenecientes a familias con criterios de alto riesgo y/o con alta carga familiar. La realización de estos estudios se consensuó previamente mediante los criterios de inclusión en el comité multidisciplinar del Programa de Cáncer Hereditario (Tabla 7).

**Tabla 7.** Criterios de estudio genético para personas sanas

<b>Criterios clínicos:</b>
Familia con criterios Ámsterdam I/II
Familiar con cáncer colorectal/endometrio menor de 70 años y pérdida de expresión de una de las proteínas de los genes reparados del DNA en el estudio de inmunohistoquímica (descartada hipermetilación de MLH1)
Familiar de primer grado con síndrome hereditario bien definido (Poliposis colónica, neurofibromatosis tipo I, Von-Hippel-Lindau, MEN2, Síndrome de cáncer gástrico difuso, Peutz-Jeghers, Cowden, Li-Fraumeni, etc.)
Familiar de primer grado de una paciente con cáncer de ovario epitelial de alto grado.
Familiar de primer grado afecto de cáncer de mama con criterios de alta probabilidad de mutación en <i>BRCA1/2</i> (>15%)

En los casos de sospecha de cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP), se les realizó el estudio genético tras realizar previamente el cribado por inmunohistoquímica de las proteínas codificadas por los genes involucrados en la reparación del DNA MMR. Se estudiaron los casos con pérdida de expresión de algunas de las proteínas (considerados tumores con reparación deficiente/tumores inestables). También se consideró indicado hacer estudio en aquellos pacientes con tumores con reparación eficiente/tumor estable pero diagnóstico en edad joven ( $\leq 50$  años) y en los casos que no se disponía del tejido tumoral para su realización se indicó el estudio genético según los criterios clínicos de Ámsterdam II o Bethesda.

Todos los individuos fueron visitados y recibieron asesoramiento genético, tras el mismo dieron su consentimiento para realizar el estudio genético diagnóstico. Se les ofreció además la ampliación del estudio mediante el análisis de un grupo de genes en el marco de investigación.

Los datos clínicos e histológicos de los pacientes fueron recogidos retrospectivamente mediante la revisión de la historia clínica electrónica. Además se recogieron datos de informes clínicos en papel cuando los pacientes aportaron información de sus familiares que habían sido diagnosticados y tratados fuera del centro.

#### **4.2.1 Cohorte de individuos con estudio inicial mediante panel de genes**

En esta cohorte de paciente se incluyeron 1205 pacientes que de manera consecutiva fueron remitidos y visitados en las Unidades de Consejo Genético de la Red de centros catalanes (Institut Català d'Oncologia, Hospital Vall d'Hebron, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Hospital Clínic, Hospital Arnau de Vilanova de Lleida, Hospital del Mar, Hospital Parc Taulí, Consorci Sanitari de Terrassa, Hospital Althaia de Manresa y Hospital Sant Joan de Reus) entre mayo de 2016 y noviembre de 2017.

A los individuos con sospecha de cáncer hereditario se le ofreció realizar el estudio genético mediante un panel de genes dirigido por fenotipo y que incluía el cribado de "genes oportunistas" (*ver más detalles en el apartado 4.3 de metodología*).

El análisis incluyó pacientes que cumplían criterios de estudio genético para cáncer de mama y/o ovario hereditario, cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP), Li-Fraumeni y poliposis adenomatosa familiar. Además, se incluyeron 18 pacientes con tumores con pérdida de expresión por inmunohistoquímica de *PMS2*. Se excluyeron del estudio 9 individuos en el que el análisis de CNVs (del inglés *copy number variations*) identificó grandes reordenamientos debido a las diferencias de metodología utilizada para su valoración en los 2 laboratorios que realizaron los estudio de NGS.

#### **4.2.2 Cohorte de pacientes con estudio inicial de *BRCA 1/2* negativo, ampliación del estudio mediante panel de NGS.**

En este estudio se analizaron los pacientes visitados en la red de hospitales de la Unidad de Consejo Genético del Institut Català d'Oncologia (ICO) y en la Unidad del Hospital Universitario Vall d'Hebron con sospecha de síndrome de cáncer de mama y/o ovario hereditario (CMOH) a quienes se les había realizado el estudio genético previo de los genes *BRCA1/2* entre 1998 y 2005.

Se incluyeron 568 pacientes con estudio inicial de *BRCA1/2* no informativo y que eran nuevamente visitados en las Unidades por tres motivos: 1) seguimiento de alto riesgo, 2) contacto por nuevo caso en la familia, y 3) confirmación de hallazgos en proyectos de investigación/estudios clínicos.

Los pacientes fueron visitados nuevamente entre enero de 2015 y octubre de 2019 y tras el correspondiente asesoramiento genético se les ofreció ampliar el estudio mediante panel de genes.

Para valorar la accionabilidad de los hallazgos se revisaron individualmente los datos de cada familia y se revisó toda la bibliografía disponible actualizada junto a las nuevas guías de recomendaciones (23,30,109). Ante el hallazgo de una VP accionable se ofreció el estudio de co-segregación a familiares de primer grado.

#### **4.2.3 Cohorte de pacientes para la valoración de nuevas asociaciones genotipo-fenotipo.**

De la serie de pacientes estudiados por sospecha de cáncer de mama y cáncer de ovario hereditario con consentimiento de estudios de investigación, se analizó la prevalencia de mutaciones en el gen *ERCC3*. Se incluyeron 1311 pacientes no relacionados.

En los pacientes portadores de VP se analizó el fenotipo que presentaban, las características clínicas de los tumores y el espectro de tumores que se presentaron en la familia. Se ofreció estudio de co-segregación a familiares de primer grado, tanto afectos como sanos.

Posteriormente se realizó estudio de correlación de riesgo para el cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de mama y ovario.

Se realizó un análisis comparativo con 2 cohortes. Se analizaron los datos del estudio de secuenciación masiva (NGS) realizado a una serie de 453 controles sanos españoles, de los cuales 194 correspondían a la cohorte de GCAT (Genomes For Life - Cohort Study of the Genomes of Catalonia) (111) que fueron analizados con el mismo panel de genes; y 259 individuos sanos que pertenecen a la cohorte española de Babelomics de los que se había realizado estudio de exomas y se había estudiado *ERCC3* (112).

Además se analizó la frecuencia de variantes truncantes en *ERCC3* en la cohorte de individuos europeos no finlandeses (no-cáncer) GnomAD 2.1.1 <http://gnomad.broadinstitute.org/> (cohorte de 51.343 individuos).

Tras la publicación de nuestros datos se realizó una valoración comparativa con una serie de pacientes de República Checa publicada por el consorcio CZECANCA (1333 pacientes afectas de Cáncer de ovario).

#### **4.2.4 Cohorte de pacientes portadores de más de una variante patogénica. Síndrome “MINAS”**

De la cohorte de pacientes no relacionados estudiados entre mayo de 2016 y noviembre de 2017 mediante panel de genes como estudio inicial se incluyeron en este sub-estudio todos aquellos individuos visitados en la Unidad de Consejo Genético del Institut Català d'Oncologia (ICO) con análisis completo del panel que incluía el estudio opcional de panel de investigación (1023 casos índice). De ellos un 16% (163) presentaban múltiples tumores.

Sólo se incluyeron en el análisis los pacientes portadores de más de una variante patogénica o probablemente patogénica (VP) en genes conocidos de predisposición hereditaria al cáncer.

Para la correcta valoración fenotipo-genotipo se revisaron los datos clínicos disponibles y se ofreció realizar estudios de co-segregación a los familiares directos y en los casos cuya historia oncológica podría relacionarse con los hallazgos del estudio.

### **4.3 Estudio de Paneles multigenes**

Desde julio de 2015 el Programa de Cáncer Hereditario dentro de la red de Centros Catalanes para el manejo del cáncer implementó un programa conjunto que incluye criterios clínicos consensuados y paneles de genes para el estudio germinal basados en el fenotipo de los pacientes y sus familias (Anexo I). Los paneles dirigidos según el fenotipo familiar incluyen genes asociados específicamente a tumores con validez clínica y accionabilidad conocidas(78) (Tabla 8).

Para el cáncer de mama (CM) se incluyeron aquellos genes con un riesgo relativo (RR) cercano a dos. Para el cáncer de ovario (CO) los genes fueron seleccionados de acuerdo con los datos basados en series de caso-controles. Los genes incluidos en el panel de cáncer de colon y poliposis adenomatosa fueron seleccionados de acuerdo a su asociación conocida a un aumento del riesgo de cáncer de colon o poliposis y susceptible de controles clínicos.

En el mismo panel se incluyeron los genes *BRCA1/2*, *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* definiéndose como cribado de genes oportunistas dada la accionabilidad conocida de las VP en estos genes. *PMS2* no se incluyó en este análisis por la presencia de pseudogenes que pueden alterar el resultado, pero se analizó mediante PCRs (del inglés *polymerase chain reaction*) de largo alcance si se consideraba indicado tras el estudio inmunohistoquímico.

Además, se ofreció a los pacientes la ampliación del estudio con un set de 24 genes CORE relacionados con cáncer hereditario (en contexto de investigación) para valorar si mejoraba el rendimiento del estudio de variantes patogénicas más allá del estudio de los genes por fenotipo.

**Tabla 8.** Genes incluidos en cada panel basado en el fenotipo.

	CM	CO	CMO	CCHNP	Poliposis Adenomatosa	Li-Fraumeni
<b>BRCA1*</b>	<b>BRCA1</b>	<b>BRCA1</b>	<b>BRCA1</b>	<b>BRCA1</b>	<b>BRCA1</b>	<b>BRCA1</b>
<b>BRCA2*</b>	<b>BRCA2</b>	<b>BRCA2</b>	<b>BRCA2</b>	<b>BRCA2</b>	<b>BRCA2</b>	<b>BRCA2</b>
<i>PALB2</i>	<i>PALB2</i>		<i>PALB2</i>			
<i>ATM</i>	<i>ATM</i>		<i>ATM</i>			
<i>TP53</i>	<i>TP53</i>		<i>TP53</i>			<b>TP53</b>
<i>CHEK2</i>	<i>CHEK2</i>		<i>CHEK2</i>			<b>CHEK2</b>
<i>BRIP1</i>		<b>BRIP1</b>	<b>BRIP1</b>			
<i>RAD51C</i>		<b>RAD51C</b>	<b>RAD51C</b>			
<i>RAD51D</i>		<b>RAD51D</b>	<b>RAD51D</b>			
<b>MLH1*</b>	<b>MLH1</b>	<b>MLH1</b>	<b>MLH1</b>	<b>MLH1</b>	<b>MLH1</b>	<b>MLH1</b>
<b>MSH2*</b>	<b>MSH2</b>	<b>MSH2</b>	<b>MSH2</b>	<b>MSH2</b>	<b>MSH2</b>	<b>MSH2</b>
<b>MSH6*</b>	<b>MSH6</b>	<b>MSH6</b>	<b>MSH6</b>	<b>MSH6</b>	<b>MSH6</b>	<b>MSH6</b>
<i>MUTYH</i>				<b>MUTYH</b>	<b>MUTYH</b>	
<i>POLD1</i>				<b>POLD1</b>	<b>POLD1</b>	
<i>POLE</i>				<b>POLE</b>	<b>POLE</b>	
<i>APC</i>					<b>APC</b>	
<i>BMPR1A</i>					<b>BMPR1A</b>	
<i>NTHL1</i>					<b>NTHL1</b>	
<i>SMAD4</i>					<b>SMAD4</b>	
*Cribado de genes oportunistas: <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>MLH1</i> , <i>MLH2</i> , <i>MSH6</i> (se realizó a todos los probandos)						
<i>PTEN</i> , <i>CDH1</i> y <i>STK11</i> se analizó solo ante un fenotipo sugestivo <i>PMS2</i> se analizó de manera separada si estaba indicado por el resultado de la IHQ						

CM: cáncer de mama; CO: cáncer de ovario; CMO: cáncer mama-ovario; CCHNP: cáncer de colon hereditario no polipósico. (Tabla adaptada de Feliubadaló et al, IJC 2019)

#### **4.4 Secuenciación masiva de genes**

En todos los estudios se extrajo DNA genómico a partir de linfocitos de sangre periférica de los pacientes.

Los estudios de panel de genes llevados a cabo en el ICO se realizaron a partir de varias versiones de una librería de diseño propio, llamada ICO-IMPPC Hereditary Cancer Panel (I2HCP) (cita PMID: 28051113), basada en el enriquecimiento por hibridación. El panel I2HCP contiene un compendio exhaustivo de genes implicados en el cáncer hereditario (de tumores sólidos) y las rasopatías. La lista concreta ha ido evolucionando en el tiempo con el avance de los conocimientos del cáncer hereditario, desde los 122 genes iniciales a los 164 actuales. Las primeras versiones utilizaban sondas SureSelectXT Custom (Agilent, Santa Clara, CA), mientras que la actual usa tecnología Kapa HyperChoice MAX (Roche Diagnostics, XXXX), siempre de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las librerías se secuenciaron en distintas plataformas Illumina, dependiendo del número de muestras. Los resultados crudos se analizaron con un pipeline bioinformático de diseño propio llamado I2HCP Diagnostics Pipeline, que incluye las herramientas no comerciales FastQC, BWA (BWA-MEM), Samtools, Bedtools, VarScan, Table-Annovar, DECoN y programas propios (cita PMID: 28051113).

Los estudios de panel de genes llevados a cabo en el HVH utilizaron la librería comercial Hereditary Cancer MASTR™ Plus (Agilent), también de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron en la plataforma MiSeq de Illumina. Fueron analizadas mediante el software comercial Sophia Genetics Platform (Sophia DDM®).

Ambas aproximaciones detectan variantes puntuales y grandes reordenamientos. Las variantes identificadas fueron interpretadas por personal cualificado y aquellas con significación clínica fueron confirmadas por secuenciación Sanger u otra técnica adecuada.

Así mismo, los estudios directos de co-segregación y de pérdida de heterocigocidad (LOH) se realizaron mediante secuenciación Sanger.

#### **4.5 Clasificación de las variantes**

Las variantes encontradas fueron clasificadas de acuerdo a la clasificación propuesta por Plon et al.(115) siguiendo las recomendaciones de la ACMG (del inglés American College

of Medical Genetics) (<https://acmg.net>), ENIGMA e InSiGHT (Tabla 9). Las variantes patogénicas y probablemente patogénicas (Clases IV y V) se consideraron juntas como variantes patogénicas (VP). Las variantes de significado desconocido (VSD, clase III) se describieron por separado y las variantes benignas y probablemente benignas se omitieron del análisis.

**Tabla 9.** Clasificación de las variantes genéticas

Clase	Probabilidad de patogenicidad
5. Patogénica	>0,99
4. Probablemente patogénica	0,95-0,99
3. De significado incierto	0,05-0,949
2. Probablemente benigna	0,001-0,049
1. Benigna	<0,001

#### 4.6 Análisis Estadístico

Para la valoración de los resultados descriptivos, se describieron las variables cuantitativas mediante la mediana aritmética y su correspondiente desviación estándar. Las variables categóricas se describieron mediante tablas de frecuencias (número y porcentaje).

En el estudio de valoración de *ERCC3* como gen de riesgo para cáncer de mama-ovario las variables binarias se analizaron mediante regresión logística binaria. Los resultados se expresaron como Odds Ratios (OR) con su intervalo de confianza (IC) del 95%.

Para el estudio comparativo de cohortes las diferencias en la frecuencia alélica entre los casos y controles se realizó mediante el test exacto de Fisher usando el paquete estadístico R v.3.5.1.

Para todas las comparaciones realizadas se consideraron asociaciones estadísticamente significativas aquellas cuyo p-valor era <0.05.

#### **4.7 Consideraciones éticas**

Los estudios descritos en esta tesis se llevaron a cabo siguiendo rigurosamente las recomendaciones éticas internacionales para la investigación médica en humanos. Los investigadores implicados hemos sido responsables de garantizar que los estudios se realizaron de acuerdo con las normas recogidas en la Declaración de Helsinki.

Los estudios se llevaron a cabo tras aprobación por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitari de Bellvitge (PR278/19).

## 5. RESULTADOS

## **5.1 Utilidad clínica del panel multigenes como estudio genético inicial. (Objetivo 1)**

En este apartado se resumen los resultados del uso de un panel de genes relacionados con cáncer hereditario en una cohorte de pacientes de los centros de la red de centros catalanes. Se presentan los resultados del análisis de genes asociados a fenotipo, la ampliación con genes oportunistas, así como una ampliación a un set de 24 genes CORE relacionados con cáncer hereditario (investigación) (Tabla 8 en apartado metodología 4.3). Este estudio fue publicado en 2019 en la revista IJC (Feliubadalò et al. (79)).

Se incluyeron 1205 individuos no relacionados visitados en las unidades de consejo genético de la red de hospitales de Cataluña entre mayo de 2016 y noviembre de 2017 y que cumplían criterios clínicos de estudio genético. Se analizaron los genes previamente definidos según criterios clínicos, los genes oportunistas fueron analizados en todas las muestras.

El 87% eran mujeres y el 13% hombres. Como historia personal de neoplasia se incluyeron: mama (51%), ovario (22%), cáncer colorectal (16%), poliposis colónica (3%) y cáncer de endometrio (2%). Un 7% de los pacientes fueron diagnosticados de otros tumores (como por ejemplo cáncer gástrico, cáncer de intestino delgado, poliposis colorectal) y un 3% eran personas sanas que pertenecían a familias con alta sospecha de cáncer hereditario (Tabla 10).

**Tabla 10.** Características clínicas de la población

Población	n = 1205
Edad al primer diagnóstico	48 (DE 14)
Mujeres	1048 (87%)
Hombres	157 (13%)
<b>Historia oncológica personal</b>	
Cáncer de mama	476 (40%)
Cáncer de mama múltiple (multifocal, multicéntrico y/o bilateral)	82 (7%)
Cáncer de ovario	236(20%)
Cáncer de mama + ovario	26 (2%)
Cáncer de mama + otro	29 (2%)
Cáncer de mama + colon	5 (<1%)
Cáncer colorectal	116 (10%)
Cáncer colorectal múltiple	14 (1%)
Cáncer colorectal + otros	53 (4%)
Cáncer de endometrio	21 (2%)
Cáncer de intestino delgado	3 (<1%)
Cáncer gástrico	4 (<1%)
Adenomas sebáceos	3 (<1%)
Poliposis colorectal	36 (3%)
Otros	24 (2%)
Múltiples tumores de diferentes orígenes	46 (4%)
Sanos	31 (3%)

DE: desviación estándar

(Tabla adaptada de Feliubadaló et al, IJC 2019)

En esta población se hallaron 150 individuos portadores de variantes patogénicas y probablemente patogénicas (ambas denominadas VP a partir de ahora), 148 individuos (12%) portadores en heterocigocis en un gen dominante y 2 pacientes con mutación bialélica en *MUTYH*.

Los genes con mayor porcentaje de variantes patogénicas fueron *BRCA2* (37) y *BRCA1* (30), seguidos por los genes de reparación del DNA (24 *MSH6*, 15 *MLH1* y 13 *MSH2*). El estudio en genes oportunistas identificó 7 variantes patogénicas adicionales (0,6%), 5 en *MSH6*, una en *BRCA1* y 1 en *BRCA2*. Asimismo, se realizó el estudio de co-segregación a 13 familiares de primer grado de los 29 familiares identificados. El estudio de panel que incluyó los 24 genes de investigación evidenció 25 variantes patogénicas adicionales por lo que el rendimiento del panel aumentó de 13% a 15%. (Figura 7)

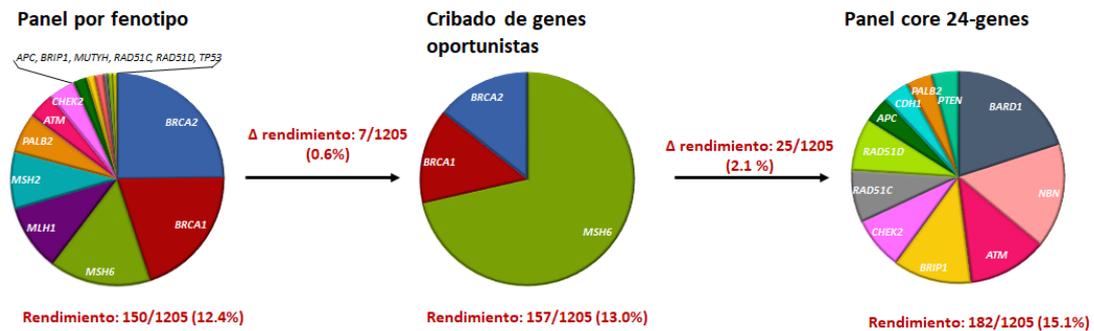


Figura 7: Rendimiento del uso de panel en cada uno de los escenarios analizados (adaptada de Feliubadaló et al IJC 2019)

Se describe a continuación los resultados por grupo clínico (Figura 8)

### 5.1.1 Variantes patogénicas en pacientes con cáncer de mama y cáncer de Ovario

El estudio se llevó a cabo en 883 familias con historia de cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de mama y ovario. A 168 familias se les había realizado previamente un estudio de *BRCA 1/2* que no mostró VP.

El panel dirigido a pacientes con cáncer de mama se analizó en 543 individuos detectándose variantes patogénicas en un 8% de ellos (46): 18 en *BRCA2*, 10 en *BRCA1*, 8 en *PALB2*, 5 en *CHEK2* y 5 en *ATM* (Figura 8). No se hallaron mutaciones en *TP53*.

Respecto a las 210 pacientes estudiadas para el panel de cáncer de ovario, el rendimiento fue del 11% (23): se identificaron 10 Variantes patogénicas en *BRCA1* y 10 variantes patogénicas en *BRCA2*, además 1 en *BRIP1*, 1 en *RAD51C* y 1 en *RAD51D*.

Entre las 130 pacientes con historia de cáncer de mama y de ovario, un 17% (22) resultó portadora de una variante patogénica: 9 en *BRCA1*, 8 en *BRCA2*, 2 en *ATM*, 1 en *BRIP1*, 1 en *CHEK2* y 1 en *PALB2*.

A destacar que 4 pacientes (1 cáncer de mama, 2 cáncer de ovario y 1 cáncer de mama y ovario) resultaron portadoras de una VP en *MSH6*.

Al analizarse los resultados de todo el panel de genes (añadiendo el grupo de 24 genes del core de investigación), se identificaron 17 VPs adicionales. Cabe destacar que 6 VPs en genes relacionados a cáncer de ovario se encontraron en familias que sólo presentaban historia de cáncer de mama (3 *BRIP1*, 2 *RAD51C* y 1 en *RAD51D*).

En resumen, con la ampliación del análisis a los genes de investigación el estudio resultó en un rendimiento del 10.5, 14.3 y 18.5% en los casos de cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de mama y ovario respectivamente (Figura 8).

### **5.1.2 Variantes patogénicas en pacientes con cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis.**

A los pacientes con sospecha de cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis se les realizó inicialmente el estudio por IHQ de las proteínas implicadas en la reparación del DNA (MMR).

De un total de 205 casos, se analizaron 137 tumores con déficit en la reparación, 56 con reparación eficiente (diagnóstico a edad joven) y 12 con reparación no estudiada.

El rendimiento del panel en estos 205 individuos fue del 24% (50) (Figura 8). El gen donde se hallaron variantes patogénicas con mayor frecuencia fue *MSH6* (23), seguido de *MLH1* con 14 y *MSH2* con 13. Todas las VP halladas en los genes de reparación fueron encontradas en pacientes con tumores deficientes o con determinación MMR desconocida, sin encontrarse VPs en los 56 pacientes con tumores con reparación eficiente. Una VP en *MSH6* fue encontrada en el estudio de genes oportunistas en una paciente con cáncer de mama.

De manera interesante, 3 casos de los 137 tumores con déficit en la reparación (2%) tuvieron un resultado discordante entre la pérdida de expresión proteica por inmunohistoquímica y el resultado del estudio genético.

El estudio de genes oportunistas en un individuo sano cuyo padre tenía un tumor MMR deficiente presentó una VP en *BRCA2*.

Se evidenciaron 6 VPs adicionales en el análisis completo del panel de 24 genes, todas en casos con MMR eficiente o desconocido (3 en *ATM*, 2 en *CHEK2* y 1 en *RAD51D*), lo que aumenta el rendimiento global del panel core un 3%.

Además, se realizó de manera separada el estudio de *PMS2* en 18 casos encontrándose 6 variantes patogénicas y 2 variantes de significado desconocido.

### 5.1.3 Variantes patogénicas en pacientes con Poliposis Adenomatosa y Síndrome de Li-Fraumeni

Se analizaron 73 pacientes con clínica sospechosa de Poliposis Adenomatosa Familiar hallándose 3 VPs en *APC* y 2 pacientes con mutaciones bialélicas en *MUTYH*. No se encontraron VPs en pacientes con 20 o menos pólipos.

El estudio de genes oportunistas identificó 1 VP adicional en *BRCA1* en un portador de VP en *APC*. Al analizar el panel de genes de investigación, se detectaron 1 VP en *PALB2* y una en *PTEN*.

El análisis de 15 pacientes con sospecha de síndrome de Li-Fraumeni identificó una VP en *TP53* y el estudio de genes oportunistas detectó una VP en *MSH6*. En estos individuos la ampliación al panel de investigación de 24 genes no identificó otras variantes patogénicas.

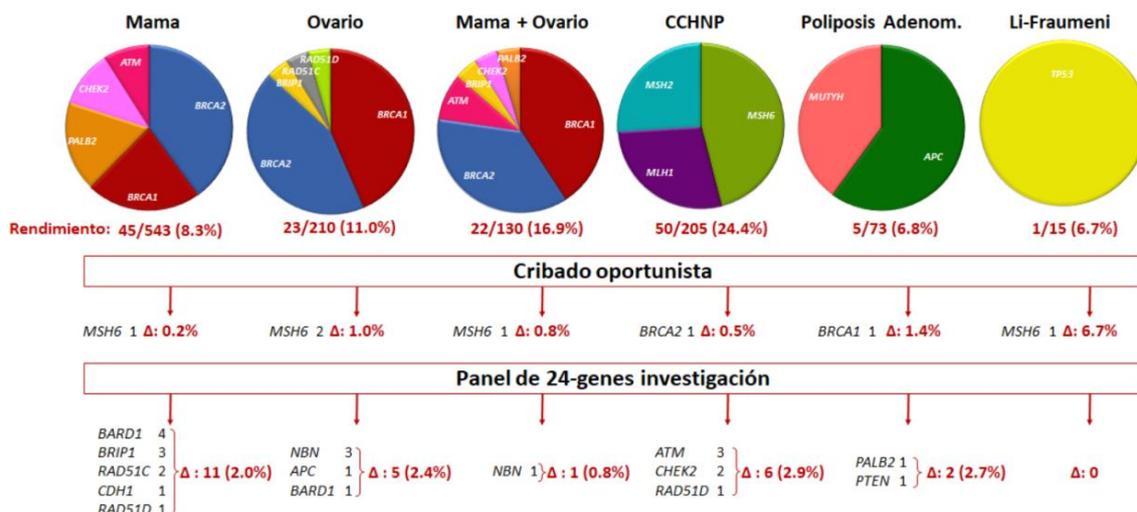


Figura 8: Rendimiento en la identificación de variantes patogénicas según el enfoque de análisis, desglosado por paneles de fenotipos. Adaptada de Feliubadaló et al. IJC 2019)

### 5.1.4 Variantes patogénicas en individuos sanos

A 31 individuos sin historia personal de cáncer pero con familia con alta sospecha de cáncer hereditario se les realizó estudio germinal. Se encontraron cuatro VPs (13%), 3 en *BRCA1* en familias con historia de cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de mama y ovario y una en *BRCA2* en una familia con sospecha de cáncer de colon hereditario no polipósico.

### 5.1.5 Detección de variantes de significado desconocido

En el total de casos analizados, se encontró que un 30% de los pacientes a quienes se le realizó un panel dirigido por fenotipo eran portadores de una variante de significado desconocido (VSD), un 36% cuando se amplió el estudio con genes oportunistas y un 65% cuando se añadió el análisis del panel completo con los 24 genes de investigación.

La mayoría de las VSD se evidenciaron en el gen *ATM*, seguido por *CDH1*, *PALB2* y *APC*.

Con estos resultados hemos planteado que podría combinarse el panel dirigido por fenotipos con el cribado de genes oportunistas ya que permitiría mejorar el rendimiento clínico con un asumible incremento de la detección de variantes de significado desconocido (Tabla 11).

**Tabla 11.** Nuevo panel de genes dirigido por fenotipo

	CM/CMO	CO	CCHNP	Poliposis Adenomatosa	Li-Fraumeni
<b>BRCA1</b>	<i>BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6</i>				
<b>BRCA2</b>					
<b>MLH1</b>					
<b>MSH2</b>					
<b>MSH6</b>					
<b>PALB2</b>	<i>PALB2</i>				
<b>ATM</b>	<i>ATM</i>				
<b>TP53</b>	<i>TP53<sup>1</sup></i>				<i>TP53</i>
<b>CHEK2</b>	<i>CHEK2</i>				
<b>BRIP1</b>	<i>BRIP1</i>	<i>BRIP1</i>			
<b>RAD51C</b>	<i>RAD51C</i>	<i>RAD51C</i>			
<b>RAD51D</b>	<i>RAD51D</i>	<i>RAD51D</i>			
<b>MUTYH</b>			<i>MUTYH</i>	<i>MUTYH</i>	
<b>POLD1</b>			<i>POLD1</i>	<i>POLD1</i>	
<b>POLE</b>			<i>POLE</i>	<i>POLE</i>	
<b>APC</b>				<i>APC</i>	
<b>BMPR1A</b>				<i>BMPR1A</i>	
<b>NTHL1</b>				<i>NTHL1</i>	
<b>SMAD4</b>				<i>SMAD4</i>	

Genes oportunistas en todos los pacientes. PTEN, CDH1 y STK11 sólo si fenotipo sugestivo. PMS2 según resultado de IHQ. <sup>1</sup> Sólo pacientes con CM antes de los 35 años.

CM: cáncer de mama; CO: cáncer de ovario; CMO: cáncer mama-ovario; CCHNP: cáncer de colon hereditario no polipósico. (Tabla adaptada de Feliubadaló et al, IJC 2019)

## **5.2 Rendimiento clínico y accionabilidad de la ampliación del estudio mediante panel de genes tras un estudio inicial de BRCA1/2. (Objetivo 2)**

En este estudio se analizaron los pacientes visitados en las Unidades de Consejo Genético del Institut Català d'Oncologia y en la Unidad del Hospital Universitario Vall d'Hebron con sospecha de síndrome de Cáncer de Mama/Ovario Hereditario (CMOH) a quienes se les había realizado el estudio genético inicial sólo de los genes *BRCA1/2* entre 1998 y 2005. En 568 casos con resultado indeterminado o donde se había evidenciado una mutación de significado desconocido se les ofreció ampliar el estudio mediante un panel de genes dirigido por fenotipo. Actualmente este estudio está en fase de preparación de manuscrito.

El objetivo del estudio fue valorar el rendimiento obtenido por un panel de genes en familias *BRCA1/2* no informativo. El segundo objetivo del estudio fue evaluar la accionabilidad en las familias donde se evidenció variantes patogénicas.

Se utilizaron como criterios de inclusión los siguientes: a) Estudio previo de la región codificante de los genes *BRCA1* y *BRCA2* que hubiese incluido estudio de grandes reordenamientos (MLPA), b) Familias que recontactaron con las unidades de consejo genético por aparición de casos nuevos, c) Familiares en seguimiento según protocolos de alto riesgo (LTR (de las siglas en inglés life time risk >20-25%) y d) Confirmación de hallazgos procedentes de proyectos de investigación (translacional/ensayos clínicos)

### **5.2.1 Rendimiento clínico del estudio mediante panel de genes**

Las visitas para la ampliación del estudio mediante panel se realizaron entre enero de 2015 y octubre de 2019. Se incluyeron 568 casos, todos ellos con estudios previos con resultados indeterminados (515 casos) o con hallazgo de VSD (53 casos).

Las características clínicas de las familias incluidas se detallan en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Características clínicas de los casos

Características clínicas (tipo de familia)*	Nº
3 o más familiares de 1º grado con cáncer de mama	136
Diagnóstico de cáncer de mama bilateral	89
2 casos en la familia con cáncer de mama en menores de 50 años	72
Diagnóstico cáncer de mama a los 35 años o menor	97
Asociación de cáncer de mama y cáncer de ovario en la misma familia	50
Cáncer de ovario	52
Diagnóstico de cáncer de mama triple negativo en menores de 50 años	62
Cáncer de mama en el varón	19

\* Algunas pacientes tenían características de varios tipos de familia

El estudio genético se llevó a cabo para ajustar el riesgo en un 68% de los casos, por el diagnóstico de nuevos casos en la familia en un 22% y por proyectos de investigación un 10 % (Tabla 13).

**Tabla 13.** Criterios de estudio de las pacientes

Criterios de estudio	Nº (%)
Ajustar riesgo	386 (67,95)
Nuevo caso en la familia	125 (22,00)
Proyectos de investigación:	57 (10,05)
Total:	568 (100)

Previa visita con el adecuado asesoramiento genético se les ofreció a las pacientes ampliar su estudio mediante la realización del panel de genes dirigido por fenotipo que incluía también al cribado de genes oportunistas (Tabla 8 en apartado metodología 4.3). El mismo incluyó:

- A) Genes de alto riesgo para Cáncer de mama: *PALB2*, *TP53* (*BRCA1* y *BRCA2*)
- B) Genes de moderado riesgo para Cáncer de mama: *ATM*, *CHEK2*
- C) Riesgo moderado de Cáncer de Ovario: *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*
- D) Cribado de genes oportunistas: *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*.

El análisis de los paneles evidenció 60 variantes probablemente –patogénicas (VP a partir de ahora) (10,56%); de ellas, 24 (40%) se presentaron en genes de alto riesgo y 36 (60%) en genes de moderado riesgo.

El gen donde se hallaron variantes patogénicas con mayor frecuencia fue *PALB2* (17: 28,33%), seguido de *ATM* (11: 18,33%), *RAD51D* (8: 13,33%), *RAD51C* (6: 10%) y *CHEK2* (6: 10%). También se encontraron VP en *TP53* (3), *BRIP1* (2), *BRCA1* y *BRCA2* (1 en cada gen, variantes intrónicas en regiones no incluidas en el estudio previo por secuenciación Sanger) y *PTEN* (1) (Tabla 14 y Tabla 14b). El análisis evidenció 227 variantes de significado desconocido.

**Tabla 14.** Variantes Patogénicas identificadas

GEN	Variante Patogénica (N)
<i>PALB2</i>	c.2257C>T; p.(Arg753*)
	c.509_510del; p.(Arg170Llefs*14)
	c.121_130del; p.(Ala41Leufs*9)
	c.1653T>A; p.(Tyr551*) (2)
	c.2749_3113del365; p.(Val917Glu fs*14) §
	c.1857delT; p.(Phe619Leufs*9)
	c.73A>T, p.(Lys25*)
	c.2257C>T, (R753*) (2)
	c.3201+5G>T intrón 11; p.(Asn1039GLYfs*7)
	c.1192delG; p.(Val398Cysfs*26)
	c.1675C>T; p.(Gln559*)
	c.3362delG exon 3; p.(Gly1121fs)
	c.73A>T, p.(Lys25*)
	c.1111G>T; p.(Glu371*)
c.3256C>T; p.(Arg1086*)	
<i>ATM</i>	c.4909+1G>A; p.?
	c.2510C>G; p.(Ser837*)
	c.3712_3716del; p.(Leu1238Lysfs*6) (2)
	c.9007_9034del; p.(Asn3003Aspfs*6)
	c.7788+3A>G; p.(Leu2544_Glu2596del)
	c.3756del; p.(Tyr1252*)
	c.2413C>T; p.(ARg805*)
	c.3802del; p.(Val1268*)
	c.1595G>A; p.(Cys532Tyr)
	c.4432C>T; p.(Gln1478*)
<i>RAD51D</i>	c.694C>T; p.(Arg232*) (4)
	c.94_95delGT; p.(Val32Phefs)
	c.655C>T; p.(Gln219Ter)
	c.94_95delGT; p.(Val32Phefs*38)
	c.649G>T; p.(Gly217Ter)

En el caso de variantes recurrentes, en paréntesis, tras la mutación se indica el número de casos  
 § este paciente era portador de 2 variantes patogénicas

**Tabla 14b.** Variantes Patogénicas identificadas

GEN	Variante Patogénica (N)
RAD51C	c.709C>T; p.(Arg237*)
	c.358dupA; p.(Thr120Anfs*35) (2)
	c.706-2A>G; p.?
	c.1026+5_1026+7del; p.(Arg322Serfs*22)
	c.656T>C; p.(Leu219Ser)
CHEK2	c.349A>G; p.(Arg117Gly)
	c.715G>T; p.(Glu239*) (3)
	del E03-E04; p.?
	c.279G>A; p.(Thp93*)
MSH6	c.1577_1581dup; p.(Glu528Cysfs*45)
	c.3103C>T; p.(Arg1035*)
	c.3261dupC; p.(Phe1088Leufs*5)
TP53	c.207delT>C; p.(Ala69=)
	c.783-1G>A; p.?
	c.736A>G; p.(Met246Val)
BRIP1	c.2392C>T; p.(Arg798*)
	c.1702_1703del; p.(Asn568Trpfs*9)
MSH2	c.2083G>A; p.(Val695Met) §
BRCA1	c.4185+4105C>T; p.gln1395_gln1396insSerlysSerleu*
BRCA2	c.8332-13T>G; p.(Lle2778_Gln2829del)
PTEN	c.407G>A exon 5; p.(Cys136Tyr)

En el caso de variantes recurrentes tras la mutación se indica el número de casos

§ este paciente era portador de 2 variantes patogénicas

Las características clínicas de los pacientes donde se hallaron VP se detallan en la tabla 15.

El análisis de los genes oportunistas detectó 3 variantes patogénicas en *MSH6* y 1 en *MSH2*. Respecto a los casos de *MSH6* cabe destacar una paciente que era portadora también de una VP en *ATM*; había sido diagnosticada a los 54 años de una neoplasia de mama receptor de estrógeno positivo y de una neoplasia de colon a los 62 años.

La paciente portadora de la mutación en *MSH2* había sido diagnosticada de cáncer de mama a los 30 años. En la historia familiar destaca su padre con una neoplasia de colon a los 49 años y el abuelo paterno una neoplasia de colon diagnosticada a los 31 años.

**Tabla 15.** Características clínicas de los casos según el gen con variante patogénica

	Sólo Cáncer de mama						Con cáncer de ovario	
	≥ 3 casos	2 casos ≤ 50 años	Diagnóstico ≤35 años	TN ≤50 años	CM bilateral	CM varón	CM+CO	CO
<b>PALB2</b>	6	3	1	1	4	1	1	
<b>TP53</b>	1		2					
<b>BRCA1</b>							1	
<b>BRCA2</b>							1	
<b>ATM</b>	3	2	2		2		2	
<b>CHEK2</b>			4	1	1			
<b>PTEN</b>							1	
<b>RAD51C</b>	1			1	1			3
<b>RAD51D</b>		2					2	4
<b>BRIP1</b>			1		1			
<b>MSH2</b>			1					
<b>MSH6</b>	2	1						

CM: cáncer de mama; CO: cáncer de ovario, TN: cáncer de mama triple negativo

### 5.2.2 Accionabilidad de los resultados

En los casos con hallazgo de variante patogénica, tras explicar los resultados y sus implicaciones, se ofreció estudios de co-segregación a los familiares de primer grado, realizándose 147 estudios en cascada a familiares directos.

Se procedió a analizar la accionabilidad de los hallazgos; de acuerdo a las guías clínicas actuales, se consideró que los hallazgos eran “accionables” cuando provocaban un cambio en el manejo del paciente o de su familia.

En los portadores de las VP, en 37 casos (67,2%) este hallazgo produjo un cambio en las medidas de seguimiento y/o recomendaciones de cirugías profilácticas (Tabla 16).

A modo de ejemplos; en la familia con la VP intrónica en *BRCA2* se le aconsejó realizar mastectomía bilateral profiláctica a la hija del caso índice. En uno de los casos de VP en *RAD51D* se planteó al probando realizar mamografía anual (para control de la mama contralateral) y seguimiento ginecológico semestral con ecografía transvaginal y marcador tumoral CA 125 y valorar salpingo-ooforectomía bilateral profiláctica (SOBP)

entre los 45-50 años. A su hermana, también portadora de la VP, se le recomendó seguimiento con RM mamaria.

En otros casos los hallazgos no provocaron un cambio en el manejo habitual, es el ejemplo de uno de los casos de VP en *RAD51C* que la probando tenía ya realizada una ooforectomía bilateral y por la historia familiar ya cumplía con los controles mediante mamografía y RM mamaria.

**Tabla 16.** Accionabilidad clínica en las familias con variantes patogénicas.

Gen	Nº VP	Estudios directos	Nuevas recomendaciones (familias)
<b>Cáncer de mama Alto riesgo</b>			
<i>PALB2</i>	17	40	12
<i>TP53</i>	3	2	2
<i>BRCA1</i>	1	2	1
<i>BRCA2</i>	1	1	1
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>45</b>	<b>16</b>
<b>Cáncer de mama Riesgo Moderado</b>			
<i>ATM</i>	11	28	5
<i>CHEK2</i>	6	7	2
<i>PTEN</i>	1	2	1
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>37</b>	<b>8</b>
<b>Cáncer de ovario</b>			
<i>RAD51C</i>	6	15	2
<i>RAD51D</i>	8	26	5
<i>BRIP1</i>	2	5	2
<i>MSH6</i>	3	17	3
<i>MSH2</i>	1	2	1
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>65</b>	<b>13</b>
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>147</b>	<b>37 (62.7%)</b>

VP: variante patogénica

### **5.3 Nuevas relaciones genotipo-fenotipo. Papel de *ERCC3* en el Síndrome de Cáncer de mama ovario hereditario. (Objetivo 3)**

En este trabajo se analizó una cohorte de 1311 pacientes no relacionados con sospecha de cáncer de mama y/o ovario hereditario a quienes se les realizó un panel de genes dirigido por fenotipo y que consintieron para realizar el core de genes de investigación. Se

identificaron 162 variantes, lo que representó que un 12,36% de los pacientes eran portadores de mutaciones en genes de alta y moderada penetrancia (Tabla 17).

Con el objetivo de analizar el papel de *ERCC3* como gen de riesgo para cáncer de mama y/o ovario se realizó el estudio exhaustivo de variantes y de alteraciones en el número de copias de dicho gen. Este estudio se publicó en 2020 en EJC (Stradella et al.(116). Se identificaron 13 pacientes portadores de variantes deletéreas en heterocigosis en el gen *ERCC3* (Tabla 18). No se evidenciaron alteraciones en el número de copias. Curiosamente, cinco de los pacientes también eran portadores de una variante patogénica adicional en un gen asociado ya previamente al Síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario (CMOH) de moderada/alta penetrancia, y uno tenía Síndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD) concomitante (Tabla 18 y Figuras 9 y 10).

La frecuencia de alteraciones patogénicas en *ERCC3* de la serie global fue del 0.99%. El porcentaje de variantes deletéreas en el gen en el subgrupo de pacientes con cáncer de mama fue del 0,85%, del 1,00% en los casos de cáncer de ovario y del 1,5% en pacientes con cáncer de mama y ovario. Al analizar sólo aquellas pacientes sin otras mutaciones en genes asociados a riesgo de CMOH, los porcentajes pasaron a ser del 0,54% para CM, del 1,14% para CO y 0,65% para CMO. Sólo se identificó un paciente portador de una variante deletérea de *ERCC3* en nuestra cohorte control de 453 personas sanas (0,22%) (Tabla 17).

Se identificaron 4 variantes de *ERCC3* recurrentes en nuestra cohorte. La variante más frecuente fue c.583C>T; p.(Arg195\*) que fue identificada en 3 pacientes no relacionados. Tres variantes fueron encontradas en 2 pacientes cada una, c.325C>T; p.(Arg109\*), c.335dup; p.(His112Glnfs\*4) y c.1757\_1758delAG; p.(Gln586Argfs\*17). A destacar que una de las pacientes portadoras de la variante c.325C>T (Arg109\*) (descrita previamente como VP asociada a CM) comentó ser descendiente de familia judía pero estaba diagnosticada de cáncer de ovario y no de cáncer de mama.

**Tabla 17.** Resumen de los resultados del panel NGS de nuestra cohorte de CMOH y las poblaciones control.

Grupo Clínico	N de pacientes (%)	Genes estudiados por Fenotipo	N Variantes Patogénicas (%)	ERCC3 (%)	ERCC3 excluyendo pacientes con otras variantes patogénicas <sup>§</sup> (%)
Sólo cáncer de mama, CMH	818 (62%)	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, TP53</i>	<b>85 PP/P (10,39%):</b> 28 <i>BRCA2</i> , 22 <i>BRCA1</i> , 11 <i>ATM</i> , 11 <i>PALB2</i> , 5 <i>CHEK2</i> , 3 <i>RAD51C</i> , 2 <i>BRIP1</i> , 2 <i>MSH6</i> , 1 <i>MLH1</i>	7 (0,85) OR=3,54 (1,39-7,54)** p=0,005	4 (0,54) OR=2,25 (0,6-5,93) p=0,11
Sólo cáncer de ovario, COH	298 (23%)	<i>BRIP1, BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, RAD51C, RAD51D</i>	<b>36 PP/P (12,08%):</b> 17 <i>BRCA2</i> , 10 <i>BRCA1</i> , 4 <i>BRIP1</i> , 2 <i>RAD51D</i> , 1 <i>MSH6</i> , 1 <i>PALB2</i> , 1 <i>RAD51C</i>	3 (1,00) OR=4,17 (0,84-12,58)* p=0,04	3 (1,14) OR=4,74(1-14,34)* p=0,28
Cáncer de mama y ovario, HBOC	195 (15%)	<i>ATM, BRIP1, BRCA1, BRCA2, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, RAD51C, RAD51D, TP53</i>	<b>41 PP/P (21,02%):</b> 21 <i>BRCA1</i> , 12 <i>BRCA2</i> , 2 <i>ATM</i> , 2 <i>BRIP1</i> , 2 <i>CHEK2</i> , 1 <i>PALB2</i> , 1 <i>RAD51C</i>	3 (1,5) OR=6,4 (1,29-19,42)* p=0,013	1 (0,65) OR=2,68(0,07-15,42) p=0,315
<b>Total</b>	<b>1311</b>		<b>162 (12,36%)</b>	<b>13 (0,99)</b> OR=4,1 (2,12-7,3) ** p=4,44 x 10 <sup>-5</sup>	<b>8 (0,70)</b> OR=2,87(1,21-5,86)** p=0,009
<b>Cohorte de controles</b>					
			Cohorte de población española (453)	<b>1 (0,22 %)</b>	
			Individuos GnomAD 51,343 (Europeos no-Finlandeses, no-cáncer)	<b>125 (0,24%)</b>	

<sup>§</sup>Paciente con VP en *FLCN* no fue excluida porque *FLCN* no se asocia a CMOH.

\* $\alpha < 0.05$  \*\* $\alpha < 0.01$

Las características clínicas de los pacientes portadores de variantes de *ERCC3* están descritas en la Tabla 18. Considerando sólo aquellos pacientes sin otra variante en genes de moderada/alta penetrancia para CMOH, cinco pacientes fueron diagnosticadas de cáncer de mama siendo el diagnóstico en ellas a una edad más temprana que la población general (35 años, rango 20-62). Dos pacientes desarrollaron un cáncer de mama receptor de estrógenos positivos, Her2 negativo, 1 paciente un carcinoma intraductal, 1 paciente un cáncer de mama triple negativo (RE, receptor de progesterona

(RP) y Her2 negativos) y otra paciente un cáncer Her2 positivo (RE y RP negativos). Todos los casos de cáncer de mama invasivo fueron tumores de alto riesgo y con índice de proliferación alto. Las pacientes fueron tratadas mediante cirugía, quimioterapia y radioterapia cuando estuvo indicada. Presentaron una evolución que se solapa a las series de pacientes ya publicadas con este tipo de tumor. Ninguna de ellas presentó recaída tumoral.

Respecto al grupo de pacientes de cáncer de ovario, cuatro pacientes fueron diagnosticadas con una mediana de edad de 65 años (56-77), dos de ellas de un tumor con células claras (50%). Esta proporción es más alta de lo esperado, aunque puede tratarse de un sesgo por el pequeño número de pacientes. Todas las pacientes presentaron una evolución similar: fueron diagnosticadas con estadio IIIC de FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetric) y presentaron buena respuesta a la quimioterapia basada en platinos neoadyuvante pero todas recayeron tras la cirugía.

Como se comentaba previamente, cabe destacar que 5 de los 13 pacientes con *ERCC3* también eran portadores de una mutación adicional en un gen de predisposición a CMOH y podrían ser considerados casos de síndrome de neoplasias hereditarias múltiples (MINAS del inglés *multilocus inherited neoplasia alleles syndrome*). (Tabla 18 y Figura 10)

**Tabla 18.** Pacientes portadores de VP en *ERCC3*, historia personal y familiar y otros hallazgos del estudio genético.

Familia	Indicación clínica	Tumor (s) caso índice	Edad dx (a)	Mutación <i>ERCC3</i>	Otras Neoplasias (a)	Variante patogénica adicional
1	CM	CM RE+	20	c.325C>T; p.(Arg109*)	Madre: CM RE+ (50)	-
2	CMOH	CM RE+, CP	62, 77	c.335dup; p.(His112Glnfs*4)		-
3	CM	CID	35	c.583C>T; p.(Arg195*)	Tía materna: CM RE+ (54)	-
4	CO	COCC	64	c.760C>T; p.(Gln254*)		-
5	CM	CM Her2+	44	c.1421_1422insA; p.(Asp474Glufs*2)	Madre: CM RE+ (65) Tía materna: CM RE+ (80)	-
6	CM	CMTN	34	c.1757_1758delAG ; p.(Gln586Argfs*17)		-
7	CO	COSAG	56	c.1757_1758delAG ; p.(Gln586Argfs*17)		-
<b>Casos MINAS <i>ERCC3</i></b>						
8	CO	COSAG, Birt-Hogg-Dubé	66	c.325C>T; p.(Arg109*)	Padre: MC (84)	<b><i>FLCN</i></b> ; c.346C>T; p.(Gln116*)
9	CMOH	COSAG, CMTN	63, 65	c.335dup; p.(His112Glnfs*4)	Madre: CM RE+Her2- (70), cáncer gástrico (80)	<b><i>BRCA1</i></b> : c.5123C>A; p.[Ala1708Glu, Asp1692_Trp1718delinsGly])
10	CMOH	CM RE+, mix COSAG - COCC	49, 50	c.583C>T; p.(Arg195*)	Hermana: CM RE+ Her2- (48) Madre: CM (72) Prima materna: CM (50)	<b><i>BRCA2</i></b> : c.3922G>T; p.(Glu1308*)
11	CM	CM RE+	49	c.583C>T; p.(Arg195*)		<b><i>CHEK2</i></b> : c.349A>G; p.(Arg117Gly)
12	CM	CM RE+ Her2+, CID	48, 58	c.2218-1G>A; p.?	Madre: CM (60), Hermana: Cáncer de colon (48)	<b><i>BRCA2</i></b> : c.8978_8991del; p.(Ser2993Phefs*20)
13	CM	CM RE-, Her2+ BC	27	c.658-1G>A; p.?	Padre: osteosarcoma (18), sarcoma fusiforme (57); Hija: tumor de Wilms (1)	<b><i>TP53</i></b> : c.724T>G; p.(Cys242Gly)

CM: cáncer de mama; CO: cáncer de ovario; CMOH: cáncer de mama y ovario; COSAG: cáncer seroso de alto grado de ovario; CMTN: cáncer de mama triple negativo; CID: Carcinoma de mama intraductal (in situ); COCC: Carcinoma de ovario de células claras; CP: carcinoma peritoneal; MC: melanoma cutáneo; RE: receptor de estrógeno (+ positivo, - negativo); Her2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico.

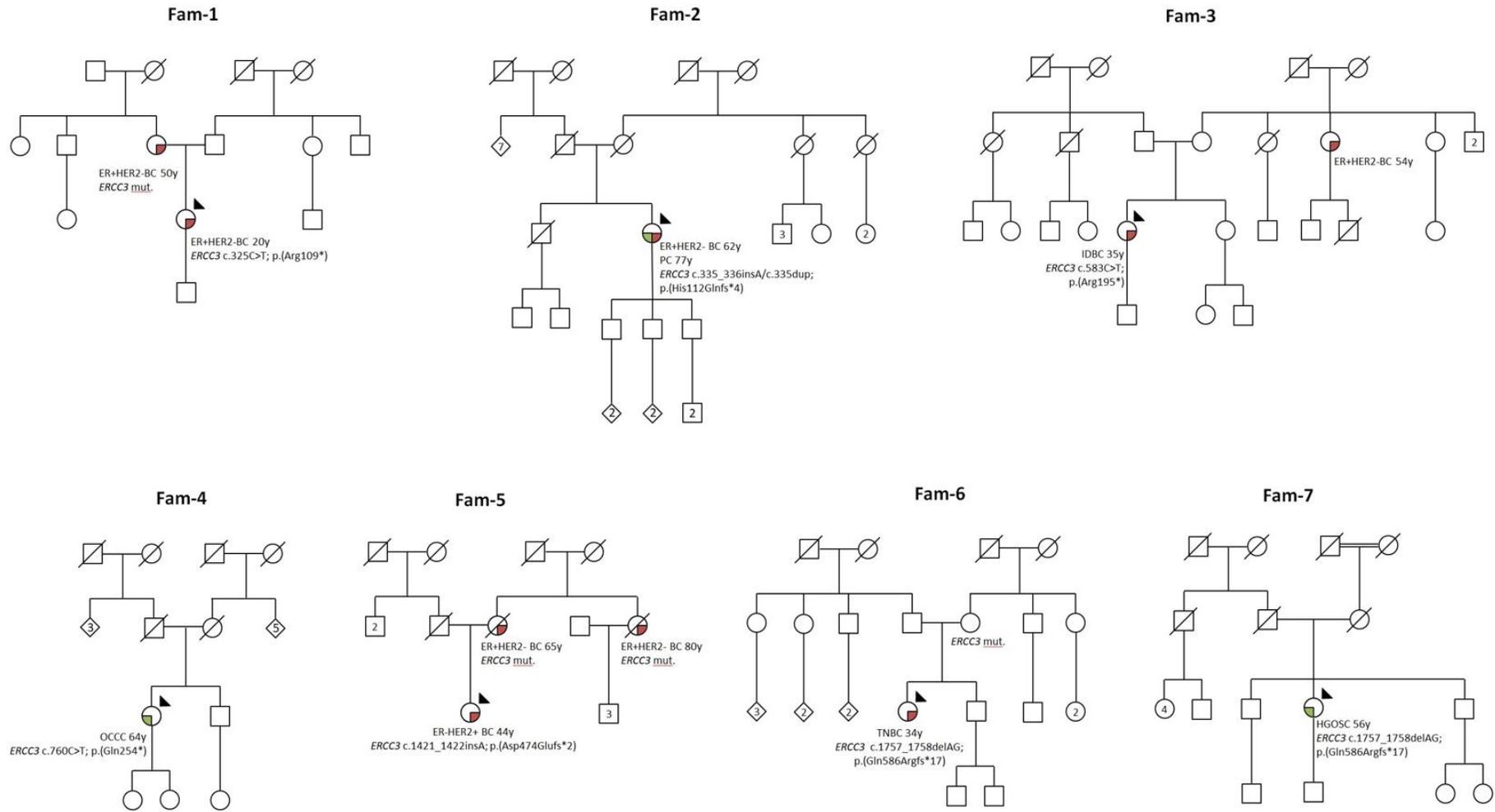


Figura 9. Familias de pacientes portadores de VP en *ERCC3* sin otra VP en genes de susceptibilidad al cáncer. Adaptado de Stradella et al (EJC 2020). Se representan los antecedentes personales y familiares de cáncer y los resultados de la co-segregación. Los cuartos llenos de símbolos indican los pacientes afectados (cada color se refiere a un tipo específico de cáncer/enfermedad). También se detalla la edad en el momento del diagnóstico. El probando está marcado con una flecha. Los estudios directos se realizaron en los familiares disponibles, y los portadores de la variante están marcados con mut (portador de la variante) o wt (no mutado). BC: Cáncer de mama (rojo), HGOSC: Cáncer de ovario seroso de alto grado (verde), IDBC: Ca de mama intraductal (rojo), OCCC: Cáncer de ovario de células claras (verde), PC: Carcinoma peritoneal (verde), TNBC: Cáncer de mama triple negativo, ER: Receptor de estrógenos (+ positivo – negativo); Her2: del inglés human epidermal growth factor receptor 2 (+ positivo – negativo).



Respecto a estos casos, a continuación, los describimos con más detalle:

Familia 9: el caso índice también era portador de una mutación en *BRCA1*, ella había sido diagnosticada de un cáncer de ovario seroso de alto grado a los 63 años y de un cáncer de mama triple negativo a los 65 años. Su madre había desarrollado un cáncer de mama RE positivo, Her2 negativo a los 70 años. Lamentablemente no pudo realizarse el estudio de co-segregación de *ERCC3*.

Dos pacientes eran también portadoras de variantes patogénicas en *BRCA2* (familia 10 y familia 12). La paciente índice de la familia 10 fue diagnosticada de un cáncer de mama RE positivo a los 49 años y de un cáncer de ovario mixto seroso y de células claras a los 50 años. Su madre desarrolló un cáncer de mama RE positivo a los 72 años y su hermana fue diagnosticada de un cáncer de mama RE positivo a los 48 años. El estudio de co-segregación sólo fue realizado a su hermana y demostró que era portadora también de la variante en *ERCC3* pero no de la variante en *BRCA2*.

La paciente de la familia 12 fue diagnosticada de un cáncer de mama RE positivo y Her2 positivo a los 48 años y de un carcinoma in situ en la misma mama a los 58 años. Respecto a su familia, su madre fue diagnosticada de un cáncer de mama (no disponemos de la información del subtipo) a los 60 años y su hermana desarrolló un cáncer de colon a los 48 años.

El caso índice de la familia 11 también presentaba de manera concomitante la variante deletérea c.349A>G (p.Arg117Gly) de *CHEK2* que ya había sido asociada a riesgo de cáncer de mama en población europea (OR de 2,26 (117)). La paciente fue diagnosticada de un cáncer bifocal RE positivo a los 49 años. El estudio de co-segregación demostró que la madre sana de la paciente también era portadora de la variante en *ERCC3*.

La paciente de la familia 13 también era portadora de una variante probablemente patogénica en *TP53*; ella había sido diagnosticada de un cáncer de mama RE negativo Her2 positivo a los 27 años. La historia familiar cumplía los criterios del síndrome de Li-Fraumeni: su hija fue diagnosticada de un osteosarcoma al año y su padre sufrió un sarcoma fusocelular a los 57 años. Ambos resultaron portadores de la variante de *TP53* y su padre también de la variante en *ERCC3*.

Por último, la paciente portadora también de la mutación en *FLCN* (familia 8) desarrolló un cáncer de ovario de tipo seroso de alto grado a los 66 años y además presentaba la clínica clásica del Síndrome Birt-Hogg-Dubé con varios neumotórax espontáneos y quistes renales.

El análisis de co-segregación y de pérdida de heterocigosidad (LOH) también se realizó en algunos casos adicionales; la familia 1 mostró que el caso índice heredó la mutación de su madre, también afectada de un cáncer de mama (carcinoma invasivo RE positivo) a los 50 años. En este caso fue posible realizar LOH en la muestra tumoral de la paciente índice y el análisis mostró una pérdida total del alelo mutado.

El estudio de co-segregación en la familia 5 demostró que la madre y la tía del caso índice eran también portadoras de la variante de *ERCC3* y ambas habían sido diagnosticadas de cáncer de mama a los 65 y 80 años respectivamente. No se evidenció LOH en ninguna de las muestras de los 3 casos. En la familia 6, la variante de *ERCC3* fue heredada de su madre sana y no se identificó LOH de su muestra. El estudio de co-segregación en la familia 10 fue llevado a cabo sólo en la hermana de la paciente índice que había sido diagnosticada de un cáncer de mama a los 48 años. El estudio demostró que también era portadora de la variante en *ERCC3* pero no de la variante de *BRCA2*. En la muestra tumoral del caso índice no se observó pérdida de heterocigosidad. El estudio de co-segregación de la familia 11 demostró que la paciente heredó la variante de su madre sana.

El estudio de secuenciación masiva (NGS) realizado a 453 controles sanos de nuestra población identificó solo una variante patogénica en *ERCC3* (0,22%). También se analizó la frecuencia de variantes truncantes en *ERCC3* en la cohorte de individuos europeos no finlandeses (no-cáncer) GnomAD 2.1.1 observándose una incidencia del 0,24% (125 portadores de variantes en heterocigosis de la cohorte de 51.343 individuos). Para poder comparar estos datos con nuestra serie excluimos aquellos casos con variantes patogénicas en *BRCA1/2*, *TP53* y *CHEK2* ya que estas mutaciones por si solas pueden ser responsables del fenotipo desarrollado por las pacientes. No excluimos el caso de la paciente portadora de mutación en *FLCN* porque este gen no está relacionado con el síndrome de CMOH. Tras este análisis encontramos una asociación con tendencia a la significancia estadística para el cáncer de mama con una OR= 2,25 (CI=0,6-5,93 y  $p=0,011$ ), como ya había sido publicado; pero, curiosamente, también observamos una asociación con cáncer de ovario con OR=4,74 (CI=1-14,34 y  $p=0,028$ ). Además, la existencia de una variante en *ERCC3* demostró un riesgo elevado para desarrollar el fenotipo de cáncer de mama y cáncer de ovario, pero sin presentar una diferencia estadísticamente significativa, OR=2,68 (CI=0,07-15,42 y  $p=0,315$ ) (tabla 17).

#### **5.4 Pacientes portadores de dobles mutaciones. (Objetivo 4)**

De la cohorte de pacientes estudiadas mediante panel de genes y que consintieron para realizar el estudio de investigación se incluyeron en este estudio 1023 pacientes no relacionados visitados en las Unidades de Consejo Genético del Institut Català d'Oncologia.

En la serie analizada y publicada en 2018 en JMG (Stradella et al.(118)) identificamos 13 portadores de variantes patogénicas en más de 1 gen relacionado a un incremento de riesgo de desarrollar una neoplasia (1,37%). (Tabla 19, Figuras 11 y 12). Esto representó el 5,75% de los pacientes portadores de variantes patogénicas de nuestra serie.

Nueve pacientes presentaron una variante patogénica en un gen de alta penetrancia (Familia 1-Familia 9); todas mostraron asociación con el fenotipo clínico del caso índice. En estas familias, la variante deletérea en el segundo gen no se asoció al fenotipo excepto en el caso de la Familia 2. En este caso dos hermanas eran portadoras de 2 variantes patogénicas en genes de alto riesgo (*MLH1* y *MEN1*); una de ellas presentó un fenotipo con manifestaciones clínicas de ambos síndromes hereditarios mientras que la otra hermana sólo presentó manifestaciones clínicas relacionadas al síndrome de *MEN1*.

**Tabla 19.** Características clínicas de las familias MINAS y variantes identificadas.

N Familia	Fenotipo	Tumor/Enfermedad	Edad Dx	Edad actual (β) /muerte(£)	Variante Patogénica A*	Variante Patogénica B*
Fam-1	PAFA	Poliposis colorectal	76	77(£)	<i>APC</i> [c.423-3T>A; p.(Arg141Serfs*8)]	<i>BRCA1</i> [c.1961delA; p.(Lys654Serfs*47)]
Fam-2 (probando)	MEN1	Tumor neuroendocrino Adenoma hipotuitario Hiperplasia paratiroidea Hemangiomas hepáticos	41 36 39 29	45(β)	<i>MLH1</i> [c.244A>G; p.(Thr82Ala)]	<i>MEN1</i> (c.784-9G>A; p.[Lys267Valfs*28,Arg280Serfs*2])
Fam-2 (hermana)	CCHNP, MEN1	Carcinoma uterino Cáncer colorectal Hemangiomas Hiperparatiroidismo	41 48 45 45	52(β)	<i>MLH1</i> [c.244A>G; p.(Thr82Ala)]	<i>MEN1</i> (c.784-9G>A; p.[Lys267Valfs*28,Arg280Serfs*2])
Fam-3	CMOH	Cáncer de ovario	45	51(β)	<i>BRCA1</i> [c.607C>T; p.(Arg1203*)]	<i>TP53</i> [c.659A>G; p.(Tyr220Cys)]
Fam-4	Esclerosis Tuberosa	Tumores subcutaneous benignos-hamartomas Epilepsia	6	28(β)	<i>TSC2</i> [c.5227C>T; p.(Arg1743Trp)]	<i>RAD51D</i> [c.694C>T; p.(Arg232*)]
Fam-5	Síndrome de Reed	Leimiomas cutáneos	40	47(β)	<i>FH</i> (c.905-2A>G; p.?)	<i>BARD1</i> [c.157delT; p.(Cys53Valfs*5)]
Fam-6	PAFA	Poliposis colorectal Cáncer colorectal	52 53	55(β)	<i>APC</i> [c.5826_5829del; p.(Asp1942Glufs*27)]	<i>EXO1</i> [c.1900C>T; p.(Arg634*)]
Fam-7 (probando)	CMOH	Cáncer de ovario	51	57(β)	<i>BRCA1</i> [c.2309C>A; p.(Ser770*)]	<i>XPA</i> [c.553C>T; p.(Gln185*)]
Fam-7 (hermana)	CMOH	Cáncer de ovario	37	38(β)	<i>BRCA1</i> [c.2309C>A; p.(Ser770*)]	<i>XPA</i> [c.553C>T; p.(Gln185*)]
Fam-8	CMOH-Birt-Hogg-Dubé	Cáncer de ovario Neumotórax (x5)	66 33	68(β)	<i>FLCN</i> [c.346C>T;p.(Gln116*)]	<i>ERCC3</i> [c.325C>T;p.(Arg109*)]
Fam-9	CMOH	Cáncer de mama Cáncer de páncreas	54 59	59(β)	<i>PALB2</i> [c.3256 C>T; p.(Arg1086*)]	<i>ATM</i> (c.3802delG;p.Val1268*)
Fam-11 &	CMOH	Cáncer de mama bilateral	35	37(β)	<i>CHEK2</i> (c.433C>T; p.(Arg145Trp)]	<i>CHEK2</i> [c.470T>C; p.(Ile157Thr)]
Fam-11 &	CMOH	Cáncer de mama	42	42(£)	<i>CHEK2</i> [whole gene deletion]	<i>CHEK2</i> [c.499G>A; p.(Gly167Arg)]
Fam-12	CMOH	Cáncer de mama	35	38(β)	<i>ATM</i> [c.3712_3716del; p.(Leu1238Lysfs*6)]	<i>FANCA</i> (c.2602-1G>C; p.?)
Fam-13	CMOH	Cáncer de ovario	49	70(β)	<i>SDHB</i> [c.505C>T; p.(Gln169*)]	<i>FANCA</i> [c.3558dupG; p.(Arg1187Glufs*28)]

PAFA: poliposis adenomatosa familiar atenuada, CCHNP: cáncer de colon hereditario no polipósico, CMOH: cáncer de mama-ovario hereditario. Adaptada de Stradella et al JCG 2018.

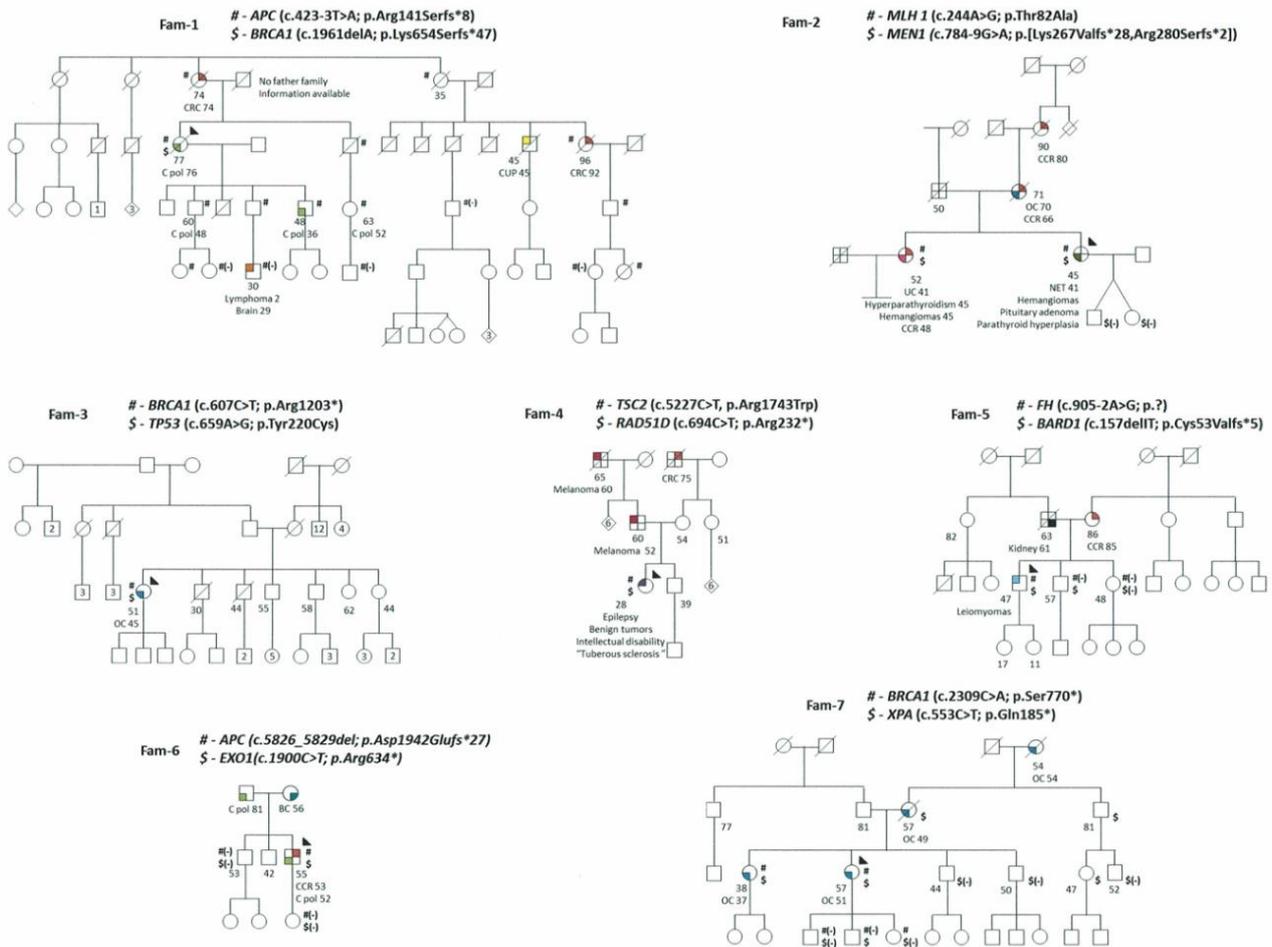


Figura 11. Familias MINAS (adaptado de Stradella et al JMG 2018). Los cuartos coloreados representan los pacientes afectados. También se detallan la edad actual, la edad al diagnóstico y la edad en el momento del fallecimiento. El probando de la familia está marcado por una flecha. Se indica mediante un símbolo el estudio de co-segregación (+ portador, - no portador). Cada tipo de tumor se identifica con un color. BI C: cáncer de vejiga (Amarillo claro), BC: cáncer de mama (esmeralda), Bil BC: cancer de mama bilateral (esmeralda), C pol: poliposis colónica (verde claro), Chondrosarc: condrosarcoma (violeta claro), CRC: Cáncer colorectal (rodo), CUP: carcinoma de origen desconocido (amarillo), Kidney Cancer: cáncer renal (negro), LC: Cáncer de pulmón (gris), Leiomyomatosis:leiomiomatosis (azul claro), Lymphoma: linfoma (naranja), Melanoma (marrón), NET: tumor neuroendocrino (verde oscuro), OC: cáncer de ovario (azul), PC: cáncer de páncreas (naranja claro), Stomach cáncer: cáncer gástrico (gris claro), Tuberosus sclerosis: esclerosis tuberosa (violeta), UC: carcinoma uterino (rosa)

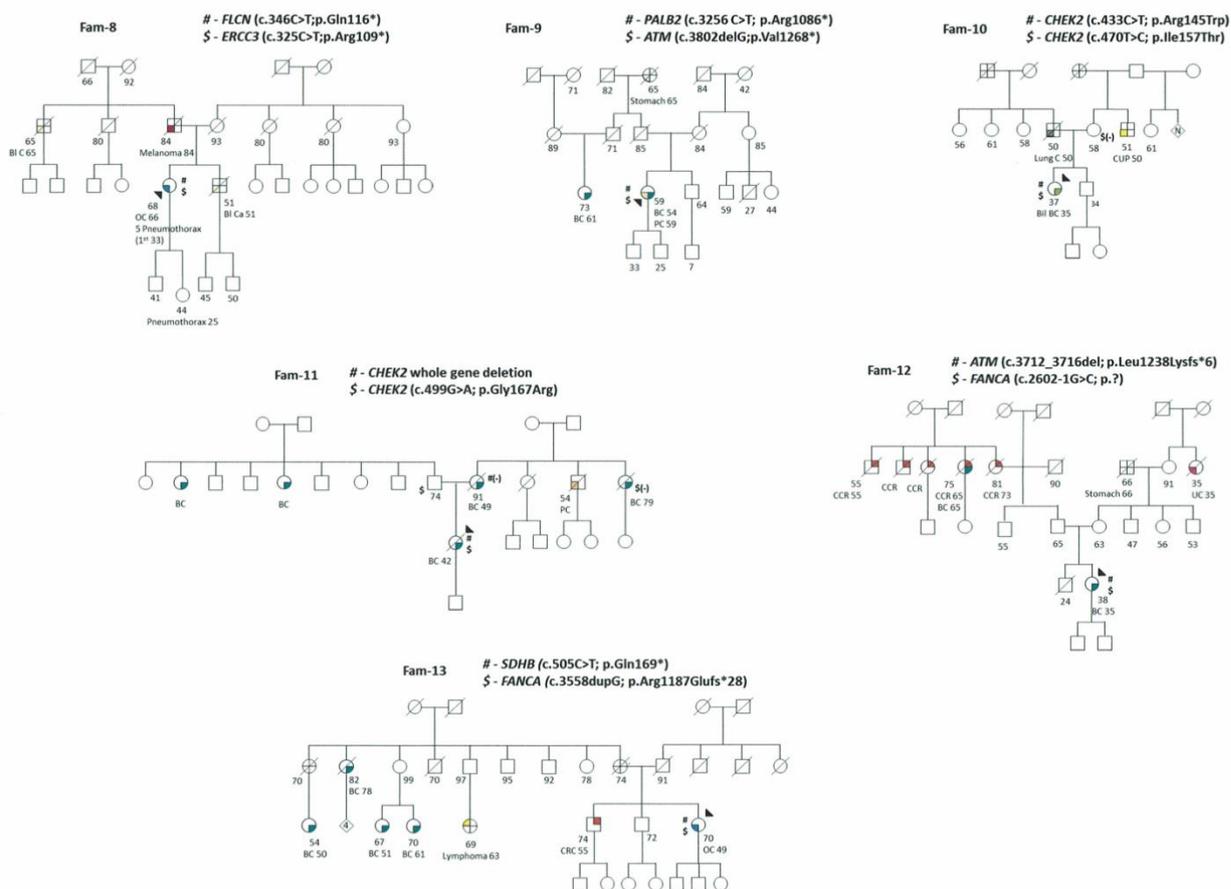


Figura 12. Familias MINAS (adaptado de Stradella et al JMG 2018). Los cuartos coloreados representan los pacientes afectados. También se detallan la edad actual, la edad al diagnóstico y la edad en el momento del fallecimiento. El probando de la familia está marcado por una flecha. Se indica mediante un símbolo el estudio de co-segregación (+ portador, - no portador). Cada tipo de tumor se identifica con un color. BI C: cáncer de vejiga (Amarillo claro), BC: cáncer de mama (esmeralda), Bil BC: cancer de mama bilateral (esmeralda), C pol: poliposis colónica (verde claro), Chondrosarc: condrosarcoma (violeta claro), CRC: Cáncer colorrectal (rodo), CUP: carcinoma de origen desconocido (amarillo), Kidney Cancer: cáncer renal (negro), LC: Cáncer de pulmón (gris), Leiomyomatosis:leiomiomatosis (azul claro), Lymphoma: linfoma (naranja), Melanoma (marrón), NET: tumor neuroendocrino (verde oscuro), OC: cáncer de ovario (azul), PC: cáncer de páncreas (naranja claro), Stomach cáncer: cáncer gástrico (gris claro), Tuberous sclerosis: esclerosis tuberosa (violeta), UC: carcinoma uterino (rosa)

En la Familia 7 dos hermanas que resultaron portadoras de dos variantes deletéreas (*BRCA1* y *XPA*) fueron diagnosticas de cáncer de ovario a los 37 y 51 años respectivamente.

Cabe destacar que en 2 pacientes más la segunda variante deletérea estaba en un gen de alto riesgo (*BRCA1* y *TP53*) mientras que en el resto las variantes estaban en genes asociados riesgo moderado o bajo de cáncer de mama, ovario o colorrectal (*RAD51D*, *XPA*, *BARD1*, *EXO1*, *ATM* y *ERCC3*).

Tres casos (Familias 10, 11 y 12) con sospecha clínica de Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario resultaron ser portadores de dos variantes en genes de moderado-bajo riesgo de cáncer de mama: una de ellas presentó una variante deletérea en *ATM* y en *FANCA* y dos pacientes portadoras de variantes bialélicas en *CHEK2*.

Dos de estas pacientes fueron diagnosticadas de cáncer de mama a edad joven (35 años) y una tercera paciente fue diagnosticada de cáncer de mama metastásica al debut a los 42 años y presentó una mala evolución clínica. Ninguna de ellas tenía antecedentes familiares de cáncer de mama.

La paciente perteneciente a la Familia 13 fue diagnosticada de cáncer de ovario antes de los de 50 años y presentaba una variante patogénica en *SDHB* y *FANCA*, difíciles de asociar con el fenotipo observado.

Estos resultados no nos permiten afirmar que los casos de doble mutaciones tienen un fenotipo más agresivo que en los casos portadores de una sola. Sólo en los casos de 2 mutaciones en genes de moderada penetrancia presentaron un fenotipo algo más agresivo, hecho que debería estudiarse en poblaciones más grandes.

## 6. DISCUSIÓN

En el trabajo incluido en esta tesis se realizó el análisis de variantes genéticas mediante secuenciación masiva para la detección de variantes patogénicas relacionadas con el cáncer hereditario. En nuestra cohorte de 1205 pacientes identificamos un 13% de VP en individuos que cumplían criterios clínicos de estudio genético y que se estudiaron mediante paneles de genes dirigidos por fenotipo además del cribado de los genes oportunistas *BRCA1/2* y los genes MMR. Cuando el estudio se amplió con el grupo de genes de investigación el incremento del rendimiento de VP fue modesto (2%). En general, la frecuencia de VPs identificadas es semejante a otras series europeas publicadas (119–121).

Respecto al hallazgo de variantes de significado desconocido, el porcentaje de pacientes portadores de al menos una VSD fue del 30% cuando se analizó el panel de genes dirigido por fenotipos y aumentó hasta el 65% cuando se amplió el estudio con el core de genes de investigación, datos que también concuerdan con los publicados previamente (77,122,123). Debido a la diferencia de la metodología utilizada para analizar el estudio de grandes reordenamientos se decidió no incluir las alteraciones en el número de copias, motivo por el que consideramos que la detección de VP en nuestra serie puede estar infravalorada.

El cribado de genes oportunistas identificó un individuo portador de una VP en *BRCA1*, un portador de VP en *BRCA2* y 5 en *MSH6* lo que incrementó el rendimiento del panel en un 0,6%. De los portadores de VP en *MSH6* 4 (uno con CM, 2 con CO y 1 con glioblastoma) no habían realizado el screening molecular de las proteínas MMR porque cumplían criterios para estudio de panel para otro fenotipo. La restante paciente, afecta de CM y cáncer de endometrio mostraba normal expresión de *MSH6* y según este criterio no hubiese sido estudiada. Estos hallazgos fueron accionables tanto para los pacientes portadores como también para sus familias, donde se realizaron estudio de co-segregación en 13 de los 29 familiares identificados. Dada la frecuencia de estos síndromes de susceptibilidad al cáncer (1/200 para CCHNP y 1/500 para CMOH)(21,100,124,125), la tendencia a realizar cada vez más estudio genéticos mediante NGS y el rendimiento obtenido en este trabajo, consideramos que estos genes deberían incorporarse a todos los estudios independientemente del fenotipo por el que se estudie al paciente. Respecto a *PMS2*, a pesar de no estar incluido dentro del cribado de genes oportunistas, consideramos que debe valorarse si la calidad del estudio puede garantizar los resultados.

Sin considerar *BRCA1/2*, entre los individuos estudiados por CM principalmente se identificaron VP en *PALB2*, *CHEK2* y *ATM* mientras que en las familias con CO se detectaron más VP en *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*. A destacar que se identificaron VP en genes relacionados a CO en pacientes con CM y sin historia familiar de CO cuando se analizó el panel de investigación de 24 genes, hecho que refuerza la idea que a las familias con CM y/o CO se las debería estudiar mediante el mismo panel de genes. De acuerdo con la evidencia actual (32,97,126) las portadoras de VP en estos genes se podrían beneficiar de medidas específicas de reducción del riesgo del CO, por lo que incluirlos en el panel de genes para CM sería razonable. Respecto a los genes asociados a CM *PALB2*, *CHEK2* y *ATM*, no se identificaron VP en pacientes con CO, por lo que seguirían relacionados sólo a CM.

Aproximadamente un cuarto de los pacientes (24%) con sospecha de CCHNP debido a su historia familiar o por ser diagnosticado a edad joven resultaron portadores de una VP en genes con asociación conocida al síndrome. Este alto rendimiento se puede deber al cribado molecular previo que se les realizó a los pacientes. Por el contrario no se evidenciaron PV en pacientes con tumores con reparación eficiente a pesar de presentar una clínica sospechosa. La mayoría de las VP se identificó en *MSH6* comparada con *MLH1* y *MSH2* (23 vs 14 y 13 respectivamente), lo que refleja que la distribución histórica de los VP ha sido probablemente impulsada por los criterios clínicos para el estudio (68). De especial interés la identificación de 4 pacientes con diagnóstico de cáncer de colon a edad joven a quienes se les realizó el estudio por sospecha de CCHP con tumor con reparación eficiente y que resultaron ser portadores de VP en *CHEK2* y *ATM*. En la actualidad, a pesar de que se ha descrito un leve aumento del riesgo de CCR asociado a ambos genes, no hay evidencia sólida de un aumento del riesgo considerable de CCR en las series reportadas (127–129). Por este motivo, consideramos que estos resultados no modificarán las recomendaciones de cribado ni consideramos que esté indicado añadir estos genes en el panel dirigido para CCHNP.

El análisis de *TP53* se incluyó en el panel dirigido para CM sin importar la edad del diagnóstico de la neoplasia o si se cumplían los criterios de sospecha de Li-Fraumeni. No se hallaron VP en los individuos estudiados por CM, la única VP que se identificó fue en un paciente que cumplía con los criterios de Chompret (130). El estudio publicado por Rana y colaboradores (131) identificó que la incidencia de VP en pacientes a los que se le realizaba el panel por CM era del 0,3% mientras que en pacientes que cumplían criterios de Li-Fraumeni era del 4%. A pesar de la baja tasa de VP, y de los retos que supone el asesoramiento genético de los hallazgos en *TP53* (132) en ausencia de

criterios clínicos sospechosos, este gen se incluye en muchos paneles de CM (109,133). Nuestros resultados apoyan la propuesta de restringir el análisis de *TP53* cuando la historia individual o familiar cumple criterios de Chompret o en casos de CM en menores de 35 años como ya se recomienda por otros autores (132).

El análisis exhaustivo del panel permitió identificar 26 PV adicionales. De ellas, 22 se encontraron en genes con evidencia de asociación con el riesgo de cáncer (*APC*, *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *POLE*, *PTEN*, *RAD51C* y *RAD51D*) y cuatro en el *NBN*, donde sólo la mutación eslava fundadora se ha asociado con el CM (21,134,135). Profundizando en las VP identificadas en genes accionables, 3 VP en genes asociados a cáncer de ovario (*BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*) fueron identificadas en pacientes con cáncer de mama por lo que se propone incluirlos también en dicho panel. Las VP en *CHEK2*, *ATM* y *PALB2* fueron descritas en 0,5% de los pacientes, pero creemos que un análisis coste-beneficio se debería hacer antes de plantear incorporarlos al cribado de genes oportunistas. Respecto a *RAD51D* el papel de este gen en la susceptibilidad a CM está en investigación (99,134), hay algunos datos que sugieren una posible relación con CM tipo tiple negativo, aunque dada la baja frecuencia de dicho subtipo tumoral el riesgo absoluto sería bajo.

Respecto a la identificación de una VP en *CDH1* y en *PTEN* en el panel core de investigación creemos que posiblemente estas variantes se podrían identificar por las características fenotípicas de las familias, por lo que se consideró que no estaría indicado incluirlos en el panel por fenotipos.

Es conocido el incremento de identificación de VSD con los estudios de secuenciación masiva (77,122), en nuestro estudio el ratio de detección está en el rango alto. Para la clasificación de las variantes seguimos principalmente las guías de la ACMG, pero también las del consorcio ENIGMA e INSIGHT cuando se consideró indicado. Se ha reportado que las guías de la ACMG dejan un margen a la interpretación permitiendo un 40% de diferencias en la clase III vs otras clases entre los distintos laboratorios (136). Posiblemente nuestra ratio fue elevada por tener un manejo más conservador.

Desde nuestro punto de vista, los paneles basados en el fenotipo asociado al cribado de genes oportunistas son un enfoque conservador pero eficiente para ofrecer un diagnóstico de susceptibilidad genética al cáncer en comparación con los estudios de secuenciación masiva amplios. Las principales razones para proponer este enfoque están relacionadas con la incertidumbre en las estimaciones de riesgo de cáncer y/o el espectro de riesgo de cáncer para algunos de los genes, lo que ha demostrado traducirse en

incertidumbre en los pacientes (137). En un entorno de diagnóstico, creemos que los laboratorios pueden necesitar centrarse en los estudios de genes accionables desde el punto de vista clínico. Además, se debe considerar que los paneles amplios llevan a una detección de VSD alta y requieren esfuerzos continuos de investigación para la reclasificación de las variantes (138,139).

En un entorno donde el uso de paneles multigenes ya está incorporado a la práctica habitual un punto importante a tener en cuenta es la incertidumbre que hay sobre qué pacientes con un estudio genético previo negativo podrían beneficiarse de realizar un nuevo estudio más extenso. La falta de predictores clínicos junto con el elevado número de familias obliga a plantear estrategias para ofrecer un nuevo estudio (*retest*). Para este aspecto es clave el concepto de utilidad clínica o accionabilidad (83). Utilidad clínica/ accionabilidad se refiere a aquellos hallazgos que conducirán a un cambio en el manejo de los pacientes, en el ámbito del cáncer hereditario se refiere tanto a las recomendaciones para el seguimiento de los pacientes como a la posibilidad de ofrecer cirugías reductoras de riesgo(82,85).

En nuestro estudio analizamos una cohorte de 568 casos con sospecha de CMOH y con estudio previo de *BRCA1/2* negativo, donde identificamos 60 nuevas VP (10,56%), 24 (40%) se presentaron en genes de alto riesgo y 36 (60%) en genes de moderado riesgo. En estudios previamente publicados la ratio reportada de VP oscila entre 3,5 al 11% (77,80,82,84–89), diferencias que se explican porque son series muy heterogéneas y son pocos los estudios que analizan los hallazgos del panel en paciente con estudio previo de *BRCA1/2*. Cuatro estudios que valoraron retestar a pacientes con un estudio previo de *BRCA1/2* negativo informaron también un rendimiento del 11% de variantes patogénicas (77,82,84,89) pero ninguno de ellos con población europea. La serie reportada por Kurian y colaboradores (77) incluyó 198 pacientes de los cuales 141 habían sido estudiados para *BRCA1/2* sin hallarse mutaciones; en ellos se identificaron 16 VP (11,4%). La cohorte publicada por Yadav (82) incluyó 122 pacientes *BRCA1/2* negativo e identificaron 13 portadoras de VP (11%). Otra serie americana (84) de 278 pacientes evidenció 31 pacientes con VP (11%), Por último, la serie coreana reportada por Park y colaboradores analizó una serie de 700 mujeres con cáncer de mama y con estudio *BRCA1/2* negativo e identificaron 76 portadoras de VP (10,9%).

Cabe destacar que un estudio de población americana (80) con un gran tamaño de la muestra identificó variantes deletérea sólo en el 3,8% de las pacientes que realizaron un panel tras obtener un resultado no informativo de *BRCA1/2*. El mayor rendimiento en

nuestro estudio, en consonancia con las series comentadas, podría deberse a los criterios de selección de la cohorte, ya que sólo se ofreció ampliar el estudio mediante panel a un grupo seleccionado de pacientes que fueron remitidas de nuevo a la consulta de asesoramiento genético por el fenotipo familiar de alto riesgo (el 68% son pacientes que seguían controles en la unidad por considerarse de alto riesgo por historia familiar y el estudio se realizó para ajustar riesgo).

Respecto a las VP identificadas, 24 (40%) se presentaron en genes de alta penetrancia y 36 (60%) en genes de moderada penetrancia. El gen donde se hallaron variantes patogénicas con mayor frecuencia fue *PALB2* (17: 28,33%), seguido de *ATM* (11: 18,33%), *RAD51D* (8: 13,33%), *RAD51C* (6: 10%) y *CHEK2* (6: 10%). A comentar que también se identificaron 2 VP en *BRCA1* y *BRCA2* (ambas variantes intrónicas en regiones no incluidas en el estudio previo por secuenciación Sanger) Estos datos se solapan casi por completo a las series publicadas con anterioridad (77,80,82,85,87), las pequeñas diferencias se deben a la elección de los genes incluidos en los paneles.

En relación al cribado de genes oportunistas, en nuestra serie se encontraron 3 portadoras de VP en *MSH6* y 1 en *MSH2*. De los portadores de VP en *MSH6* ninguno cumplía criterios de estudio para CCHNP. Sólo una paciente había sido diagnosticada de cáncer de colon a los 62 años, pero su familia no cumplía criterios Ámsterdam II y su tumor de colon era eficiente. Además, es portadora también de una VP *ATM*, lo que podría justificar su fenotipo. Respecto a la paciente portadora de mutación en *MSH2* el estudio se realizó porque había sido diagnosticada de cáncer de mama a los 30 años. En la historia familiar destaca su padre con una neoplasia de colon a los 49 años y el abuelo paterno una neoplasia de colon diagnosticada a los 31 años, lo que pudiera haber llevado a realizar estudio de CCHNP en la familia. Como se comentaba previamente con los resultados publicados por Feliubadaló y colaboradores (79), dada la accionabilidad de estos genes oportunistas consideramos que debe plantearse su inclusión cuando se valore ampliar el estudio en paciente con *BRCA1/2* negativo.

Tras realizar los estudios de co-segregación en los familiares directos se analizó su utilidad clínica y evidenciamos que en 37 casos (67,2%) este hallazgo produjo un cambio en las medidas de seguimiento y/o recomendaciones de cirugías profilácticas. En las diferentes series publicadas la accionabilidad varía del 4,7% al 85% (77,80,82,86). Es importante distinguir entre la accionabilidad y utilidad clínica real en los pacientes individuales. No todas las mutaciones accionables conducen a una intervención significativa ya que factores específicos del paciente desempeñan un papel importante a

la hora de determinar el impacto clínico de un gen accionable. Por ejemplo, una paciente portadora de una VP en *RAD51C* tenía ya realizada una ooforectomía bilateral y por la historia familiar ya cumplía con los controles mediante mamografía y RM mamaria. En otro caso, una paciente portadora de una variante deletérea en *PALB2* tenía enfermedad metastásica, por lo que no se indicaron nuevas medidas de seguimiento. Habitualmente la utilidad clínica es mayor en los familiares que en los pacientes a quienes se les realiza el estudio. En nuestra serie la mayoría de las VP se presentaron en genes donde las recomendaciones de seguimiento están bien establecidas, como es el caso de los hallazgos en *BRCA1/2*, *PALB2*, *TP53*, *RAD51C*, *RAD51D* y los genes de MMR. Para los genes de moderada penetrancia *ATM* y *CHEK2* donde la utilidad clínica es más dudosa (109,140) el asesoramiento genético está siendo más complejo y lento debido a la necesidad de individualizar caso a caso.

En este momento, basándonos en nuestro estudio y en estudios anteriores (80,82), es muy difícil determinar a qué subgrupo de pacientes con *BRCA 1/2* negativos se les debe ofrecer ampliar el estudio mediante un panel de genes. Es importante señalar que los antecedentes familiares por sí solos no siempre identifican a los pacientes que podrían beneficiarse de un nuevo estudio. Uno de los factores más importantes a tener en cuenta es la relevancia clínica de los genes a estudiar. Incluso para los genes de alta penetrancia, como el *TP53*, las recomendaciones clínicas tienen que ser individualizadas. Por ejemplo, a nuestra paciente portadora de una variante patogénica en *TP53* dada la historia personal y familiar de cáncer se le ofreció realizar seguimiento dermatológico, *whole body* RMN anual, RMN SNC, analítica sanguínea anual, RMN mamaria anual y valorar mastectomía contralateral profiláctica. En muchos casos, donde no hay una clínica florida de cáncer en la familia estas recomendaciones no son claramente beneficiosas y pueden generar mucho malestar en las personas portadoras, tanto como que les lleve a rechazar el estudio (89,137,141).

Nuestro estudio demuestra la viabilidad y el beneficio clínico de la ampliación del estudio mediante un panel de genes dirigido por fenotipo en pacientes con estudio previo de *BRCA1/2* negativo, demostrando un rendimiento del 11% para las variantes patogénicas con una accionabilidad del 67,2%.

Sin embargo es importante aclarar que debido a la complejidad de la información, la posible ambigüedad de los resultados y la escasez de consensos de manejo basadas en la evidencia, la ampliación del estudio, debe realizarse en el marco de un asesoramiento

genético previo y posterior al estudio y por parte de profesionales con conocimientos y experiencia en cáncer hereditario.

Uno de los objetivos que ha tenido siempre la implementación de los estudios de secuenciación masiva es la búsqueda de nuevos genes que puedan explicar los casos de pacientes con gran carga familiar de neoplasias o casos de presentación atípica (edad de diagnóstico temprana o evolución no habitual). Es el caso del cáncer de mama ovario hereditario múltiples trabajos han estudiado el papel de diferentes genes de moderada y baja penetrancia como *ATM*, *CHEK2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, pero sólo representan en torno al 5% de los casos (19) por lo que la búsqueda se ha mantenido, habitualmente centrada en genes que interactúan directamente con *BRCA1/2* o que están implicados en la reparación homóloga (RH) del DNA.

En este escenario *ERCC3*, gen implicado en la reparación por escisión de nucleótidos al codificar una proteína ATPasa/helicasa involucrada en la reparación del DNA; emergió como un buen candidato para analizar en pacientes con cáncer de mama ovario hereditario (CMOH). Variantes bialélicas en *ERCC3* han sido descritas como causa del Xeroderma Pigmentoso/Síndrome (101) pero su rol como gen de susceptibilidad al cáncer no está establecido claramente. Una variante truncante en *ERCC3* en heterocigosis recurrente fue relacionada con un incremento del riesgo de CM en individuos con ascendencia judía Ashkenazi (102). Esta variante, c.325C>T p.Arg109\*(R109X), fue identificada mediante secuenciación de exomas en 3 individuos de la misma familia con *BRCA 1/2* no mutado al analizarse una cohorte de pacientes judíos Ashkenazis con diagnóstico de CM a edad joven. El estudio posterior de casos-contrroles para esta variante en 3286 pacientes con CM y 2761 individuos judíos Ashkenazis sanos reveló que los portadores de dicha variante tenían un incremento de riesgo para CM de 1,53 ( $p=0,023$ ) y para CM RE positivo de 1,73 ( $p=0,007$ ).

Con el objetivo de analizar el papel de *ERCC3* como gen de riesgo para cáncer de mama y/o ovario se realizó el estudio exhaustivo de las regiones codificantes. En nuestra cohorte de 1311 individuos con sospecha de CMOH identificamos 13 portadores de variantes deletéreas en *ERCC3*. Nuestros datos evidenciaron que los portadores de VP en heterocigosis en *ERCC3* presentaron un riesgo significativamente mayor para desarrollar cáncer de ovario (OR= 4,74) y se evidenció una tendencia, aunque no significativa, para el cáncer de mama (OR=2,25). Es la primera vez que se reporta la asociación de *ERCC3* y cáncer de ovario.

Tras la identificación de la primera mutación fundadora Ashkenazi (R109X) (102), se han descrito variantes de *ERCC3* en 17 pacientes con CM (86,103–105) y en siete pacientes con otros tumores no relacionados (105,106) lo que sugiere su posible papel en la predisposición al cáncer. La cohorte más grande de CM publicada incluyó 10047 mujeres afroamericanas y mostró un OR de 2,4 (IC= 1,04-5,86,  $p=0,44$ ) para CM y de 2,76 (IC 1,08-7,10;  $p=0,032$ ) para CM RE positivo (104). La co-ocurrencia con otras mutaciones u otras características clínicas no estaban disponibles.

Es importante señalar que nuestro trabajo es el primero en donde se evidencia un aumento estadísticamente significativo del riesgo de CO de variantes truncantes de *ERCC3* (OR= 4,74 CI: 1-14,34,  $p=0,028$ ). Una serie publicada también en 2020 por el consorcio CZECANCA(142) analizó la relación de *ERCC3* y cáncer de ovario. En su serie de 1333 mujeres con CO la incidencia de VP en este gen fue del 0,15% (0,11% en pacientes sin otra VP en genes de susceptibilidad al cáncer). En un estudio posterior (143), el consorcio revisó los datos de 10574 pacientes con cáncer, y el 0,29% (31 pacientes) tenía VP en *ERCC3*. El análisis de una cohorte checa de individuos sanos (N: 2428) mostró una prevalencia del 0,41% de VP en *ERCC3*. En nuestra cohorte la incidencia de variantes deletéreas fue mayor, del 1% en pacientes con cáncer de ovario y del 1,14% en aquellas pacientes sin otras mutaciones en genes de alto riesgo conocidos. En nuestra cohorte española sana, se identificaron VP de *ERCC3* en el 0,22% de los individuos (1/453), muy similar a la encontrada en los controles europeos no finlandeses de GnomAD (0,24%).

Todas estas diferencias, en conjunto, podrían explicarse por un sesgo entre las dos poblaciones estudiadas que podría estar relacionado tanto con el diferente tamaño de la muestra, pero también a las diferencias en las raíces genéticas entre estas dos poblaciones. En este sentido, es llamativo que mientras la incidencia en nuestros controles es prácticamente la misma que en los controles europeos no finlandeses GnomAD (0,22% frente a 0,24%, respectivamente), los controles checos eran casi el doble (0,45% y 0,41%). Además, podrían existir diferencias en los criterios de estudio de los pacientes. Impresiona que en la cohorte checa los criterios pudieron ser más estrictos ya que tienen una mayor tasa de VP en genes de alta penetrancia (17,8% frente a 12,4%), aunque esto es especulativo ya que no tenemos suficiente información al respecto. Si ese fuera el caso y nuestros criterios fueran más amplios, favorecería que hubiera más pacientes con VP en genes con menor penetrancia, que podría ser el caso de *ERCC3*.

Respecto a otros genes estudiados como relacionados a CO (más allá de los genes *BRCA1/2* y *MMR* (144), en la última década otros genes de alta y moderada penetrancia, como *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* y *BRIP1*(142,145,146). La serie publicada por el consorcio CZECANCA (142) describió asociación con CO para varios genes además de *BRCA* y los genes *MMR*, como *RAD51D* con OR=11,3 (2,6-103,4) y P=<0,001, *RAD51C* con OR= 5,7 (1,7-23,8) y p= 0,001, *BRIP1* con OR= 3,5 (1,1-13) y P= 0,03, *NBN* con OR= 3,5 (1,3-10,2) y P= 0,006, y *PPM1D* con OR= 13,82 (3,24-124,22) P= 0,001. La OR para *ERCC3* en nuestra cohorte es de 4,74 ligeramente inferior a la encontrada para *RAD51C* en el mencionado estudio y superior a la observada para *BRIP1*.

En relación con las características histológicas, mientras que los tumores relacionados con el CMOH son prácticamente todos carcinomas serosos de alto grado, los relacionados con el Síndrome de Lynch son más frecuentemente de tipo endometriode y de células claras (144,147). En nuestra serie hay una alta proporción de casos de células claras de células claras, pero esto podría estar sesgado por el número pequeño de pacientes. En relación con el cáncer de mama, cabe mencionar que nuestros casos se diagnosticaron a una edad media más joven respecto con los casos esporádicos, aunque subtipo de tumor y la evolución coincidieron con los observados en los casos de CM esporádicos.

Después de revisión cuidadosa de los portadores en nuestra cohorte, no esperamos encontrar VP en *ERCC3* en familias con una alta carga de historia familiar de cáncer ya que en familias con estas características se identificó también una VP en otro gen de susceptibilidad al cáncer que también puede explicar el fenotipo. En nuestra serie se identificaron 5 casos de MINAS (*Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome*) y en estudio del consorcio CZECANCA, los autores también identificaron 7 casos. Además, previamente se había reportado 2 casos: Dumbrava (105) describió un paciente de 13 años diagnosticado de un tumor sólido pseudopapilar de páncreas portador de dos variantes patogénicas, una en *MSH6* y otra en *ERCC3* y Tedaldi y colaboradores (103) describieron el caso de una paciente con CM con variantes deletéreas en *BRCA1* y *ERCC3*. Todos estos hallazgos pueden sugerir que las mutaciones de *ERCC3* en esta situación podrían actuar como modificadores del fenotipo, aunque esto debe ser analizado con precaución y requiere pruebas adicionales de grandes cohortes.

En resumen, nuestros resultados aportan pruebas sólidas para confirmar que *ERCC3* podría comportarse como un gen de susceptibilidad al cáncer de mama y más fuertemente su asociación con el cáncer de ovario. Es necesario su análisis en cohortes

más amplias que incluyan una estratificación clínica y molecular de las cohortes para ponderar mejor el riesgo relativo de las portadoras de CM y CO, entre otros tumores. Nuestros datos también indican un posible papel modificador de las mutaciones de *ERCC3* en combinación con variantes patogénicas en genes de alta penetrancia, aunque esto es más especulativo y necesita más datos para ser confirmado.

Así mismo, a medida que los estudios genéticos se expanden y los paneles multigenes se vuelven más abarcadores, se detecta un número creciente de individuos portadores de variantes patogénicas en dos o más genes de susceptibilidad al cáncer. El término MINAS (Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Síndrome) se describió con el objetivo de discernir si los portadores de variantes patogénicas en más de un gen asociado al cáncer hereditario tenían características clínicas específicas o si se asociaban a un fenotipo más grave (81). Los ejemplos más conocidos de pacientes con más de 1 VP son aquellos con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* (81,107,148,149).

En nuestra serie identificamos 13 portadoras de dos VP que representó una incidencia de 1,27% (y un 5,75% de los casos con VP), posteriormente se identificaron 2 individuos más tras realización del estudio de co-segregación. Si bien se ha observado un incremento de los casos MINAS desde la implementación de NGS, lamentablemente la incidencia que hemos evidenciado no puede ser comparada dado que este dato no se ha recogido en las series publicadas.

La situación más frecuente fue la presencia de una VP en un gen de alto riesgo que se relacionaba con el fenotipo del paciente y una segunda VP sin manifestación clínica evidente en el probando ni en su familia. Sólo en una familia se observó un fenotipo mixto donde uno de los portadores de una VP en *MEN1* y en *MLH1* presentó características clínicas de ambos síndromes de cáncer hereditario. La serie más extensa publicada recientemente (107) revisó 385 casos, de los cuales 206 eran portadores de una VP en *BRCA1* o *BRCA2*. Los pacientes presentaron un fenotipo característico de este síndrome sin claros signos clínicos de la segunda VP y, al igual que en otras series, no identificaron un fenotipo más agresivo (150); los casos de fenotipos relacionados a ambas VP fueron anecdóticos.

De manera interesante, en 3 casos diagnosticados de CM a edad temprana se identificaron 2 VP en genes de riesgo intermedio y bajo (2 con 2 VP en *CHEK2* y 1 con 1 VP en *ATM* y otra en *FANCA*), lo que hace sospechar de un posible efecto aditivo. Diferentes estudios han evaluado este posible efecto aditivo pero sin resultados contundentes (81,107,151). Un estudio con población alemana analizó el efecto de la

variante fundadora de *CHEK2* c.1100delC (151) y evidenciaron que las pacientes portadoras de la variante en homocigosis presentaron mayor riesgo de CM que los portadores en heterocigosis. Es importante aclarar que los 2 casos que presentaron ambas VP en *CHEK2* no cumplen estrictamente con la definición de MINAS al estar en el mismo gen, pero realmente creemos que el hecho de observar un fenotipo severo en los tres casos con VP en genes de moderado/bajo riesgo de cáncer hace que merezca la pena destacarlo y que se documente juntos a los casos de MINAS.

Destaca la identificación de VP en genes conocidos de alto riesgo (como *BRCA1*, *TP53* o *RAD51C*) que, en este contexto de dobles mutaciones, se comportan como variantes patogénicas de baja penetrancia sin antecedentes personales o familiares de cáncer. Esto puede deberse a diferentes motivos, como la corta edad del probando, una penetrancia incompleta, una mutación de novo en el probando, un mosaicismo genético, un riesgo menor del esperado para la mutación específica identificada o información familiar incompleta o ausente. Es de esperar que esta situación se pueda aclarar con datos de cosegregación, análisis funcionales o estudios sobre las muestras tumorales. A pesar de que en la actualidad no se conozca la implicación de estas VP en el fenotipo de los pacientes consideramos que se debe ofrecer asesoramiento genético, medidas de seguimiento y estudios de co-segregación a los familiares de primer grado ya que estas VP se encuentran en genes de utilidad clínica claramente conocida.

Sigue existiendo la necesidad de un mayor análisis y seguimiento prospectivo de estos pacientes para mejorar nuestro conocimiento de la relevancia clínica y las consecuencias de los casos MINAS. Además, de potencial interés clínico y científico es la posible relación de dobles mutaciones en genes de riesgo bajo o moderado de cáncer con un fenotipo clínico grave o diagnóstico a edad temprana. Siendo éste un fenómeno infrecuente, es crucial compartir los datos genéticos y clínicos

## 7. CONCLUSIONES

- Nuestros resultados muestran que el abordaje del estudio genético mediante la utilización de paneles de secuenciación masiva dirigida por fenotipo, añadiendo el estudio asociado al cribado de genes oportunistas, ofrece un buen rendimiento de detección de variantes patogénicas en genes de accionabilidad conocida.
- En nuestro estudio la identificación de variantes patogénicas fue del 12,4%, con un incremento del rendimiento del 0,6% con el cribado de genes oportunistas y del 2% adicional con el análisis del panel de investigación. La proporción de pacientes portadores de variantes de significado desconocido fue del 30% en el panel, del 36% cuando se amplió el estudio con genes oportunistas y del 65% con análisis del panel de investigación
- La ampliación del estudio en pacientes con sospecha de cáncer de mama y ovario hereditario y con estudio previo de *BRCA1/2* negativos ha permitido la identificación de variantes patogénicas en genes de alta y moderada penetrancia con una utilidad clínica en más del 60% de los casos analizados.
- El estudio mutacional del gen *ERCC3* en nuestra cohorte de pacientes de CH demuestra una asociación con el cáncer de ovario y sugiere una asociación con el cáncer de mama.
- La implementación de los paneles multigenes ha permitido mostrar que un 1,3% de los casos/pacientes son portadores de más de una variante patogénica en genes de susceptibilidad al cáncer (casos MINAS).
- Nuestros resultados sugieren que en la mayoría de los casos de pacientes con Sd. MINAS no existe un efecto modificador del fenotipo.

## 8. LINEAS DE FUTURO

Actualmente se sigue trabajando en la explotación de los datos fruto del análisis del panel de NGS en pacientes *BRCA* negativas. En concreto se están realizando estudios de co-segregación a los familiares y realizando un estudio de valoración global de la accionabilidad de los resultados.

Además, se está desarrollando un proyecto de investigación con el objetivo de implementar el modelo poligénico de riesgo con la finalidad de ajustar mejor el riesgo de cada paciente como así también las recomendaciones de seguimiento y reducción del riesgo.

Así mismo se están realizando estudios prospectivos de obertura de paneles de investigación para la identificación de nuevas relaciones genotipo-fenotipo así como para la identificación de más casos de pacientes MINAS que serán de gran utilidad para profundizar en el conocimiento de este síndrome de varias mutaciones patogénicas en un mismo paciente.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Robin H. DNA methylation and epigenotypes. *Biochemistry (Moscow)*. 2005;70(5):500–4.
2. Weinberg DH and RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* [Internet]. 2000;100(1):57–70. Available from: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2981683-9>
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
4. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*. 2022;12(1):31–46.
5. Bert Vogelstein, Nickolas Papadopoulos, Victor E. Velculescu, Shibin Zhou LAD, Jr. and KWK. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546–58.
6. Alexandrov LB, Nik-zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR. Europe PMC Funders Group Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2014;500(7463):415–21.
7. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Europe PMC Funders Group Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. 2009;446(7132):153–8.
8. Van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. J., & Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics*. 2001;2(3):196–206.
9. Fox EJ, Salk JJ, Loeb LA. Exploring the implications of distinct mutational signatures and mutation rates in aging and cancer. *Genome Medicine* [Internet]. 2016;8(1):1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-016-0286-z>
10. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 2004;23(38):6445–70.
11. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(2):276–92.
12. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: Towards an understanding of the

- molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Human Genetics*. 2013.
13. Ngeow J, Eng C. Precision medicine in heritable cancer: When somatic tumour testing and germline mutations meet. *npj Genomic Medicine*. 2016;1(September 2015):2015–7.
  14. Abdel-Rahman WM, Peltomäki P. Molecular basis and diagnostics of hereditary colorectal cancers. *Annals of Medicine*. 2004;36(5):379–88.
  15. Abdel-Rahman WM, Mecklin JP, Peltomäki P. The genetics of HNPCC: Application to diagnosis and screening. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2006;58(3):208–20.
  16. PAUL LICHTENSTEIN, PH.D., NIELS V. HOLM, M.D., PH.D., PIA K. VERKASALO, M.D., PH.D., ANASTASIA ILIADOU MS, JAAKKO KAPRIO, M.D., PH.D., MARKKU KOSKENVUO, M.D., PH.D., EERO PUKKALA, PH.D., AXEL SKYTTE MS, AND KARI HEMMINKI, M.D. PD. ENVIRONMENTAL AND HERITABLE FACTORS IN THE CAUSATION OF CANCER. *Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. The New England Journal of Medicine* [Internet]. 2000;343(2):78–85. Available from: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM200007133430201?articleTools=true>
  17. Sud A, Kinnersley B, Houlston RS. Genome-wide association studies of cancer: Current insights and future perspectives. *Nature Reviews Cancer* [Internet]. 2017;17(11):692–704. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.82>
  18. Foulkes WD. Inherited Susceptibility to Common Cancers. *New England Journal of Medicine*. 2008;
  19. Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian S V., Nathanson KL, et al. Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *New England Journal of Medicine*. 2015;
  20. Kamps R, Brandão RD, van den Bosch BJ, Paulussen ADC, Xanthoulea S, Blok MJ, et al. Next-generation sequencing in oncology: Genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(2).
  21. Nadine Tung, Susan M Domchek, Zsofia Stadler, Katherine L Nathanson, Fergus

- Couch, Judy E Garber, Kenneth Offit MER. Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(9):581–8.
22. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkäs K, Roberts J, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 2014;69(11):659–60.
23. González-Santiago S, Ramón y Cajal T, Aguirre E, Alés-Martínez JE, Andrés R, Balmaña J, et al. SEOM clinical guidelines in hereditary breast and ovarian cancer (2019). *Clinical and Translational Oncology* [Internet]. 2020;22(2):193–200. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02262-0>
24. Kyriaki Michailidou 1, Jonathan Beesley 2, Sara Lindstrom 3, Sander Canisius 4, Joe Dennis 1, Michael J Lush 1, Mel J Maranian 5, Manjeet K Bolla 1, Qin Wang 1, Mitul Shah 5, Barbara J Perkins 5, Kamila Czene 6, Mikael Eriksson 6, Hatef Darabi 6, Judith S JC-C. Genome-wide association analysis of more than 120,000 individuals identifies 15 new susceptibility loci for breast cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2015;47(4):373–80. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/25751625/>
25. Sampson JN, Wheeler WA, Yeager M, Panagiotou O, Wang Z, Berndt SI, et al. Analysis of heritability and shared heritability based on genome-wide association studies for thirteen cancer types. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015;107(12):1–11.
26. Fehring G, Kraft P, Pharoah PD, Eeles RA, Chatterjee N, Schumacher FR, et al. Cross-cancer genome-wide analysis of lung, ovary, breast, prostate, and colorectal cancer reveals novel pleiotropic associations. *Cancer Research*. 2016;76(17):5103–14.
27. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Polley EC, Na J, et al. Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. *JAMA Oncology*. 2017;3(9):1190–6.
28. Lecarpentier J, Silvestri V, Kuchenbaecker KB, Barrowdale D, Dennis J, McGuffog L, et al. Prediction of Breast and Prostate Cancer Risks in Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers Using Polygenic Risk Scores. 2017;35(20):2240–50.
29. Mavaddat N, Pharoah PDP, Michailidou K, Tyrer J, Brook MN, Bolla MK, et al. Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants.

- Journal of the National Cancer Institute. 2015;107(5):1–15.
30. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO clinical practice guidelines for cancer prevention and screening. *Annals of Oncology* [Internet]. 2016;27(Supplement 5):v103–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdw327>
  31. Stjepanovic N, Moreira L, Carneiro F, Balaguer F, Cervantes A, Balmaña J, et al. Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2019;30(10):1558–71.
  32. Guillén-Ponce C, Lastra E, Lorenzo-Lorenzo I, Martín Gómez T, Morales Chamorro R, Sánchez-Heras AB, et al. SEOM clinical guideline on hereditary colorectal cancer (2019). *Clinical and Translational Oncology* [Internet]. 2020;22(2):201–12. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02272-y>
  33. Grissom AA. Multigene Panel Testing for Hereditary Cancer Risk Faculty Activity Rationale and Purpose Intended Audience Financial Disclosures. *AdvancedPractitioner.com* [Internet]. 2016;7(4):394–406. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5679029/pdf/jadp-07-394.pdf>
  34. ALFRED G. KNUDSON J. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Nat Acad Sci USA* [Internet]. 1971;Vol. 68(4):820–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC389051/pdf/pnas00079-0129.pdf>
  35. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DEC, Rosen B, Bradley L, Fan I, et al. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: A kin-cohort study in Ontario, Canada. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(23):1694–706.
  36. Nielsen FC, Van Overeem Hansen T, Sørensen CS. Hereditary breast and ovarian cancer: New genes in confined pathways. *Nature Reviews Cancer* [Internet]. 2016;16(9):599–612. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.72>
  37. Fergus J. Couch, Katherine L. Nathanson and KO. Two Decades After BRCA: Setting Paradigms in Personalized Cancer Care and Prevention. *Science* [Internet]. 2014;343(6178):1466–1470. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4074902/pdf/nihms-596217.pdf>

38. Couch FJ, Wang X, MCGuffog L, Lee A, Olswold C, Kuchenbaecker KB, et al. Genome-Wide Association Study in BRCA1 Mutation Carriers Identifies Novel Loci Associated with Breast and Ovarian Cancer Risk. 2013;9(3).
39. Tyrer. KBKSJRJ. Identification of six new susceptibility loci for invasive epithelial ovarian cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2015;47(2):164–171. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4445140/pdf/nihms647338.pdf>
40. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics*. 2003;72(5):1117–30.
41. Foulkes WD, Knoppers BM, Turnbull C. Population genetic testing for cancer susceptibility: Founder mutations to genomes. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2016;13(1):41–54.
42. Dorling L, Carvalho S, Allen J, González-Neira A, Luccarini C, Wahlström C, et al. Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(5):428–39.
43. Hu C, Hart SN, Gnanaolivu R, Huang H, Lee KY, Na J, et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(5):440–51.
44. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, et al. Li-Fraumeni and Related Syndromes: Correlation between Tumor Type, Family Structure, and TP53 Genotype. *Cancer Research*. 2003;63(20):6643–50.
45. Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Higgins J, Roach KC, et al. at High Risk of Breast Cancer. *Technology*. 2012;295(12):1379–88.
46. Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(2):400–7.
47. Pardeep Kaurah, MSc; Andrée MacMillan MSc; Niki Boyd, MSc, PhD; Janine Senz BSc; Alessandro De Luca BsN, Chun, MS; Gianpaolo Suriano P. Founder and Recurrent CDH1 Mutations in Families With Hereditary Diffuse Gastric Cancer. *JAMA*. 2007;297(21):2360–72.

48. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJP, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(10):3209–15.
49. Sara Gutiérrez-Enríquez, Sandra Bonache, Gorka Ruíz de Garibay, Ana Osorio, Marta Santamariña, Teresa Ramón y Cajal, Eva Esteban-Cardenosa, Anna Tenés, Kira Yanowsky, Alicia Barroso, Gemma Montalban, Ana Blanco, Mònica Cornet, Neus Gadea, Mar Infante, Tri OD. About 1% of the breast and ovarian Spanish families testing negative for BRCA1 and BRCA2 are carriers of RAD51D pathogenic variants. *Int J Cancer*. 2014;134(9):2088–97.
50. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature Genetics*. 2010;42(5):410–4.
51. Sopik V, Akbari MR, Narod SA. Genetic testing for RAD51C mutations: In the clinic and community. *Clinical Genetics*. 2015;88(4):303–12.
52. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nature Genetics*. 2006;38(8):873–5.
53. Weischer M, Nordestgaard BG, Pharoah P, Bolla MK, Nevanlinna H, Van't Veer LJ, et al. CHEK2\*1100delC heterozygosity in women with breast cancer associated with early death, breast cancer-specific death, and increased risk of a second breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(35):4308–16.
54. Ministerio de Sanidad y Política Social. Estrategia en Cáncer del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Política Social. 2010;1–172.
55. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib Maintenance Therapy in Patients With Platinum-Sensitive Relapsed Serous Ovarian Cancer. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2014;69(10):594–6.
56. Robson ME, Tung N, Conte P, Im SA, Senkus E, Xu B, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2019;30(4):558–66.
57. Tutt ANJ, Garber JE, Kaufman B, Viale G, Fumagalli D, Rastogi P, et al. Adjuvant

- Olaparib for Patients with BRCA1 - or BRCA2 -Mutated Breast Cancer . New England Journal of Medicine. 2021;384(25):2394–405.
58. Henry T. Lynch, M.D., and Albert de la Chapelle, M.D. P. Hereditary Colorectal Cancer. The New England Journal of Medicine *new england journal of medicine* [Internet]. 2003;348:919–32. Available from: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMra012242?articleTools=true>
  59. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(35):5783–8.
  60. Ou J, Rasmussen M, Westers H, Andersen SD, Jager PO, Kooi KA, et al. Biochemical characterization of MLH3 missense mutations does not reveal an apparent role of MLH3 in lynch syndrome. *Genes Chromosomes and Cancer*. 2009;48(4):340–50.
  61. Thompson E, Meldrum CJ, Crooks R, McPhillips M, Thomas L, Spigelman AD, et al. Hereditary non-polyposis colorectal cancer and the role of hPMS2 and hEXO1 mutations. *Clinical Genetics*. 2004;65(3):215–25.
  62. Hampel H, Stephens JA, Pukkala E, Sankila R, Aaltonen LA, Mecklin J-P, et al. Cancer Risk in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Later Age of Onset. *Gastroenterology*. 2005;129(2):415–21.
  63. Sjursen W, Haukanes BI, Grindedal EM, Aarset H, Stormorken A, Engebretsen LF, et al. Current clinical criteria for Lynch syndrome are not sensitive enough to identify MSH6 mutation carriers. *Journal of Medical Genetics*. 2010;47(9):579–85.
  64. Zerhouni E. Bethesda criteria. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2004;96(4):261–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/306/5703/1895.short>
  65. Vasen HFA, Boland CR. Progress in genetic testing, classification, and identification of lynch syndrome. *Journal of the American Medical Association*. 2005;293(16):2028–30.
  66. Boland CR, Shike M. Report From the Jerusalem Workshop on Lynch Syndrome- Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(7):2197.e1-2197.e7.
  67. Moreira L, Balaguer F, Lindor N, De La Chapelle A, Hampel H, Aaltonen LA, et al.

- Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2012;308(15):1555–65.
68. Adar T, Rodgers LH, Shannon KM, Yoshida M, Ma T, Mattia A, et al. Universal screening of both endometrial and colon cancers increases the detection of Lynch syndrome. *Cancer*. 2018;124(15):3145–53.
69. Hendriks YMC, de Jong AE, Morreau H, Tops CMJ, Vasen HF, Wijnen JT, et al. Diagnostic Approach and Management of Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma): A Guide for Clinicians. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2006;56(4):213–25.
70. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter D, et al. NIH Public Access. 2009;135(2):419–28.
71. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, White DM, Wagner A, Gomez Garcia EB, et al. Risks of lynch syndrome cancers for msh6 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(3):193–201.
72. Lu KH, Dinh M, Kohlmann W, Watson P, Green J, Syngal S, et al. Gynecologic cancer as a “sentinel cancer” for women with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Obstetrics and Gynecology*. 2005;105(3):569–74.
73. Walsh T, Lee MK, Casadei S, Thornton AM, Stray SM, Pennil C, et al. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(28):12629–33.
74. Ballester LY, Luthra R, Kanagal-Shamanna R, Singh RR. Advances in clinical next-generation sequencing: Target enrichment and sequencing technologies. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [Internet]. 2016;16(3):357–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.2016.1133298>
75. Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes: Second edition. *Journal of the National Cancer Institute - Monographs*. 2008;2008(38):3–93.
76. Fecteau H, Vogel KJ, Hanson K, Morrill-Cornelius S. The evolution of cancer risk assessment in the era of next generation sequencing. *Journal of Genetic Counseling*. 2014;23(4):633–9.

77. Kurian AW, Hare EE, Mills MA, Kingham KE, McPherson L, Whittemore AS, et al. Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(19):2001–9.
78. Castellanos E, Gel B, Rosas I, Tornero E, Santín S, Pluvinet R, et al. A comprehensive custom panel design for routine hereditary cancer testing: Preserving control, improving diagnostics and revealing a complex variation landscape. *Scientific Reports*. 2017;
79. Feliubadaló L, López-Fernández A, Pineda M, Díez O, del Valle J, Gutiérrez-Enríquez S, et al. Opportunistic testing of BRCA1, BRCA2 and mismatch repair genes improves the yield of phenotype driven hereditary cancer gene panels. *International Journal of Cancer*. 2019;145(10):2682–91.
80. Desmond A, Kurian AW, Gabree M, Mills MA, Anderson MJ, Kobayashi Y, et al. Clinical actionability of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer risk assessment. *JAMA Oncology*. 2015;1(7):943–51.
81. Whitworth J, Skytte AB, Sunde L, Lim DH, Arends MJ, Happerfield L, et al. Multilocus inherited neoplasia alleles syndrome. *JAMA Oncology*. 2016.
82. Yadav S, Reeves A, Campian S, Paine A, Zakalik D. Outcomes of retesting BRCA negative patients using multigene panels. *Familial Cancer*. 2017;16(3):319–28.
83. Colas C, Golmard L, de Pauw A, Caputo SM, Stoppa-Lyonnet D. “Decoding hereditary breast cancer” benefits and questions from multigene panel testing. *Breast* [Internet]. 2019;45:29–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.01.002>
84. Maxwell KN, Wubbenhorst B, D’Andrea K, Garman B, Long JM, Powers J, et al. Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. *Genetics in Medicine*. 2015;17(8):630–8.
85. Moran O, Nikitina D, Royer R, Poll A, Metcalfe K, Narod SA, et al. Revisiting breast cancer patients who previously tested negative for BRCA mutations using a 12-gene panel. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2017;161(1):135–42.
86. Bonache S, Esteban I, Moles-Fernández A, Tenés A, Duran-Lozano L, Montalban G, et al. Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish

- families and clinical actionability of findings. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [Internet]. 2018;144(12):2495–513. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-018-2763-9>
87. Weitzel JN, Neuhausen SL, Adamson A, Tao S, Ricker C, Maoz A, et al. Pathogenic and likely pathogenic variants in PALB2, CHEK2, and other known breast cancer susceptibility genes among 1054 BRCA-negative Hispanics with breast cancer. *Cancer*. 2019;125(16):2829–36.
  88. Shin H-C, Lee H-B, Yoo T-K, Lee E-S, Kim RN, Park B, et al. Detection of Germline Mutations in Breast Cancer Patients with Clinical Features of Hereditary Cancer Syndrome Using a Multi-Gene Panel Test. *Cancer Research and Treatment*. 2020;1–17.
  89. Park JS, Shin S, Lee YJ, Lee S-T, Nam EJ, Han JW, et al. Implication and Influence of Multigene Panel Testing with Genetic Counseling in Korean Patients with *BRCA1/2* Mutation-Negative Breast Cancer. *Cancer Research and Treatment*. 2021;1–43.
  90. Lu HM, Li S, Black MH, Lee S, Hoiness R, Wu S, et al. Association of Breast and Ovarian Cancers with Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing. *JAMA Oncology*. 2019;5(1):51–7.
  91. Fachal L, Dunning AM. From candidate gene studies to GWAS and post-GWAS analyses in breast cancer. *Current Opinion in Genetics and Development* [Internet]. 2015;30(Table 1):32–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2015.01.004>
  92. Nicholas E, Mamrak, Akiko Shimamura and NGH. Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Rev*. 2017;31(3):93–99.
  93. Nguyen-Dumont T, Myszka A, Karpinski P, Sasiadek MM, Akopyan H, Hammet F, et al. FANCM and RECQL genetic variants and breast cancer susceptibility: Relevance to South Poland and West Ukraine. *BMC Medical Genetics*. 2018;19(1):1–7.
  94. Dörk T, Peterlongo P, Mannermaa A, Bolla MK, Wang Q, Dennis J, et al. Two truncating variants in FANCC and breast cancer risk. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1–14.

95. P Economopoulou 1, G Dimitriadis 2 AP. Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(1):1-8.
96. Kluźniak W, Wokołorczyk D, Rusak B, Huzarski T, Gronwald J, Stempa K, et al. Inherited variants in XRCC2 and the risk of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2019;178(3):657–63.
97. Ramus SJ, Song H, Dicks E, Tyrer JP, Rosenthal AN, Intermaggio MP, et al. Germline mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN genes in women with ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 2015;107(11):1–8.
98. De Brakeleer S, De Grève J, Loris R, Janin N, Lissens W, Sermijn E, et al. Cancer predisposing missense and protein truncating BARD1 mutations in non-BRCA1 or BRCA2 breast cancer families. *Human Mutation.* 2010;31(3):1175–85.
99. Shimelis H, LaDuca H, Hu C, Hart SN, Na J, Thomas A, et al. Triple-negative breast cancer risk genes identified by multigene hereditary cancer panel testing. *Journal of the National Cancer Institute.* 2018;110(8):855–62.
100. Slavin TP, Maxwell KN, Lilyquist J, Vijai J, Neuhausen SL, Hart SN, et al. The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *npj Breast Cancer.* 2017;3(1).
101. Kyu-Seon Oh, 1 Sikandar G. Khan, N.G.J. Jaspers, Anja Raams, Takahiro Ueda 1 Alan Lehmann, Peter S. Friedmann, Steffen Emmert, Alexi Gratchev, Katherine Lachlan, Anneke Lucassan, Carl C. Baker and KHK. Phenotypic Heterogeneity in the XPB DNA Helicase Gene (ERCC3): Xeroderma Pigmentosum Without and With Cockayne Syndrome. *HUMAN MUTATION.* 2006;27(11):1092–103.
102. Vijai J, Topka S, Villano D, Ravichandran V, Maxwell KN, Maria A, et al. A recurrent ERCC3 truncating mutation confers moderate risk for breast cancer. *Cancer Discovery.* 2016;6(11):1267–75.
103. Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, Danesi R, Arcangeli V, Ravegnani M, et al. Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. *Oncotarget.* 2017;8(29):47064–75.
104. Palmer JR, Polley EC, Hu C, John EM, Haiman C, Hart SN, et al. Contribution of Germline Predisposition Gene Mutations to Breast Cancer Risk in African American Women. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 2020;112:1–9.

105. Dumbrava EI, Brusco L, Daniels MS, Wathoo C, Shaw KR. original report abstract Expanded Analysis of Secondary Germline Findings From Matched Tumor / Normal Sequencing Identifies Additional Clinically Significant Mutations. 2019;1–11.
106. Carlo MI, Ravichandran V, Srinivasan P, Bandlamudi C, Kemel Y, Ceyhan-Birsoy O, et al. Cancer Susceptibility Mutations in Patients With Urothelial Malignancies. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(5):406–14.
107. McGuigan A, Whitworth J, Andreou A, Hearn T, Ambrose JC, Arumugam P, et al. Multilocus Inherited Neoplasia Allele Syndrome (MINAS): an update. *European Journal of Human Genetics*. 2022;(July):1–6.
108. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO clinical practice guidelines for cancer prevention and screening. *Annals of Oncology*. 2016;27(Supplement 5):v103–10.
109. Clinical N, Guidelines P, Guidelines N. Genetic / Familial High-Risk Assessment : Breast , Ovarian , and Pancreatic. 2022;
110. Burke CA, Dallas S. Genetic / Familial High-Risk Assessment : Colorectal. 2021;
111. Obón-Santacana M, Vilardell M, Carreras A, Duran X, Velasco J, Galván-Femenía I, et al. GCAT|Genomes for life: A prospective cohort study of the genomes of Catalonia. *BMJ Open*. 2018;8(3).
112. Dopazo J, Amadoz A, Bleda M, Garcia-Alonso L, Alemán A, García-García F, et al. 267 Spanish Exomes Reveal Population-Specific Differences in Disease-Related Genetic Variation. *Molecular Biology and Evolution*. 2016;33(5):1205–18.
113. Feliubadaló L, Lopez-Doriga A, Castellsagué E, Del Valle J, Menéndez M, Tornero E, et al. Next-generation sequencing meets genetic diagnostics: Development of a comprehensive workflow for the analysis of BRCA1 and BRCA2 genes. *European Journal of Human Genetics*. 2013;21(8):864–70.
114. Lopez-Doriga A, Feliubadaló L, Menéndez M, Lopez-Doriga S, Morón-Duran FD, del Valle J, et al. ICO amplicon NGS data analysis: A web tool for variant detection in common high-risk hereditary cancer genes analyzed by amplicon GS junior next-generation sequencing. *Human Mutation*. 2014;35(3):271–7.

115. Sharon E. Plon, Diana M. Eccles, Douglas Easton, William D. Foulkes, Maurizio Genuardi, Marc S. Greenblatt, Frans B.L. Hogervorst, Nicoline Hoogerbrugge, Amanda B. Spurdle and ST for the IUGVWG. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat.* 2008;29(11):1282–1291.
116. Stradella A, del Valle J, Rofes P, Vargas-Parra G, Salinas M, González S, et al. ERCC3, a new ovarian cancer susceptibility gene? *European Journal of Cancer.* 2020;141:1–8.
117. Southey MC, Goldgar DE, Winqvist R, Pylkäs K, Couch F, Tischkowitz M, et al. PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: Data from COGS. *Journal of Medical Genetics.* 2016;53(12):800–11.
118. Stradella A, Del Valle J, Rofes P, Feliubadaló L, Grau Garces È, Velasco À, et al. Does multilocus inherited neoplasia alleles syndrome have severe clinical expression? *Journal of Medical Genetics.* 2019;56(8):521–5.
119. Hansen MF, Johansen J, Sylvander AE, Bjørnevoll I, Talseth-Palmer BA, Lavik LAS, et al. Use of multigene-panel identifies pathogenic variants in several CRC-predisposing genes in patients previously tested for Lynch Syndrome. *Clinical Genetics.* 2017;92(4):405–14.
120. Hauke J, Horvath J, Groß E, Gehrig A, Honisch E, Hackmann K, et al. Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Medicine.* 2018;7(4):1349–58.
121. Coppa A, Nicolussi A, D’Inzeo S, Capalbo C, Belardinilli F, Colicchia V, et al. Optimizing the identification of risk-relevant mutations by multigene panel testing in selected hereditary breast/ovarian cancer families. *Cancer Medicine.* 2018;
122. Laduca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS, Keiles S, Tandy S, Pesaran T, et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: Analysis of more than 2,000 patients. *Genetics in Medicine.* 2014;16(11):830–7.
123. LaDuca H, Polley EC, Yussuf A, Hoang L, Gutierrez S, Hart SN, et al. A clinical guide to hereditary cancer panel testing: evaluation of gene-specific cancer associations and sensitivity of genetic testing criteria in a cohort of 165,000 high-risk patients. *Genetics in Medicine [Internet].* 2020;22(2):407–15. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/s41436-019-0633-8>

124. Maxwell KN, Domchek SM, Nathanson KL, Robson ME. Population frequency of germline BRCA1/2 mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(34):4183–5.
125. Win AK, Jenkins MA, Dowty JG, Antoniou AC, Lee A, Giles GG, et al. Prevalence and penetrance of major genes and polygenes for colorectal cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2017;26(3):404–12.
126. Song H, Dicks E, Ramus SJ, Tyrer JP, Intermaggio MP, Hayward J, et al. Contribution of germline mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D genes to ovarian cancer in the population. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(26):2901–7.
127. AlDubayan SH, Giannakis M, Moore ND, Han GC, Reardon B, Hamada T, et al. Inherited DNA-Repair Defects in Colorectal Cancer. *American Journal of Human Genetics* [Internet]. 2018;102(3):401–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.01.018>
128. Mirjam M de Jong 1, Iija M Nolte, Gerard J Te Meerman, Winette T A van der Graaf, Marcel J Mulder, Gerrit van der Steege, Marcel Bruinenberg, Michael Schaapveld, Renée C Niessen, Maran J W Berends, Rolf H Sijmons, Robert M W Hofstra, Elisabeth G E de Vrie JHK. Colorectal cancer and the CHEK2 1100delC mutation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;43(4):377–82.
129. Rachel Pearlman, MS, CGC, Wendy L. Frankel, MD, Heather Hampel, MS C. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(4):464–471.
130. Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, Charbonnier C, Fermey P, Belotti M, et al. Revisiting Li-Fraumeni syndrome from TP53 mutation carriers. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(21):2345–52.
131. Rana HQ, Gelman R, LaDuca H, McFarland R, Dalton E, Thompson J, et al. Differences in TP53 mutation carrier phenotypes emerge from panel-based testing. *Journal of the National Cancer Institute*. 2018;110(8):863–70.
132. Azzollini J, Mariani M, Peissel B, Manoukian S. Increased access to TP53 analysis through breast cancer multi-gene panels: clinical considerations. *Familial Cancer*.

- 2018;17(3):317–9.
133. Taylor A, Brady AF, Frayling IM, Hanson H, Tischkowitz M, Turnbull C, et al. Consensus for genes to be included on cancer panel tests offered by UK genetics services: guidelines of the UK Cancer Genetics Group. *Journal of medical genetics*. 2018;55(6):372–7.
  134. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Polley EC, Na J, et al. Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. *JAMA Oncology*. 2017;
  135. Li J, Meeks H, Feng BJ, Healey S, Thorne H, Makunin I, et al. Targeted massively parallel sequencing of a panel of putative breast cancer susceptibility genes in a large cohort of multiple-case breast and ovarian cancer families. *Journal of Medical Genetics*. 2016;53(1):34–42.
  136. Amendola LM, Jarvik GP, Leo MC, McLaughlin HM, Akkari Y, Amaral MD, et al. Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *American Journal of Human Genetics*. 2016;98(6):1067–76.
  137. Esteban I, Vilaró M, Adrover E, Angulo A, Carrasco E, Gadea N, et al. Psychological impact of multigene cancer panel testing in patients with a clinical suspicion of hereditary cancer across Spain. *Psycho-Oncology*. 2018;27(6):1530–7.
  138. Balmaña J, Digiovanni L, Gaddam P, Walsh MF, Joseph V, Stadler ZK, et al. Conflicting interpretation of genetic variants and cancer risk by commercial laboratories as assessed by the prospective registry of multiplex testing. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(34):4071–8.
  139. Mersch J, Brown N, Pirzadeh-Miller S, Mundt E, Cox HC, Brown K, et al. Prevalence of variant reclassification following hereditary cancer genetic testing. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2018;320(12):1266–74.
  140. Njiaju UO, Olopade OI. Genetic determinants of breast cancer risk: A review of current literature and issues pertaining to clinical application. *Breast Journal*. 2012;18(5):436–42.
  141. Flores KG, Steffen LE, McLouth CJ, Vicuña BE, Gammon A, Kohlmann W, et al. Factors Associated with Interest in Gene-Panel Testing and Risk Communication

- Preferences in Women from BRCA1/2 Negative Families. *Journal of Genetic Counseling*. 2017;26(3):480–90.
142. Lhotova K, Stolarova L, Zemankova P, Vocka M, Janatova M, Borecka M, et al. Multigene Panel Germline Testing of 1333 Czech Patients with Ovarian Cancer. 2020;3–16.
143. Jana Soukupova, Petra Zemankova, Petr Nehasil, Zdenek Kleibl C consortium. Re: ERCC3, a new ovarian cancer susceptibility gene? *Eur J Cancer*. 2021;150:278–80.
144. Watson P, Vasen HFA, Mecklin JP, Bernstein I, Aarnio M, Järvinen HJ, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *International Journal of Cancer*. 2008;123(2):444–9.
145. Nakonechny QB, Gilks CB. Ovarian Cancer in Hereditary Cancer Susceptibility Syndromes. *Surgical Pathology Clinics* [Internet]. 2016;9(2):189–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.path.2016.01.003>
146. Angeli D, Salvi S, Tedaldi G. Genetic predisposition to breast and ovarian cancers: How many and which genes to test? *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(3).
147. NAKAMURA K, BANNO K, YANOKURA M, IIDA M, ADACHI M, MASUDA K, et al. Features of ovarian cancer in Lynch syndrome (Review). *Molecular and Clinical Oncology*. 2014;2(6):909–16.
148. T Caldes, M de la Hoya, A Tosar, S Sulleiro, J Godino, D Ibañez MM, P Perez-Segura ED-R. A breast cancer family from Spain with germline mutations in both the BRCA1 and BRCA2 genes. *J Med Genet*. 2002;39(e44).
149. B Leegte, A H van der Hout, A M Deffenbaugh, M K Bakker, I M Mulder, A ten Berge EPL, J Wesseling, J de Hullu, N Hoogerbrugge, M J L Ligtenberg, A Ardern-Jones EB, A Salmon, J Barwell, R Eeles JCO. Phenotypic expression of double heterozygosity for BRCA1 and BRCA2 germline mutations. *J Med Genet*. 2005;42(e20).
150. Rebbeck TR, Friebel TM, Mitra N, Wan F, Chen S, Andrulis IL, et al. Inheritance of deleterious mutations at both BRCA1 and BRCA2 in an international sample of 32,295 women. *Breast Cancer Research*. 2016;

151. Adank MA, Jonker MA, Kluij I, van Mil SE, Oldenburg RA, Mooi WJ, et al. CHEK2\*1100delC homozygosity is associated with a high breast cancer risk in women. *Journal of Medical Genetics*. 2011;

## 10. ANEXOS

**10.1 Consens Catal3n en els criteris cl3nics i panels de gens per a l'estudi de les s3ndromes hereditaries de c3ncer. A3o 2019**

# CONSENS CATALÀ EN ELS CRITERIS CLÍNICS I PANELLS DE GENS PER A L'ESTUDI DE LES SÍNDROMES HEREDITÀRIES DE CÀNCER

**Centres participants.** Han participat professionals de les Unitats de Consell Genètic en Càncer i dels Laboratoris de Diagnòstic Molecular/Genètic dels següents centres:

- Institut Català d'Oncologia (centres Hospitalet, Badalona i Girona)
- Hospital Vall d'Hebron, Barcelona
- Hospital Arnau de Vilanova, Lleida
- Hospital Sant Pau, Barcelona
- Hospital Clínic, Barcelona
- Hospital del Mar, Barcelona
- Hospital Parc Taulí, Sabadell
- Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa.
- Hospital Althaia, Manresa
- Hospital Sant Joan, Reus

**Metodologia.** Cada centre va designar una representació de professionals de l'àmbit clínic i del de diagnòstic genètic. En total 30 professionals han estat convocats a les 3 Jornades de treball. En cada Jornada s'ha disposat prèviament d'ordre del dia i material per a revisió. Cada punt del consens (criteris clínics i gens a incloure en el panell) ha estat presentat per un o dos experts i sotmès a discussió entre els assistents. Un cop finalitzada la discussió s'han fet votacions online (mentimeter.com). Es considerava consens  $\geq 75\%$  vots, entre 50 i 75% es traslladava a la següent jornada,  $< 50\%$  no s'aprovava. S'han redactat i aprovat actes tant de les votacions com de les discussions.

**Jornades de Consens.** S'han realitzat 3 Jornades de treball: ICO Hospitalet (13/7/2018), Hospital Sant Pau (26/10/2018), Hospital Clínic (8/2/2019)

## **Criteris clínics d'indicació d'estudi de panell de gens en línia germinal i gens a estudiar**

**A tots els probands se'ls oferirà el cribratge oportunista dels següents gens independentment dels criteris clínics: *BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6***

### **Càncer de mama o Càncer de mama i Ovari Hereditari (CMOH)**

#### Criteris clínics

- Càncer de mama  $\leq 40$  anys.
- Càncer de mama triple negatiu  $\leq 60$  anys.
- Càncer de mama en el varó
- Tres o més familiars de primer grau afectes de càncer de mama (al menys un en edat premenopàusica).
- Dos casos de càncer de mama en  $\leq 50$  anys.
- Un cas de càncer de mama bilateral i un altre de càncer de mama (un  $\leq 50$  anys)
- Càncer d'ovari epitelial invasiu no mucinós (En els tumors de baix grau s'individualitzarà en funció edat, historia familiar i possible benefici a familiars)

#### Panell de gens en Càncer de Mama i Ovari (casos o famílies amb càncer de mama o càncer de mama i càncer d'ovari)

*BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, TP53\*, PALB2, CHEK2, ATM, BRIP1, RAD51C, RAD51D, PTEN\*\*, CDH1\*\**

\*Només si càncer de mama  $\leq 35$  anys o criteris de CHOMPRET

\*\* Només si fenotip suggestiu (criteris Síndrome de Cowden, criteris de Càncer Gàstric Difús Hereditari-Ca de mama lobel·lar)

#### Panell de gens en Càncer d'Ovari (casos o famílies amb només càncer d'ovari)

*BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, BRIP1, RAD51C, RAD51D*

## **Síndromes Hereditàries de Poliposis**

### Críteris clínics en Poliposis Adenomatoses

- $\geq 20$  Adenomes
- $\geq 10$  Adenomes si edat  $< 40$  anys o familiar amb CCR abans dels 60 anys

### Críteris clínics en Poliposis No Adenomatoses

- Críteris clínics de cada síndrome (Cowden, Peutz-Jeghers, etc)

### Panell de gens en Poliposis

*BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, APC, MUTYH, POLE (exons 7-14), POLD1 (exons 6-13), NTHL1, BMPR1A, SMAD4, PTEN\*, STK11\**

\*Només si fenotip suggestiu

## **Càncer Colorectal i Endometri**

S'aprova el cribratge de la Síndrome de Lynch mitjançant estudi Immunohistoquímic (IHQ) de les proteïnes dels gens reparadors a tots els càncers colorectals i d'endometri.

### Críteris clínics

- Inestabilitat de Microsatèl·lits (MSI) o IHQ alterada
- Càncer colorectal  $\leq 50$  anys o criteris d'Amsterdam

### Panell de gens en Càncer Colorectal i Endometri

*BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2\*, EPCAM (exons 8-9), MUTYH, POLE (exons 7-14), POLD1 (exons 6-13), TP53\*\**

\* Si hi ha pèrdua d'expressió en la IHQ, o en tots els casos en funció de la tècnica disponible (vàlida analítica garantida)

\*\*Si criteris Chompret

## **Càncer Gàstric Difús Hereditari (CGD)**

### Criteris clínics

- Càncer Gàstric Difús  $\leq$  40 anys
- 2 casos CGD, almenys 1 amb histologia confirmada
- Història personal o familiar (primer o segon grau) de CGD i càncer de mama lobel·lar infiltrant, almenys un abans dels 50 anys

### Panell de gens en CGD

*BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, CDH1, CTNNA1*

## **Càncer de Pàncreas Hereditari**

### Criteris clínics

- Càncer de pàncrees  $\leq$ 45
- Càncer de pàncrees i melanoma o mama en la mateixa persona
- $\geq$ 3 casos amb càncer de pàncrees per la mateixa branca
- $\geq$  2 familiars de primer grau amb càncer de pàncrees
- $\geq$  2 casos càncer pàncrees i melanoma per la mateixa branca
- $\geq$  3 casos entre càncer de pàncrees i/o ovari i/o mama i/o pròstata metastàsica Gleason  $>$ 7

### Panell de gens en càncer de pàncrees

*BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, ATM, PALB2, CDKN2A  
PRSS1 només si presenta criteris de pancreatitis hereditària*

## **Melanoma Familiar**

### Criteris clínics

- 2 casos de melanoma en familiars de primer o segon grau, almenys un dels dos diagnosticats abans dels 60 anys
- Melanomes múltiples: 2 o més melanomes en 1 individu, el primer abans dels 60 anys
- Melanoma i pàncrees en el mateix individu o familiar

### Panell de gens en Melanoma

*BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, CDKN2A, CDK4, POT1, BAP1, MITF(Només la variant E318K)*

## **Càncer de Pròstata Hereditari**

### Criteris clínics

- Càncer de pròstata amb Gleason >7 i:
  - Edat <70 i metastàssic resistent a la castració o
  - Edat < 55 anys, o
  - Història familiar de CMOH, o 2 ó més casos de càncer de pròstata
- Càncer de pròstata de <55 anys i història familiar de 2 o més casos de càncer de pròstata, o de CMOH

### Panell de gens en càncer de pròstata

*BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, HOXB13 (Variant G84E), ATM\*, CHEK2\**

*\*Només si hi ha història familiar de càncer de mama*

## **Càncer Renal Hereditari**

### Criteris clínics

- Criteris clínics d'una síndrome relacionada amb càncer renal hereditari: Von Hippel-Lindau, Birt-Hogg-Dubé, Leiomiomatosis Hereditària (Síndrome de Reed), Cowden, Esclerosi Tuberos, Paraganglioma/Feocromocitoma Hereditari, Carcinoma Renal Papilar tipus 1 hereditari
- Càncer renal  $\leq 45$  anys, independentment de la histologia i història familiar
- Agregació familiar de càncer renal (2 o més casos en familiars de primer o segon grau), tumors bilaterals i/o multifocals són candidats a derivació a consulta. Es valorarà la indicació d'estudi genètic segons histologies, informativitat de la família, edat de diagnòstic i exploració dermatològica

### Panell de gens en càncer renal

Si hi ha criteris clínics diagnòstics clars de la Síndrome es pot plantejar fer estudi només del gen relacionat

*BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, FH, FLCN, MET, VHL, SDHx, TSC1\*, TSC2\*, PTEN\*, BAP1\*, MITF\* (E318K)*

*\*si fenotip suggestiu*

## **Indicacions en persones sanes quan no és possible l'estudi genètic en afectats**

Es farà l'estudi genètic en teixit sà extret d'un bloc de parafina del pacient afecte per neoplàsia. Quan això no sigui possible es valorarà fer l'estudi en el familiar sa, prèvia discussió en comitè de càncer hereditari o sessió clínica del servei.

L'estudi es realitzarà en un familiar de primer grau que pertanyi a una família amb criteris d'alt risc i/o amb alta càrrega familiar

- Família amb criteris d'Amsterdam I/II
- Familiar amb càncer colorectal/ endometri <70 anys i pèrdua d'expressió d'una de les proteïnes dels gens reparadors de l'ADN a l'estudi d'IHQ (descartada hipermetilació de *MLH1*)
- Familiar de primer grau amb una síndrome hereditària ben definida (Pol·liposi colònica, Neurofibromatosi tipus 1, Von-Hippel-Lindau, MEN2, CGDH, Peutz-Jeghers, Cowden, Li-Fraumeni,...)
- Familiar de primer grau d'una pacient amb càncer d'ovari epitelial d'alt grau
- Familiar de primer grau d'afecte de càncer de mama amb criteris d'alta probabilitat de mutació en *BRCA1/2* (>15%)

## 10.2 Artículos publicados en el marco de esta tesis

### 10.2.1 Artículo 1

Agostina Stradella, Jesús del Valle, Paula Rofes, Lúdia Feliubadaló, Èlia Grau Garces, Àngela Velasco, Sara González, Gardenia Vargas, Àngel Izquierdo, Olga Campos, Eva Tornero, Matilde Navarro, Judith Balmaña-Gelpi, Gabriel Capellá, Marta Pineda, Joan Brunet, Conxi Lázaro. Does multilocus inherited neoplasia alleles syndrome have severe clinical expression? J Med Genet 2018;0:1–5. doi:10.1136/jmedgenet-2018-105700



OPEN ACCESS

## SHORT REPORT

# Does multilocus inherited neoplasia alleles syndrome have severe clinical expression?

Agostina Stradella,<sup>1,2,3</sup> Jesús del Valle,<sup>1,2,4</sup> Paula Rofes,<sup>1,4,2</sup> Lúdia Feliubadaló,<sup>1,4,2</sup> Èlia Grau Garcés,<sup>1,2</sup> Àngela Velasco,<sup>5</sup> Sara González,<sup>1,4,2</sup> Gardenia Vargas,<sup>1,4,2</sup> Àngel Izquierdo,<sup>5</sup> Olga Campos,<sup>1,4,2</sup> Eva Tornero,<sup>1,4,2</sup> Matilde Navarro,<sup>1,2</sup> Judith Balmaña-Gelpi,<sup>6</sup> Gabriel Capellá,<sup>1,4,2</sup> Marta Pineda,<sup>1,4,2</sup> Joan Brunet,<sup>1,5,7</sup> Conxi Lázaro<sup>1,4,2</sup>

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105700>).

For numbered affiliations see end of article.

### Correspondence to

Dr Conxi Lázaro and Dr Joan Brunet, Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona 08907, Spain; [clazaro@iconcologia.net](mailto:clazaro@iconcologia.net), [jbrunet@iconcologia.net](mailto:jbrunet@iconcologia.net)

Received 3 September 2018  
Revised 24 October 2018  
Accepted 28 October 2018

### ABSTRACT

**Importance** Genetic testing of hereditary cancer using comprehensive gene panels can identify patients with more than one pathogenic mutation in high and/or moderate-risk-associated cancer genes. This phenomenon is known as multilocus inherited neoplasia alleles syndrome (MINAS), which has been potentially linked to more severe clinical manifestations.

**Objective** To determine the prevalence and clinical features of MINAS in a large cohort of adult patients with hereditary cancer homogeneously tested with the same gene panel.

**Patients and methods** A cohort of 1023 unrelated patients with suspicion of hereditary cancer was screened using a validated panel including up to 135 genes associated with hereditary cancer and phakomatoses.

**Results** Thirteen (1.37%) patients harbouring two pathogenic mutations in dominant cancer-predisposing genes were identified, representing 5.7% (13/226) of patients with pathogenic mutations. Most (10/13) of these cases presented clinical manifestations associated with only one of the mutations identified. One case showed mutations in *MEN1* and *MLH1* and developed tumours associated with both cancer syndromes. Interestingly, three of the double mutants had a young age of onset or severe breast cancer phenotype and carried mutations in moderate to low-risk DNA damage repair-associated genes; two of them presented biallelic inactivation of *CHEK2*. We included these two patients for the sake of their clinical interest although we are aware that they do not exactly fulfil the definition of MINAS since both mutations are in the same gene.

**Conclusions and relevance** Genetic analysis of a broad cancer gene panel identified the largest series of patients with MINAS described in a single study. Overall, our data do not support the existence of more severe manifestations in double mutants at the time of diagnosis although they do confirm previous evidence of severe phenotype in biallelic *CHEK2* and other DNA repair cancer-predisposing genes.

risk of developing cancer at an early age as well as multiple synchronous or metachronous tumours. It is important to identify these patients because they will require specialised, long-term care and both they and their families can benefit from clinical follow-up appropriate to their risk, together with proper reproductive choices. One of the challenges in genetic counselling of these disorders is dealing with clinical heterogeneity and overlapping clinical manifestations. The phenotype variability could be explained by many factors, in isolation or in combination, such as incomplete penetrance, allelic and genetic heterogeneity, existence of genetic modifiers, environmental factors and stochastic events.<sup>2,3</sup> Genetic diagnosis of these conditions has evolved over the last decade thanks to the introduction of next-generation sequencing, a cost-effective solution in terms of cost and time for the simultaneous sequencing of multiple genes. These new approaches for sequencing have led to the development of gene panels that contain clearly defined high-penetrance genes and moderate or even low-penetrance genes, arbitrary defined with a relative risk below 4 (moderate) or 2 (low). The use of these genes in the clinical setting is a matter of discussion and some clinical geneticists and genetic counsellors are reluctant to screen them for clinical purposes due to the uncertainty of changing medical management in carriers and in non-carriers of mutations in these genes because clinical utility has not yet been clearly established.<sup>4</sup> Moreover, the use of large gene panels can lead to unexpected and complex findings, for example, to identify patients with more than one pathogenic mutation in genes implicated in different cancer syndromes.<sup>5–7</sup> The term ‘MINAS’ (multilocus inherited neoplasia alleles syndrome) was coined by Whitworth and colleagues<sup>8</sup> in a *JAMA Oncology* review in which the authors presented their experience (five cases) and the literature review (82 cases) of patients with cancer with two pathogenic mutations in hereditary cancer genes. No clear conclusion was reached and a database was created to record such cases (<http://databases.lovd.nl/shared/diseases/04296>); as of July 2018 it contained only 40 entries, all but one from the Whitworth group. Very recently, the same group presented data from a series of 460 patients with two or more tumours identifying two additional cases of MINAS.<sup>9</sup>

### INTRODUCTION

Hereditary cancer syndromes account for 5%–10% of all patients with cancer.<sup>1</sup> Patients with these syndromes are carriers of pathogenic mutations in high or moderate-penetrance genes and are at



© Author(s) (or their employer(s)) 2018. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

**To cite:** Stradella A, del Valle J, Rofes P, et al. *J Med Genet* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/jmedgenet-2018-105700

**Table 1** Description of patients with MINAS identified

ID	Phenotype	Tumour/condition	Age Dx	Current age (β)/death (E)	Mutation A*	Mutation B*
Fam-1	AFAP	Colorectal polyposis	76	77 (E)	<i>APC</i> [c.423-3T>A; p.(Arg141Serfs*8)]	<i>BRCA1</i> [c.1961delA; p.(Lys654Serfs*47)]
Fam-2 (proband)	MEN1	Neuroendocrine tumour Pituitary adenoma Parathyroid Hyperplasia Hepatic haemangiomas	41 36 39 29	45 (β)	<i>MLH1</i> [c.244A>G; p.(Thr82Ala)]	<i>MEN1</i> (c.784-9G>A; p.[Lys267Valfs*28,Arg280Serfs*2])
Fam-2 (sister)	HNPCC, MEN1	Uterine carcinoma Colorectal cancer Haemangiomas Hyperparathyroidism	41 48 45 45	52 (β)	<i>MLH1</i> [c.244A>G; p.(Thr82Ala)]	<i>MEN1</i> (c.784-9G>A; p.[Lys267Valfs*28,Arg280Serfs*2])
Fam-3	HBOC	Ovarian cancer	45	51 (β)	<i>BRCA1</i> [c.607C>T; p.(Arg1203*)]	<i>TP53</i> [c.659A>G; p.(Tyr220Cys)]
Fam-4	Tuberous sclerosis	Subcutaneous benign tumours Epilepsy	6	28 (β)	<i>TSC2</i> [c.5227C>T; p.(Arg1743Trp)]	<i>RAD51D</i> [c.694C>T; p.(Arg232*)]
Fam-5	Reed's syndrome	Cutaneous leiomyomas	40	47 (β)	<i>FH</i> (c.905-2A>G; p.?)	<i>BARD1</i> [c.157delT; p.(Cys53Valfs*5)]
Fam-6	AFAP	Colorectal polyposis Colorectal cancer	52 53	55 (β)	<i>APC</i> [c.5826_5829del; p.(Asp1942Glu fs*27)]	<i>EXO1</i> [c.1900C>T; p.(Arg634*)]
Fam-7 (proband)	HBOC	Ovarian cancer	51	52 (β)	<i>BRCA1</i> [c.2309C>A; p.(Ser770*)]	<i>XPA</i> [c.553C>T; p.(Gln185*)]
Fam-7 (sister)	HBOC	Ovarian cancer	37	38 (β)	<i>BRCA1</i> [c.2309C>A; p.(Ser770*)]	<i>XPA</i> [c.553C>T; p.(Gln185*)]
Fam-8	HBOC Birt-Hogg-Dubé	Ovarian cancer Pneumothorax (×5)	66 33	68 (β)	<i>FLCN</i> [c.346C>T; p.(Gln116*)]	<i>ERCC3</i> [c.325C>T; p.(Arg109*)]
Fam-9	HBOC	Breast cancer Pancreatic cancer	54 59	59 (β)	<i>PALB2</i> [c.3256 C>T; p.(Arg1086*)]	<i>ATM</i> (c.3802delG; p.Val1268*)
Fam-10†	HBOC	Bilateral breast cancer	35	37 (β)	<i>CHEK2</i> (c.433C>T; p.(Arg145Trp))	<i>CHEK2</i> [c.470T>C; p.(Ile157Thr)]
Fam-11†	HBOC	Breast cancer	42	42 (E)	<i>CHEK2</i> (whole gene deletion)	<i>CHEK2</i> [c.499G>A; p.(Gly167Arg)]
Fam-12	HBOC	Breast cancer	35	38 (β)	<i>ATM</i> [c.3712_3716del; p.(Leu1238Lysfs*6)]	<i>FANCA</i> (c.2602-1G>C; p.?)
Fam-13	HBOC	Ovarian cancer	49	70 (β)	<i>SDHB</i> [c.505C>T; p.(Gln169*)]	<i>FANCA</i> [c.3558dupG; p.(Arg1187Glu fs*28)]

\*Cell shadow code: dark grey: high-risk genes, light grey: moderate to low-risk genes (see online supplementary table 1).

†These patients are compound heterozygous for mutations at the same time, therefore they do not strictly fulfil the MINAS first definition.

AFAP, attenuated familial adenomatous polyposis; HBOC, hereditary breast-ovarian cancer; HNPCC, hereditary non-polyposis colorectal cancer; MEN1, multiple endocrine neoplasia type 1; MINAS, multilocus inherited neoplasia alleles syndrome.

The authors highlighted that data gathered in the literature presented inherent ascertainment bias in relation to the genes and patients analysed. Most of the cases studied in the prepanel era were patients with breast and ovarian or colorectal cancer, in which only a few suspected genes were analysed, hence most examples with double mutations are patients with two germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations or with constitutional mismatch repair deficiency syndrome, the latter with a clearly defined severe phenotype.<sup>10–13</sup> In addition, homozygosity for the founder c.1100delC *CHEK2* mutation has been associated with high breast cancer risk relative to heterozygous carriers.<sup>14</sup>

We report the genotype and phenotype of the largest unbiased MINAS cohort of patients with hereditary cancer analysed with a comprehensive gene panel that includes almost all hereditary cancer genes described in the literature.

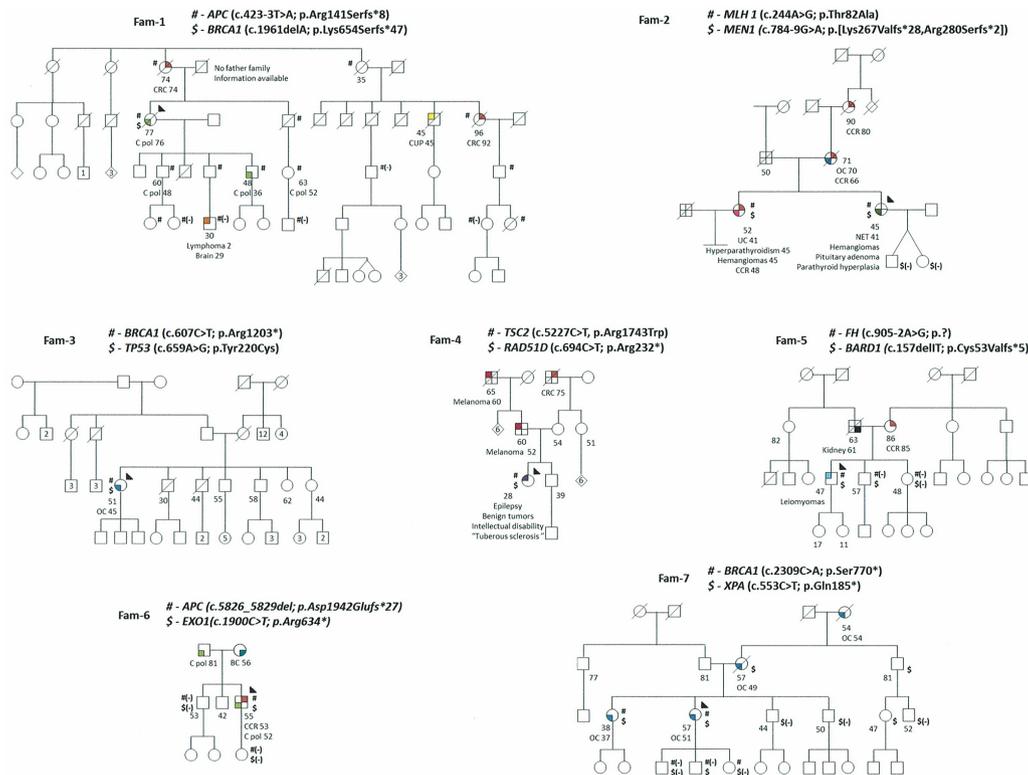
## MATERIALS AND METHODS

Our study population is a cohort of 1023 unrelated adult patients with clinical suspicion of hereditary cancer, visited in the Genetic Counselling Unit of the Catalan Institute of Oncology. Institutional review board approval was obtained for panel testing. For genetic testing, we used our validated custom I2HCP gene panel (containing 122–135 genes, depending on the version used).<sup>15</sup> Variant classification was conducted under American College of Medical Genetics and Genomics guidelines.<sup>16</sup> When possible, cosegregation analysis was performed.

A brief description of the whole cohort is depicted in online supplementary table 1 and online supplementary figure 1 (comprehensive analysis is under publication, Feliubadaló *et al*, submitted manuscript). From our cohort of 1023 patients, 16% had multiple tumours. Of them, four patients are part of our MINAS series. For the purposes of this study, only patients with more than one pathogenic/likely pathogenic mutation (hereafter, ‘mutation’) in dominant cancer-predisposing genes are presented (online supplementary table 2). All the mutations reported here were confirmed by Sanger sequencing. All patients underwent a tiered-binned informed consent process. Twenty-four of our 135 panel genes were denominated CORE genes (Feliubadaló *et al*, submitted manuscript). Pathogenic variants in all these genes were returned to patients—including those with an unrelated phenotype, unless patients did not consent for the CORE panel analysis. The remaining genes of the panel were considered as research genes and are used for research purposes and the results are then explained to families in this scenario where cosegregation analysis is requested.

## RESULTS

We identified 13 unrelated patients carrying more than one mutation (1.37%) (table 1, figures 1 and 2), representing 5.75% of patients with pathogenic mutations in our study population (the overall mutation detection yield is 22.14%). The referral criteria for each are summarised in online supplementary table 1.



**Figure 1** Pedigrees of MINAS patients. Filled quarters of symbols indicate affected patients (each color denotes a specific type of tumor). Current age, age at death and age at diagnosis, when available, are also detailed. Proband is marked by an arrow, carrier status was studied in available relatives, and those carrying the variant are shown with the variant symbol (#,\$) and if genotyped and not carries a (-) is under the mutation symbol. A number inside a symbol denotes the number of siblings condensed in the symbol. Brain C (light orange), BC: breast cancer (emerald), C pol: colon polyposis (light green), CRC: colorectal cancer (red), CUP: carcinoma of unknown primary (yellow), Kidney Cancer (black), Leiomyomas (light blue), Lymphoma (orange), Melanoma (brown), NET: neuroendocrine tumor (dark green), OC: ovarian cancer (blue), Tuberous sclerosis (purple), UC: uterine carcinoma (pink).

Nine patients had one high-risk gene mutation (Fam-1 to Fam-9); all showed an association with the proband's clinical phenotype. The second mutation in these families did not translate into recognised clinical manifestations, except for Fam-2, in which two sisters carry two high-risk mutations; one presented a phenotype consistent with the clinical features of both cancer syndromes (*MLH1* and *MEN1*), whereas the other showed only *MEN1* clinical traits. In Fam-7, two sisters with double mutations (*BRCA1* and *XPA*) presented ovarian cancer at ages 37 and 51, respectively. It should be noted that in two additional patients the second mutation was in a high-risk gene (*BRCA1* and *TP53*), whereas in the remainder the mutations were in genes associated with moderate or low risk of breast, ovarian or colorectal cancer (*RAD51D*, *XPA*, *BARD1*, *EXO1*, *ATM* and *ERCC3*).

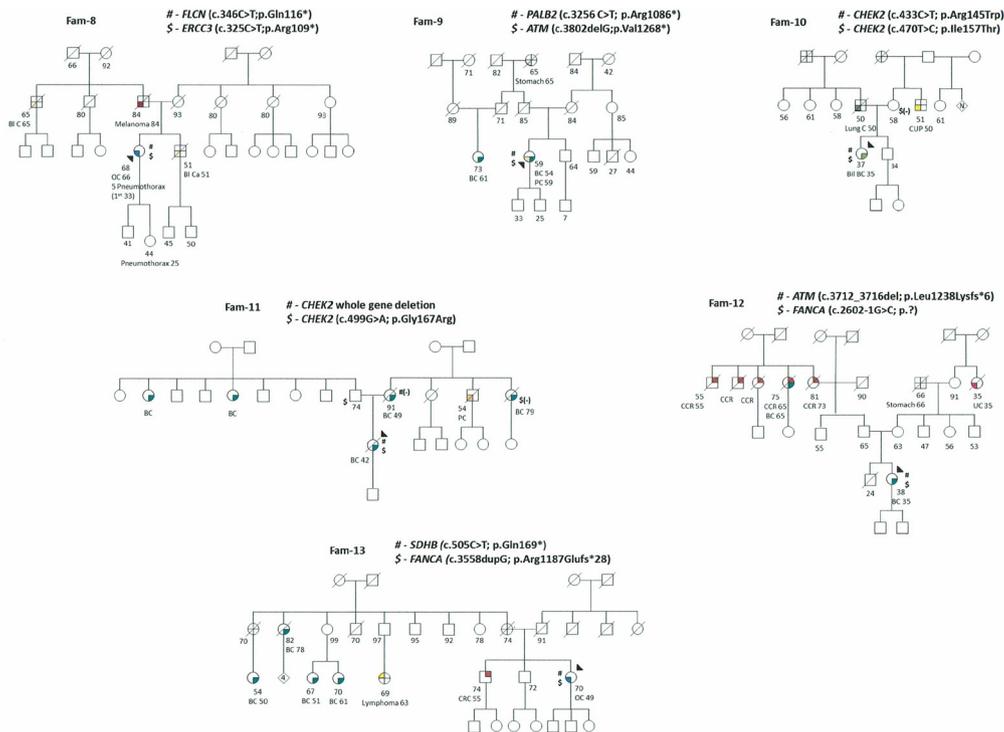
Three cases (Fam-10 to Fam-12) with clinical suspicion of hereditary breast-ovarian cancer harbour two mutations in moderate to low breast cancer risk genes: one patient with mutations in *ATM* and *FANCA* genes and two patients with biallelic mutations in *CHEK2*. Two of these patients were diagnosed with young-onset breast cancer (35 years) and the third was diagnosed with metastatic breast cancer at 42 years and had a poor outcome; none had a family history of breast cancer.

The last patient was diagnosed with ovarian cancer before the age of 50 and presented mutations in *SDHB* and *FANCA*, which are difficult to associate with the observed phenotype (Fam-13).

## DISCUSSION

The term MINAS was introduced with a view to discerning whether carriers of pathogenic mutations in more than one

dominant hereditary cancer gene have specific clinical characteristics or are associated with a more severe phenotype. In our series, 15 patients from 13 families are carriers of two pathogenic mutations in dominant hereditary cancer genes. The most common situation was the presence of a mutation in a high-risk gene associated with the proband's cancer phenotype and a second mutation without current clinical manifestations in the proband or the family. A mixed clinical presentation was only observed in one family where one of carriers of *MEN1* and *MLH1* mutations presented clinical traits of the two hereditary cancer conditions. Interestingly, in three cases of early-onset breast cancer the proband carried two pathogenic mutations in moderate to low-risk genes, suggesting an additive effect of these two mutations. This hypothesis merits further exploration and is additionally supported by Dutch population data for the analysis of the founder c.1100delC *CHEK2* mutation.<sup>14</sup> It is important to note that the two patients who were compound heterozygotes for *CHEK2* mutations do not fulfil the strict definition of MINAS made formerly since both mutations are in the same gene, but we really believe that the fact of observing a severe phenotype in the three instances with mutations in moderate to low cancer risk genes makes it worth highlighting as well as being documented together in the MINAS open database. Notably, we highlight the identification of mutations in known high-risk cancer-associated genes (such as *BRCA1*, *TP53* or *RAD51C*) that, in this context of double mutations, behave as low-penetrance pathogenic variants with no personal or family cancer history. There are different possible reasons for this, such as young age of the proband, incomplete penetrance, a de novo mutation in the proband,



**Figure 2** Pedigrees of MINAS patients. Filled quarters of symbols indicate affected patients (each color denotes a specific type of tumor). Current age, age at death and age at diagnosis, when available, are also detailed. Proband is marked by an arrow, carrier status was studied in available relatives, and those carrying the variant are shown with the variant symbol (#,\$) and if genotyped and not carriers a (-) is under the mutation symbol. A number inside a symbol denotes the number of siblings condensed in the symbol. Bl C: bladder cancer (light yellow), BC: breast cancer (emerald), Bil BC: bilateral breast cancer (emerald), CRC: colorectal cancer (red), CUP: carcinoma of unknown primary (yellow), Kidney Cancer (black), LC: lung cancer (grey), Lymphoma (orange), Melanoma (brown), OC: ovarian cancer (blue), PC: pancreas cancer (light orange), Stomach cancer (light grey), Tuberosus sclerosis (purple), UC: uterine carcinoma (pink).

genetic mosaicism, lower risk than expected for the specific mutation identified or incomplete/missing family information. Hopefully, these can be clarified with cosegregation data, functional analysis or tumour profiling. In such situations, genetic counselling, clinical surveillance and cascade testing should be offered since these mutations are in genes of clearly known clinical utility.

In conclusion, further analysis and prospective follow-up of these patients is needed to improve our knowledge of the clinical relevance and consequences of MINAS. Of potential clinical and scientific interest is the putative relation of double mutations in moderate to low cancer risk genes with a severe clinical phenotype in early onset of cancer. As suggested by Whitworth, sharing genetic and clinical data and the continuous clinical update of these patients is crucial. To this end, all our cases have been submitted to the open database created by Whitworth (<https://databases.lovd.nl/shared/diseases/04296>).

#### Author affiliations

- <sup>1</sup>Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
- <sup>2</sup>Program in Molecular Mechanisms and Experimental Therapy in Oncology (Oncobell), IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
- <sup>3</sup>Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
- <sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica en RED (CIBERONC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
- <sup>5</sup>Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBGI, Girona, Spain
- <sup>6</sup>High Risk and Cancer Prevention Unit, Medical Oncology Department, University Hospital Vall d'Hebron and Vall d'Hebron Institute of Oncology, Barcelona, Spain
- <sup>7</sup>Medical Sciences Department, School of Medicine, University of Girona, Girona, Spain

**Acknowledgements** We thank the participating patients and families and all members of the Genetic Counselling Unit and Genetic Diagnostic Unit involved in the Hereditary Cancer Program at the Catalan Institute of Oncology (ICO-IDIBELL). We thank CERCA Program/Generalitat de Catalunya for institutional support.

**Contributors** Planning the project: CL, JB, JBG, GC, AS and JdV. Preparation of samples for further study: OC. Analysis of the mutations found in the sequencing and checking by Sanger: JdV, PR, LF, SG, GV, ET and CL. Correlation of the findings with the clinic of the individuals studied and their families: AS, JdV, LF, ÈGG, SG, ÀI, ET, MN, JBG, MP, JB and CL. Genetic counselling: ÈGG, ÀV, ÀI, MN and AS. Global analysis of the results and preparation of the manuscript: AS, JdV, ÈGG, JB, LF, MP and CL.

**Funding** Contract grant sponsor: Supported by the Carlos III National Health Institute and Ministerio de Educación y Ciencia funded by FEDER funds—a way to build Europe (PI16/00563, PI16/01363, SAF2015-68016-R and CIBERONC); the Government of Catalonia (Pla estratègic de recerca i innovació en salut (PERIS), 2017SGR1282 and 2017SGR496); and the scientific foundation Asociación Española Contra el Cáncer.

**Competing interests** None declared.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitari de Bellvitge.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Open access** This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

#### REFERENCES

- 1 Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med* 2008;359:2143–53.

- 2 Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet* 2013;132:1077–130.
- 3 Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004;4:665–76.
- 4 Robson ME, Bradbury AR, Arun B, Domchek SM, Ford JM, Hampel HL, Lipkin SM, Syngal S, Wollins DS, Lindor NM. American Society of clinical oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 2015;33:3660–7.
- 5 Thompson ER, Rowley SM, Li N, McInerney S, Devereux L, Wong-Brown MW, Trainer AH, Mitchell G, Scott RJ, James PA, Campbell IG. Panel testing for familial breast cancer: calibrating the tension between research and clinical care. *J Clin Oncol* 2016;34:1455–9.
- 6 Balmaña J, Digiiovanni L, Gaddam P, Walsh MF, Joseph V, Stadler ZK, Nathanson KL, Garber JE, Couch FJ, Offit K, Robson ME, Domchek SM. Conflicting interpretation of genetic variants and cancer risk by commercial laboratories as assessed by the prospective registry of multiplex testing. *J Clin Oncol* 2016;34:4071–8.
- 7 Couch FJ, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Polley EC, Na J, Hallberg E, Moore R, Thomas A, Lilyquist J, Feng B, McFarland R, Pesaran T, Huether R, LaDuca H, Chao EC, Goldgar DE, Dolinsky JS. Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. *JAMA Oncol* 2017;3:1190.
- 8 Whitworth J, Skytte A-B, Sunde L, Lim DH, Arends MJ, Happerfield L, Frayling IM, van Minkelen R, Woodward ER, Tischkowitz MD, Maher ER. Multilocus inherited neoplasia alleles syndrome. *JAMA Oncol* 2016;2:373.
- 9 Whitworth J, Smith PS, Martin J-E, West H, Luchetti A, Rodger F, Clark G, Carss K, Stephens J, Stirrups K, Penkett C, Mapeta R, Ashford S, Megy K, Shakeel H, Ahmed M, Adlard J, Barwell J, Brewer C, Casey RT, Armstrong R, Cole T, Evans DG, Fostira F, Greenhalgh L, Hanson H, Henderson A, Hoffman J, Izatt L, Kumar A, Kwong A, Laloo F, Ong KR, Paterson J, Park S-M, Chen-Shtoyerman R, Searle C, Side L, Skytte A-B, Snape K, Woodward ER, Tischkowitz MD, Maher ER, Aitman T, Alachkar H, Ali S, Allen L, Allsup D, Ambegaonkar G, Anderson J, Antrobus R, Armstrong R, Arno G, Arumugakani G, Ashford S, Astle W, Attwood A, Austin S, Bacchelli C, Bakchoul T, Bariana TK, Baxendale H, Bennett D, Bethune C, Bibi S, Bitner-Glindzicz M, Bleda M, Boggard H, Bolton-Maggs P, Booth C, Bradley JR, Brady A, Brown M, Browning M, Bryson C, Burns S, Calleja P, Canham N, Carmichael J, Carss K, Caulfield M, Chalmers E, Chandra A, Chinnery P, Chitre M, Church C, Clement E, Clements-Brod N, Clowes V, Coghlan G, Collins P, Cookson V, Cooper N, Corris P, Creaser-Myers A, DaCosta R, Daugherty L, Davies S, Davis J, De Vries M, Deegan P, Deevi SVV, Deshpande C, Devlin L, Dewhurst E, Dixon P, Doffinger R, Dormand N, Drewe E, Edgar D, Egner W, Erber WN, Erwood M, Erwood M, Everington T, Favier R, Firth H, Fletcher D, Flinter F, Fray A, Freson K, Furie B, Furnell A, Gale D, Gardham A, Gattens M, Ghali N, Ghataorhe PK, Ghurye R, Gibbs S, Gilmour K, Gissen P, Goddard S, Gomez K, Gordins P, Graf S, Gräf S, Greene D, Greenhalgh A, Greinacher A, Grigoriadou S, Grozeva D, Hackett S, Hadinnapola C, Hague R, Haimel M, Halmagyi C, Hammerton T, Hart D, Hayman G, Heemskerk JWM, Henderson R, Hensiek A, Henskens Y, Herwadkar A, Holden S, Holder M, Holder S, Hu F, Huis in't Veld A, Huissoon A, Humbert M, Hurst J, James R, Jolles S, Josifova D, Kazmi R, Keeling D, Kelleher P, Kelly AM, Kennedy F, Kiely D, Kingston N, Koziell A, Krishnakumar D, Kuijpers TW, Kuijpers T, Kumararatne D, Kurian M, Laffan MA, Lambert MP, Allen HL, Lango-Allen H, Lawrie A, Lear S, Lees M, Lentaigne C, Liesner R, Linger R, Longhurst H, Lorenzo L, Louka E, Machado R, Ross RM, MacLaren R, Maher E, Maimaris J, Mangles S, Manson A, Mapeta R, Markus HS, Martin J, Masati L, Mathias M, Matser V, Maw A, McDermott E, McLannet C, Meacham S, Meehan S, Megy K, Mehta S, Michaelides M, Millar CM, Moledina S, Moore A, Morrell N, Mumford A, Murng S, Murphy E, Nejentsev S, Noorani S, Nurden P, Oksenhendler E, Othman S, Ouwehand WH, Ouwehand WH, Papadia S, Park S-M, Parker A, Pasi J, Patch C, Paterson J, Payne J, Peacock A, Peerlinck K, Penkett CJ, Pepke-Zaba J, Perry D, Perry DJ, Pollock V, Polwarth G, Ponsford M, Qasim W, Quinti I, Rankin S, Rankin J, Raymond FL, Rayner-Matthews P, Rehnstrom K, Reid E, Rhodes CJ, Richards M, Richardson S, Richter A, Roberts I, Rondina M, Rosser E, Roughley C, Roy N, Rue-Albrecht K, Samarghitean C, Sanchis-Juan A, Sandford R, Santra S, Sargur R, Savic S, Schotte G, Schulman S, Schulze H, Scott R, Scully M, Seneviratne S, Sewell C, Shamardina O, Shipley D, Simeoni I, Sivapalaratnam S, Smith KGC, Sohal A, Southgate L, Staines S, Staples E, Stark H, Stauss H, Stein P, Stephens J, Stirrups K, Stock S, Suntharalingam J, Talks K, Tan Y, Thachil J, Thaventhiran J, Thomas E, Thomas M, Thompson D, Thrasher A, Tischkowitz M, Titterton C, Toh C-H, Toshner M, Treacy C, Trembath R, Tuna S, Turek W, Turro E, Van Geet C, Veltman M, Vogt J, von Ziegenweld J, Vonk Noordegraaf A, Wakeling E, Wanjiku I, Warner TQ, Wassmer E, Watkins H, Watt C, Webster ndrew, Welch S, Westbury S, Wharton J, Whitehorn D, Wilkins M, Willcocks L, Williamson C, Woods G, Woods G, Wort J, Yeatman N, Yong P, Young T, Yu P. Comprehensive cancer-predisposition gene testing in an adult multiple primary tumor series shows a broad range of deleterious variants and atypical tumor phenotypes. *Am J Hum Genet* 2018;103:1–16.
- 10 Tung N, Battelli C, Allen B, Kaldate R, Bhatnagar S, Bowles K, Timms K, Garber JE, Herold C, Ellisen L, Krejdosky J, DeLeonardis K, Sedgwick K, Soltis K, Roa B, Wenstrup RJ, Hartman AR. Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer* 2015;121:25–33.
- 11 Silva-Smith R, Sussman DA. Co-occurrence of Lynch syndrome and juvenile polyposis syndrome confirmed by multigene panel testing. *Fam Cancer* 2018;17:87–90.
- 12 Rebbeck TR, Friebel TM, Mitra N, Wan F, Chen S, Andrusis IL, Apostolou P, Arnold N, Arun BK, Barrowdale D, Benitez J, Berger R, Berthet P, Borg A, Buys SS, Caldes T, Carter J, Chiquette J, Claes KB, Couch FJ, Cybulski C, Daly MB, de la Hoya M, Diez O, Domchek SM, Nathanson KL, Durda K, Ellis S, Evans DG, Foretova L, Friedman E, Frost D, Ganz PA, Garber J, Glendon G, Godwin AK, Greene MH, Gronwald J, Hahnen E, Hallberg E, Hamann U, Hansen TV, Imyanitov EN, Isaacs C, Jakubowska A, Janavicius R, Jaworska-Bieniek K, John EM, Karlan BY, Kaufman B, Investigators K, Kwong A, Laitman Y, Lasset C, Lazaro C, Lester J, Loman N, Lubinski J, Manoukian S, Mitchell G, Montagna M, Neuhausen SL, Nevanlinna H, Niederacher D, Nussbaum RL, Offit K, Olah E, Olopade OI, Park SK, Piedmonte M, Radice P, Rappaport-Fuerhauser C, Rookus MA, Seynaeve C, Simard J, Singer CF, Soucy P, Southey M, Stoppa-Lyonnet D, Sukienicki G, Szabo CI, Tancredi M, Teixeira MR, Teo SH, Terry MB, Thomassen M, Tihomirova L, Tischkowitz M, Toland AE, Toloczko-Grabarek A, Tung N, van Rensburg EJ, Villano D, Wang-Gohrke S, Wappenschmidt B, Weitzel JN, Zidan J, Zorn KK, McGuffog L, Easton D, Chenevix-Trench G, Antoniou AC, Ramus SJ. EMBRACEHEBON. Inheritance of deleterious mutations at both BRCA1 and BRCA2 in an international sample of 32,295 women. *Breast Cancer Res* 2016;18:112.
- 13 Katharina W, Kratz CP, Vasen HFA, Caron O, Colas C, Entz-Werle N, Gerdes AM, Goldberg Y, Ilencikova D, Muleris M, Duval A, Lavoine N, Ruiz-Ponte C, Slavic I, Burkhardt B, Brugieres L. Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Suggestions of the European consortium 'Care for CMMRD' (C4CMMRD). *J Med Genet* 2014.
- 14 Adank MA, Jonker MA, Kluij I, van Mil SE, Oldenburg RA, Mooi WJ, Hogervorst FB, van den Ouweland AM, Gille JJ, Schmidt MK, van der Vaart AW, Meijers-Heijboer H, Waisfisz Q. CHEK2\*1100delC homozygosity is associated with a high breast cancer risk in women. *J Med Genet* 2011;48:860–3.
- 15 Castellanos E, Gel B, Rosas I, Tornero E, Santin S, Pluvinet R, Velasco J, Sumoy L, Del Valle J, Peruchio M, Blanco I, Navarro M, Brunet J, Pineda M, Feliubadaló L, Capellá G, Lázaro C, Serra E. A comprehensive custom panel design for routine hereditary cancer testing: preserving control, improving diagnostics and revealing a complex variation landscape. *Sci Rep* 2017;7:39348.
- 16 Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405–23.

### **10.2.2 Artículo 2**

Agostina Stradella, Jesús del Valle, Paula Rofes, Gardenia Vargas-Parra, Mónica Salinas, Sara González, Eva Montes, Adriana López-Doriga, Carolina Gómez, Rafael de Cid, Esther Darder, Alex Teulé, Ares Solanes, Elisabet Munté, Gabriel Capellà, Marta Pineda, Lidia Feliubadaló, Joan Brunet, Conxi Lázaro. ERCC3, a new ovarian cancer susceptibility gene? *European Journal of Cancer* 141 (2020) 1-8. Doi: 10.1016/j.ejca.2020.09.023.



## Original Research

*ERCC3*, a new ovarian cancer susceptibility gene?

Agostina Stradella <sup>a,b,c,1</sup>, Jesús del Valle <sup>a,b,d,1</sup>, Paula Rofes <sup>a,b,d</sup>,  
 Gardenia Vargas-Parra <sup>a,b,d</sup>, Mónica Salinas <sup>a,b,d</sup>, Sara González <sup>a,b,d</sup>,  
 Eva Montes <sup>a,b,d</sup>, Adriana López-Doriga <sup>e,f</sup>, Carolina Gómez <sup>a,b,d</sup>,  
 Rafael de Cid <sup>g</sup>, Esther Darder <sup>a,b,d</sup>, Alex Teulé <sup>a,b,d</sup>, Ares Solanes <sup>a,b,d</sup>,  
 Elisabet Munté <sup>a,b,d</sup>, Gabriel Capellà <sup>a,b,d</sup>, Marta Pineda <sup>a,b,d</sup>,  
 Lidia Feliubadaló <sup>a,b,d</sup>, Joan Brunet <sup>a,d,h,2</sup>, Conxi Lázaro <sup>a,b,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL-IGTP-IDIBGI, Hospitalet de Llobregat, Badalona, Girona, Spain

<sup>b</sup> Program in Molecular Mechanisms and Experimental Therapy in Oncology (Oncobell), IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Spain

<sup>e</sup> Oncology Data Analytics Program (ODAP), Catalan Institute of Oncology, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Consortium for Biomedical Research in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain

<sup>g</sup> Genomes for Life – GCAT Lab Group, IGTP, Institut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain

<sup>h</sup> Medical Sciences Department, School of Medicine, University of Girona, Girona, Spain

Received 31 July 2020; received in revised form 22 September 2020; accepted 25 September 2020

**KEYWORDS**

ERCC3;  
 Hereditary Breast and  
 Ovarian Cancer;  
 HBOC;  
 Moderate cancer risk;  
 Ovarian cancer;  
 Breast cancer

**Abstract Background:** Hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC) is an inherited disorder with an increased risk of breast cancer (BC) and ovarian cancers (OC). Mutations in *BRCA1-BRCA2* explains less than a half of cases. In the last decade several genes with different penetrance have been associated with an increased risk of BC or OC. A recurrent heterozygous *ERCC3* truncating mutation increases the risk for breast cancer in patients with Ashkenazi Jewish ancestry. Our study aimed to investigate the role of *ERCC3* truncating variants in a cohort of patients with suspicion of HBOC.

**Patients and methods:** *ERCC3* screening by multigene-panel analysis in 1311 unrelated patients after our regional consensus for genetic testing in hereditary cancer was done. In addition, 453 Spanish cancer-free individuals and 51,343 GnomAD non-Finnish, non-cancer

\* Corresponding author: Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL and CIBERONC. Av. Gran Via 199-203, 08908, Hospitalet de Llobregat, Spain.

E-mail address: [clazaro@iconcologia.net](mailto:clazaro@iconcologia.net) (C. Lázaro).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work and should be considered first co-authors. <sup>2</sup> These authors should be considered senior co-authors.

European individuals were used as control populations.

**Results:** We identified 13 patients with heterozygous *ERCC3* truncating variants (0.99%). Five of them also carried a mutation in a high- /moderate-penetrance HBOC gene (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, and *TP53*) being Multilocus Inherited Neoplasia Alleles syndrome (MINAS) patients. The frequency in 453 Spanish controls was of 0.22%; similar to that observed in 51,343 non-Finnish European GnomAD population (0.24%). We found an almost statistically significant association of truncating *ERCC3* variants with BC (odds ratio [OR] = 2.25, confidence interval [CI] = 0.6–5.93,  $P = 0.11$ ), and we observed for the first time a significant association with OC (OR = 4.74, CI = 1–14.34,  $P = 0.028$ ), that holds even after removing MINAS cases.

**Conclusions:** To our knowledge, this is the largest HBOC series comprehensively analysed for *ERCC3* mutations, and the first study identifying *ERCC3* as a cancer risk for OC.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC) is an inherited disorder showing an increased risk of breast cancer (BC) and ovarian cancer (OC) at early age [1]. Most cases of HBOC are caused by mutations in *BRCA1-Brca2* genes. In the last decade several genes with different penetrance have been associated with an increased risk of BC and/or OC [2]. In addition, hundreds of single nucleotide polymorphisms have been described as cancer risk modifiers for BC/OC [3,4] although an important fraction of the familial risk remains unexplained [5].

In this scenario *ERCC3*, a nucleotide excision repair gene encoding an ATPase/helicase protein involved in DNA repair, emerged as a good candidate to explore in patients with HBOC. Biallelic mutations in *ERCC3* have been described to cause xeroderma pigmentosum complementation group B/Cockayne syndrome and also photosensitive trichothiodystrophy-2 disorder. A recurrent heterozygous *ERCC3* truncating mutation was described to increase the risk of BC in individuals with Ashkenazi Jewish ancestry [6]. This variant, c.325C>T p.Arg109\*(R109X), was identified through exome sequencing in three individuals from the same *BRCA*-wild-type kindred when screening a cohort of early onset Ashkenazi Jews patients. A case–control study for this mutation in 3286 BC patients and 2716 control Ashkenazi Jews revealed that carriers of this mutation had a risk of BC of 1.53 ( $P = 0.023$ ) and for oestrogen receptor (ER)–positive BC of 1.73 ( $P = 0.007$ ).

Other studies identified germline *ERCC3* deleterious variants. Tedaldi et al. [7], when screening 255 patients with HBOC, identified a patient carrying a truncating variant of *ERCC3* who also carried a pathogenic variant in *BRCA1*. Bonache et al. [8] identified a patient carrying a nonsense *ERCC3* variant in the analysis of 192 patients with HBOC. Recently the analysis of 23 BC genes in a series of African American women with BC identified 14 carriers of *ERCC3* mutations in 5054

patients and nine carriers in 4993 unaffected controls (OR) 2.40  $P = 0.044$ ) [9]. In addition, the analysis of 1000 patients with different tumours identified four carriers of germline truncating variants in *ERCC3* (0.4%), corresponding to breast, colorectal, sarcoma, and pancreatic tumours [10]. Finally, a study of 586 patients with urothelial cancer detected four patients with germline *ERCC3* truncating variants (0.7%), all diagnosed with bladder cancer at a young age [11].

In the present study, we investigate the prevalence of deleterious germline *ERCC3* variants in a cohort of 1311 patients with clinical suspicion of hereditary BC and/or OC and compare with a cohort of 453 geographically matched cancer-free controls and with a 51,343 individual GnomAD non-cancer, non-Finnish European cohort.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and controls

Included in this study were a total of 1311 patients index cases with suspected breast and/or ovarian hereditary cancer (HC) referred via our genetic counselling units and that underwent Next Generation Sequencing (NGS) panel testing based on their clinical suspicion [12] (Table 1). The clinical consensus criteria in our regions includes the following patients: Patients with personal history of BC before 40 years; patients with triple-negative BC before 60 years; patients with BC in males; patients with non-mucinous OC, patients with a family history of two cases of BC before age 50; patients with three or more cases of first-degree BC; patients with a case of bilateral BC associated with another case of BC in the family. Informed written consent for both diagnostic and research purposes was obtained from all patients, and the study protocol was approved by the ethics IDIBELL committee (PR278/19).

A set of 453 Spanish cancer-free individuals were used as controls. One hundred and ninety four

Table 1

Summary of the Next Generation Sequencing panel results in our hereditary breast and/or ovarian cancer cohort and in the control populations.

Clinical groups	Number of patients (%)	Tested genes by phenotype	Number of Pathogenic mutations (%)	<i>ERCC3</i> (%)	<i>ERCC3</i> excluding patients with other mutations <sup>S</sup> (%)
Only Breast Cancer, HBC	818 (62%)	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, TP53</i>	<b>85 LP/IP (10.39%):</b> 28 <i>BRCA2</i> , 22 <i>BRCA1</i> , 11 <i>ATM</i> , 11 <i>PALB2</i> , 5 <i>CHEK2</i> , 3 <i>RAD51C</i> , 2 <i>BRIP1</i> , 2 <i>MSH6</i> , 1 <i>MLH1</i>	7 (0.85) OR = 3.54 (1.39–7.54)** P = 0.005	4 (0.54) OR = 2.25 (0.6–5.93) P = 0.11
Only Ovarian Cancer, HOC	298 (23%)	<i>BRIP1, BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, MSH6, RAD51C, RAD51D</i>	<b>36 LP/IP (12.08%):</b> 17 <i>BRCA2</i> , 10 <i>BRCA1</i> , 4 <i>BRIP1</i> , 2 <i>RAD51D</i> , 1 <i>MSH6</i> , 1 <i>PALB2</i> , 1 <i>RAD51C</i>	3 (1.00) OR = 4.17 (0.84–12.58)* P = 0.04	3 (1.14) OR = 4.74(1–14.34)* P = 0.028
Breast and Ovarian Cancer, HBOC	195 (15%)	<i>ATM, BRIP1, BRCA1, BRCA2, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, RAD51C, RAD51D, TP53</i>	<b>41 LP/IP (21.02%):</b> 21 <i>BRCA1</i> , 12 <i>BRCA2</i> , 2 <i>ATM</i> , 2 <i>BRIP1</i> , 2 <i>CHEK2</i> , 1 <i>PALB2</i> , 1 <i>RAD51C</i>	3 (1.5) OR = 6.4 (1.29–19.42)* P = 0.013	1 (0.65) OR = 2.68(0.07–15.42) P = 0.315
<b>Total</b>	<b>1311</b>		<b>162 (12.36%)</b>	<b>13 (0.99)</b> OR = 4.1 (2.12–7.3) ** P = 4.44 × 10 <sup>-5</sup>	<b>8 (0.70)</b> OR = 2.87(1.21–5.86)** P = 0.009
			<b>Controls studied</b>		
			Spanish population cohort (453)		1 (0.22%)
			GnomAD 51,343 individual (non-Finnish European, non-cancer)		125 (0.24%)

OR, odds ratio. LP: likely Pathogenic. P: Pathogenic

<sup>S</sup> Patient with *FLCN* mutation was not removed because *FLCN* is not associated with HBOC.\*  $\alpha < 0.05$ .\*\*  $\alpha < 0.01$ .

individuals correspond to the GCAT cohort (Genomes For Life — Cohort Study of the Genomes of Catalonia) [13] and were screened with the same cancer panel; 259 control individuals belong to the Spanish Babelomics cohort, and *ERCC3* variants were obtained from exome sequencing [14].

## 2.2. NGS Panel testing

Genomic DNA was used to screen our I2HCP custom NGS panel, comprising 122–135 HC-associated genes, depending on the version used [15]. For this study we consider any variant that originate a premature stop codon or affecting canonical splice site positions (+1, +2, -1, -2) as a pathogenic or likely pathogenic variant (pathogenic variant hereinafter). All variants were confirmed by Sanger sequencing. Copy number analysis was performed from NGS data using the DECoN [16] tool with parameter optimisation [17].

## 2.3. Co-segregation analysis and loss of heterozygosity (LOH)

Both analyses were performed by Sanger sequencing when samples from relatives or tumour DNA was available.

## 2.4. GnomAD analysis

The GnomAD non-Finnish European population, non-cancer data set (Genome Aggregation Database, v2.1.1, <http://gnomad.broadinstitute.org/>) [18] was used as a control population. Variants were downloaded and filtered to identify predicted loss-of-function variants in *ERCC3*.

## 2.5. Statistical analysis

Differences in the allele frequency between cases and controls were determined by the Fisher exact test. Odds Ratios (OR) and the corresponding 95% confidence intervals (CI) were determined for two by two comparisons. Statistical tests were carried out using R v.3.5.1.

## 3. Results

In our cohort of 1311 unrelated patients with hereditary BC/OC, 162 pathogenic variants were identified as per clinical gene panel analysis (results summarised in Table 1 and detail of genes analysed by phenotype in Feliubadaló et al., 2019 [12]) meaning that 12.36% of the patients harbour mutations in high- /moderate-penetrance BC/OC genes. In addition, and with the aim of

investigating the role of pathogenic variants in the *ERCC3* gene, we performed an exhaustive analysis of small variants and copy number alterations in this gene. We identified 13 unrelated patients with heterozygous deleterious *ERCC3* variants; no copy number variations were identified. Interestingly five of the patients were also carriers of an additional pathogenic variant in a high- /moderate-penetrance HBOC gene, and one had concomitant Birt-Hogg-Dubé syndrome (BHD) (Table 2 and Figures 1 and 2).

The global *ERCC3* pathogenic variant carrier frequency throughout our cohort of HC patients was 0.99%. The percentage of *ERCC3* deleterious variants in the subset of patients with hereditary breast cancer (HBC) was of 0.85%, 1.00% in hereditary ovarian cancer (HOC) cases and 1.5% in patients with HBOC (Table 1). When removing carriers of other HBOC pathogenic variants percentages shift to 0.54% for HBC, 1.14% for HOC and 0.65% for HBOC (Table 1). Only one deleterious *ERCC3* variant was identified in our set of 453 cancer-free control cohort (0.22%). Four recurrent *ERCC3* variants were found in our cohort. The most

frequent variant was c.583C>T; p.(Arg195\*) which was identified in three unrelated patients. Three variants were found in two independent patients each, c.325C>T; p.(Arg109\*), c.335dup; p.(His112Glnfs\*4) and c.1757\_1758delAG; p.(Gln586Argfs\*17). Of note, one of the c.325C>T (R109X) carriers that self-reported to be of Jewish descent was diagnosed with OC but not BC.

The clinical characteristics of *ERCC3* carrier patients are depicted in Table 2. Considering the clinical phenotype of *ERCC3* patients without another HBOC mutation, five patients developed BC. The median age was 35 years (20–62), younger than the general population. Regarding the type of BC diagnosed, two patients had an ER-positive tumour, one an intraductal breast carcinoma (IDBC), one a triple-negative tumour (TNBC) and the other an ER-negative human epidermal growth factor receptor 2 (Her2)–positive tumour. All the invasive cases were high-grade tumours and had a high proliferative index. They were all treated with surgery and radiation therapy followed by chemotherapy; all presented a fairly normal evolution of the

Table 2  
*ERCC3* patients, personal and family cancer history and other genetic findings.

Family	Clinical indication	Index case tumour(s)	Age dx (y)	<i>ERCC3</i> mutation	Others cancers (y)	Additional pathogenic mutation
1	HBC	ER + BC	20	c.325C>T; p.(Arg109*)	Mother: ER + BC (50)	–
2	HBOC	ER + BC, PC	62, 77	c.335dup; p.(His112Glnfs*4)		–
3	HBC	IDBC	35	c.583C>T; p.(Arg195*)	Maternal aunt: ER + BC (54)	–
4	HOC	OCCC	64	c.760C>T; p.(Gln254*)		–
5	HBC	Her2+ BC	44	c.1421_1422insA; p.(Asp474Glnfs*2)	Mother: ER + BC (65) Maternal aunt: ER + BC (80)	–
6	HBC	TNBC	34	c.1757_1758delAG; p.(Gln586Argfs*17)		–
7	HOC	HGOSC	56	c.1757_1758delAG; p.(Gln586Argfs*17)		–
<b>MINAS <i>ERCC3</i> cases</b>						
8	HOC	HGOSC, Birt-Hogg-Dubé	66	c.325C>T; p.(Arg109*)	Father: CMM (84)	<i>FLCN</i> ; c.346C>T; p.(Gln116*)
9	HBOC	HGOSC, TNBC	63, 65	c.335dup; p.(His112Glnfs*4)	Mother: ER + Her2– BC (70), gastric cancer (80)	<i>BRCA1</i> : c.5123C>A; p.(Ala1708Glu, Asp1692_Trp1718delinsGly) <i>BRCA2</i> : c.3922G>T; p.(Glu1308*)
10	HBOC	ER + Her2– BC, mix HGOSC – OCCC	49, 50	c.583C>T; p.(Arg195*)	Sister: ER + Her2– BC (48) Mother: BC (72) Maternal cousin: BC (50)	<i>CHEK2</i> : c.349A>G; p.(Arg117Gly) <i>BRCA2</i> : c.8978_8991del; p.(Ser2993Phefs*20) <i>TP53</i> : c.724T>G; p.(Cys242Gly)
11	HBC	ER + BC	49	c.583C>T; p.(Arg195*)		
12	HBC	ER + Her2+ BC, IDC	48, 58	c.2218-1G>A; p.?	Mother: BC (60), Sister: Colon cancer (48)	
13	HBC	ER–, Her2+ BC	27	c.658-1G>A; p.?	Father: osteosarcoma (18), Spindle cell sarcoma (57); Daughter: Wilms tumour (1)	

HGOSC: ovarian high-grade serous carcinoma; TNBC: triple-negative breast cancer; IDBC: intraductal breast carcinoma; OCCC: ovarian clear-cell carcinoma; PC: peritoneal carcinoma; CMM: cutaneous malignant melanoma; IDC: invasive ductal carcinoma of the breast; ER: oestrogen receptor status; Her2: human epidermal growth factor receptor 2.

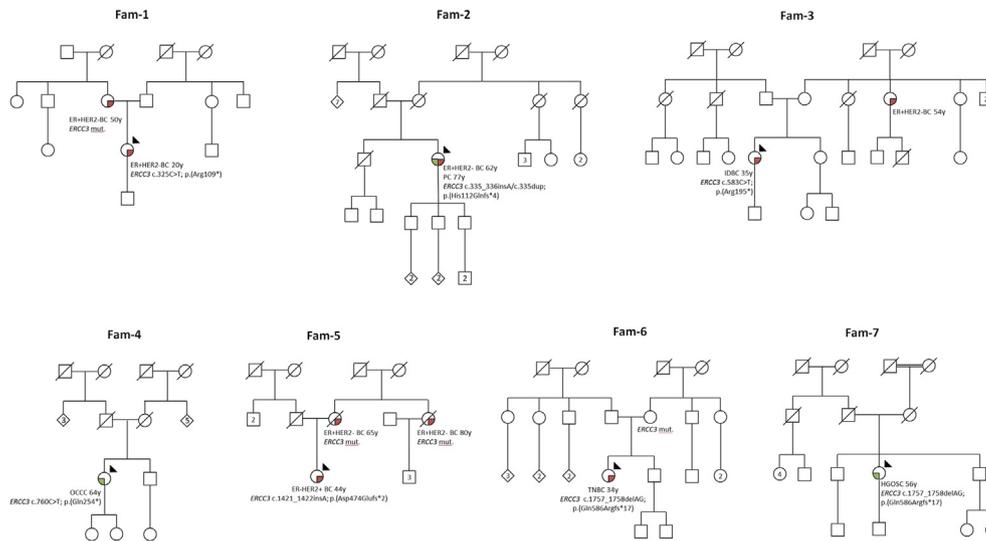


Fig. 1. Pedigrees of *ERCC3* patients without additional hereditary cancer gene mutations. Personal and family cancer history and co-segregation findings are depicted. Filled quarters of symbols indicate affected patients (each colour refers to a specific type of cancer/illness). Age at diagnosis is also detailed. Proband is marked by an arrow, carrier status was studied in available relatives, and those carrying the variant are marked with mut (carrier of variant) or wt (wild type). BC: breast cancer (red), HGOSC: ovarian high-grade serous carcinoma (green), IDBC: intraductal breast cancer (red), OCCC: ovarian clear cell carcinoma (green), PC: peritoneal carcinoma (green), TNBC: triple-negative breast cancer, ER: oestrogen receptor status (+ positive or – negative); Her2: human epidermal growth factor receptor 2 status (+ positive or – negative). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

disease, and none of them suffered tumour relapse. Regarding OC cases, four patients were diagnosed at a median age of 65 years (56–77), and two had clear cell carcinoma (50%). This proportion is higher than the expected although it could be biased because of the low number of patients. All patients presented a similar evolution: they were International Federation of Gynecology and Obstetrics stage IIIC at diagnosis and responded well to the initial platinum-based chemotherapy but relapsed after surgery.

It is worth noting that five of 13 *ERCC3* patients harbour an additional mutation in a high-/moderate-penetrance HBOC predisposition gene and could be considered multilocus inherited neoplasia alleles syndrome (MINAS) cases (Table 2 and Figure 2). Hence, index case of family 9 had also a pathogenic variant in *BRCA1*; she had an ovarian high-grade serous carcinoma at 63 and a TNBC at 65, and her mother developed an ER-positive BC at 70. Unfortunately, the co-segregation study for *ERCC3* could not be performed. Two *ERCC3* patients are carriers of a concurrent mutation in *BRCA2* (family 10 and family 12). The patient from family 10 developed an ER-positive BC aged 49 and a mix high-grade serous and clear-cell ovarian carcinoma at 50. Her mother developed an ER-positive BC at 72, and her sister was diagnosed with an ER-positive BC at 48. A co-segregation study carried out only in her sister showed that she carried the *ERCC3* mutation but not the *BRCA2* mutation. The other carrier of a concurrent *BRCA2* mutation (family 12) was diagnosed

with an ER-positive Her2-positive BC aged 48 and an IDBC in the same breast at 58. Within her family, her mother was diagnosed with BC at 60, and her sister developed colon cancer at 48. The index case of family 11 also carries the recurrent c.349A>G (p.Arg117Gly) *CHEK2* variant, which was shown to be significantly associated with BC in European women, with an OR of 2.26 ( $P = 0.003$ ) [19]; she was diagnosed with bifocal ER-positive BC cancer at age 49. The co-segregation study showed that the index case inherited the *ERCC3* mutation from her healthy mother. Lastly, the index case of family 13 also carries a likely pathogenic variant in *TP53*; she was diagnosed with an ER-negative Her2-positive breast tumour at age 27. Her family history supports the diagnosis of Li-Fraumeni syndrome; her daughter developed a Wilms tumour at one year of age, and her father suffered an osteosarcoma at 18 and a spindle cell sarcoma at 57. Both are carriers of the *TP53* mutation, and her father also carried the *ERCC3* variant. The patient carrying the *FLCN* mutation (family 8) developed an ovarian high-grade serous carcinoma at age 66 and also presented a classic BHD phenotype with spontaneous pneumothoraxes and renal cysts.

Co-segregation and LOH analysis was feasible in some additional cases; family 1 showed that the index case inherited the mutation from her mother, also affected with BC (infiltrating ductal ER positive carcinoma) at age 50. In this case it was possible to perform LOH in the tumour sample from the index patient, and

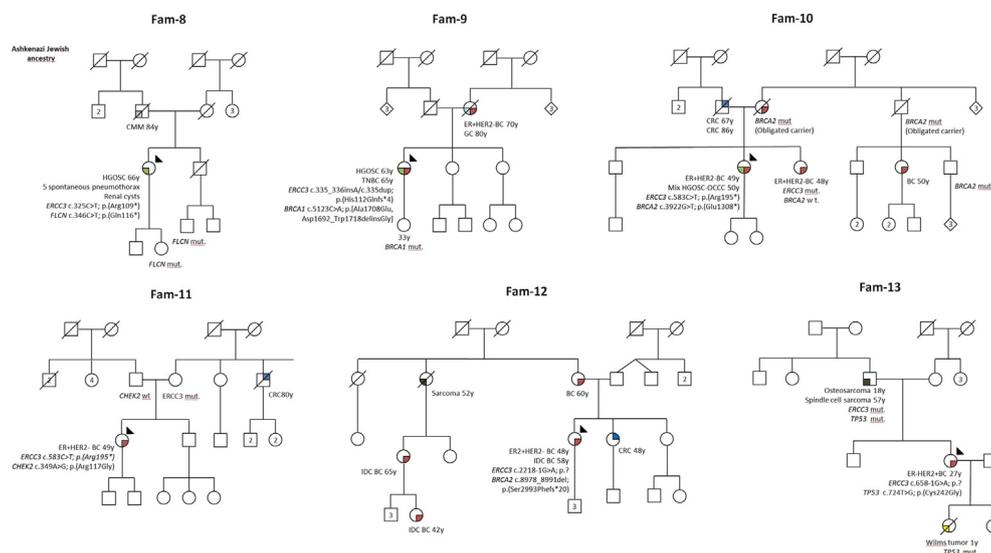


Fig. 2. Pedigrees of MINAS *ERCC3* cases. Personal and family cancer history and co-segregation findings. Filled quarters of symbols indicate affected patients (each colour refers to a specific type of cancer/illness). Age at diagnosis is also detailed. Proband is marked by an arrow, carrier status was studied in available relatives, and those carrying the variant are marked with mut (carrier of variant) or wt (wild type). BC: breast cancer (red), CMM: cutaneous malignant melanoma (grey), CRC: colorectal cancer (blue), GC: gastric cancer (light blue), HGOSC: ovarian high-grade serous carcinoma (green), IDBC: intraductal breast cancer (red), OCCC: ovarian clear cell carcinoma (green), PC: peritoneal carcinoma (green), sarcoma (brown), TNBC: triple-negative breast cancer (green), Wilms tumour (yellow), ER: oestrogen receptor status (+ positive or – negative); Her2: human epidermal growth factor receptor 2 status (+positive or – negative). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

analysis showed total loss of the mutated allele. Co-segregation analysis in family 5 demonstrated that the mother and aunt of the index case were also carriers of the pathogenic *ERCC3* variant, and both had BC at age 65 and 80, respectively. There was no evidence of LOH in the tumour samples from the three cases. In family 6, the *ERCC3* variant was inherited from the asymptomatic mother, and there was no evidence of LOH. Co-segregation analysis in family 10 was carried out only in the sister of the index patient who developed an ER-positive BC at age 48; she carries the variant in *ERCC3* but not in *BRCA2*. In the index breast tumour there was also no evidence of LOH. In family 11, co-segregation analysis found that the index case inherited the *ERCC3* mutation from her healthy mother.

NGS results in 453 control individuals from our population identified only one truncating *ERCC3* variant (0.22%). To increase the control cohort, pathogenic *ERCC3* variants in the non-Finnish European GnomAD 2.1.1 (non-cancer) population, identifying a total of 125 heterozygous carriers of 51,343 individuals (0.24%). To compare our cohort with this one we also performed statistics analysis excluding cases with mutations in *BRCA1/2*, *TP53* and *CHEK2* because these mutations, by themselves, can be responsible for the observed phenotype. We did not exclude the patient with the *FLCN* mutation as mutations in this gene are not associated with HBOC syndrome. With this analysis we found an almost statistically significant association

with BC OR = 2.25, CI = 0.6–5.93 and  $P = 0.011$ , as already reported but, interestingly, we also observed a significant association with OC (OR = 4.74, CI = 1–14.34,  $P = 0.028$ ); moreover, mutations in *ERCC3* demonstrated an increased risk in the BC and OC group, but this difference was not statistically significant (OR = 2.68, CI = 0.07–15.42,  $P = 0.315$ ) (Table 1).

#### 4. Discussion

In this study, we have gained insight into the prevalence of *ERCC3* loss-of-function mutations in patients with hereditary BC/OC by comprehensive analysis of the entire coding region. Our data evidenced that *ERCC3* heterozygous carriers showed a significant increased risk for OC (OR = 4.74) and evidenced a trend, although non-significant, for BC (OR = 2.25). This increased risk for OC is reported for the first time in the present study.

After the first Ashkenazi founder mutation (R109X) was identified, *ERCC3* variants have been described in 17 patients with BC [7–10] and in seven patients with other unrelated tumours [11,10], suggesting its putative role in cancer predisposition. The largest BC cohort was recently reported in a case–control study of 10,047 African Americans showing an OR of 2.4 (CI = 1.04–5.86,  $P = 0.44$ ) for BC and of 2.76 (CI = 1.08–7.10,  $P = 0.032$ ) for ER-positive BC [9]; co-occurrence with other mutations or other clinical characteristics were unavailable for this large study.

It is important to note that our work is the first to show a statistically significant increased risk of OC for *ERCC3* truncating variants (OR = 4.74, CI = 1.14–34,  $P = 0.028$ ). Besides the known risk of OC in carriers of mutations in *BRCA1/2* and MMR genes [20], in the last decade other high- and moderate-penetrance genes have shown an association with OC, such as *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* and *BRIP1* [21–23]. A recent study presented a multigene-panel analysis of 18 genes in a cohort of 1333 OC [22] describing a significant association for several genes besides *BRCA* and *MMR*, genes such as *RAD51D* with OR = 11.3 (2.6–103.4) and  $P < 0.001$ , *RAD51C* with OR = 5.7 (1.7–23.8) and  $P = 0.001$ , *BRIP1* with OR = 3.5 (1.1–13) and  $P = 0.03$ , *NBN* with OR = 3.5 (1.3–10.2) and  $P = 0.006$ , and *PPM1D* with OR = 13.82 (3.24–124.22)  $P = 0.001$ . The OR for *ERCC3* in our cohort is of 4.74, slightly lower to that found for *RAD51C* in the aforementioned study and higher than that observed for *BRIP1*. In relation to the histological features, while HBOC-related tumours are virtually all high-grade serous carcinoma, those related to Lynch syndrome are more frequently endometrioid and clear-cell type [20,24]. In our series there are a high proportion of clear-cell cases, but this could be biased by the small number of patients. In relation to BC it is worth to mention that our BC-*ERCC3* cases were diagnosed at a younger median age compared with the sporadic cases, although tumour subtype and outcome overlapped with the ones observed in sporadic BC cases.

Lastly, it captures our attention the high number of MINAS patients carrying a pathogenic *ERCC3* variants (50%) while the percentage of pathogenic mutations in our whole HC cohort was 12%. Interestingly, two more MINAS *ERCC3* cases have been previously reported in the literature. In Dumbrava's series they described a 13-year-old patient diagnosed with a solid pseudopapillary tumour of the pancreas, who carried two pathogenic variants, one in *MSH6* and one in *ERCC3*. In addition, Tedaldi et al. reported a BC patient with deleterious mutations in *BRCA1* and *ERCC3*. All these findings may suggest that *ERCC3* mutations could act as modifiers of the phenotype although this should be further analysed with caution and requires additional evidence from large cohorts.

In summary, our results provide strong evidence to confirm *ERCC3* as a cancer susceptibility gene for breast cancer and strongly suggest its association with OC. Its analysis in larger cohorts is needed to better weigh the relative risk of carriers for BC and OC, among other tumours. Our data also indicate a putative modifier role of *ERCC3* mutations in combination with high-penetrance cancer mutations although this is more speculative and needs further data to be confirmed.

## Authors contributions

ASt, JdV, RC, ALD, JB, CL performed the ERCC3 data analysis; PR, GVP, SG, LF, MP, EM, CG performed genetic tests; MS, ED, AT, GC, JB, ASo collected and analyse clinical information; ASt, JdV and CL wrote the manuscript; All authors reviewed and accepted the manuscript.

## Funding

Contract grant sponsor: Supported by the Carlos III National Health Institute funded by FEDER funds – a way to build Europe – PI19/00553; PI16/00563 and CIBERONC; and the Government of Catalonia (Pla estratègic de recerca i innovació en salut [PERIS-MedPerCan and URDCat projects], 2017SGR1282 and 2017SGR496).

## Conflict of interest statement

The authors have declared no conflicts of interest.

## Acknowledgements

The authors thank the CERCA Program/Generalitat de Catalunya for their institutional support. They also wish to thank all the members of the ICO Hereditary Cancer Program and to the patients who have consented to have their data included in this analysis.

## References

- [1] NCI dictionary. <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/terminologyresources/ncidictionaries>.
- [2] Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian SV, Nathanson KL, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med* 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1501341>.
- [3] Kuchenbaecker KB, McGuffog L, Barrowdale D, Lee A, Soucy P, Dennis J, et al. Evaluation of polygenic risk scores for breast and ovarian cancer risk prediction in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2017;109(7):1–15. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw302>.
- [4] Mavaddat N, Michailidou K, Dennis J, Lush M, Fachal L, Lee A, et al. Polygenic risk scores for prediction of breast cancer and breast cancer subtypes. *Am J Hum Genet* 2019;104(1):21–34. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.11.002>.
- [5] Fachal L, Dunning AM. From candidate gene studies to GWAS and post-GWAS analyses in breast cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2015; 30(Table 1):32–41. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.01.004>.
- [6] Vijai J, Topka S, Villano D, Ravichandran V, Maxwell KN, Maria A, et al. A recurrent ERCC3 truncating mutation confers moderate risk for breast cancer. *Canc Discov* 2016;6(11):1267–75. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0487>.
- [7] Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, Danesi R, Arcangeli V, Ravegnani M, et al. Multiple-gene panel analysis in a case series

- of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. *Oncotarget* 2017;8(29):47064–75. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16791>.
- [8] Bonache S, Esteban I, Moles-Fernández A, Tenés A, Duran-Lozano L, Montalban G, et al. Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings. *J Canc Res Clin Oncol* 2018;144(12):2495–513. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2763-9>.
- [9] Palmer JR, Polley EC, Hu C, John EM, Haiman C, Hart SN, et al. Contribution of germline predisposition gene mutations to breast cancer risk in African American women. *JNCI (J Natl Cancer Inst)* 2020;112:1–9. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa040>.
- [10] Dumbraiva EI, Brusco L, Daniels MS, Wathoo C, Shaw KR, Lu KH. Original report abstract expanded analysis of secondary germline findings from matched tumor/normal sequencing identifies additional clinically significant mutations. *JCO Precision Oncology* 2019;1–11.
- [11] Carlo MI, Ravichandran V, Srinivasan P, Bandlamudi C, Kemel Y, Ceyhan-Birsoy O, et al. Cancer susceptibility mutations in patients with urothelial malignancies. *J Clin Oncol* 2020;38(5):406–14. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01395>.
- [12] Feliubadaló L, López-Fernández A, Pineda M, Diez O, del Valle J, Gutiérrez-Enríquez S, et al. Opportunistic testing of BRCA1, BRCA2 and mismatch repair genes improves the yield of phenotype driven hereditary cancer gene panels. *Int J Canc* 2019;145(10):2682–91. <https://doi.org/10.1002/ijc.32304>.
- [13] Obón-Santacana M, Vilardell M, Carreras A, Duran X, Velasco J, Galván-Femenía I, et al. GCAT|Genomes for life: a prospective cohort study of the genomes of Catalonia. *BMJ Open* 2018;8(3). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-018324>.
- [14] Dopazo J, Amadoz A, Bleda M, Garcia-Alonso L, Alemán A, García-García, F, et al. 267 Spanish exomes reveal population-specific differences in disease-related genetic variation. *Mol Biol Evol* 2016;33(5):1205–18. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw005>.
- [15] Castellanos E, Gel B, Rosas I, Tornero E, Santín S, Pluvinet R, et al. A comprehensive custom panel design for routine hereditary cancer testing: preserving control, improving diagnostics and revealing a complex variation landscape. *Sci Rep* 2017. <https://doi.org/10.1038/srep39348>.
- [16] Fowler A, Mahamdallie S, Ruark E, Seal S, Ramsay E, Clarke M, et al. Accurate clinical detection of exon copy number variants in a targeted NGS panel using DECoN. *Wellcome Open Res* 2016;1:20. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.10069.1>.
- [17] Moreno-Cabrera JM, del Valle J, Castellanos E, Feliubadaló L, Pineda M, Brunet J, et al. Evaluation of CNV detection tools for NGS panel data in genetic diagnostics. *Eur J Hum Genet* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0675-z>.
- [18] Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141, 456 humans. *Nature* 2020;581:434–43.
- [19] Southey MC, Goldgar DE, Winqvist R, Pylkäs K, Couch F, Tischkowitz M, et al. PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS. *J Med Genet* 2016;53(12):800–11. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103839>.
- [20] Watson P, Vasen HFA, Mecklin JP, Bernstein I, Aarnio M, Järvinen HJ, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Canc* 2008;123(2):444–9. <https://doi.org/10.1002/ijc.23508>.
- [21] Nakonechny QB, Gilks CB. Ovarian cancer in hereditary cancer susceptibility syndromes. *Surg Pathol Clin* 2016;9(2):189–99. <https://doi.org/10.1016/j.path.2016.01.003>.
- [22] Lhotova K, Stolarova L, Zemankova P, Vocka M, Janatova M, Borecka M, et al. Multigene panel germline testing of 1333 Czech patients with ovarian cancer. *Cancers* 2020;3–16.
- [23] Angeli D, Salvi S, Tedaldi G. Genetic predisposition to breast and ovarian cancers: how many and which genes to test? *Int J Mol Sci* 2020;21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031128>.
- [24] Nakamura K, Banno K, Yanokura M, Iida M, Adachi M, Masuda K, et al. Features of ovarian cancer in Lynch syndrome (Review). *Mol Clin Oncol* 2014;2(6):909–16. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.397>.