



## Revisión

# Utilidad de los algoritmos de priorización de variantes con significado clínico desconocido en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario

## *Utility of algorithms for prioritization of variants with unknown significance in hereditary breast and ovarian cancer*

Verónica Castillo Guardiola<sup>1</sup>, M.<sup>a</sup> Desamparados Sarabia Meseguer<sup>1</sup>, Laura Rosado Jiménez<sup>1</sup>, Miguel Marín Vera<sup>2</sup>, José Antonio Macías Cerrolaza<sup>3</sup>, Encarnación Cuevas Tortosa<sup>2</sup>, Francisco Ruiz Espejo<sup>1</sup>, José Antonio Noguera Velasco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genómica. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. <sup>2</sup>Servicio de Oncología Médica. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. <sup>3</sup>Servicio de Oncología Médica. Hospital General Universitario Morales Meseguer. Murcia

**Recibido:** 06/08/2020  
**Aceptado:** 05/03/2021

**Correspondencia:** Verónica Castillo Guardiola. Laboratorio de Genómica. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. Ctra. Madrid-Cartagena, s/n. 30120 El Palmar, Murcia  
e-mail: veronicacgu.88@gmail.com

### Palabras clave:

Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. Priorización. Variante con significado clínico desconocido.

### RESUMEN

La aparición de la secuenciación de nueva generación ha supuesto una revolución en el estudio genético del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH), ya que ha permitido la incorporación a la práctica clínica de paneles de genes, o incluso de exomas y genomas completos. El gran aumento de la información que se obtiene de un estudio genético ha ido unido a un incremento de la incertidumbre debido al mayor número de variantes con significado desconocido (VUS) halladas. En consecuencia, recientemente se ha acuñado el concepto de VUS priorizada, que hace referencia a aquellas variantes con significado clínico desconocido que, según la bibliografía disponible, presentan un mayor riesgo de ser deletéreas. En esta revisión se pretende mostrar la evolución de las guías de clasificación clínica de variantes, destacar la necesidad del desarrollo de algoritmos de

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

DOI: 10.20960/revmedlab.00039

Castillo Guardiola V, Sarabia Meseguer MD, Rosado Jiménez L, Marín Vera M, Macías Cerrolaza JA, Cuevas Tortosa E, Ruiz Espejo F, Noguera Velasco JA. Utilidad de los algoritmos de priorización de variantes con significado clínico desconocido en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. Rev Med Lab 2021;2(1):21-29

priorización para seleccionar estas VUS priorizadas que permitan optimizar la realización de estudios complementarios, así como advertir de la importancia de realizar un correcto proceso de asesoramiento genético que haga entender al paciente las posibles consecuencias de dicho análisis.

### Keywords:

Hereditary breast and ovarian cancer. Priorization. Genetic variation with unknown significance. Variants with unknown significance.

### ABSTRACT

The incorporation of next-generation sequencing has been a revolution in the genetic study of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC), as it has allowed the incorporation in clinical practice of multigene panel testing and even complete exomes and genomes. It has led an increase of information obtained in genetic studies. However, it has been accompanied by an uncertainty raise due to the higher number of variants with unknown significance (VUS) found. Consequently, the term prioritized VUS that refers to those variants with unknown significance that has a greater risk of being deleterious has been coined. This revision pretends to show the evolving of classification guidelines for the interpretation of variants, emphasize the importance of the development of prioritization algorithms that select prioritize and allows optimizing the complementary studies employed, as well as emphasize the importance of a correct genetic counseling that helps the patient understand the consequences of the analysis.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es el más común, así como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (1). El CM femenino supone un 25 % de los casos de cáncer diagnosticados en todo el mundo y un 11,6 % si se tienen en cuenta ambos sexos (2). La mortalidad por CM en España es el 6,6 % de la mortalidad por cáncer (3). Los datos de Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) estiman que en 2020 se diagnosticaron aproximadamente 33.000 nuevos casos de CM en España y, en 2018 6.621 muertes fueron debidas a esta causa (3).

El cáncer de ovario (CO) es el noveno tipo de cáncer más prevalente en mujeres en España y se estima que supone un 2,7 % de los casos de cáncer y casi 2000 muertes en 2020 (3,4). El riesgo de padecer CO, cáncer de trompa de Falopio o primario peritoneal es del 1,5 % en la población general. A pesar de los avances en su tratamiento quirúrgico y farmacológico, el CO sigue siendo el cáncer ginecológico más letal, debido principalmente a la ausencia de un método de cribado para su detección precoz. Además, presenta una elevada resistencia a los fármacos citostáticos usados comúnmente (5).

Se han identificado numerosos factores de riesgo para ambas patologías, siendo la historia familiar uno de ellos. De hecho, se estima que el 5-10 % de todos los casos de CM y CO están vinculados a una susceptibilidad hereditaria debida a mutaciones en genes autosómicos dominantes. El principal síndrome de cáncer hereditario relacionado con el CM y CO es el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SCMOH). Desde los años 90 este síndrome se ha asociado principalmente a mutaciones en los genes de alta penetrancia *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, en la actualidad se sugiere la participación de múltiples genes, entre los

que se incluyen genes de alto riesgo para CM (*TP53*, *PTEN* y *PALB2*), así como genes de moderado riesgo de CM (*CHEK2*, *ATM*, *NF1* y *NBN*), genes con riesgo de CM impreciso pero elevado (*CDH1* y *STK11*) y genes con riesgo para CO (*RAD51D*, *BRIP1*, y genes del sistema de reparación de apareamientos erróneos como *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*), entre otros (6). Estos genes se asocian con susceptibilidad a otros tipos de cáncer como el de páncreas, colon y próstata, entre otros. Muchos de ellos son esenciales para mantener la estabilidad genómica de las células y están relacionados funcionalmente con la reparación de DNA mediante recombinación homóloga.

La aparición de la secuenciación masiva ha permitido el desarrollo de paneles de genes, los cuales facilitan el estudio de múltiples genes en el mismo análisis con un menor coste económico. Esto ha supuesto una revolución en la práctica clínica en el campo del diagnóstico del cáncer hereditario, ya que el aumento de genes estudiados facilita el diagnóstico de síndromes como el SCMOH. A su vez esto ha ido acompañado de un incremento de la incertidumbre debido a dos causas principales: el aumento de variantes con significado clínico desconocido (VUS) como consecuencia del mayor número de genes estudiados y el estudio de genes para los que no existe suficiente experiencia en la práctica clínica ni evidencia científica que permita asociarlos con un incremento en el riesgo de padecer cáncer.

En muchas ocasiones la interpretación de toda esta información no es sencilla, lo que supone un reto para los profesionales del laboratorio. Aunque actualmente hay distintas guías de clasificación de variantes que tratan de sistematizar y estandarizar el proceso de categorización clínica de variantes, y establecer un vínculo entre los resultados obtenidos y su efecto clínico (7,8), no resuelven el problema de la interpretación de la in-

formación genética, ya que muchas de las variantes siguen clasificándose como VUS. Para muchos de los genes incluidos en los paneles comerciales de cáncer hereditario no existe evidencia suficiente que justifique un cambio en el manejo clínico, como el empleo de tratamientos específicos o aplicación de medidas de prevención para detección precoz o reducción de riesgo. Sigue existiendo una incertidumbre debida principalmente a que muchos de los genes incluidos en estos paneles comenzaron a estudiarse con el desarrollo de dichos paneles. Debido a la ausencia de estudios clínicos de correlación genotipo-fenotipo consistentes, la relación entre la presencia de variantes patogénicas en estos genes y el riesgo de padecer determinados tipos de cáncer es todavía limitada. Por lo tanto, para muchos de los genes incluidos en los paneles comerciales no existe evidencia suficiente que justifique un cambio en el manejo clínico, como el empleo de tratamientos específicos o aplicación de medidas de prevención para detección precoz o reducción de riesgo.

Recientemente y debido a la expansión del uso clínico de los paneles de genes se ha acuñado el concepto de VUS priorizada. Este hace referencia a aquellas variantes de significado clínico desconocido que tendrían una mayor probabilidad de tener un efecto deletéreo en la proteína, según los estudios *in silico* y la bibliografía (9).

## GUÍAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE VARIANTES GÉNICAS

Diferentes sociedades científicas han desarrollado guías para la interpretación de variantes con el objeto de afrontar el reto que supone actualmente el incremento de detección de nuevas variantes génicas, muchas de ellas en genes poco estudiados previamente. Esto ayuda a conseguir una estandarización en la interpretación por parte de los distintos profesionales a lo largo del mundo.

El Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) publicó en 2000 unas recomendaciones para la interpretación de variantes que posteriormente fueron revisadas en 2008 (10). Las variantes se categorizaban en 6 grupos en función de si se habían descrito previamente y su potencial efecto deletéreo. Se hacía énfasis sobre la importancia de utilizar una terminología estandarizada y bases de datos establecidas a la hora de reportar las variantes, así como de informar sobre las limitaciones del análisis. Además, se establecían actividades de seguimiento para clarificar la relación de las VUS y la patología en cuestión: estudio de familiares, estudio en controles o uso de herramientas *in silico*.

Posteriormente, Lindor y cols. desarrollaron un modelo de clasificación de variantes en cinco categorías (11). Paralelamente, la Sociedad Internacional de Tumores Gastrointestinales Hereditarios desarrolló un esquema estandarizado de clasificación de variantes en cinco clases (12).

Más recientemente la ACMG, junto con la Asociación de Patología Molecular (AMP) y el Colegio de Patólogos Americanos (CAP), desarrollaron unas nuevas guías de interpretación de variantes (7). Estas guías establecían unos criterios de clasificación que presentaban distintos grados de evidencia de patogenicidad y de benignidad de forma que, mediante un algoritmo que utilizaba la combinación de dichos criterios, las variantes se podían clasificar como patogénicas, probablemente patogénicas, con significado clínico desconocido o probablemente benignas y benignas. Esto supuso un gran paso en la normalización de la categorización clínica de variantes, ya que pretendía que dicha interpretación se realizara de una forma más objetiva y sistemática. Posteriormente, se publicó un refinamiento de dichos criterios de clasificación que pretendía mejorar aquellas áreas en las que las guías previas carecían de especificidad o daban lugar a interpretaciones ambiguas. Este refinamiento consistió en tres puntos principales: separar aquellos criterios que resultaban ambiguos en un grupo de reglas discretas pero relacionadas en las que cada una de ellas aporta un peso individual a la clasificación, agrupar determinados criterios para evitar una sobreestimación de evidencia relacionada entre sí y reemplazar los "criterios clínicos" por criterios aditivos semicuantitativos (8).

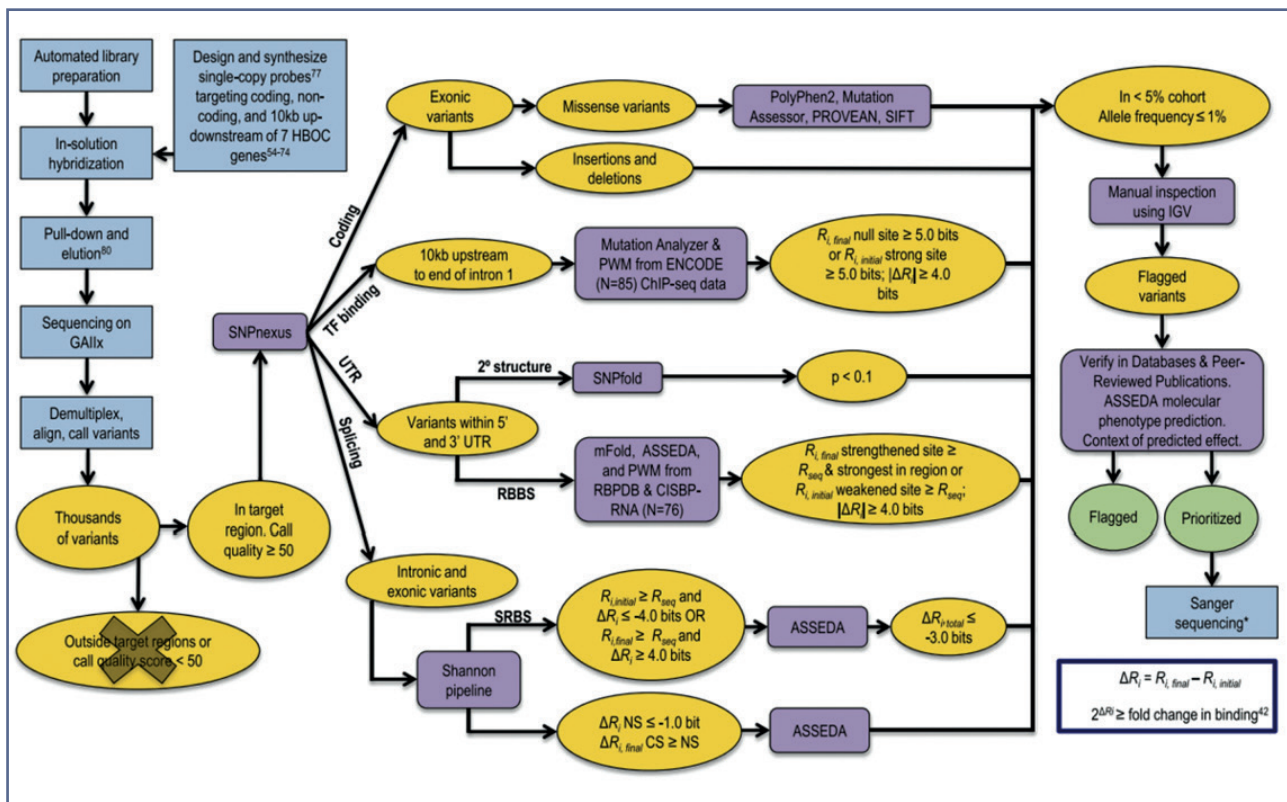
Toda esta evolución en la interpretación de variantes, aunque ha permitido sistematizar su interpretación, no ha evitado el aumento de VUS que ha supuesto la instauración en la clínica del estudio mediante paneles de genes, o incluso exomas y genomas completos.

## PRIORIZACIÓN DE VARIANTES CON SIGNIFICADO DESCONOCIDO

Los métodos de secuenciación masiva de nueva generación (NGS) engloban las técnicas de secuenciación de segunda y tercera generación. En las primeras, la secuenciación se realiza a partir de fragmentos amplificados y se obtiene una elevada profundidad de lectura (número de veces que una base está presente en las lecturas generadas). Por otro lado, las técnicas de tercera generación han conllevado una nueva revolución, ya que no requieren amplificación previa de la muestra y permiten aumentar la longitud de la lectura, lo que facilita el ensamblaje y permite la detección de variantes en el número de copias (CNV) e incluso alteraciones estructurales como translocaciones e inversiones. La rápida evolución de dichas tecnologías con el consecuente aumento de variantes detectadas ha hecho necesaria la aparición de un nuevo concepto: VUS priorizada. El término VUS priorizada se refiere a aquellas VUS que tienen un mayor riesgo de estar asociadas a un incremento de cáncer de mama y ovario y, por tanto, sobre las que se debe realizar un estudio más completo para poder determinar su efecto clínico y posible implicación en el SCMOH de forma prioritaria con respecto al resto de VUS. Mucaki y cols. desarrollaron un esquema para priorizar VUS en SCMOH, en el que

se incluyeron variantes exónicas, variantes de *splicing* situadas en regiones codificantes y no codificantes, así como variantes situadas en las regiones UTR 3' y 5', entre otras (13) (Fig. 1). Para ello emplearon modelos basados en teoría de la información (*IT-based analysis*). La teoría de la información se usa como una medida de la conservación de la secuencia. La información individual para una base se relaciona con su entropía y, por tanto, con la energía libre de unión. Esto se utiliza para estimar el cambio de afinidad de unión al compararlo con el cambio de información para un cambio de nucleótido. Estos modelos predecían potenciales mutaciones en sitios de *splicing* (SS), sitios de unión a factores de transcripción (TGBS) y sitios de unión a la proteína de

unión a RNA (RBBS) en 7 genes secuenciados al completo en una muestra de 102 pacientes con SCMOH en los que previamente no se habían hallado variantes en regiones codificantes de *BRCA1/2*. A continuación se utilizaron unos criterios de priorización e información de la bibliografía disponible para priorizar las que más probabilidad presentaban de ser deletéreas. Se emplearon distintas herramientas *in silico*, así como bases de datos, modelos o algoritmos de predicción de estructuras. Se hallaron 15311 variantes, de las cuales 87 fueron priorizadas. Caminsky y cols. realizaron un estudio similar en el que se estudiaron 20 genes relacionados con SCMOH en 287 pacientes con un test no informativo previo para *BRCA1/2*. Se priorizaron 246 de un total de



**Figura 1** – Adaptación del algoritmo para la identificación de potenciales variantes patogénicas utilizado por Mucaki y cols. (13). Incluye procesos integrados de laboratorio y análisis bioinformáticos utilizados. En amarillo se muestran los conjuntos de datos intermedios resultantes del filtrado, en verde se muestran los conjuntos de datos finales, en azul los pasos no bioinformáticos como la preparación de las muestras y en violeta los programas de predicción. Para alinear los resultados de secuenciación se utilizó CASAVA (Consensus Assessment of Sequencing and Variation) y CRAC (Complex Reads Analysis and Classification). Se utilizó GATK (Genome Analysis Toolkit) para comparar las variantes de estos datos frente a la versión GRCh37 del genoma humano de referencia. Se eliminaron las variantes con una puntuación de calidad < 50. Se utilizó SNPnexus para identificar la ubicación genómica de las variantes. Las variantes sin sentido y las indels se anotaron y se utilizaron herramientas de predicción para estimar el potencial efecto deletéreo de las variantes missense. El pipeline de análisis Shannon evaluó el efecto de una variante sobre sitios de *splicing* (SS) crípticos y naturales, así como de lugares de unión de factores reguladores del *splicing* (SRFBBS). ASSEDA (Automated Splice Site and Exon Definition Analysis) se utilizó para predecir las posibles isoformas como resultado de estas variantes. Las matrices de peso de posición (PWM) para 83 factores de transcripción (TF) se construyeron utilizando un generador de matriz de ponderación de información basado en *Bipad*. Mutation Analyzer evaluó el efecto de las variantes encontradas 10 kb aguas arriba desde el primer intrón. Las variantes halladas en las secuencias UTR se evaluaron utilizando SNPfold y las variantes con mayor probabilidad de alterar la estructura del ARNm ( $p < 0,1$ ) se procesaron utilizando mFold para predecir el efecto sobre la estabilidad. Todas las variantes de UTR se escanearon con una versión modificada del pipeline de Shannon, que utiliza PWM calculadas a partir de frecuencias de nucleótidos para 28 proteínas de unión a RNA (RBP) en las bases de datos de RPB (RBPDB) y 76 RBP en el catálogo de preferencias de unión a secuencias inferidas de proteínas de unión a RNA (CISBP-RNA). Todas las variantes que cumplen estos criterios de filtrado se verificaron con IGV.

38372 variantes. Se realizaron estudios de pedigrí y cosegregación para calcular las razones de verosimilitud (*likelihood ratio*) (14). En España, Bonache y cols. introdujeron por primera vez en nuestro país el concepto de VUS priorizada y diferenciaron los genes con un conocido alto-moderado riesgo de cáncer de aquellos genes candidatos para los que solo existe una evidencia inicial de asociación a cáncer (9). Se investigó un panel que incluía 34 genes asociados con un riesgo moderado-alto de cáncer de mama y ovario y 63 genes candidatos en 192 pacientes con sospecha de SCMOH, resultando 16 de ellos portadores de variantes en genes de riesgo. Se hallaron 383 variantes de las que se priorizaron 35 en genes de riesgo mediante el uso de bases de datos y programas *in silico*. Por otro lado, en este estudio se hacía referencia al concepto de accionabilidad clínica (*clinical actionability*), la cual se definió como un cambio en el manejo médico de la familia de acuerdo a las guías clínicas actuales, como las de la NCCN (National Comprehensive Cancer Network) (15). Este concepto se restringió a los portadores de variantes patogénicas en genes con un riesgo de cáncer bien establecido.

De esta breve revisión de estudios en los que aparece el concepto de VUS priorizada, destacan dos factores a tener en cuenta a la hora de determinar qué VUS deben priorizarse y cuáles no: los genes de estudio y las herramientas *in silico* y *pipelines* aplicadas en los algoritmos de priorización.

### Genes de riesgo y genes candidatos en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario

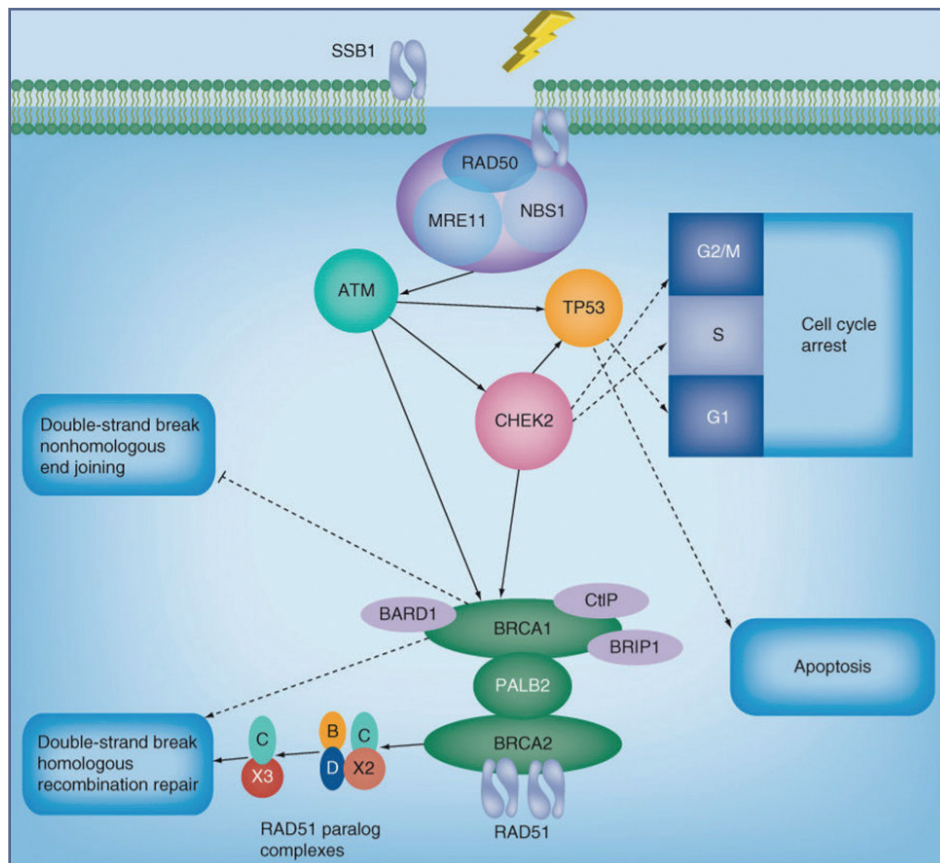
Hasta hace unos años solo se planteaba el estudio de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Actualmente estos genes son bien conocidos, lo que ha permitido reducir el número de VUS halladas en los mismos. De hecho, en un estudio español de mutaciones en estos genes realizado por Gabaldó y cols. solo el 13 % de las variantes halladas fueron VUS (16). El desarrollo de los paneles de genes ha supuesto una verdadera revolución y ha conseguido modificar la práctica clínica en el campo del SCMOH, ya que al aumentar el número de genes estudiados, también se incrementa el número de VUS y la priorización de las mismas se hace más necesaria. La mayoría de los genes incluidos en los paneles de genes empleados para el diagnóstico del SCMOH son esenciales para la estabilidad genómica celular y están relacionados con la reparación de daño en el DNA mediante recombinación homóloga, como *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1* y *BARD1*, entre otros (Fig. 2). Estos genes también están asociados a susceptibilidad a otros tipos de cáncer como el de próstata, páncreas o colorrectal (17-21).

Para los profesionales del laboratorio supone un reto decidir los genes a incluir en un panel de genes, cuáles reflejar en el informe de laboratorio, así como los que se tendrán en cuenta en el caso de llevar a cabo una priorización de VUS. Es necesario contar con la eviden-

cia disponible en las guías clínicas, así como llegar a un consenso con los responsables del asesoramiento genético. La SEOM recomienda que cuando se realice un análisis genético mediante paneles de genes, se incluyan en el análisis genes como *TP53*, *PALB2*, *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*. En cuanto a otros genes como *PTEN* o *CDH1*, su estudio debe plantearse en función de la historia familiar (6). Las guías consenso para el análisis de cáncer de mama hereditario desarrollada por la Asociación Americana de Cirugía de Mama (The American Society of Breast Surgeons) establecieron varios grupos de genes: aquellos con riesgo incrementado de CM (*ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *NF1*, *PALB2* y *STK11*), los que suponen un incremento de riesgo de cáncer ginecológico (*BARD1*, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, *BRIP1*, *RAD51C* y *RAD51D*) y los que están asociados a otros síndromes de cáncer hereditario como el síndrome de Li Fraumeni y el síndrome de Cowden (*TP53* y *PTEN*, respectivamente) (22). Las guías actuales de la NCCN recogen aquellos genes sobre los que existe evidencia de incremento de riesgo de cáncer (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* y *TP53*), así como el manejo del riesgo de cáncer basado en los resultados del análisis genético (medidas de prevención de riesgo o de detección precoz). Además se mencionan genes para los que la evidencia es insuficiente para asociarlos con riesgo de padecer cáncer de mama y ovario (*BARD1*, *FANCC*, *MRE11A*, heterocigotos en *MUTYH*, *RECQL4*, *RAD50* y *XRCC2*, entre otros) (23). Estos genes serían genes candidatos sobre los que se requiere profundizar y aumentar su conocimiento para determinar si están realmente vinculados a un incremento de riesgo de cáncer, su penetrancia, las posibles particularidades fenotípicas asociadas a mutaciones en los mismos y, por tanto, su accionabilidad clínica llegado el caso. En el caso de incluir genes candidatos en un análisis genético es necesario recoger la mayor información clínica posible de aquellas familias portadoras de variantes patogénicas o probablemente patogénicas en dichos genes. Los profesionales del laboratorio pueden registrar dichas variantes, características de la familia y de los tumores en una base de datos privada o en bases de datos públicas como *ClinVar* para ir incrementando el conocimiento sobre dichos genes y poder llegar a conclusiones sobre su implicación clínica en el futuro.

### Herramientas utilizadas en la clasificación y priorización de variantes

Actualmente hay múltiples herramientas web (muchas de acceso gratuito) que se pueden emplear para la interpretación de variantes (Tabla I). Conocerlas es de gran importancia para saber si dichas variantes han sido previamente descritas y clasificadas clínicamente o si, por el contrario, son variantes no descritas y por tanto se desconoce su implicación en la clínica de los



**Figura 2** – Secuencia de reparación tras la detección del daño de ADN de doble cadena. Adaptado de Tavtigian y cols. (45). Tras la detección del daño de ADN de doble cadena, el complejo MRN (MRE11, NBS1 y RAD50) activa la ATM quinasa. Una vez fosforilada, ATM fosforila a posteriores efectores como CHEK2 y p53, los cuales producen la detención del ciclo celular para dar tiempo a que se repare el ADN. A su vez, p53 juega un papel importante en la señalización de la apoptosis. Finalmente, se produce el reclutamiento de las proteínas responsables de la reparación de ADN mediante recombinación homóloga, activándola.

pacientes. En el caso de las VUS, estas pueden incluirse en algoritmos de priorización, combinando la información que ofrecen o estableciendo puntos de corte en las puntuaciones obtenidas en los estudios *in silico*. A continuación se describen los principales recursos disponibles para valorar clínicamente las variantes génicas halladas en un estudio:

- **Bases de datos de variantes génicas.** Se trata de bases de datos creadas por grupos de trabajo especializados que están disponibles en la red. En ellas se reportan variantes génicas con información sobre su implicación clínica o fuentes bibliográficas en las que se mencionan. Entre ellas se encuentra *ClinVar* (24), *dbSNP* (25), *HGMD* (26), *LOVD* (27) y *LitVar* (28), entre otras.
- **Programas predictivos o estudios *in silico*.** Los algoritmos que utilizan estos programas son diferentes e incluyen la importancia de la alteración tanto a nivel de nucleótido como a nivel de aminoácido. Se pueden dividir en dos grupos: aquellos programas que predicen si el cambio es perjudicial para la función o estructura de la proteína resultante (predic-

- tores del impacto del cambio como *PolyPhen2* (29), *SIFT* (30), *MutationTaster* (31), *Align-GVGD* (32), *Grantham* (33) o predictores del grado de conservación filogenética como *GERP* (34), *SiPhy* (35), *PhyloP* (36) y programas que predicen si se altera el *splicing* (*GeneSplicer* [37], *Human Splice Finder* [38], *NNSplice* [39] o *MaxEntScan* [40], entre otros).
- **Evaluación de la frecuencia de la variante en población control.** Determinar la frecuencia de una variante en la población general o en una población control es de utilidad para conocer su patogenicidad. Esto se puede hacer mediante una búsqueda en las bases de datos poblacionales como la del Proyecto 1000 Genomas o de la Genome Aggregation Database (gnomAD). Según las guías de la ACMG/AMP del año 2015, una frecuencia alélica en población control superior a la esperada para una determinada enfermedad apoya una interpretación benigna (7).
- **Software de apoyo a decisiones.** Se trata de herramientas web que integran información de distintas bases de datos y que la combinan para llevar a cabo una clasificación según las guías clínicas

**Tabla I.**  
**Resumen de los principales recursos disponibles para valorar clínicamente las variantes**

<b>Bases de datos de variantes génicas</b>	<i>ClinVar</i>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar</a>
	<i>dbSNP</i>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/</a>
	<i>HGMD</i>	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php">http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php</a>
	<i>LOVD</i>	<a href="http://www.lovd.nl/3.0/home">http://www.lovd.nl/3.0/home</a>
	<i>LitVar</i>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar</a>
<b>Programas predictivos <i>in silico</i></b>		
<b>Predicción de impacto en la proteína</b>	<i>PolyPhen-2</i>	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2</a>
	<i>SIFT</i>	<a href="https://sift.bii.a-star.edu.sg/">https://sift.bii.a-star.edu.sg/</a>
	<i>MutationTaster</i>	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>
	<i>Align-GVGD</i>	<a href="http://agvgd.hci.utah.edu">http://agvgd.hci.utah.edu</a>
<b>Predicción del grado de conservación filogenética</b>	<i>GERP</i>	Integrado en <i>VarSome</i>
	<i>SiPhy</i>	Integrado en <i>VarSome</i>
	<i>PhyloP</i>	Integrado en <i>VarSome</i>
<b>Predicción sobre el <i>splicing</i></b>	<i>GeneSplicer</i>	<a href="https://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml">https://www.cbcb.umd.edu/software/GeneSplicer/gene_spl.shtml</a>
	<i>Human Splice Finder</i>	<a href="https://www.genomnis.com/access-hsf">https://www.genomnis.com/access-hsf</a>
	<i>NNSplice</i>	<a href="https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a>
	<i>MaxEntScan</i>	<a href="http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html">http://hollywood.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html</a>
<b>Frecuencia poblacional</b>	Proyecto 1000 genomas	<a href="https://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers">https://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers</a>
	<i>gnomAD</i>	<a href="https://gnomad.broadinstitute.org/">https://gnomad.broadinstitute.org/</a>
<b>Software de apoyo a decisiones</b>	<i>Varsome</i>	<a href="https://varsome.com">https://varsome.com</a>
	<i>InterVar</i>	<a href="http://wintervar.wglab.org/">http://wintervar.wglab.org/</a>

de la ACMG/AMP del año 2015 (7). Una de ellas es *Varsome*, la cual permite investigar las variantes en su contexto genómico, recoge datos de múltiples bases de datos y aspira a que la comunidad comparta su conocimiento sobre variantes. Incluye información de 30 bases de datos externas que describen más de 500 millones de variantes. Además los resultados no se limitan a variantes conocidas, sino que se puede introducir cualquier tipo de variante en formato HGVS o localización genómica y permite modificar manualmente aquellos criterios dependientes de la familia (41). Otro *software* similar al anterior que clasifica las variantes según las guías ACMG/AMP es *InterVar* (42).

Por parte del laboratorio clínico se pueden realizar distintos estudios para profundizar en la interpretación de determinadas variantes:

- *Estudios funcionales*. Los estudios funcionales son un conjunto de experimentos *in vivo* o *in vitro* que intentan dilucidar las consecuencias que tiene una determinada variante en la función de la proteína. Son una herramienta poderosa para determinar el

efecto deletéreo de la variante, pero no todos son efectivos para determinar el impacto sobre el gen o la funcionalidad de la proteína. La evidencia es mayor si el ensayo refleja la totalidad de la función biológica de la proteína comparada con solo una parte de esta función. Los estudios funcionales que determinan el impacto de las variantes a nivel de mRNA pueden ser altamente informativos a la hora de evaluar los efectos en la estabilidad del mRNA, su procesamiento y traducción entre otros (7).

- *Estudio de cosegregación*. Consisten en analizar la variante hallada en otros miembros de la familia afectados y no afectados. Si la variante está presente en los familiares afectados y ausente en los no afectados, se podría afirmar que la variante cosegrega con la enfermedad. Sin embargo, se debe tener precaución a la hora de usar la cosegregación para clasificar clínicamente una variante, ya que esta evidencia una relación entre el *locus* y la enfermedad pero no confirma la patogenicidad de la variante en sí. Además, se debe tener en cuenta la presencia de posibles fenocopias o de que la cose-

gregación se deba a un desequilibrio de ligamiento con la verdadera variante patogénica. Por otro lado, en casos de enfermedades como el SCMOH, en las que la penetrancia es incompleta o dependiente de la edad, hay que valorar la posibilidad de que existan familiares asintomáticos. Actualmente, también se debe profundizar en la relación biológica entre familiares, ya que existe la posibilidad de no paternidad biológica (donación de esperma y ovocitos o adopción, principalmente).

Estos estudios no están disponibles en todos los laboratorios de genética ni pueden realizarse con todas las variantes halladas en los estudios genéticos. Una posible estrategia para optimizar su utilidad podría ser aplicarlos solo a aquellas variantes con un alto riesgo de afectar al *splicing* según las herramientas *in silico* consultadas (estudios de cDNA tras RT-PCR) y/o las que hayan sido priorizadas previamente.

### ASESORAMIENTO GENÉTICO DE LAS VARIANTES CON SIGNIFICADO DESCONOCIDO Y VARIANTES CON SIGNIFICADO DESCONOCIDO PRIORIZADAS

El hallazgo de VUS, tanto las que se encuentran en genes con una conocida implicación en la enfermedad como aquellas que se encuentran en genes para los que su relación con la misma es solo potencial, supone un problema tanto para los profesionales encargados de realizar el asesoramiento genético como para los pacientes receptores de dicha información. Es esencial que durante el asesoramiento genético pre-test se informe correctamente de los posibles resultados que se van a obtener y que sea el paciente, de manera autónoma, quien decida si quiere que se realice dicho análisis. Disponer de información sobre las VUS encontradas puede generar estrés tanto para el individuo como para su familia, que en ocasiones deberá realizarse el estudio de cosegregación. En este caso, siguiendo los principios éticos de privacidad y confidencialidad, será siempre el paciente el que decida si quiere informar a sus familiares de los hallazgos del análisis (43,44).

Según las recomendaciones de expertos y la declaración europea de consenso publicadas recientemente (43), se recomienda informar las VUS halladas en *BRCA1/2* o en otros genes, aunque puntualiza que las VUS halladas en genes de alto riesgo tendrían una mayor importancia clínica que las halladas en genes de bajo riesgo. Sin embargo, esta información no debe usarse en la toma de decisiones clínicas o para análisis predictivo. Se recomienda que el asesoramiento genético siempre quede abierto a la posibilidad de que individuos ya analizados puedan ser contactados en el caso de que aparezca nueva información que afecte a la clasificación de alguna variante en particular, por lo que sería interesante realizar un seguimiento de los portadores de VUS hallados en los estudios genéticos, especialmente de aquellos casos índice en los que se encontró una VUS priorizada (43).

### CONCLUSIONES

- El desarrollo y evolución de diferentes guías de clasificación clínica de variantes ha permitido que el proceso diagnóstico del SCMO sea más estandarizado y sistemático, aunque sigue existiendo un gran número de variantes clasificadas como VUS que tiende a aumentar al incrementarse el número de genes estudiados.
- Los algoritmos de priorización de VUS pretenden seleccionar aquellas variantes con potencial deletéreo, en las que se realizará un estudio más pormenorizado para determinar su efecto clínico. Esta priorización se realizará en función de la evidencia clínica de los genes estudiados, así como del resultado de las herramientas web de predicción de patogenicidad utilizadas.
- Es necesario realizar un correcto asesoramiento genético pre-test que permita al paciente entender las posibles consecuencias del estudio, para que decida libremente si desea que se realice dicho análisis.
- Dado que la clasificación de variantes es dinámica, se recomienda realizar un seguimiento de los portadores de VUS, sobre todo de los portadores de VUS priorizadas.

### AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Asociación Española del Laboratorio Clínico que me otorgara la beca post-residencia que me ha permitido desarrollar esta revisión.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;151:1-32. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.07.002
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018;68:394-424. DOI: 10.3322/caac.21492
3. Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España (citado 4 Dic 2020). Disponible en: <https://seom.org/dmcan-cer/cifras-del-cancer/>
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359-386. DOI: 10.1002/ijc.29210
5. Freimund AE, Beach JA, Christie EL, Bowtell DDL. Mechanisms of Drug Resistance in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2018;32:983-96. DOI: 10.1016/j.hoc.2018.07.007
6. Llort G, Chirivella I, Morales R, Serrano R, Sanchez AB, Teulé A, et al. SEOM clinical guidelines in Hereditary Breast and ovarian cancer. *Clin Transl Oncol* 2015;17:956-61. DOI: 10.1007/s12094-015-1435-3
7. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405-24. DOI: 10.1038/gim.2015.30



8. Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho Y-Y, et al. Sherloc: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med* 2017;19:1105-17. DOI: 10.1038/gim.2017.37
9. 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 Cancer Res Clin Oncol* 2018;144:2495-513. DOI: 10.1007/s00432-018-2763-9
10. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med* 2008;10:294-300. DOI: 10.1097/GIM.0b013e31816b5cae
11. Lindor NM, Goldgar DE, Tavtigian SV, Plon SE, Couch FJ. BRCA1/2 sequence variants of uncertain significance: a primer for providers to assist in discussions and in medical management. *Oncologist* 2013;18:518-24. DOI: 10.1634/theoncologist.2012-0452
12. Thompson BA, Spurdle AB, Plazzer J-P, Greenblatt MS, Akagi K, Al-Mulla F, et al. Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat Genet* 2014;46:107-15. DOI: 10.1038/ng.2854
13. Mucaki EJ, Caminsky NG, Perri AM, Lu R, Laederach A, Halvorsen M, et al. A unified analytic framework for prioritization of non-coding variants of uncertain significance in heritable breast and ovarian cancer. *BMC Med Genomics* 2016;9:19. DOI: 10.1186/s12920-016-0178-5
14. Caminsky NG, Mucaki EJ, Perri AM, Lu R, Knoll JHM, Rogan PK. Prioritizing Variants in Complete Hereditary Breast and Ovarian Cancer Genes in Patients Lacking Known BRCA Mutations. *Hum Mutat* 2016;37:640-52. DOI: 10.1002/humu.22972
15. Daly MB, Pilarski R, Yurgelun MB, Berry MP, Buys SS, Dickson P, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 1.2020: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2020;18:380-91. DOI: 10.6004/jnccn.2020.0017
16. Gabaldó Barrios X, Sarabia Meseguer MD, Marín Vera M, Sánchez Bermúdez AI, Macías Cerrolaza JA, Sánchez Henarejos P, et al. Molecular characterization and clinical interpretation of BRCA1/BRCA2 variants in families from Murcia (south-eastern Spain) with hereditary breast and ovarian cancer: clinical-pathological features in BRCA carriers and non-carriers. *Fam Cancer* 2017;16:477-89. DOI: 10.1007/s10689-017-9985-x
17. Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, Naeem N, Fazil A, Giri S, et al. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:2177-85.
18. Blanco A, de la Hoya M, Osorio A, Diez O, Miramar MD, Infante M, et al. Analysis of PALB2 gene in BRCA1/BRCA2 negative Spanish hereditary breast/ovarian cancer families with pancreatic cancer cases. *PLoS ONE* 2013;8:e67538. DOI: 10.1371/journal.pone.0067538
19. Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, Peterlongo P, Dominguez O, de la Hoya M, et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. *PLoS ONE* 2013;8:e55681. DOI: 10.1371/journal.pone.0055681
20. 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 Oncol* 2015;1:943-51. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.2690
21. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, Brown KL, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer* 2017;123:1721-30. DOI: 10.1002/cncr.30498
22. Manahan ER, Kuerer HM, Sebastian M, Hughes KS, Boughey JC, Euhus DM, et al. Consensus Guidelines on Genetic Testing for Hereditary Breast Cancer from the American Society of Breast Surgeons. *Ann Surg Oncol* 2019;26:3025-31. DOI: 10.1245/s10434-019-07549-8
23. Daly MB, Pilarski R, Berry M, Buys SS, Farmer M, Friedman S, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw* 2017;15:9-20.
24. ClinVar (Internet). ClinVar (citado 2 Nov 2020). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
25. Sherry ST, Ward M-H, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001;29:308-11.
26. HGMD (Internet). Human Gene Mutation Database (citado 8 Feb 2021). Disponible en: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php.home>
27. LOVD (Internet). An Open Source DNA variation database system (citado 30 Oct 2020). Disponible en: <http://www.lovd.nl/3.0/home>
28. LitVar-NCBI-NLM-NIH (Internet). U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information (citado 4 Dic 2020). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/Demo/LitVar/>
29. PolyPhen-2 (Internet). Prediction of functional effects of human nsSNPs (citado 4 Dic 2020). Disponible en: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
30. Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res* 2012;40:W452-7. DOI: 10.1093/nar/gks539
31. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014;11:361-2. DOI: 10.1038/nmeth.2890
32. Align GVGD (Internet). Huntsman Cancer Institute University of Utah Align GVGD (citado 4 Dic 2020). Disponible en <http://agvgd.hci.utah.edu/>
33. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 1974;185:862-4.
34. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, NISC Comparative Sequencing Program, Green ED, Batzoglou S, et al. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res* 2005;15:901-13. DOI: 10.1101/gr.3577405
35. Garber M, Guttman M, Clamp M, Zody MC, Friedman N, Xie X. Identifying novel constrained elements by exploiting biased substitution patterns. *Bioinformatics* 2009;25:i54-62. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp190
36. Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, Siepel A. Detection of non-neutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res* 2010;20:110-21. DOI: 10.1101/gr.097857.109
37. Pertea M, Lin X, Salzberg SL. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res* 2001;29:1185-90.
38. Umd.be (Internet). Human Splicing Finder (citado 4 Dic 2020). Disponible en <https://www.genomnis.com/access-hsf>
39. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 1997;4:311-23. DOI: 10.1089/cmb.1997.4.311
40. Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 2004;11:377-94. DOI: 10.1089/1066527041410418
41. Varsome.com (Internet). Varsome The Human Genomics Community (citado 4 Feb 2020). Disponible en: <https://varsome.com/>
42. Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *The American Journal of Human Genetics* 2017;100:267-80. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.01.004
43. Singer CF, Balmaña J, Bürki N, Delalage S, Filieri ME, Gerdes A-M, et al. Genetic counselling and testing of susceptibility genes for therapeutic decision-making in breast cancer - an European consensus statement and expert recommendations. *Eur J Cancer* 2019;106:54-60. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.10.007
44. Gronowski AM, Budelier MM, Campbell SM. Ethics for Laboratory Medicine. *Clin Chem* 2019;65:1497-507. DOI: 10.1373/clinchem.2019.306670
45. Tavtigian SV, Chenevix-Trench G. Growing recognition of the role for rare missense substitutions in breast cancer susceptibility. *Biomark Med* 2014;8:589-603. DOI: 10.2217/bmm.13.143