

Validación del Test de Screening poblacional para Cáncer de Mama y Ovario Hereditario myBRCA Hi Risk

Birgitte B. Simen, PhD¹ y Joseph V. Thakuria, MD²

Abstract

myBRCA HiRisk es un test clínico para detectar mutaciones en 26 genes asociados con el incremento del riesgo para cáncer de mama y ovario. El test está basado en secuenciación de última generación (Next-Generation Sequencing) y detección de deleciones/duplicaciones PCR y es realizado en el laboratorio con licencia CLIA de Veritas Genetics. El test utiliza saliva o sangre pura y fue cuidadosamente validado en una diversa cantidad de muestras con representación de las variantes tanto de patologías raras como relativamente comunes. Se describen los resultados de la validación.

Introducción

Mutaciones patogénicas en BRCA1 y BRCA2 aumentan dramáticamente el riesgo individual de desarrollar cáncer de mama y ovario. En muchos casos, mutaciones patogénicas en estos genes de los que se sabe su acción supresora de tumores, resultan en la producción de proteínas supresoras de tumores truncadas o no funcionales. Mutaciones patogénicas en BRCA1 o BRCA2 causan el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, y, en menor grado, también incrementa el riesgo para otros cánceres, como cáncer de próstata, cáncer pancreático y melanoma.

En adición a estos dos genes, muchos otros han sido identificados como contribuidores al riesgo de cáncer de mama y ovario. El myBRCA HiRisk de Veritas Genetics incluye 24 genes aparte de BRCA1 y BRCA2. Un extracto de ADN es procesado por amplificación múltiple con cebadores específicos, y el producto es secuenciado en un secuenciador de última generación de Illumina. El ensayo cubre 82.853 pares de bases de secuencia genética,

incluyendo la completa codificación de las regiones y sitios de empalme de estos 26 genes. Mutaciones puntuales y pequeñas inserciones/deleciones son detectadas con más del 99,9% de especificidad y sensibilidad. Para la detección de grandes variaciones estructurales (variaciones en el número de copias), se desarrolló un ensayo complementario de deleciones y duplicaciones que detecta simples y múltiples deleciones y duplicaciones de exones en BRCA1 y BRCA2 con muy alta precisión (sensibilidad y especificidad >99,9%). Los análisis de deleciones y duplicaciones de los restantes 24 genes son basados en los datos de la secuenciación y detecta variaciones estructurales multi-exónicas. El análisis de *PMS2* es complicado por la existencia de un pseudogen altamente homólogo. Si una variación es detectada en los últimos tres exones (exones 13-15) del gen, se realiza un PCR de alto rango que excluye a los pseudogenes y se verifica la secuencia del gen con secuenciación Sanger (1).

Sobre los autores:

Dr. Birgitte Simen, quien ha diseñado el estudio de validación, co-autor de la publicación del grupo de trabajo CDC “Nature Biotechnology” *Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Laboratory Practice*. Dr. Simen previamente encabezó el ensayo sobre Next-Generation Sequencing desarrollado en Roche.

Dr. Joseph Thakuria es una reconocida autoridad en la interpretación clínica de información genética (7). Sus logros previos incluyen ser director médico y co-investigador para el *Personal Genome Project* en *Harvard Medical School*.

Validación General del Estudio

El estudio de validación fue basado en las guías de CDC, CLIA, CAP, ACMG y CLSI (2-7). Ambos tipos de muestra, sangre y saliva, fueron procesados desde el principio hasta el final.

¹ Veritas Genetics, Danvers, MA 01923.

² Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114

También fueron incluidas líneas celulares con mutaciones de ADN para asegurar un completo espectro de variantes de validación, pero la mayoría de las muestras fueron procesadas desde pacientes originales.

myBRCA HiRisk es un panel de identificación de mutaciones en la línea germinal para el cáncer de mama y ovario hereditario que utiliza una secuenciación de última generación con una completa cobertura de la región codificante. Con cobertura de más de 82.000 pares de bases, myBRCA HiRisk es uno de los paneles más exhaustivo actualmente en el mercado para el Screening de pacientes con alto riesgo de cáncer de mama y ovario. Está diseñado para pacientes con cáncer de mama y ovario confirmado y/o pacientes con fuerte historial familiar para el cáncer de mama y ovario. También es recomendado para pacientes que hayan tenido un resultado negativo para mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* con historial personal o familiar con respecto al cáncer de mama y ovario. Otros indicadores incluyen antecedentes personales o familiares de cáncer de mama masculino, cáncer diagnosticado a temprana edad, diferentes cánceres en la misma persona o en ambos órganos pares (por ejemplo, cáncer en ambos senos). Como se documentó en un estudio clínico recientemente publicado, realizado a través de 10 años en *Massachusetts General, Stanford and Beth Israel Deaconess hospitals*, las evaluaciones de rendimiento de paneles multigénicos del riesgo de cáncer de mama y ovario hereditario “descubrimientos probablemente cambiaran el manejo clínico para sustancialmente más pacientes que el solo análisis de *BRCA1* y *BRCA2*. myBRCA HiRisk ofrece la oportunidad de mejorar los resultados clínicos para individuos de alto riesgo y sus familias y “adecuará las recomendaciones de evaluaciones y gestiones a corto plazo del riesgo de cáncer para individuos afectados por mutaciones a través de un espectro de genes de predisposición”.(8) Veritas incluyó cuidadosamente muestras provenientes de múltiples etnias, en lugar de simplemente asumir que la información relevante está disponible en la etapa de diseño, un punto a menudo pasado por alto en los tests de ADN. Un tercio de las muestras de validación de sangre y saliva con sabido origen étnico fueron provenientes de donantes no caucáseos.

Genes testeados en myBRCA HiRisk

<i>ATM</i>	<i>BARD1</i>	<i>BLM</i>	<i>BRCA1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>BRIP1</i>	<i>CDH1</i>	<i>CHEK2</i>
<i>EPCAM*</i>	<i>FAM175A</i>	<i>MEN1</i>	<i>MLH1</i>
<i>MRE11A</i>	<i>MSH2</i>	<i>MSH6</i>	<i>MUTYH</i>
<i>NBN</i>	<i>PALB2</i>	<i>PSM2</i>	<i>PTEN</i>
<i>RAD50</i>	<i>RAD51C</i>	<i>RAD51D</i>	<i>STK11</i>
<i>TP53</i>	<i>XRCC2</i>		

*solo análisis de deleciones/duplicaciones

Resultados

Las muestras fueron recolectadas de pacientes que habían tenido tests positivos previos para una mutación en la clínica y están siendo actualmente monitoreados clínicamente para el desarrollo de cáncer. Muestras clínicas ciegas conteniendo conocidas SNPs, pequeñas inserciones o deleciones, y amplias variaciones estructurales fueron incluidos. 87 muestras fueron secuenciadas, incluyendo 69 positivas de saliva y sangre. El análisis fue realizado ciegamente para excluir sesgos de interpretación. Todos los resultados positivos fueron patogénicos, es decir, que este análisis no fue amortiguado por la inclusión de polimorfismos benignos como verdaderos positivos. Un ejemplo de validación se muestra debajo.



Reproductibilidad y repetición a través de múltiples intentos y diferentes operadores fueron ambas del 100%. Todas las muestras positivas resultaron con las variantes patogénicas esperadas. No fueron detectados falsos negativos ni falsos positivos.

	Condition Positive (Sanger)	Condition Negative (Sanger)
Test outcome Positive (NGS)	69	0
Test outcome Negative (NGS)	0	18

Conclusión

El test myBRCA HiRisk está clínicamente validado, con gran precisión, en el desarrollo en laboratorio para el riesgo de cáncer de mama y ovario, cubriendo todas las regiones codificantes de 26 genes relacionados con el cáncer de mama y ovario, en personas con amplia variedad étnica.

Agradecimientos

Queremos reconocer a los pacientes y voluntarios quienes desinteresadamente donaron saliva y sangre a este estudio de validación. En adición, queremos agradecer a los siguientes clínicos quienes amablemente proveyeron de muestras de referencia para la validación:

Judy E. Garber, MD, MPH

Director, Center for Cancer Genetics and Prevention, Dana-Farber Cancer Institute
Professor of Medicine, Harvard Medical School

Sapna Syngal, MD, MPH

Director of Research, Center for Cancer Genetics and Prevention, Dana-Farber Cancer

Institute Professor of Medicine, Harvard Medical School

Jan Lubinski, MD, PhD

Head, Division of Genetics and Pathomorphology and Chair of Oncology at the Medical University in Szczecin, Poland
Head, International Hereditary Cancer Center, Pomeranian Medical University, Poland.

Referencias

1. Vaughn CP, Hart KJ, Samowitz WS et al. Avoidance of pseudogene interference in the detection of 3' deletions in PMS2. *Hum Mutat* 32:1063 (2011)
2. Gargis A, Kalman L, Berry M et al. Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Laboratory Practice. *Nature Biotechnology*, 30:1033 (2012)
3. Standards and Certification: Laboratory Requirements (42CFR493), www.ecfr.gov
4. Aziz N, Zhao Q, Bry L. College of American Pathologists' Laboratory Standards for Next-Generation Sequencing Clinical Tests. *Arch Pathol Lab Med* (2014)
5. Molecular Pathology Checklist (09.25.2012). College of American Pathologists, www.cap.org
6. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P et al. ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Gen Med*, 15:733 (2013)
7. Verification and Validation of Multiplex Nucleic Acid Assays; Approved Guideline