



Módulo I
Bases
del cáncer
hereditario

Introducción

El cáncer o desarrollo tumoral se caracteriza por un crecimiento excesivo y descontrolado de un grupo de células que invaden y dañan tejidos y órganos. Es una de las causas más frecuentes de mortalidad ocupando un segundo puesto en los países desarrollados detrás de las enfermedades cardiovasculares o coronarias. La incidencia del cáncer ha aumentado en las últimas décadas; si bien es notorio que en aquellos países donde el control sanitario es mayor ha habido una disminución de los casos de mortalidad, en los últimos años, debido a los grandes avances en los tratamientos terapéuticos y en el diagnóstico precoz. El cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células formando un tumor o neoplasia y la posterior adquisición por parte de estas células de capacidad invasiva permitiéndoles migrar desde su lugar de origen a otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis. Para entender o estudiar la carcinogénesis hay que tener en cuenta su alta complejidad, la cual que se refleja en la gran heterogeneidad y variabilidad morfológica y pronóstica de los tumores y el gran número de alteraciones moleculares oncogénicas descritas. Estas seguirán aumentando conforme se avance en el conocimiento de nuevas moléculas o nuevas funciones de moléculas ya conocidas, cuya activación o inactivación puedan afectar a los procesos de proliferación y diferenciación celular, ya sea a nivel del ciclo celular, a nivel de apoptosis etc ¹.

El cáncer se considera una enfermedad genética esporádica, excepcionalmente hereditaria. El proceso de formación de un tumor consiste en la acumulación de múltiples alteraciones en el genoma de las células que forman dicho tumor. Existen dos posibles conjuntos de alteraciones genéticas: cambios en la secuencia del ADN y cambios epigenéticos que afectan a la expresión de genes. Las alteraciones

a nivel de secuencia pueden ser deleciones de regiones cromosómicas, que implican pérdida de genes que pueden estar relacionados con la regulación negativa del ciclo celular, como es el caso de los genes supresores de tumores; mutaciones génicas que pueden activar o inactivar distintas proteínas; amplificaciones génicas que conllevan la sobreexpresión de genes específicos; e incluso, pérdidas y ganancias de cromosomas enteros. En cuanto a alteraciones epigenéticas nos encontramos con el silenciamiento de genes causado por hipermetilación de las islas CpG localizadas en sus promotores, como es caso de *p16^{INK4a}*, el gen *MLH1* o el gen *BRCA1*. Cuando estas alteraciones se encuentran en las células de la línea germinal se transmiten a la descendencia. Este es el caso del cáncer de mama, patología en la que aproximadamente un 5-10% de los afectados son consecuencia de la herencia por vía germinal de mutaciones en los genes *BRCA1*² y *BRCA2*³. También en este grupo encontramos alteraciones genéticas que transmiten una predisposición a desarrollar un tipo o varios tipos de tumores, como es el caso de la ataxia telangiectasia, cuya mutación afecta al gen *ATM*³ que está implicado en los procesos de reparación del ADN, y sus pacientes desarrollan linfomas de tipo no Hodgkin, leucemias linfocíticas agudas, carcinoma de estómago y, además, poseen una alta predisposición para el cáncer de mama. Estas alteraciones genéticas en el cáncer hereditario pueden afectar a genes supresores y a genes de reparación del ADN. Ejemplos de mutaciones en genes reparadores del ADN aparecen en algunos casos como el cáncer colorrectal hereditario de tipo no polipósico (HNPCC)⁴ con mutaciones fundamentalmente en los genes *MSH2* y *MLH1*. En cuanto a mutaciones en genes supresores de tumores encontramos, un tipo de cáncer muy conocido es el retinoblastoma, donde el gen alterado es el gen supresor de tumores *Rb*; la poliposis familiar adenomatosa, donde el gen afectado es *APC*⁵; el tumor de Wilms, con el gen *Wt1* mutado; las neurofibromatosis de tipo 1 y 2 con alteraciones en los genes *NF1* y *NF2*.

Las causas del cáncer residen en: a) fallos endógenos en procesos celulares y b) agentes externos que pueden alterar nuestros genes. Estos agentes externos se pueden dividir en tres grupos: agentes químicos, algunos naturales, pero la mayoría producidos por la actividad industrial que causan entre un 80-90% de los casos; agentes físicos como radiaciones ionizantes, luz ultravioleta y fibras minerales (asbestos) que constituyen el 5% de los casos; y los virus responsables de un 5-10% de los cánceres (tales como HPV-16, HPV-18 y otros).

Hay muy pocos casos de tumores que posean alteraciones constantes, solamente en algunos procesos linfoproliferativos y algunas leucemias que tienen translocaciones características, como es el caso de los linfomas foliculares con la translocación $t^{14,18}$, linfomas del manto $t^{11;14}$, leucemia mieloide crónica $t^{9;22}$ etc. Los distintos procesos moleculares (Figura 1) que se asocian con la formación y progresión tumoral son:

- activación de oncogenes
- inactivación de genes supresores
- alteración en los genes de reparación del ADN
- alteración de genes relacionados con la apoptosis
- otros mecanismos tales como la activación de telomerasa, de genes interruptores, reparación de la oxidación mediada por radicales libres procedentes del metabolismo celular, reacciones de depurinación, de desaminación, etc.
- inestabilidad genética (microsatélites y cromosómica)

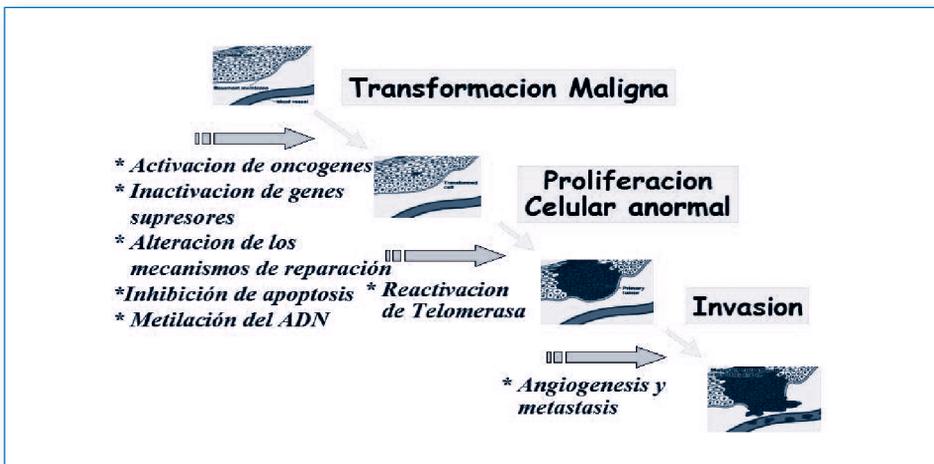


Figura 1: Carcinogénesis humana

Oncogenes

Son las formas mutadas de los proto-oncogenes, que son genes que intervienen en las rutas de proliferación celular, y originan proteínas con funciones anómalas que estimulan el crecimiento y alteran la morfología produciendo la transformación celular. Los primeros oncogenes descubiertos eran virales, pero los virus sólo son responsables de un porcentaje muy pequeño de los procesos tumorales. Se pueden

clasificar según su mecanismo de acción y en función de la ruta bioquímica en la que se encuentran. Así tenemos oncogenes que codifican factores de crecimiento, receptores tirosina-quinasa, receptores sin actividad tirosina-quinasa, proteínas que intervienen en las vías de señalización de determinadas señales mitógenas y proteínas nucleares que regulan los procesos de transcripción. De entre los muchos oncogenes conocidos, sólo algunos mas relevantes serán comentados.

Sis

El oncogén *sis*, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), es un regulador que tiene un papel crítico en los procesos de migración y proliferación de células del mesénquima. Se ha visto que induce quimiotaxis y reorganización de actina protegiendo a las células de la muerte por apoptosis. Este factor contribuye al cáncer mediante mecanismos autocrinos y paracrinos a través de los tejidos circundantes o de otras células presentes en tumores como macrófagos y células endoteliales, además de estar implicado en angiogénesis y en las interacciones entre tumor y estroma

erbB

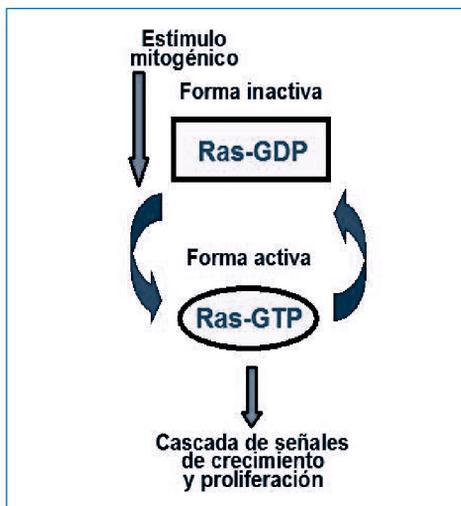
Los oncogenes *erbB* codifican para receptores tirosina-quinasa de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Particularmente los receptores *erbB2* y *erbB3* están implicados en el desarrollo de canceres humanos. En un 25-30% de los tumores de mama hay una sobreexpresión y activación constitutiva del receptor *erbB2* y se asocia con procesos de metástasis en ganglios linfáticos correlacionando, por tanto, con mal pronóstico. *erbB3* también se expresa en tumores humanos en donde hay sobreexpresión de *erbB2* como mama, vejiga y otros. Recientemente, se ha demostrado que la sobreexpresión independiente de cada uno no promueve transformación celular, pero el heterodímero *erbB2/erbB3* es el que posee funciones oncogénicas ⁶.

Se han descrito muchos más oncogenes que son homólogos de receptores con actividad tirosina-quinasa como el oncogén *fms*, receptor para el factor estimulante de la formación de colonias de macrófagos (CSF-1); *c-kit*, el receptor y su ligando; el factor de crecimiento de células hematopoyéticas o *stem cell factor* cuya expresión está aumentada en distintos tumores como leucemia mieloide aguda, mastocitosis, seminomas, tumores gastrointestinales y carcinomas de ovario y útero; *c-ret*,

que codifica uno de los componentes del receptor para el factor neurotrófico derivado de la glía o GDNF y se encuentra activado en las neoplasias múltiples endocrinas, carcinomas medulares familiares de tiroides (FMTC) y carcinomas papilares esporádicos de tiroides (PTC).

Ras

Entre los oncogenes que codifican proteínas citoplasmáticas que traducen señales mitogénicas encontramos la *superfamilia Ras*. Esta superfamilia codifica para un grupo de proteínas monoméricas de bajo peso molecular con actividad GTPasa. En humanos hay más de cien miembros y se pueden clasificar en seis subfamilias Ras, Rho, Arf, Rab, Ran, y Rad e intervienen en procesos de transmisión de señales en los procesos de control del ciclo celular y apoptosis, regulación de citoesqueleto y transporte membranar. Las proteínas Ras unen GTP (estado activo, normalmente asociadas a membrana e interacciona con sus moléculas efectoras) o GDP (estado inactivo) y poseen actividad intrínseca de GTP hidrolasa y una mayor afinidad por GTP. Este ciclo es regulado por activadores (GAPs) que aumentan la hidrólisis de GTP y factores de intercambio de guanina (GEFs) que estimula el cambio de GDP por GTP (Figura 2). Los miembros de las familias Rho, Rab y Ran también son regulados por inhibidores de la disociación de GDP (GDIs).



Familia Ras: Incluyen tres variantes *H-ras*, *K-ras* y *N-ras*⁷ que codifican para proteínas de 21 kDa. Su implicación en cáncer es incuestionable. Se han encontrado mutaciones activadoras de Ras en un 70% de las neoplasias humanas: entre ellas mutaciones de *K-ras* en tumores pancreáticos (90%), en cáncer de pulmón (33%) y (44%); mutaciones de *H-ras* en vejiga (10%) y riñón (10%); y mutaciones en *N-ras* en leucemias (30%), hígado (30%) y melanoma (13%); y casos de sobreexpresión en distintos tumores como vejiga.

Figura 2 : Vía de activación de Ras

Rho

Familia *Rho*: Su implicación en cáncer es bastante reciente. Sus mutaciones son muy raras pero su sobreexpresión es bastante común. *RhoA* se sobreexpresa en carcinomas de cuello, cabeza, pulmón, colón y mama. La sobreexpresión de *RhoC* se ha encontrado en carcinoma de mama y páncreas. Otros miembros de esta familia también están sobreexpresados en cáncer de mama como *Rac1* y *cdc42*. Una desregulación de la activación de los miembros de esta familia puede contribuir a la progresión del cáncer. Algunos rhoGEF poseen propiedades transformantes y otros actúan como supresores de tumores, como es el caso p190 rho GAP.

Jun y Fos

Los oncogenes *jun* y *fos* fueron descubiertos en retrovirus animales: el virus del sarcoma aviar 17 (ASV-17) y dos virus que producen osteosarcomas en ratones (*Finkel-Biskis-Jinkins* o *FBJ* y *Finkel-Biskis-Reilly* o *FBR*) respectivamente. *c-jun* pertenece a la familia *jun* junto a *junB* y *junD*, y *c-fos* a la familia *fos* con *fosB*, *fra-1* y *fra-2*. Las proteínas poseen homologías estructurales⁸. Tienen dos dominios: uno responsable de activar la transcripción, y otro de unión al ADN que contiene una región rica en leucinas que forma una cremallera necesaria para la dimerización. La actividad biológica de *c-jun* está regulada por fosforilación por la enzima jun-quinasa JNK (SAPK), que es activada por distintos factores como citoquinas y estrés. Otras quinasas que regulan *c-jun* son la casein-quinasa II (CSII) que la inhibe y PKC que la activa. La expresión *c-fos* está regulada transcripcionalmente por el elemento de respuesta al suero (SRE) al que se unen los factores de transcripción ELK-1, que se activa por ERK1 (vía) y JNK (vía de estrés celular), y por el factor SRF (*serum response factor*) activado por ERK-1 y 2, AMPc y calcio. La actividad biológica de *c-jun* reside en procesos de proliferación celular, tumorigénesis, apoptosis y morfogénesis embrionaria.

v-erbA

El oncogén nuclear *v-erbA* causa eritroleucemias y sarcomas en aves y hepatocarcinomas en ratones transgénicos. No posee gran actividad transformante por sí solo, pero potencia la actividad oncogénica de *v-erbB*. Es una forma mutada de un receptor nuclear de alta afinidad de las hormonas tiroideas TR β 1/*c-erbA*, que actúa como represor constitutivo de los genes regulados por T3. En los últimos años se han descrito numerosas alteraciones, como mutaciones y expresión anómala en los genes de los

receptores de las hormonas tiroideas⁹. En cáncer de mama, se ha considerado al receptor de hormonas tiroideas como marcador e incluso como diana terapéutica tanto a los receptores de estrógenos como a los de progesterona. Algunos autores han descrito casos de hipermetilación del promotor con su consecuente reducida expresión de transcritos de *TRβ1*, y sugieren que este proceso ocurre en los primeros estadios del tumor. También se han descrito alteraciones a nivel del ARNm de *TRβ1* y *TRβ1*, además de la aparición de transcritos anormales de *TRβ1*. En otros cánceres, como el de hígado, hay una mayor expresión de *TRβ1*, formas truncadas de *β1* y *β2*; mutaciones puntuales, todas estas proteínas mutantes son dominantes negativos de la actividad normal de la forma silvestre. En cáncer de tiroides los niveles de ARNm *TRβ2* son menores mientras que los niveles de las proteínas son mayores, aunque la mayoría son formas mutantes. En otros cánceres, como colon, hay una reducción o pérdida total del ARNm de *TRβ* pero no delección a nivel de ADN. Varios estudios han propuesto que estos genes pueden funcionar como genes supresores de tumores ya que las formas mutantes pueden alterar otras rutas de señalización de control celular como en la expresión de ciclina D1, interacción con p53, etc.

myc

El oncogén *c-myc*, que codifica para un factor de transcripción, pertenece a la familia de los genes *myc* que incluye su homólogo *v-myc*, *N-myc* y *L-myc*. En un gran número de cánceres humanos se ha visto una expresión anormal asociada a tumores poco diferenciados y muy agresivos. *c-myc* se expresa durante la embriogénesis y en tejidos con alta capacidad proliferativa. Su actividad está controlada por distintos agentes externos como factores de crecimiento, mitógenos y β -catenina, que lo activan, o factores como TGF β que lo inhibe. Su actividad es debida a que activa o reprime genes implicados en ciclo celular. *c-myc* aumenta la expresión de CCND2 (*ciclina D2*) y CDK4 (*quinasa dependiente de ciclina 4*), las cuales son secuestradas por el inhibidor de quinasa p27^{KIP1} degradable por Cul-1 y CKS, también dianas de *myc*. De este modo evita la unión de p27^{KIP1} al complejo cdk2-ciclinaE y éste fosforila retinoblastoma (Rb) y se liberan los factores de transcripción E2F. También *c-myc* reprime los inhibidores de ciclinas p15 y p21 a través de la interacción de los heterodímero *myc-max* con otros factores de transcripción MIZ-1 y SP1. También *myc* es importante en procesos de diferenciación y apoptosis. La activación oncogénica de *c-myc* causa aumento de la proliferación, pero la transformación celular requiere otras lesiones oncogénicas. Los tres genes *c-myc*, *N-myc* y *L-myc* son frecuentemente sobreexpresados en una gran variedad de tumores¹⁰. A veces se so-

breexpresan por amplificación como en los neuroblastomas, carcinomas microcíticos de pulmón, carcinomas de mama, estomago, pulmón y colón, o por translocaciones como ocurre en el 100% de los linfomas de Burkitt.

Genes supresores de tumores

La pérdida de función de los genes supresores de tumores es crucial para la transformación celular. Estos genes controlan la proliferación celular principalmente a nivel de ciclo celular y de la reparación del ADN. Entre ellos encontramos genes tan importantes como *Rb*, *p53*, *p16*, *APC*, *BRCA1* y *2*, de los que vamos a hablar en este capítulo.

Rb (gen supresor de susceptibilidad al retinoblastoma)

El retinoblastoma es un tumor de las células nerviosas de la retina embrionaria que aparece en humanos antes de los cinco años de edad. Su origen puede ser hereditario o esporádico. Los pacientes con origen hereditario han heredado una mutación por línea germinal, preexistente en algún progenitor o que aparece durante la gametogénesis. Esta mutación les hace más susceptibles a contraer la enfermedad, tras adquirir una segunda mutación por vía somática. La enfermedad de aparición esporádica es menos frecuente y de aparición más tardía ya que se requiere la acumulación de dos mutaciones por vía somática. El gen que confiere la susceptibilidad a contraer esta enfermedad fue localizado en la banda q14 de la rama larga del cromosoma 13 y presenta un carácter recesivo. El producto de expresión de este gen es una proteína de 105 kDa de peso molecular que se conoce con las siglas *Rb*¹¹. La ausencia total de dicha proteína o la presencia de una proteína mutada sin actividad biológica provoca la aparición de retinoblastoma pero además está implicada en muchos procesos no retinianos como en los tumores microcíticos de pulmón, carcinoma de mama, vejiga y próstata. *Rb* inhibe la proliferación celular. El mecanismo por el cuál ejerce su función consiste en reprimir los genes que se requieren para la síntesis del ADN a través de su interacción con los factores de transcripción E2F. La inactivación de *Rb* es necesaria para la proliferación celular. Hay cuatro mecanismos de inactivación: 1) inactivación genética; 2) oncoproteínas virales como el antígeno T del SV40, E1A de adenovirus y E7 de papiloma virus secuestran el *Rb* impidiendo su función; 3) inactivación por fosforilación por proteínas quinasa dependientes de ciclinas durante el ciclo celular y una vez fosforilado impide la asociación con E2F; 4) degradación por caspasas en respuesta a estímulos apoptóticos¹². La sobreexpresión de *Rb* produce

paro en fase G1 en ciclo celular lo que indica que actúa como inhibidor de proliferación. Además de su papel en ciclo celular está implicado en la regulación de otros procesos celulares como replicación de ADN, diferenciación y apoptosis (Fig 3).

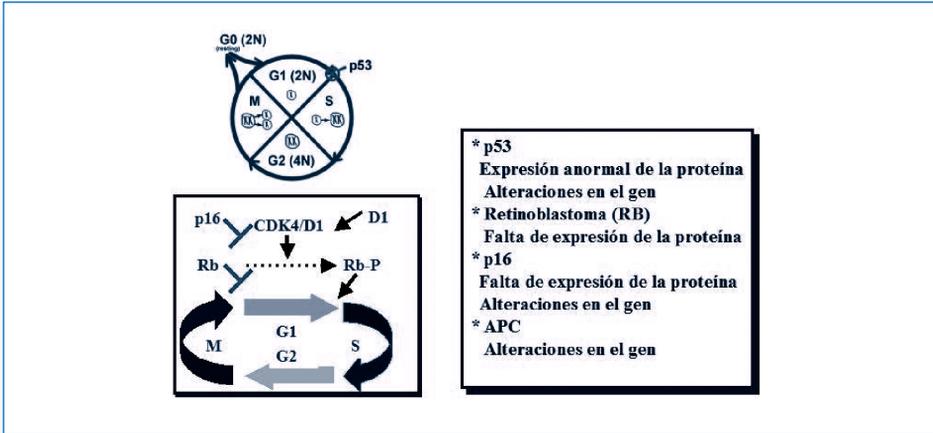


Figura 3: Ciclo celular y alteraciones que afectan a genes supresores detectadas con mayor frecuencia en cáncer

p53

Es otro gen supresor de tumores muy importante ya que está mutado en más de la mitad de los tumores humanos. Se considera como el guardián del genoma. Las mutaciones de *p53* en cada tipo de cáncer son diferentes, pueden ser deleciones totales o parciales o mutaciones puntuales. Las formas mutantes de *p53* se sobreexpresan en las células tumorales, pero son inactivas. La proteína *p53* es un factor de transcripción que controla la expresión de genes cuyos productos median parada del ciclo celular o inducción de apoptosis^{13,14}. Este gen se desarrolla con más profundidad en el capítulo de Oncogenes y Genes Supresores.

APC

El análisis genético de las familias FAP (poliposis adenomatosa familiar) llevó a la identificación del gen *APC* y estudios posteriores demostraron su interacción con β -catenina, lo que señala su implicación en la vía de señalización de Wnt¹⁵. Es una proteína de 312 kDa de peso molecular que forma homodímeros y presenta diversas funciones en procesos de migración y adhesión celular, regulación del

ciclo celular y inestabilidad genómica. Su papel como gen supresor de tumores reside en el hecho de que actúa como un regulador negativo de la vía Wnt ya que controla el nivel intracelular de β -catenina. El gen está localizado en el cromosoma 5q y se encuentra mutado en el 85% de los cánceres colorrectales humanos, lo que indica su papel crítico en la carcinogénesis. Además de su función principal, que consiste en formar complejos de degradación de β -catenina junto a axina y el enzima serina-treonín quinasa GSK3 β que hacen susceptible a β -catenina a la degradación por proteosoma, APC es importante en la regulación del transporte de β -catenina del núcleo al citoplasma para su destrucción. En ausencia de señal de la vía Wnt las células regulan los niveles de β -catenina por la formación de dicho complejo que fosforila β -catenina preparándola para su ubiquitinación y degradación (Figura 4).

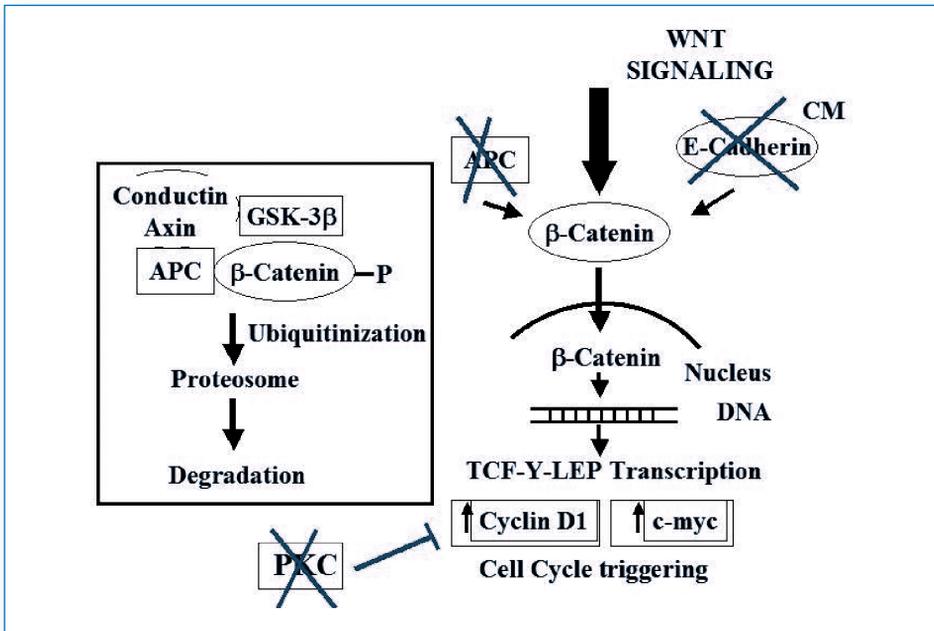


Figura 4: Vía de señalización de WNT

Cuando existe un ligando Wnt que activa dicha vía, ocurren una serie de eventos intracelulares que finalmente desestabilizan el complejo β -catenina/APC/GSK3/axina, β -catenina no fosforilada se transloca al núcleo y actúa como coactivador de los factores de transcripción de TCF/LEF (*T-cell factor/limphoid enhancing factor*) favoreciendo la transcripción de genes que regulan la proliferación celular.

Así pues alteraciones en la vía Wnt afectan a procesos de proliferación y diferenciación celular y, por tanto, prueban su implicación en los procesos de carcinogénesis humana, sobre todo a nivel colorrectal ¹⁶. Hay mutaciones inactivantes monoalélicas hereditarias de carácter autosómico dominante en *APC* en pacientes con FAP que poseen una predisposición al desarrollo de adenomas en colon. Es un típico supresor de tumores, por tanto, los dos alelos deben estar afectados. La mayoría de los casos descritos presentan un alelo con mutaciones, que dan lugar a proteínas truncadas, y otro con pérdidas de heterogigosidad u otras mutaciones.

BRCA 1 y 2

Aproximadamente el 10% de todos los casos de cáncer de mama tienen un componente familiar. Numerosos estudios han conseguido identificar las bases moleculares de dicho aspecto con la clonación de los dos genes *BRCA 1* y *2* (*breast-cancer-susceptibility genes*), cuya delección es responsable de más de un 60% de los casos familiares, y corresponde a un 5% de los todos los casos. Estos genes se caracterizan por tener herencia autosómica dominante, alta penetrancia y baja frecuencia. Mutaciones en *BRCA1* o *2* no están solamente asociados con un aumento del riesgo del cáncer, sino que también incrementan la susceptibilidad a cánceres de ovario, próstata, páncreas, y mama en hombres. *BRCA 1* y *BRCA2* tienen secuencias muy diferentes. *BRCA1* es una proteína de 1863 residuos, con un extremo amino-terminal implicado en interacciones proteína-proteína, un dominio C-terminal (BRCT) que contiene 95 aminoácidos que se encuentran en proteínas implicadas en reparación del ADN. Estudios cristalográficos de la estructura de esta proteína muestran que las mutaciones asociadas con tumores en *BRCA1* afectarían a la estabilidad o conformación del dominio BRCT o alterarían el dominio de dimerización. El gen *BRCA2* de 3418 residuos tiene 8 repeticiones de 30-40 residuos (BRC) cuya función es la unión de *BRCA2* a la proteína *RAD51* que es esencial para los procesos de reparación del ADN y recombinación genética ¹⁷. Ratones deficientes para cada una de ellas presentan una mayor sensibilidad a genotoxinas lo que indica su implicación en las respuestas celulares al daño del ADN. A pesar de que no presentan ninguna similitud en la secuencia hay muchas evidencias que demuestran que poseen funciones biológicas comunes, tales como la presencia del mismo patrón de expresión y la misma localización celular. De hecho, los niveles de expresión de ambas son más elevados durante la fase S, durante la cual tiene lugar las funciones de reparación del ADN. Su localización y expresión la comparten con la proteína *RAD51*, proteína con la que interaccionan físicamente formando complejos (Figura 5).

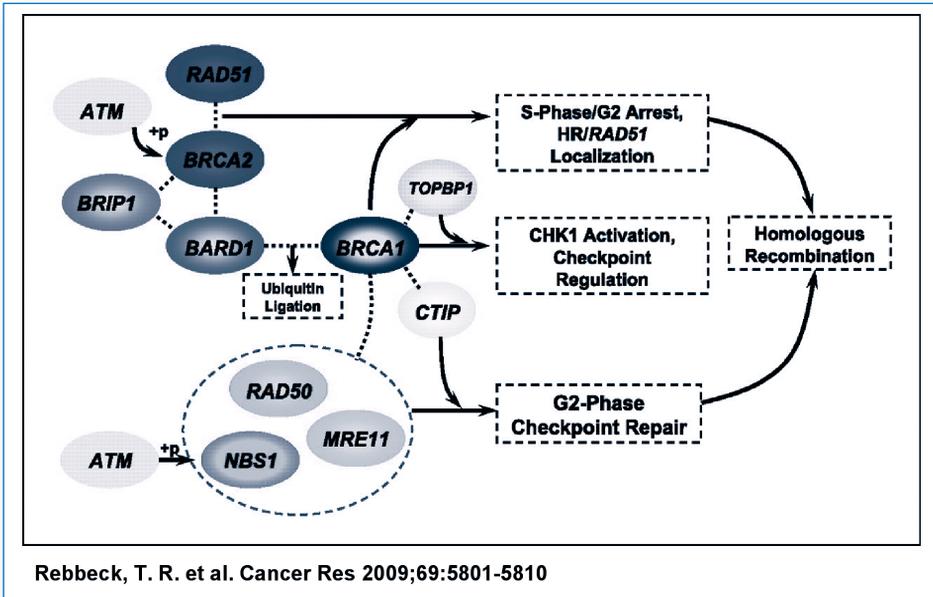


Figura 5: Funciones de las proteínas BRCA1 y BRCA2

Mecanismos de reparación del ADN y Cáncer

Mecanismos de reparación del ADN

El ADN genómico de todos los organismos está constantemente sometido a la acción de agentes exógenos y endógenos que provocan modificaciones en el mismo. Además, algunas vías del metabolismo del ADN, como es el proceso de replicación, también provocan alteraciones en su estructura debido a la introducción de errores durante la síntesis de las nuevas cadenas. Por otro lado, resulta esencial el mantenimiento de la integridad del genoma, con objeto de que éste se transmita sin alteraciones entre las distintas generaciones. Por ello, las células superiores disponen de distintos sistemas de reparación, cuya actuación está encaminada básicamente al mantenimiento de la integridad del ADN. Entre estos sistemas de reparación cabe citar los siguientes: mecanismos de reparación por escisión de bases (*Base Escisión Repair* o *BER*), mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos (*Nucleotide Escision Repair* o *NER*), mecanismos de reparación de errores de replicación (*MisMatch Repair System* o *MMR*), y mecanismos de reparación por recombinación.

Parece lógico pensar que cualquier alteración en las proteínas que intervienen en el correcto funcionamiento de los sistemas de reparación citados, tendría que conducir a un incremento en la frecuencia de mutaciones en el ADN y, por tanto, estaría íntimamente relacionada con el cáncer. Sin embargo, únicamente algunos genes codificantes de proteínas reparadoras del ADN se han encontrado mutados en el cáncer. Entre estos destacan aquellos que codifican para las proteínas del sistema MMR.

Sistema MMR y Cáncer

El correcto funcionamiento del sistema de reparación de errores de replicación, o de apareamientos incorrectos, es crítico para el mantenimiento de la integridad del genoma. Este sistema actúa a través de proteínas que, en un primer paso, se encargan de reconocer las distorsiones originadas en la estructura del ADN como consecuencia de la existencia de apareamientos incorrectos de bases. Seguidamente, proceden a la eliminación de la zona de ADN dañada y promueven la nueva síntesis de la misma. Por tanto, las alteraciones que afectan a las proteínas del sistema MMR (proteínas “Mut”) conducen a un acúmulo de mutaciones en el ADN ¹⁸. Este hecho ocasiona lo que ha dado en denominarse “Fenotipo Mutador” (Figura 6).

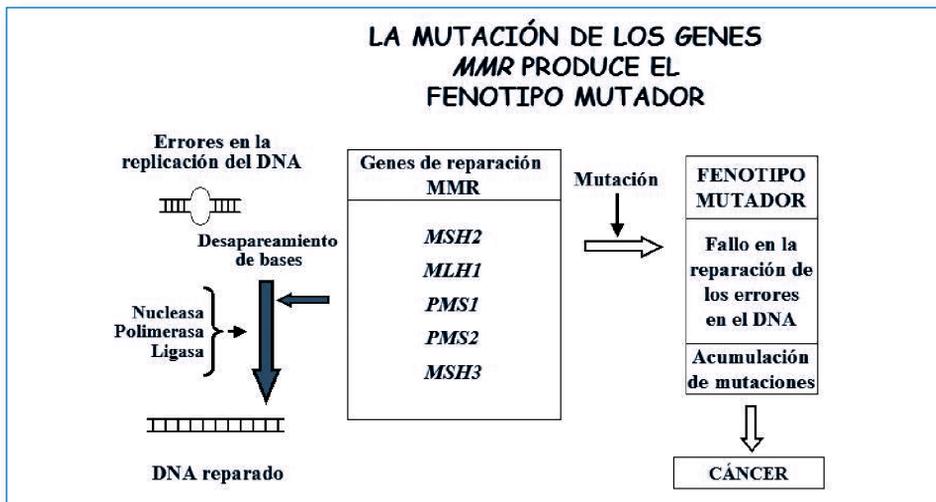


Figura 6: Mecanismo de reparación de desapareamientos en el ADN

En humanos, las alteraciones en el sistema MMR se detectaron por primera vez en 1993, en tumores de colon, endometrio, ovario y otros órganos relacionados con

el Síndrome del Cáncer de colon hereditario sin poliposis (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer o HNPCC*). El estudio de estos tumores reveló que sus células tienen un elevado número de mutaciones y presentan, además, una gran inestabilidad en los microsatélites o secuencias cortas repetidas que se localizan a lo largo de todo el genoma. Si bien los microsatélites no son genes, sus alteraciones implican que los genes en los que se encuentran están sufriendo mutaciones. Sin embargo, se ha observado que la inestabilidad de microsatélites en células de cánceres humanos se asocia a alteraciones en ciertos genes codificantes para las proteínas que reparan los errores ocurridos durante la replicación del ADN. Son los genes *MMR* y se ha calculado que estos genes proporcionan al genoma humano un nivel de protección de 100 a 1000 veces frente a la aparición de mutaciones durante la replicación del ADN. Además del ya mencionado síndrome HNPCC, el modelo tumorigénico del fenotipo mutador se ha demostrado en otros tipos de cánceres humanos, entre los que cabe destacar el cáncer de colon esporádico. Aproximadamente entre 12-15% de estos últimos cursan por la vía carcinogénica del fenotipo mutador y también en estos la inestabilidad en microsatélites puede considerarse un indicador de alta tasa de mutación génica. Entre los genes del sistema MMR implicados, hasta la fecha, en el desarrollo de tumores humanos a través de la vía del fenotipo mutador cabe destacar a *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hPMS1* y *hPMS2*. A pesar de que la posibilidad de que todos los casos con fenotipo mutador sean consecuencia de mutaciones en los genes *MMR* no está confirmada, lo cierto es que la presencia de estas alteraciones incrementa la tasa de mutaciones en todo el genoma y, serían responsables del desarrollo tumoral cuando estas alteraciones afectan a secuencias directamente relacionadas con la proliferación celular. Por tanto, el proceso puede iniciarse con la mutación de algún gen *MMR*, lo cual aumentaría enormemente la frecuencia de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, favoreciéndose la adquisición del fenotipo canceroso. Si bien el mecanismo molecular permanece hoy día sin dilucidar completamente, lo cierto es que estos tumores confieren una menor agresividad y los pacientes afectados presentan un pronóstico claramente más favorable

Apoptosis y Cáncer

Apoptosis

El fenómeno de apoptosis implica la activación de un programa de mecanismos específicos que produce finalmente una destrucción regulada de la célula (muerte

celular programada). Este proceso ocurre en condiciones fisiológicas normales, como el desarrollo, la embriogénesis, la metamorfosis, el recambio normal de los tejidos, los mecanismos de defensa y el envejecimiento, si bien también está presente en algunas patologías ²⁰.

La muerte celular apoptótica tiene lugar en dos fases: en la primera o fase de determinación, las células reaccionan ante un estímulo (o ante su ausencia) decidiendo iniciar el proceso de muerte; la segunda o fase de ejecución conlleva la activación de las caspasas y produce en la célula una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que la conducen a la muerte. Las células experimentan una pérdida de la adhesión celular y de los contactos intercelulares, cambios en la superficie celular con aparición de protusiones que causan un aumento en la movilidad, una reducción del volumen celular, condensación de la cromatina y ruptura del ADN, y finalmente, la fragmentación de las células dando lugar a los “cuerpos apoptóticos”, constituidos por trozos de citoplasma rodeados de membrana, que contienen orgánulos intactos y parte del núcleo, que son rápidamente fagocitados y digeridos por macrófagos y otras células vecinas. La técnica más utilizada para el estudio de la apoptosis es el análisis bioquímico de las escaleras de ADN extranuclear. Durante la apoptosis, el ADN se rompe por las regiones internucleosomales en fragmentos de 180 pares de bases o múltiplos, que pueden ser observados mediante electroforesis del ADN.

Proteínas implicadas en apoptosis

La familia de las caspasas implicadas en apoptosis se pueden subdividir en dos grupos: caspasas de iniciación (caspasa-2, -8, -9 y -10), que se encargan de iniciar la cascada de activación de caspasas durante la apoptosis y poseen un prodominio largo; y las caspasas ejecutoras de apoptosis (caspasa-3, -6 y -7) que se encargan de llevar a cabo la destrucción de las células durante la apoptosis y poseen prodominios cortos (o carecen de ellos) ¹².

Además de las caspasas, existe otro grupo de proteínas implicado en la regulación de la entrada de las células en apoptosis: la familia de Bcl-2 ¹⁴. Esta familia de proteínas está constituida por miembros que promueven la apoptosis (pro-apoptóticos), como Bax, Bak, Bid, Bad y Bim; y miembros que actúan como represores (anti-apoptóticos), como Bcl-2 y Bcl-XL. Todos ellos poseen dominios BH (dominios de homología a Bcl-2), si bien el número de estos dominios varía de unos miembros

a otros. Los miembros anti-apoptóticos típicamente poseen 4 dominios BH (BH1-BH4), mientras que los miembros pro-apoptóticos generalmente carecen del dominio BH4. Durante la apoptosis, la membrana externa mitocondrial permite la liberación de ciertos componentes mitocondriales como el citocromo *c*. Las investigaciones parecen demostrar que tanto los miembros pro-apoptóticos como los anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 están implicados en el control de la permeabilidad de esta membrana mitocondrial.

El resultado de la activación de las distintas vías que inducen apoptosis provoca finalmente la proteólisis de sustratos de diversa naturaleza llevada a cabo por las caspasas de ejecución. Entre estos sustratos se encuentra la poli(ADP-ribosa) polimerasa, la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN, el componente de 70 kDa de la ribonucleoproteína pequeña U1; reguladores de la progresión del ciclo celular, como la proteína retinoblastoma y las isoformas de la proteína quinasa C; proteínas estructurales, como las láminas de la envoltura nuclear, o del citoesqueleto, como la actina, Gas2, fodrina. Asimismo, en los últimos años se ha descubierto que las caspasas ejercen su acción proteolítica sobre proteínas específicas que participan en la transducción de señales de supervivencia, como son Raf-1 o AKT o la proteína fosfatasa PP2A. Recientemente, ha sido identificada una Dnasa que corta el ADN cromosómico mediante un mecanismo que parece ser dependiente de caspasas (CAD).

Vías de supervivencia

Además de las vías que inducen apoptosis, la célula dispone de mecanismos que promueven la supervivencia celular, a través de las vías de supervivencia. El balance entre ambos tipos de vías determinará el destino final que ha de tomar la célula.

La supervivencia celular en la mayoría de los tejidos depende del aporte continuo de señales por parte de las células vecinas y de la matriz extracelular. En este sentido, la retirada de factores de crecimiento a células en cultivo produce la muerte por apoptosis. Sin embargo, el aporte de factores específicos (NGF, PDGF, IGFs) previene la apoptosis en diversos sistemas celulares. Estos factores extracelulares pertenecen en su mayoría a la familia de factores cuyos receptores presentan dominios citoplasmáticos con actividad tirosina-quinasa. La unión del factor a su receptor específico produce la dimerización y autofosforilación del receptor, al que pueden unirse proteínas transductoras, así como la estimulación de la actividad tirosina-quinasa que fosforila

numerosas proteínas diana, lo que conduce a cambios a nivel citoplásmico y, finalmente, a cambios a nivel nuclear. Existen dos grandes rutas de señalización a partir de estos receptores: la cascada Raf/MAPK y la cascada PI 3-quinasa/AKT/p70S6 quinasa. Las quinetas activadas por mitógenos (MAPK) son serina/treonina-quinetas que se activan por fosforilación en residuos de treonina y tirosina. Estas MAPKs ejercen su acción por fosforilación de proteínas citosólicas y/o factores de transcripción tras su translocación al núcleo. La ruta de las MAPKs se ha relacionado con los procesos de proliferación y diferenciación celular, así como en el proceso de apoptosis. Pero además, recientemente, se ha implicado esta ruta en supervivencia celular por fosforilación directa de Bad en un residuo de serina (Ser-112), que parece ser un requisito necesario para la disociación de Bad de Bcl-XL, permitiendo la protección de apoptosis por Bcl-XL.

Por otro lado, la fosfatidil inositol (PI) 3-quinasa, es un complejo heterodimérico que posee actividad lipido-quinasa y actividad serina/treonina-quinasa. Esta proteína es la cabeza de una cascada de transducción de señales implicada en numerosas respuestas biológicas a los receptores tirosina quinetas. Por debajo de la PI 3-quinasa la supervivencia celular parece depender de la Ser/Thr quinasa AKT/PKB. Existen evidencias de que los efectos de AKT en la supervivencia celular están mediados por la fosforilación directa de Bad en un residuo de serina (Ser-136), creando una zona de unión para la proteína adaptadora 14-3-3. Cuando Bad está unida a 14-3-3 es incapaz de heterodimerizar e inhibir el efecto de supervivencia de Bcl-2 o Bcl-XL. Sin embargo, dado que Bad solo se expresa en un número limitado de tejidos y líneas celulares, no parece que la fosforilación de esta proteína sea la única vía a través de la cual AKT ejerce su efecto antiapoptótico. Asimismo, existen evidencias de que AKT fosforila e inhibe la caspasa-9 humana y otros trabajos demuestran que AKT actuaría por encima de la caspasa-9 impidiendo la salida del citocromo c.

Apoptosis inducida por p53

El gen supresor de tumores *p53* desempeña un papel relevante en la inducción de las vías de apoptosis en respuesta a un daño en el ADN (radiaciones, ROS).

Cuando una célula con la proteína *p53* normal presenta un daño limitado en el ADN se produce la estabilización de la proteína, la cual induce la expresión de genes que provocan la parada del ciclo celular en la fase G1 (*p21/Cip 1/Waf 1*) y

de genes de reparación del ADN dañado (*Gadd 45*). De este modo, la célula repara la lesión y posteriormente inicia la progresión del ciclo. En caso de que el daño en el ADN sea excesivo se inducen altos niveles de p53 que, en lugar de parar el ciclo, activan el mecanismo de apoptosis mediante la inducción de la expresión de genes pro-apoptóticos (*Bax*) e inhibiendo la expresión del gen anti-apoptótico *Bcl-2*, acontecimientos que conllevan la activación de la vía mitocondrial inductora de apoptosis. Existen evidencias de que en algunos sistemas celulares, el aumento de los niveles de p53, induce la expresión del receptor de muerte Fas/CD95, activando la vía mediada por estos receptores.

Sin embargo, una célula con la proteína p53 mutada, responde ante el daño del ADN provocando la replicación del mismo con la consiguiente transmisión y acumulación de mutaciones que puede dar lugar a la pérdida del control de la proliferación y a la aparición de cánceres.

Terapia del cáncer basada en la inducción de apoptosis

El aumento o disminución del proceso apoptótico se asocia a muchos procesos patológicos humanos, entre los que se encuentra el cáncer. En ciertas patologías tumorales los mecanismos apoptóticos han sido suprimidos bien por inactivación de la proteína inductora p53 o por sobreexpresión del represor de apoptosis *Bcl-2*, o por ambos acontecimientos. Un gran número de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer basan su acción terapéutica en la inducción de apoptosis. Sin embargo, en ocasiones, las células tumorales adquieren resistencia al desencadenamiento del proceso apoptótico, lo que explica la falta de efectividad en el tratamiento del cáncer de ciertos agentes anticancerígenos ²⁰.

Entre las terapias que intentan inducir apoptosis en células tumorales se encuentra la terapia basada en el uso de oligonucleótidos antisentido que reducen la expresión de la proteína anti-apoptótica *Bcl-2* y provocan un aumento de la quimiosensibilidad de las células cancerosas. Los niveles de *Bcl-2* se encuentran sobreexpresados en casi un 50% de tumores humanos, incluidos tumores sólidos de próstata, pulmón, renal y también en leucemias. Esta sobreexpresión, además de contribuir a la malignización celular, dificulta su tratamiento causando resistencia tanto a drogas anticancerígenas (cisplatino, etopósido, metotrexato) como al tratamiento radioterápico. Distintas terapias basadas en el uso de oligonucleótidos antisentido *Bcl-2* o de pequeñas moléculas inhibidoras de *Bcl-2*, se encuentran en la

actualidad en ensayos clínicos en fases I y II. Asimismo, se están examinando distintas estrategias terapéuticas basadas en una combinación de oligonucleótidos antisentido Bcl-2 y agentes quimioterápicos como paclitaxel en carcinoma de pulmón de célula pequeña, mitoxantrona en cáncer de próstata metastásico resistente a hormonas, docetaxel en cáncer de mama, irinotecan en cáncer y arabinosido de citosina (ARA-C) y fludaribina en leucemia aguda recurrente.

Otra de las dianas terapéuticas está basada en la reactivación de p53. Las células tumorales que presentan una pérdida o inactivación de la función de p53 aumentan la probabilidad de transformación maligna. Así, se ha podido demostrar que ratones delecionados homocigotamente para p53 presentan una alta incidencia de desarrollo de tumores, al igual que ocurre en humanos con un alelo mutado. Asimismo, la pérdida de p53 confiere resistencia a la inducción de apoptosis por tratamientos anticancerígenos. Por tanto, la reactivación de p53 en estos tumores provocaría la eliminación de las células tumorales por apoptosis mejorando la sensibilidad al tratamiento. En este sentido se están realizando ensayos de terapia génica basada en la utilización de construcciones de p53 inducibles aunque lamentablemente por el momento no ha podido demostrarse su efectividad.

Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) sobreexpresadas en ciertos tipos de cáncer (linfoma, melanoma) se asocian también a resistencia a apoptosis²¹. Estudios realizados con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la survivina, un miembro de la familia de IAPs, pueden inducir apoptosis espontánea en células de cáncer de pulmón, melanoma maligno y otros tipos de células cancerosas.

Asimismo, los receptores de muerte constituyen una diana terapéutica en el tratamiento del cáncer. Las estrategias basadas en la activación de estos receptores tienen por objeto inducir apoptosis en las células cancerígenas a través de la activación de caspasas. Los resultados obtenidos hasta el momento con proteínas recombinantes en modelos animales parecen bastante prometedores. La inyección de un TRAIL recombinante (Apo-2L) en gliomas intracraneales provocó una completa eliminación de la masa tumoral. Asimismo, en carcinoma de colon la combinación de TRAIL recombinante con agentes quimioterápicos convencionales produjo la completa remisión del tumor.

Telomerasa y Cáncer

Telomerasa y Telómeros

La telomerasa es la enzima que utilizan la mayoría de los organismos eucarióticos para el mantenimiento de sus telómeros. Mediante la incorporación de secuencias teloméricas en el extremo 3' de los cromosomas se equilibra la pérdida de nucleótidos que tiene lugar con cada división celular, como consecuencia del problema de la replicación terminal. Los telómeros son estructuras especializadas formadas por ADN y proteínas que constituyen, por tanto, los extremos de los cromosomas lineales eucarióticos. Son esenciales para el mantenimiento de la estructura y función de los cromosomas y para la viabilidad celular. El ADN telomérico consiste en repeticiones en tándem de secuencias nucleotídicas cortas ricas en residuos de guanina en dirección 5'-3'. Aunque todos los telómeros de un mismo genoma presentan las mismas repeticiones, éstas varían entre las distintas especies, si bien es notable la gran conservación que existe en las secuencias teloméricas de especies tan distantes en la evolución como vertebrados, plantas y protozoos. En el caso de los telómeros humanos la secuencia que se repite es TTAGGG. En asociación con el ADN telomérico, se sitúan distintas proteínas..

Los telómeros no sólo actúan como los extremos físicos de los cromosomas que impiden la pérdida de secuencias codificantes, sino que además desempeñan funciones esenciales para el mantenimiento de la función cromosómica. Así, protegen a los cromosomas de procesos de degradación, fusión y recombinación que amenazarían la integridad cromosómica, participan en la organización de la arquitectura nuclear, desempeñando un papel crítico en la segregación cromosómica durante la mitosis y meiosis, e intervienen en funciones de regulación de la expresión génica, mediante el fenómeno conocido como TPE (*Telomere Position Effect*).

Telomerasa: componentes y actividad

Desde su identificación en *Tetrahymena*, la telomerasa ha sido estudiada y caracterizada en diversos organismos eucarióticos, entre los que se incluyen ciliados, levaduras, ratones y humanos. Hasta la fecha, todas las telomerasas conocidas son ribonucleoproteínas ADN polimerasas que constan de un componente ARN y de diversos componentes de naturaleza proteica, entre los que destaca la subunidad

catalítica de la enzima. El componente ARN de la telomerasa humana, denominado *hTR*, está codificado por un gen de copia única localizado en 3q26.3. Su transcripción por la ARN polimerasa II y posterior procesamiento en el extremo 3', produce un transcrito maduro de 451 nucleótidos. La región molde para la transcripción inversa, complementaria a la secuencia del ADN telomérico humano (TTAGGG)_n está próxima al extremo 5' y comprende 11 nucleótidos de secuencia 5'- CUAACC-CUAAC - 3'. La subunidad catalítica de la telomerasa humana, *hTERT*, está codificada por un gen de copia única de 40 kb localizado en 5p15.33 compuesto por 16 exones y que genera una proteína de 127 kDa con 1132 aminoácidos. En su extremo N- terminal presenta un dominio T específico de la telomerasa, pues no se encuentra presente en ningún otro tipo de proteínas. En el extremo C-terminal existen siete motivos responsables de la actividad catalítica, motivos RT, comunes a la familia de las transcriptasas inversas (RTs) que incluyen ciertos residuos de aspártico esenciales para la actividad retrotranscriptasa.

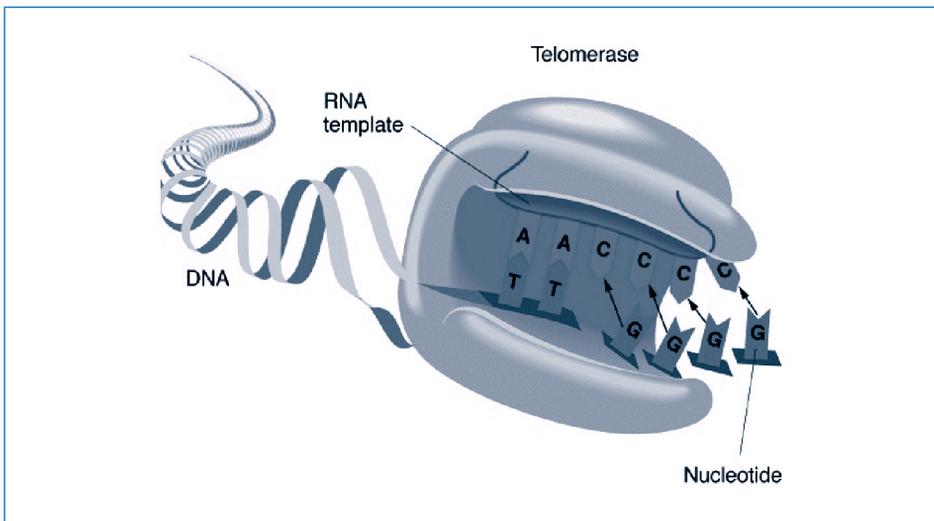


Figura 8: Composición de la Telomerasa

La expresión de *hTR* se ha demostrado en numerosos tejidos, tanto normales como neoplásicos, con independencia de la actividad telomerasa, por lo que no parece ser el componente limitante de la actividad de la enzima. A diferencia del componente ARN, la expresión de *hTERT* está limitada a tejidos con actividad telomerasa. El gen que codifica para la proteína se expresa a niveles altos en tumores primarios, líneas celulares inmortales y tejidos telomerasa-positivos, pero no en te-

jididos sin actividad telomerasa ²². La expresión ectópica de *hTERT* en células telomerasa-negativas es suficiente para reconstituir la actividad telomerasa. Además, el nivel de expresión del ARNm de *hTERT* se correlaciona con el nivel de la actividad enzimática del complejo telomerasa. Todos estos estudios apoyan el papel de *hTERT* como factor limitante de la actividad telomerasa. Si bien la coexpresión de *hTR* y *hTERT* es suficiente para reconstituir la actividad telomerasa *in vitro*. Sin embargo, estudios bioquímicos y genéticos sugieren que *in vivo* son necesarios ciertos factores adicionales a este núcleo mínimo, los cuales podrían estar implicados en la biogénesis y ensamblaje de la enzima activa, así como en la regulación del acceso a su sustrato, los telómeros.

Desde el descubrimiento del problema de la replicación terminal y la implicación de los telómeros y la telomerasa en el mismo, distintos estudios plantearon un posible papel de los telómeros en el control de la senescencia celular, que llevaron al planteamiento de la llamada hipótesis telomérica.

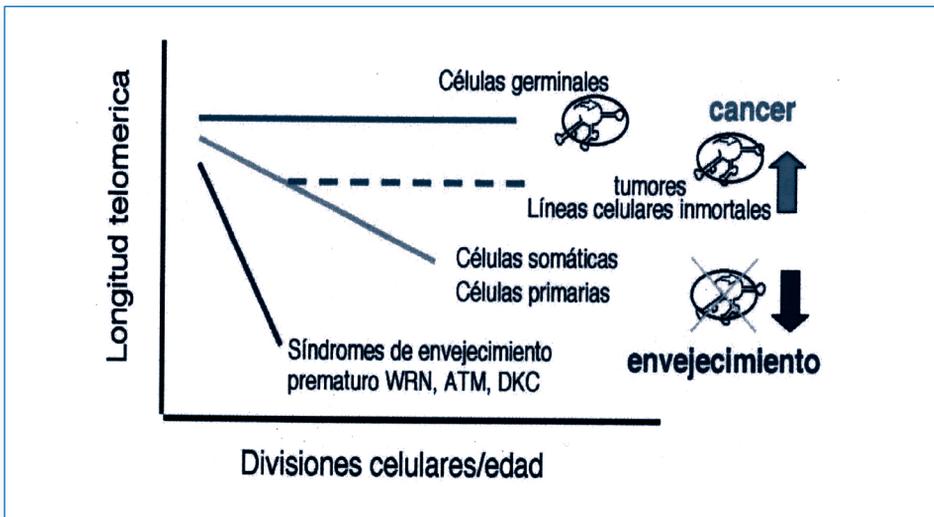


Figura 9: Telómeros y división celular

Esta hipótesis propone que la pérdida telomérica progresiva es un factor limitante en la capacidad replicativa celular y emite una señal que desencadena la entrada en senescencia, de tal modo que los telómeros actúan a modo de reloj mitótico que controla el número de divisiones que una célula puede experimentar. Según el modelo de la hipótesis telomérica (Figura 8), en los tejidos germinales y en una minoría de

los tejidos somáticos con alta tasa de proliferación, la longitud de los telómeros se mantiene a medida que las células se dividen debido a la presencia de la telomerasa. Sin embargo, en la mayoría de tejidos somáticos, los telómeros sufren un acortamiento progresivo, pues carecen de la enzima. Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, las células entran en la fase de mortalidad 1 (M1), donde sufren una parada prolongada del ciclo celular en G1 y, al cabo de cierto tiempo, mueren. El estímulo que induce la parada del crecimiento son las señales de lesión del ADN que se emiten como respuesta a la pérdida telomérica. En estas condiciones, existen células capaces de evadir la senescencia, por ejemplo, células transformadas con oncogenes virales que tienen inactivadas las vías controladas por p53 y Rb. Estas células son capaces de ignorar los avisos para detener su crecimiento y adquieren una ampliación de su capacidad replicativa en la que siguen acortando sus telómeros. Esta ampliación es limitada y finaliza en la fase de mortalidad 2 (M2) o crisis, en la cual la mayor parte de las células han acumulado gran cantidad de alteraciones cromosómicas y sufren apoptosis de manera masiva. Según este modelo, la reactivación de la actividad telomerasa, o de cualquier otro mecanismo capaz de mantener la longitud telomérica, estabiliza el acortamiento de los telómeros, lo cual trae como resultado un escape de M2 y la adquisición de la inmortalidad celular ²².

Telómeros, Telomerasa y Cáncer

Lo expuesto en los párrafos anteriores de este apartado, con respecto a la conexión entre el mantenimiento de los telómeros y la regulación de las funciones replicativas celulares, implica que las alteraciones en la biología telomérica juegan un papel importante en la transformación celular maligna. En apoyo de esta hipótesis existen en la bibliografía distintos trabajos de investigación en los que se demuestra la reactivación de la telomerasa en la mayoría de los tumores humanos, y la ausencia de esta enzima en los tejidos normales ²³. Los últimos estudios indican que durante las etapas tempranas de la transformación celular, la longitud de los telómeros actuaría limitando la expansión celular; sin embargo, en etapas más avanzadas, coincidiendo con la reactivación de la telomerasa la oncogénesis se facilitaría. Por otro lado, además de la función de los telómeros facilitando la inmortalización celular, estas secuencias determinan otro aspecto crítico en la transformación maligna. El acortamiento de los telómeros conduce a la senescencia celular, un proceso que se acompaña de fusiones cromosómicas e incremento de la inestabilidad genómica. Por otro lado, este incremento de la inestabilidad genómica causado por el acortamiento telomérico y la pérdida de la

función protectora de los telómeros, puede también conducir a la transformación maligna, en ciertas condiciones. De hecho existen suficientes evidencias que relacionan el mantenimiento de las secuencias teloméricas, fundamentalmente por reactivación de la telomerasa, y el cáncer.

Implicaciones clínicas de la telomerasa en cáncer

La detección de la actividad telomerasa en células tumorales *in vivo* fue descrita por primera vez en 1994, gracias al desarrollo de un método sencillo conocido como TRAP (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*). Desde entonces, y gracias a numerosas modificaciones del ensayo original, se ha procedido al análisis de la actividad telomerasa en los diferentes tipos de tumores humanos primarios, así como en tumores metastásicos, lesiones premalignas, tumores benignos y muestras de tejidos normales adyacentes a los correspondientes tumores. Globalmente, alrededor del 85% de los tumores analizados hasta la fecha presentan actividad de la enzima. Los avances logrados en los últimos años, en relación con el entendimiento del papel de los telómeros y de la telomerasa en la patofisiología del cancer humano, indican que las estrategias encaminadas al análisis de la longitud telomérica y de la actividad telomerasa pueden tener una gran utilidad en el establecimiento del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los procesos cancerosos humanos. En particular, la telomerasa se ha convertido, en los últimos años, en una diana atractiva para el diseño de compuestos útiles en terapia anticancerosa ²⁴.

Utilidad de la telomerasa en el diagnóstico del cáncer

La fuerte asociación existente entre la actividad telomerasa y la malignidad celular ha ofrecido la posibilidad de utilizar la telomerasa como marcador en el diagnóstico del cáncer. El empleo de métodos de detección de la enzima de alta sensibilidad y especificidad basados en el ensayo TRAP, así como su análisis a bajo coste en una amplia variedad de muestras, desde biopsias hasta distintos tipos de fluidos corporales que reducen la invasividad, ha potenciado la utilidad de la telomerasa como marcador diagnóstico en distintos tipos tumorales. Además, también puede constituir una herramienta de gran valor en la detección precoz del cáncer o de las metástasis tempranas. Para ello, resulta de vital importancia conocer la expresión diferencial de la telomerasa en los distintos tejidos del organismo. En el caso de la detección precoz, es especialmente relevante conocer la expresión de la enzima durante los estadios benignos, tempranos y avanzados del tumor. Así, por ejemplo, en el caso de la carcinogénesis colorrectal, uno de los modelos mejor

caracterizados en lo que respecta a las alteraciones moleculares que tienen lugar en cada etapa del proceso, se ha demostrado que la reactivación de la telomerasa parece ser un evento obligado en la transición de adenoma a carcinoma. Es más, se ha llegado a postular que dicha reactivación tiene lugar después de la mutación en *K-ras* pero antes de que se produzcan mutaciones en *p53*. Asimismo, en el desarrollo de carcinomas de tiroides, se ha visto que los estadios benignos y menos avanzados presentan niveles bajos o indetectables de actividad telomerasa ²⁵.

Papel de la telomerasa como marcador pronóstico en cáncer

La utilidad de la telomerasa como marcador pronóstico en cáncer se basa en estudios llevados a cabo en distintos tipos celulares, a partir de los cuales se ha postulado que la presencia o no de actividad telomerasa determina, respectivamente, la infinita o finita capacidad proliferativa de las células que integran los distintos tumores. En base a estos análisis, se ha propuesto que los tumores pueden ser divididos en dos grupos: aquellos que contienen células inmortales y aquellos que, por el contrario, carecen de ellas. La correlación entre telomerasa y pronóstico clínico se ha puesto de manifiesto en determinados tipos de cáncer. Así, en cáncer de pulmón, analizando una amplia población de carcinomas no microcíticos (CNMP) y de carcinomas microcíticos (CMP), se observó que los tumores pertenecientes al primer grupo presentaban actividades que oscilaban entre niveles prácticamente inexistentes hasta niveles altos. Sin embargo, en todos los carcinomas microcíticos de pulmón analizados, se observaron niveles muy altos de actividad de la enzima. Asimismo, la actividad telomerasa se ha correlacionado con mal pronóstico en cáncer gástrico, en cáncer de mama, o en cáncer colorrectal. Por otro lado, en leucemias agudas, una elevada actividad telomerasa se asocia con un desenlace clínico adverso y, además, se ha observado que la actividad enzimática decrece durante la fase de remisión de la enfermedad.

Todos estos datos demuestran que la detección de la actividad telomerasa puede constituir un marcador molecular útil, tanto para predecir el desenlace del cáncer, como a la hora de aportar nuevos datos acerca del tratamiento más adecuado, en cada caso. Así pues, un pronóstico basado en la detección de la telomerasa puede ser de gran ayuda en el caso de tumores que experimentan recurrencias, ya que en estos casos se podría establecer una terapia adyuvante más agresiva. El papel de la telomerasa como marcador pronóstico podrá ser, por tanto, más relevante en aquellos tipos de neoplasias para las que existen tratamientos definidos en base al grado de agresividad del tumor.

La telomerasa como marcador de progresión tumoral

Aparte de su posible utilidad en lo que a diagnóstico y pronóstico se refiere, el estudio de la actividad telomerasa puede utilizarse como marcador de progresión tumoral. Así, la detección de dicha actividad puede ser útil en la monitorización de la efectividad de las terapias antineoplásicas clásicas, puesto que el nivel de actividad de la enzima podría emplearse para determinar el número de células inmortales presentes en un paciente sometido a tratamiento. Estas determinaciones permitirían reducir, por ejemplo, en el caso de trasplantes autólogos de médula ósea, el número de recurrencias debidas a la presencia de células cancerosas no detectadas previamente ²⁵.

Inhibición de la telomerasa y su utilidad en la terapia antitumoral

La presencia de la telomerasa en un alto porcentaje de tumores humanos y su ausencia en la gran mayoría de células normales, indican que la inhibición de la enzima podría constituir una alternativa a las estrategias actuales contra el cáncer. Los inhibidores de la telomerasa producirían un acortamiento telomérico progresivo que conduciría finalmente al estado de senescencia y, por ello, a una eventual destrucción de las células tumorales. Puesto que las células continuarían proliferando hasta que sus telómeros alcanzaran una longitud crítica, estas terapias anti-telomerasa serían especialmente útiles como tratamiento adyuvante de las terapias actuales, a fin de evitar recidivas debidas a la presencia de células tumorales que no hayan sido eliminadas por completo con los tratamientos convencionales. Con respecto a los posibles efectos adversos, se piensa que la importancia de los mismos sería inferior a las terapias actuales.

Hasta la fecha se han desarrollado distintas clases de agentes inhibidores de la telomerasa, entre los que se encuentran oligonucleótidos antisentido contra el componente ARN, mutantes dominantes negativos de la subunidad catalítica, así como moléculas de pequeño tamaño con alta especificidad por la enzima, si bien ninguno de ellos se utiliza aún en clínica ²⁴.

Otras líneas de investigación están dirigidas a la obtención de vacunas contra la telomerasa. Se trataría de estimular el sistema inmune para que reconociera las células telomerasa positiva y las eliminara. Estas vacunas, en principio, no afectarían a las células normales de tejidos de alto recambio, dado que éstas presentan niveles bajos de actividad de la enzima. Por el contrario, las células tumorales son capaces de expresar con frecuencia componentes de la telomerasa unidos a moléculas del

sistema principal de histocompatibilidad, con lo que serían reconocidas como dianas de destrucción.

Bibliografía

- 1 Pharoah P, Caldas C. Molecular genetics and the assessment of human cancers. *Expert reviews in molecular medicine* 1999;11 March:1-19.
- 2 Miki Y, Swenson J, Shattuck-Eidens D et al . A strong candidate for the breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1995;56:265-71.
- 3 Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q12-13. *Science* 1994;265:2088-90
- 4 Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 2003;284(1): 99-110.
- 5 Liu B, Parsons S, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT et al . Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996;2:169-174.
- 6 Miyaki m, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita r et al. Coexistence of somatic and germline mutations of APC gene in desmoid tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1993;53:5079-82.
- 7 Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol* 2002;192(2): 125-130.
- 8 Dunn C, Wiltshire C, MacLaren A, Gillespie DA. Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal* 2002;14(7): 585-593.
- 9 Kurokawa K, Kawai K, Hashimoto M, Ito Y, Takahashi M. Cell signalling and gene expression mediated by RET tyrosine kinase. *J Intern Med* 2003;253(6):627-633.
- 10 Pelengaris S, Khan, M. The many faces of c-myc. *Arch Biochem Biophys* 2003; 416(2): 129-136.
- 11 Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*2002;2(12): 910-917.
- 12 Creagh EM, Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans* 2001;29: 696-702.
- 13 Rubbi CP, Milner J. p53-guardian of the genomes guardian? *Cell Cycle* 2003;(1): 20-21.
- 14 Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev*2002;2: 647-653.
- 15 Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes and Dev* 2000;14: 1837-1851.
- 16 Giles R.H., van Es J.H., Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003;1653: 1-24.
- 17 Rebbeck TR, Mitra N, Domchek SM, Wan F, Chuai S, Friebel TM, Panossian S, Spurdle A, Chenevix-Trench G; kConFab, Singer CF, Pfeiler G, Neuhausen SL, Lynch HT, Garber JE, Weitzel JN, Isaacs C, Couch F, Narod SA, Rubinstein WS, Tomlinson GE, Ganz PA, Olopade OI, Tung N, Blum JL, Greenberg R, Nathanson KL, Daly MB. Modification of ovarian cancer risk by BRCA1/2-interacting genes in a multicenter cohort of BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Res.* 2009 Jul 15;69(14):5801-10. Epub 2009 Jul 7
- 18 Jiricny J, Marra G. DNA repair defects in colon cancer. *Curr Op Gen Dev* 2003;13: 61-69.
- 19 Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407: 770-776.

- 20 Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nature Rev* 2002;1: 111-121.
- 21 Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000;407: 810-816.
- 22 Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and Cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10(7): 677-685.
- 23 Blasco MA. Telomeres and cancer: a tail with many ends. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13(1): 70-76.
- 24 Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2(4): 257-265.
- 25 Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003;21 (10): 2034-2043.

Criterios diagnósticos en los síndromes de cáncer hereditario

Angel Miguel Alonso Sánchez,
Sira Moreno Laguna
Ignacio Blanco Guillermo

Servicio de Genética
Hospital Virgen del Camino Pamplona
Programa de Cáncer Hereditario.
Instituto Catalán de Oncología.
Barcelona

José Ignacio Mayordomo Cámara

Servicio de Oncología Médica.
Hospital Clínico Universitario Lozano
Blesa. Zaragoza

Pedro Pérez Segura

Servicio de Oncología Médica.
Hospital Clínico San Carlos. Madrid

Carlos San Román Cos-Gayón

Servicio de Genética Médica. Hospital
Universitario Ramón y Cajal. Madrid

Introducción

“En el momento actual, la relevancia de la susceptibilidad genética a las formas más comunes de cáncer permanece oscura”. Con esta frase expresaban Doll y Peto en su revisión de las causas del cáncer en 1981, su opinión sobre la evidencia de que el cáncer pudiera ser, en la mayoría de los casos, una enfermedad hereditaria ¹⁴. A pesar del enorme progreso en este campo habido en las dos décadas transcurridas desde que se publicó esta excelente revisión, todavía persiste gran parte de verdad en esta cita, al encontrarse el clínico en muchas ocasiones con dudas sobre si pacientes con agregación familiar de casos de cáncer pueden ser diagnosticados con un síndrome de cáncer hereditario.

Con el objetivo de ayudar a los profesionales a formular un diagnóstico consensuado, pero también para aportar una base simple, clara y objetiva, que resulta imprescindible para asegurar que distintos científicos utilizan la misma definición cuando publican datos sobre un síndrome de cáncer hereditario, se aportan a continuación los criterios diagnósticos de los principales síndromes de cáncer hereditario.

Como se podrá observar, los criterios aportados en este capítulo son heterogéneos en su modo de enunciación, siendo esta variedad reflejo de los distintos modos de trabajo usados por el espectro multidisciplinar de las diferentes sociedades enunciantoras (oncólogos, genetistas clínicos, hematólogos, inmunólogos...), pero todos ellos mantienen su valor esencial como herramienta de trabajo y ayuda al diagnóstico.

En la definición de un síndrome de cáncer hereditario no hay que olvidar las nuevas perspectivas que nos brindan las últimas identificaciones de la base molecular de un buen número de neoplasias hereditarias (*TP53*, *hMLH1*, *BRCA1*...) El conocimiento del defecto genético subyacente clarifica, por un lado, los hallazgos clínicos que se asocian con las alteraciones de determinados genes. Por otro, permite demostrar el espectro de manifestaciones clínicas asociado a cada síndrome, y además, muestra la heterogeneidad genética existente en muchas de estas enfermedades. Estas aportaciones han permitido enunciar nuevos criterios diagnósticos y reevaluar los antiguos, que se citan en determinados apartados sobre patologías revisadas en este capítulo.

En algunos de estos criterios figuran referencias a la historia familiar y al tipo de herencia observado del análisis del pedigrí. Sin embargo, al contemplar estos criterios, no conviene ignorar la presencia de otros factores que modifican la herencia mendeliana como son, historia familiar parcialmente desconocida, penetrancia, expresividad variable, manifestaciones en heterocigotos de patologías recesivas, mutaciones de novo..., que pueden variar la exigencia en el cumplimiento de este tipo de criterios.

En los criterios de tipo resultado de exploraciones complementarias (analíticos radiológicos, etc) y en los que incluyen terminología referente a rasgos dismórficos, se hace imprescindible contar con rangos y definiciones de normalidad que, en ocasiones sólo pueden ser aportados por el especialista adecuado, a quien se debe consultar sobre ese determinado criterio.

De igual manera, es necesario tener en cuenta que estos criterios, como herramienta clínica, incluirán pacientes en los que, en ocasiones, no será posible encontrar la alteración genética responsable asociada con el síndrome clínico. Tampoco todos los pacientes con mutaciones en un gen específico cumplirán siempre los criterios diagnósticos para el síndrome asociado, demostrando que, salvo excepciones, la relación entre el síndrome clínico (normalmente identificado con prioridad) y la base molecular no es ni mucho menos unívoca para estas enfermedades.

Finalmente, la seguridad diagnóstica no depende sólo del cumplimiento de reglas enunciadas por grupos de expertos, sino del conocimiento extenso del síndrome cuyas descripciones pueden ser consultadas en los distintos capítulos de este texto

A continuación se enumera el orden, predominantemente alfabético, en el cual se encontrarán los criterios que hacen referencia a cada uno de los síndromes de cáncer hereditario tratados en este capítulo:

- | | |
|--|---|
| 1– Anemia de Fanconi. | 17– Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 1. |
| 2– Ataxia-Teleangiectasia. | 18– Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2A. |
| 3– Beckwith-Wiedeman, Síndrome de. | 19– Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2B. |
| 4– Birt-Hogg-Dubé, Síndrome de. | 20– Neurofibromatosis 1. |
| 5– Bloom, Síndrome de. | 21– Neurofibromatosis 2. |
| 6– Colon Hereditario no Asociado a Poliposis, Cáncer de. | 22– Nijmegen, Síndrome de. |
| 7– Cowden, Síndrome de. | 23– Páncreas Hereditario, Cáncer de. |
| 8– Esclerosis Tuberosa. | 24– Peutz-Jeghers, Síndrome de. |
| 9– Feocromocitoma / Paraganglioma Familiar. | 25– Poliposis Adenomatosa. |
| 10– Gástrico, Cáncer. | 26– Próstata Hereditario, Cáncer de. |
| 11– Gorlin, Síndrome de. | 27– Renal Papilar Hereditario, Carcinoma. |
| 12– Leiomiomatosis Hereditaria y Carcinoma Renal. | 28– Simpson-Golabi-Behmel, Síndrome de. |
| 13– Li-Fraumeni, Síndrome de. | 29– Sotos, Síndrome de. |
| 14– Mama y Ovario Hereditario, Cáncer de. | 30– Von Hippel Lindau, Enfermedad de. |
| 15– Medular de Tiroides Familiar, Carcinoma. | 31– Werner, Síndrome de. |
| 16– Melanoma Familiar. | 32– Wilms Familiar, Tumor de. |
| | 33– Wiskott-Aldrich, Síndrome de. |
| | 34– Xeroderma Pigmentoso. |

1 Anemia de Fanconi ²⁶

Criterios del National Institute of Health (NIH)

- Alteraciones presentes desde el periodo neonatal (75%):
 1. Anomalías óseas (aplasia o hipoplasia del radio, anomalías de los pulgares).
 2. Retraso de crecimiento.
 3. Alteraciones de la pigmentación cutánea (manchas café con leche, hiperpigmentación generalizada del tronco, cuello y pliegues).
 4. Microcefalia.
 5. Anomalías oculares.
 6. Defectos estructurales renales.
 7. Anomalías en las orejas e hipoacusia de conducción.
 8. Hipogenitalismo.

La presencia de alguna de estas anormalidades obliga a realizar las pruebas de laboratorio diagnósticas

- Alteraciones de aparición tardía
 1. Aplasia medular grave (>80%), diagnosticada en la infancia o juventud.
 2. Leucemia (10%) y síndromes mielodisplásicos (6%) en la infancia o adolescencia.
 3. Tumores sólidos (30%): adenoma hepático, carcinoma hepatocelular, carcinoma de esófago, carcinoma de vulva, carcinoma oral.

Los tumores secundarios son un problema creciente al aumentar la supervivencia tras el diagnóstico de anemia aplásica.

- Diagnóstico de laboratorio
 1. Sospecha: Volumen corpuscular medio eritrocitario aumentado.
 2. Confirmación:
 - Tasa de roturas cromosómicas aumentada en células del paciente cultivadas en presencia de diepoxibutano o mitomicina C.
 - Parada del ciclo celular en fase G2/M en células cultivadas en presencia de bajas concentraciones de clastógenos.

2 Ataxia-Teleangiectasia ²⁷

Criterios NIH

A- Criterios clínicos:

1. Ataxia cerebelosa progresiva de aparición precoz.
2. Teleangiectasias oculocutáneas.
3. Inmunodeficiencia con niveles bajos de IgA, IgG e IgE, con graves infecciones respiratorias recurrentes.
4. Aumento de la incidencia de neoplasias, predominantemente linfomas, y en menor grado tumores sólidos p.e. cáncer de mama.

Existen tres formas de ataxia-teleangiectasia (en las que la inestabilidad cromosómica e hipersensibilidad a las radiaciones ionizantes son constantes):

- a. *Ataxia teleangiectasia pura: pacientes con casi todos o todos los criterios.*
- b. *Ataxia teleangiectasia atenuada: presencia de alguno de los síntomas.*
- c. *Portadores heterocigotos de ataxia teleangiectasia: únicamente presentan aumento del riesgo de neoplasias.*

A- Métodos diagnósticos:

1. Inestabilidad cromosómica.
2. Hipersensibilidad a las radiaciones ionizantes.
3. Niveles séricos de alfa-fetoproteína elevados.

El diagnóstico se establece por el fenotipo clínico, características cromosómicas tras irradiación o detección de la mutación germinal

3 Síndrome de Beckwith-Wiedeman ²⁸

Criterios Mayores

1. Historia familiar positiva.
2. Macrosomía (>percentil 97).
3. Surcos lineales anteriores en el lóbulo de la oreja o fositas posteriores en el hélix.
4. Macroglosia.
5. Onfalocele/ hernia umbilical.

6. Visceromegalia de más de un órgano intraabdominal (hígado, bazo, riñones, glándula adrenal y páncreas).
7. Tumores embrionarios (Wilms, hepatoblastoma, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma) en la infancia.
8. Hemihiperplasia.
9. Citomegalia adrenocortical.
10. Anomalías renales, incluyendo anomalías estructurales, nefromegalia y nefrocalcinosis.
11. Paladar hendido.

Criterios Menores

1. Polihidramnios.
2. Prematuridad.
3. Hipoglucemia neonatal.
4. Nevus flammeus facial.
5. Hemangioma.
6. Rasgos faciales incluyendo hipoplasia mediofacial y surcos.
7. Cardiomegalia.
8. Diastasis de rectos.
9. Edad ósea avanzada.
10. Gemelaridad monocigótica.

Deben cumplirse al menos 2 criterios mayores + 1 menor

4. Síndrome de Birt-Hogg-Dubé^{29, 30}

1. Al menos 10 lesiones cutáneas (fibrofoliculomas, tricodiscomas y acrocordones) una de ellas fibrofoliculoma histológicamente confirmado.
2. Tumores renales múltiples y bilaterales, principalmente oncocitomas o carcinomas cromóforos.
3. Neumotórax espontáneo familiar.

Criterio 1 de confirmación. Criterios 2 y 3 de sospecha

5. Síndrome de Bloom ³¹

Criterios del Registro de síndrome de Bloom

A- Manifestaciones clínicas presentes en >50% de los pacientes:

1. Retraso de crecimiento pre y postnatal.
2. Predisposición a neoplasias:
 - Tumores no epiteliales (dos primeras décadas de vida) (Leucemias agudas, linfomas y con menor frecuencia meduloblastoma, tumor de Wilms, osteosarcoma)
 - Carcinomas (a partir de la segunda década)
3. Dolicocefalia con facies “de pájaro” (facies delgada, nariz prominente e hipoplasia malar y mandibular).
4. Eritema facial teleangiectásico fotosensible.
5. Áreas parcheadas de hiper e hipopigmentación cutánea (manchas café con leche).
6. Inmunodeficiencia moderada a grave manifestada por infecciones respiratorias y gastrointestinales recurrentes.

B- Manifestaciones clínicas presentes en <50% de los pacientes:

1. Voz aguda (“voz de ratón Mickey”).
2. Diabetes Mellitus tras la adolescencia.
3. Hipoplasia gonadal.
4. Estenosis de la uretra.

C- Métodos diagnósticos

1. Estudio citogenético de linfocitos del paciente con niveles de intercambio de cromátidas hermanas superiores al menos en 10 veces a los de células normales.

Es el único criterio diagnóstico objetivo

6. Cáncer de Colon Hereditario no Asociado a Poliposis

Criterios de Ámsterdam ⁴

1. Al menos tres parientes con cáncer colorrectal.

Criterios diagnósticos en los síndromes de cáncer hereditario

2. Un familiar debe ser pariente en primer grado de los otros dos.
3. Al menos dos generaciones sucesivas deberán verse afectadas.
4. Al menos uno de los parientes con cáncer debe ser diagnosticado antes de los 50 años de edad.
5. Deberá excluirse la poliposis adenomatosa familiar.

Deben cumplirse todos los criterios para el diagnóstico

Criterios de Ámsterdam II ^{6, 21}

1. Al menos tres familiares con cáncer asociado a HNPCC (cáncer colorrectal, de endometrio, de estomago, de ovario, de uréter/pelvis renal, de cerebro, del intestino delgado, del conducto hepatobiliar y cutáneo -tumores sebáceos-) confirmados mediante estudio histopatológico:
2. Un familiar debe ser pariente en primer grado de los otros dos.
3. Al menos dos generaciones sucesivas deberán verse afectadas.
4. Al menos uno de los cánceres asociados con el HNPCC debe ser diagnosticado antes de los 50 años.
5. La poliposis adenomatosa familiar deberá ser excluida.

Deben cumplirse todos los criterios para el diagnóstico

Criterios de Bethesda ²⁵

1. Cáncer colorrectal diagnosticado menor de 50 años de edad.
2. Presencia de tumores colorrectales sincrónicos, metacrónicos, u otros tumores asociados a HNPCC*, independientemente de la edad.
3. Cáncer colorrectal con una histología MSI-H# diagnosticado en pacientes < 60 años
4. Al menos un pariente de primer grado con cáncer colorrectal o un tumor asociado con HNPCC* y diagnosticados antes de los 50 años.
5. Al menos dos parientes de primer o de segundo grado con cáncer colorrectal o un tumor asociado con HNPCC* diagnosticado a cualquier edad.

Si se cumple al menos 1 debe realizarse estudio de inestabilidad o inmunohistoquímica

- * *Los tumores asociados con el cáncer colorrectal hereditario no-polipósico (CCHNP) incluyen los tumores de cáncer colorrectal, de endometrio, de estómago, de ovario, de páncreas, de uréter o pelvis renal, del conducto biliar y de cerebro (normalmente glioblastoma, tal y como se ha visto en el síndrome de Turcot), adenomas de glándula sebácea y queratoacantomas en el síndrome de Muir-Torre, y carcinoma del intestino delgado.*
- # *Presencia de infiltrado linfocitario en el tumor, reacción linfocítica como en la enfermedad de Crohn, diferenciación de células en anillo de sello/mucinoso, o patrón de crecimiento medular*

7. Síndrome de Cowden

International Cowden Consortium operational criteria ⁸

Rasgos patognomónicos:

1. Tricolemoma facial.
2. Queratosis acral.
3. Pápulas papilomatosas.
4. Lesiones mucosas.
5. Enfermedad de Lhermitte-Duclos adulta, definida por la presencia de gangliocitoma cerebelar displásico ²².

Criterios Mayores:

1. Cáncer de mama.
2. Carcinoma no medular de tiroides.
3. Macrocefalia.
4. Cáncer endometrial.

Criterios Menores:

1. Otras lesiones tiroideas (adenoma, bocio multinodular).
2. Retraso mental (CI <75).
3. Hamartomas gastrointestinales.
4. Mastopatía fibroquística.
5. Lipomas.
6. Fibromas.
7. Tumores genito-urinarios.

Deben cumplirse: lesiones cutáneas patognomónicas solas (si 6 o más pápulas faciales, al menos tres de las cuales deben ser tricolemomas, o paulas faciales y papilomatosis mucosa oral, o papilomatosis oral y queratosis acral, ó 6 ó más

queratosis palmoplantares), ó 2 ó más criterios mayores, ó 1 criterio mayor y tres menores, ó 4 criterios menores.

8. Esclerosis Tuberosa

Criterios NIH ⁷ y revisados ¹⁵

Criterios Mayores

1. Angiofibromas faciales o placas frontales.
2. Fibroma periungueal no traumático.
3. Más de 3 máculas hipomelánicas.
4. Nevus conectivos.
5. Hamartomas retinianos múltiples.
6. Tuber cortical.
7. Nódulo subependimal.
8. Astrocitoma seependimal de células gigantes.
9. Rabdomioma cardíaco único o múltiple.
10. Linfangiomatosis.
11. Angiomiolipoma renal.

Criterios Menores

1. Fosas del esmalte dental múltiples y dispersas.
2. Pólipos hamartomatosos rectales.
3. Quistes óseos.
4. Líneas de migración en la sustancia blanca cerebral.
5. Fibromas gingivales.
6. Hamartomas no renales.
7. Parchado retinal acromático.
8. Lesiones cutáneas en “confeti”.
9. Quistes renales multiples.

Diagnóstico definitivo: 2 criterios mayores ó 1 mayor + 2 menores.

Diagnóstico probable: 1 criterio mayor + 1 criterio menor.

Diagnóstico posible: 1 criterios mayor ó más de 1 criterio menor.

9. Feocromocitoma / Paraganglioma Familiar ^{32, 33}

1. Feocromocitoma bilateral.
2. Más de un caso en una familia.
3. El cáncer medular de tiroides debe estar excluido.

Deben cumplirse todos

10. Cáncer gástrico

Cáncer Gástrico difuso hereditario (IGCLC*) ¹³

1. Dos o más casos de cáncer gástrico difuso documentados en familiares de 1º o 2º grado con al menos 1 de ellos diagnosticado antes de los 50 años.
2. Tres o más casos de cáncer gástrico difuso documentado en familiares de 1º o 2º grado, independientemente de la edad.

Deben cumplirse al menos 1

Cáncer Gástrico difuso hereditario (Criterio 1A) ²⁴

1. Al menos un caso de cáncer gástrico difuso diagnosticado antes de los 50 años.

Deben cumplirse al menos 1

Cáncer Gástrico intestinal familiar (IGCLC*) ¹³

En poblaciones de alta incidencia:

1. Al menos tres familiares con cáncer gástrico intestinal, siendo uno de ellos familiar de 1º grado de los otros dos.
2. Al menos dos generaciones sucesivas afectadas.
3. Al menos uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años.

Deben cumplirse todos los criterios para el diagnóstico

En poblaciones de baja incidencia:

1. Al menos dos familiares de 1º o 2º grado con cáncer gástrico intestinal, siendo al menos 1 de ellos diagnosticado antes de los 50 años.

2. Tres o más familiares de 1º o 2º grado con cáncer gástrico intestinal, independientemente de la edad.

Deben cumplirse al menos 1

* IGCLC= International Gastric Cancer Linkage Consortium

11. Síndrome de Gorlin^{34,35} (Síndrome de Carcinoma Basocelular Nevoide, Nbcc)

Criterios Mayores

1. Más de dos carcinomas basocelulares o uno en menor de 20 años.
2. Queratoquistes de los maxilares demostrados con estudio histopatológico.
3. Tres o más fositas palmares o plantares.
4. Calcificación bilaminar de la hoz del cerebro.
5. Costillas bífidas, fusionadas o marcadamente expandidas.
6. Pariente de primer grado con Síndrome de Gorlin.

Criterios Menores

1. Macrocefalia determinada después de ajustar para la edad.
2. Malformaciones congénitas: fisura labial o palatina, prominencia frontal, facies ancha, hipertelorismo moderado a severo.
3. Otras alteraciones esqueléticas: deformación de Sprengel, marcada deformación pectoral, marcada sindactilia de los dedos.
4. Anormalidades radiográficas: puente en silla turca, anomalías vertebrales tales como hemivertebbras, fusión o elongación de los cuerpos vertebrales, defectos en manos y pies, o radiolucides de forma de llamas en las manos o pies.
5. Fibroma de ovario.
6. Meduloblastoma.

Deben cumplirse dos criterios mayores o uno mayor y dos menores

12. Leiomiomatosis Hereditaria y Carcinoma Renal ^{36, 37}

1. Más de 10 lesiones cutáneas compatibles con leiomiomas (al menos uno de ellos verificado histológicamente).
2. Leiomiomas uterinos.
3. Carcinoma papilar renal (histologicamente tipo II)

Criterio 1 de confirmación. Criterios 2 y 3 de sospecha

13. Síndrome de Li-Fraumeni

Síndrome de Li-Fraumeni clásico ⁵

1. Un probandus con un sarcoma diagnosticado antes de los 45 años.
2. Un familiar de primer grado con cualquier cáncer antes de los 45 años.
3. Un familiar de primer o segundo grado con cáncer antes de los 45 años o sarcoma a cualquier edad.

Deben cumplirse todos los criterios para el diagnóstico

Síndrome de Li-Fraumeni-Like ¹⁸

1. Un probandus con cualquier cáncer infantil o un sarcoma, tumor cerebral o tumor adrenocortical diagnosticado antes de los 45 años
2. Un familiar de primer o segundo grado con cualquier cáncer "típico de Li-Fraumeni" a cualquier edad.
3. Un familiar de primer o segundo grado con cualquier cáncer antes de los 60 años de edad.

Deben cumplirse todos los criterios para el diagnóstico

14. Cáncer de mama y ovario hereditario

Grupo de trabajo Cáncer hereditario SEOM ³

1. Un caso de cáncer de mama menor o igual a 40 años.
2. Diagnóstico de cáncer de mama y ovario mismo individuo.

3. Dos o más casos de cáncer de mama, uno de los cuales es menor de 50 años o bilateral.
4. Un caso de cáncer de mama menor o igual a 50 años o bilateral y un caso de cáncer de ovario en familiar 1º o 2º grado.
5. Tres casos de cáncer de mama y ovario (al menos un caso de ovario) en familiares de 1º o 2º grado.
6. Dos casos de cáncer de ovario en familiares de 1º y 2º grado.
7. Un caso de cáncer de mama en el varón y familiar de 1º o 2º grado con cáncer de mama u ovario.

Deben cumplirse al menos 1

“Cancer Family Study Group” de Gran Bretaña (UKCFSG) ^{16, 23}

1. Riesgo de cáncer de mama >3 veces el esperado en la población general.
2. Riesgo de presencia de mutación en BRCA1/2 > 25%, que clínicamente se corresponde con familias con 3 o más casos de cáncer de mama y/o ovario, uno diagnosticado antes de los 50, siendo uno de ellos familiar de 1º grado de los otros dos.

15. Carcinoma Medular de Tiroides Familiar³⁸

1. Más de 10 miembros afectados de cáncer medular de tiroides y que se hayan descartado otros tumores de MEN2.

16. Melanoma Familiar

Melanoma Genetics Consortium ¹⁰

1. Dos ó más familiares en 1º grado con melanoma invasivo.

17. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 1 ³⁸

Caso

1. Presencia de 2 de los 3 tumores endocrinos relacionados con MEN1 (adenomas paratiroides, tumores endocrinos enteropancreáticos y tumores pituitarios).

Familia

1. Al menos un caso MEN1 más 1 familiar de 1º grado con uno de esos 3 tumores.

18. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2A ³⁸

1. Carcinoma medular de tiroides.
- 2.- Feocromocitoma uni o bilateral.
- 3.- Tumores paratiroides.

Deben cumplirse todos

19. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2B ³⁸

1. Carcinoma medular de tiroides.
2. Feocromocitoma.
3. Hábito marfanoide.
4. Ganglioneuromatosis mucosa e intestinal.

20. Neurofibromatosis 1

Criterios NIH ⁽⁹⁾

1. Seis o más manchas café con leche mayores de 5 mm en su diámetro máximo en niños prepúberes y mayores de 15 mm en postpúberes.
2. Dos o más neurofibromas de cualquier tipo o un neurofibroma plexiforme.
3. Presencia de pecas axilares o inguinales.

4. Glioma óptico.
5. Dos o más hamartomas del iris (nódulos de Lisch).
6. Una lesión ósea distintiva (displasia del esfenoides o adelgazamiento de la cortical de huesos largos con o sin pseudoartrosis).
7. Un familiar de 1º grado con neurofibromatosis diagnosticada

Deben cumplirse al menos 2

21. Neurofibromatosis 2

Criterios NIH modificados ^{6,16}

1. Schwannomas vestibulares bilaterales.
2. Un familiar de 1º grado con NF2 y: o un schwannoma vestibular unilateral, o dos de los siguientes tumores: meningioma, schwannoma, glioma, neurofibroma, cataratas.
- 3.- Un Schwannoma vestibular unilateral y: dos de los siguientes tumores: meningioma, schwannoma, glioma, neurofibroma, cataratas.
4. Meningiomas múltiples y: o un schwannoma vestibular unilateral, o dos de los siguientes tumores: meningioma, schwannoma, glioma, neurofibroma, cataratas.

Deben cumplirse al menos uno

22. Síndrome de Nijmegen ³⁹

A- Manifestaciones clínicas presentes en >50% de los pacientes:

1. Microcefalia (perímetro cefálico por debajo del tercer percentil) presente desde el nacimiento con inteligencia normal.
2. Facies característica (macizo facial prominente con nariz larga y orejas grandes).
3. Retraso del crecimiento.
4. Defectos de la maduración sexual en niñas (hipogonadismo hipergonadotrópico).
5. Inmunodeficiencia celular y humoral con infecciones sinopulmonares recurrentes y bronquiectasias. Son frecuentes también las infecciones urinarias, gastrointestinales y la otitis media.

6. Intensa predisposición a neoplasias, particularmente leucemias linfoblásticas y linfomas. Son frecuentes también el meduloblastoma y el rabdomiosarcoma perianal.

B- Manifestaciones clínicas presentes en <50% de los pacientes:

1. Defectos en la pigmentación cutánea (manchas café con leche y áreas de vitíligo).
2. Pelo de la cabeza fino en la primera infancia. Encanecimiento en la adolescencia.
3. Anormalidades leves en las extremidades (p.e. clinodactilia del 5º dedo).
4. Malformaciones del sistema nervioso central (lóbulos frontales pequeños y cuernos frontales de los ventrículos laterales estrechos).
5. Defectos urogenitales: agenesia o hipoplasia renal, hipospadias, criptorquidia, atresia/estenosis anal.
6. Polisplenia.
7. Malformaciones respiratorias: hipoplasia traqueal, paladar hendido, labio leporino, atresia de coanas.
8. Malformaciones cardiovasculares: conducto arterioso persistente, comunicación interventricular.

C- Métodos diagnósticos

1. Estudio citogenético de células del paciente con anomalías similares a la ataxia-teleangiectasia:
 - Inestabilidad cromosómica espontánea.
 - Hipersensibilidad a las radiaciones ionizantes.
 - Síntesis de ADN radiorresistente.

Es el único criterio diagnóstico objetivo -

23. Cáncer de Páncreas Hereditario ⁴⁰

1. Dos ó más familiares en 1º grado con cáncer de páncreas sin que cumplan criterios de otro síndrome de predisposición hereditaria a cáncer.

24. Síndrome de Peutz-Jeghers

Síndrome de Peutz-Jeghers confirmado

1. Presencia de al menos un pólipo hamartomatoso gastrointestinal histológicamente verificado más historia familia positiva o presencia de máculas hiperpigmentadas mucosas perianales o periorales ¹².
2. Presencia de al menos dos pólipos hamartomatosos gastrointestinales histológicamente verificados ¹⁷.

Deben cumplirse al menos 1

25. Poliposis Adenomatosa

Poliposis Adenomatosa Familiar ²

1. Más de 100 pólipos adenomatosos colorrectales.
2. En menores de 20 años, más de 20 pólipos adenomatosos y un progenitor afecto.

Deben cumplirse al menos 1

Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada ^{6, 20}

1. Más de 15 pólipos adenomatosos colorrectales.
2. Más de 5 pólipos adenomatosos colónicos con edad menor de 60 años e historia familiar de cáncer de colon.

Deben cumplirse al menos 1

26. Cáncer de Próstata Hereditario ⁴¹

1. Tres ó más familiares de 1º grado con cáncer de próstata.

27. Carcinoma Renal Papilar Hereditario ^{42, 43}

1. Múltiples tumores renales papilares (histología tipo 1), bilaterales.
2. Historia familiar de cáncer renal.

Deben cumplirse todos

28. Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel ^{30, 44}

Características

1. Gigantismo neonatal, crecimiento acelerado con macrocefalia, cara tosca y característica, que recuerda a la cara de un bulldog, nariz y boca anchas.
2. Retraso mental en cerca de la mitad de los casos de grado de severidad variable, hipotonía, pectus excavatum, estrabismo, nistagmus, hipertelorismo, suturas craneales prominentes, macroglosia, maloclusión dental, paladar ojival, orificios nasales antevertidos.
3. Anomalías de las extremidades: manos grandes y cuadradas, pulgares anchos, hexadactilia, sindactilia, uñas hipoplásicas, sobre todo la del quinto dedo de la mano, pliegue simiesco y deformidades de los pies.
4. Anomalías esqueléticas: fusión de vértebras cervicales, costillas cervicales, presencia de una sexta vértebra lumbar, foseta sacra, edad ósea avanzada y escoliosis.
5. Anomalías viscerales: comunicación interventricular, ductus arterioso persistente y arritmia cardíaca; riñones hipertróficos, lobulados o quísticos, duplicación de la pelvis renal e hidronefrosis leve; criptorquidia; malrotación intestinal, anillo pilórico y divertículo de Meckel. Mamilas supernumerarias; piel gruesa y marronácea, manchas pigmentadas en la zona perioral y palatina y policitemia.
6. Riesgo de padecer tumores embrionarios: sobre todo tumor de Wilms y neuroblastoma.

Deben cumplirse 3 criterios mayores + 1 menor

29. Síndrome de Sotos

Criterios iniciales ¹¹ y modificados ¹⁹

Criterios Mayores

- 1.- Facies característica: Eritema malar, alopecia frontotemporal, frente alta y abombada, inclinación antimongoloide de hendiduras palpebrales, cara larga y estrecha, mandíbula prominente, contorno cefálico en pera invertida.
- 2.- Macrosomía con macrocefalia.
- 3.- Retraso psicomotor.

Criterios Menores

- 1.- Ictericia neonatal, hipotonía.
- 2.- Escoliosis.
- 3.- Convulsiones.
- 4.- Anomalías cardíacas.
- 5.- Anomalías urogenitales.
- 6.- Hipoacusia de conducción.
- 7.- Estrabismo.
- 8.- Trastorno del comportamiento.
- 9.- Tumores. Teratoma sacrocoxígeo, neuroblastoma, ganglioma presacral y leucemia linfocítica aguda.

Deben cumplirse 3 criterios mayores + 1 menor

30. Enfermedad de Von Hippel Lindau ^{45, 46}

En presencia de historia familiar de Von-Hippel-Lindau (VHL)

1. Hemangioblastoma único de retina.
2. Hemangioblastoma único de cerebelo.
3. Carcinomas renal de células claras.
4. Feocromocitoma.
5. Cistoadenoma seroso microquístico en el páncreas.

Debe cumplirse al menos 1

En ausencia de historia familiar de VHL

1. Dos o más hemangioblastomas retinianos o cerebelares.
2. Hemangioblastoma retiniano o cerebelar único en presencia de otro tumor visceral asociado.

Debe cumplirse al menos 1

Clasificación

Tipo 1: Aquellos que no presentan feocromocitomas.

Tipo 2: Presencia de feocromocitomas.

- Tipo 2A: Ausencia de carcinomas de células renales y quistes pancreáticos.
- Tipo 2B: Presencia de carcinomas de células renales y quistes pancreáticos.

31. Síndrome de Werner

Registro Internacional de síndrome de Werner ¹

Signos y síntomas cardinales (aparición después de los 10 años de edad)

2. Hemangioblastoma único de cerebelo.
1. Cataratas (bilaterales).
2. Patología dermatológica característica (piel tensa, atrófica, alteraciones pigmentarias, ulceración, hiperqueratosis, atrofia subcutánea regional) y facies característica “de pájaro”.
3. Estatura corta.
4. Consanguinidad de los padres (tercer grado o más cercana) o afectación de un hermano/a.
5. Encanecimiento y/o adelgazamiento prematuro del pelo de la cabeza.
6. Test de ácido hialurónico en orina de 24 horas positivo.

Otros signos y síntomas

1. Diabetes mellitus.
2. Hipogonadismo (poco desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, disminución de la fertilidad, atrofia testicular u ovárica).

3. Osteoporosis.
4. Osteoesclerosis de las falanges distales de los dedos.
5. Calcificación de tejidos blandos.
6. Aterosclerosis prematura (p.e. infarto de miocardio).
7. Neoplasias mesenquimales, raras o múltiples.
8. Cambios en la voz (aguda, chillona o ronca).

Diagnóstico definitivo: todos los criterios cardinales y dos más.

Probable: los tres primeros criterios cardinales y dos más no cardinales.

Posible: Cataratas o bien alteraciones dermatológicas y cuatro criterios no cardinales.

Es incompatible con síndrome de Werner la aparición de los signos y síntomas (salvo el retraso de crecimiento) antes de la adolescencia.

32. Tumor De Wilms Familiar ⁴⁷

1. Patrón Herencia autosómico dominante.
2. Inicio precoz del tumor de Wilms.
3. Afectación bilateral.
4. Ausencia de alteraciones congénitas.
5. Los síndromes WAGR (asociación de tumor de Wilms, Aniridia, gonadoblastoma y retraso mental) ó el síndrome de Denys-Drash, deben estar descartados.

Deben cumplirse todos

33. Síndrome de Wiskott-Aldrich ⁴⁸

European Society of Immunodeficiencies

Criterio Mayor

1. Trombocitopenia severa ($<70,000/\text{mm}^2$) con signos hemorrágicos y plaquetas pequeñas.

Criterios Menores

1. Inmunodeficiencia con infecciones bacterianas o virales recurrentes u oportunistas en la infancia.
2. Historia familiar en la rama materna.
3. Aumento de la incidencia de neoplasias, especialmente linfomas.
4. Eczema.
5. En ocasiones, signos de autoinmunidad.
6. Ausencia o disminución de la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) determinada por citometría de flujo o western blot

Debe cumplirse el criterio mayor y dos menores

34. Xeroderma Pigmentoso ⁴⁹

Manifestaciones clínicas:

1. Cutáneas: Extremada fotosensibilidad, con aparición de ampollas y pecas a la mínima exposición solar. Envejecimiento prematuro de la piel expuesta al sol, labios, ojos, boca y lengua, con altísima incidencia de cánceres de piel en esas áreas.
2. Oftalmológicas: Lesiones por exposición UV en párpados, conjuntiva y córnea.
3. Complicaciones neurológicas progresivas:
 - Retraso psicomotor con microcefalia.
 - Neuropatía axonal o mixta.
 - Sordera progresiva.

Deben identificarse lesiones compatibles en los 3 sistemas

Bibliografía

- 1 Carol C. Diagnostic criteria of Werner syndrome: <http://www.wernersyndrome.org/registry/diagnostic.html>, 2005.
- 2 Bussey H. Familial Polyposis Coli. Family studies, histopathology, differential diagnosis and results of treatment. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1975.
- 3 Hoya MDI. Documento de consenso sobre cáncer de mama hereditario. Documentos de Consenso en Cáncer Hereditario. Madrid: Dispublic, 2004:13-15.
- 4 Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). Dis Colon Rectum 1991; 34:424-5.

- 5 Li FP, Fraumeni JF, Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969; 71:747-52.
- 6 Evans DG, Huson SM, Donnai D, et al. A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med* 1992; 84:603-18.
- 7 Hyman MH, Whittemore VH. National Institutes of Health consensus conference: tuberous sclerosis complex. *Arch Neurol* 2000; 57:662-5.
- 8 Eng C. Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *J Med Genet* 2000; 37:828-30.
- 9 Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, et al. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *Jama* 1997; 278:51-7.
- 10 Kefford RF, Newton Bishop JA, Bergman W, Tucker MA. Counseling and DNA testing for individuals perceived to be genetically predisposed to melanoma: A consensus statement of the Melanoma Genetics Consortium. *J Clin Oncol* 1999; 17:3245-51.
- 11 Cole TR, Hughes HE. Sotos syndrome: a study of the diagnostic criteria and natural history. *J Med Genet* 1994; 31:20-32.
- 12 Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, et al. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med* 1987; 316:1511-4.
- 13 Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet* 1999; 36:873-80.
- 14 Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66:1191-308.
- 15 Roach ES, Sparagana SP. Diagnosis of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004; 19:643-9.
- 16 Baser ME, Friedman JM, Aeschliman D, et al. Predictors of the risk of mortality in neurofibromatosis 2. *Am J Hum Genet* 2002; 71:715-23.
- 17 Tomlinson IP, Houlston RS. Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 1997; 34:1007-11.
- 18 Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 1994; 54:1298-304.
- 19 Tatton-Brown K, Rahman N. Clinical features of NSD1-positive Sotos syndrome. *Clin Dysmorphol* 2004; 13:199-204.
- 20 Knudsen AL, Bisgaard ML, Bulow S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* 2003; 2:43-55.
- 21 Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116:1453-6.
- 22 Zhou XP, Marsh DJ, Morrison CD, et al. Germline inactivation of PTEN and dysregulation of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway cause human Lhermitte-Duclos disease in adults. *Am J Hum Genet* 2003; 73:1191-8.
- 23 Eccles DM, Evans DG, Mackay J. Guidelines for a genetic risk based approach to advising women with a family history of breast cancer. UK Cancer Family Study Group (UKCFSG). *J Med Genet* 2000; 37:203-9.
- 24 Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet* 2004; 41:508-17.
- 25 Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:261-8.
- 26 Alter BP LJ. Fanconi Anemia. Vol. 2006, 2005.
- 27 Perlman S, Becker-Catania S, Gatti RA. Ataxia-telangiectasia: diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Neurol* 2003; 10:173-82.

- 28 Weksberg R, Shuman C, Smith AC. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005; 137:12-23.
- 29 Zbar B, Alvord WG, Glenn G, et al. Risk of renal and colonic neoplasms and spontaneous pneumothorax in the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:393-400.
- 30 Rodriguez-Criado G, Magano L, Segovia M, et al. Clinical and molecular studies on two further families with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet A* 2005; 138:272-7.
- 31 Amor-Guélet M. Bloom's syndrome: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Bloomsyndrome.pdf>, 2004.
- 32 Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med* 2002; 346:1459-66.
- 33 Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 2000; 287:848-51.
- 34 Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, et al. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet* 1997; 69:299-308.
- 35 Gorlin RJ. Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome. *Genet Med* 2004; 6:530-9.
- 36 Kiuru M, Launonen V. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC). *Curr Mol Med* 2004; 4:869-75.
- 37 Chuang GS, Martinez-Mir A, Engler DE, Gmyrek RF, Zlotogorski A, Christiano AM. Multiple cutaneous and uterine leiomyomata resulting from missense mutations in the fumarate hydratase gene. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31:118-21.
- 38 Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5658-71.
- 39 Chrzanowska KH JC. Nijmegen breakage syndrome: <http://www.emedicine.com/DERM/topic725.htm>, 2006.
- 40 Hruban RH, Petersen GM, Goggins M, et al. Familial pancreatic cancer. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 4:69-73.
- 41 Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 2002; 168:906-13.
- 42 Dharmawardana PG, Giubellino A, Bottaro DP. Hereditary papillary renal carcinoma type I. *Curr Mol Med* 2004; 4:855-68.
- 43 Schmidt L, Lubensky I, Linehan WM, Zbar B. Hereditary papillary renal carcinoma: pathology and pathogenesis. *Contrib Nephrol* 1999; 128:11-27.
- 44 DeBaun MR, Ess J, Saunders S. Simpson Golabi Behmel syndrome: progress toward understanding the molecular basis for overgrowth, malformation, and cancer predisposition. *Mol Genet Metab* 2001; 72:279-86.
- 45 Maher ER, Kaelin WG, Jr. von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76:381-91.
- 46 Lonser RR, Glenn GM, Walther M, et al. von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003; 361:2059-67.
- 47 Dome JS, Coppes MJ. Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr* 2002; 14:5-11.
- 48 Immunodeficiencies Esf. Diagnostic Criteria for Primary Immunodeficiencies: www.esid.org, 2005.
- 49 Kraemer KH, Lee MM, Scotto J. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* 1987; 123:241-50.

Oncogenes y genes supresores

Raquel Salazar Sáez

Eva María Sánchez Tapia

Rogelio González Sarmiento

Servicio de Oncología Médica
Hospital San Pedro. Logroño
Unidad de Medicina Molecular.
Centro del Investigación del Cáncer.
Universidad de Salamanca. CSIC.
Salamanca

Estudios epidemiológicos muestran que, salvo excepciones, antes de que una célula normal se transforme en célula cancerosa son necesarios al menos cuatro o cinco mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en el control de la proliferación y diferenciación celular, y que estas alteraciones aparecen de manera secuencial a lo largo del tiempo. Dado que se ha estimado que la posibilidad de que una célula somática sufra tres mutaciones a lo largo de su vida es de una por cada 100 individuos vivos y que la posibilidad de que se acumulen cuatro mutaciones en una misma célula es mucho menor que la incidencia de cánceres detectada, todo parece indicar que las alteraciones genéticas iniciales que transforman una célula normal hacen que estas sufran una selección positiva. De acuerdo con este modelo, las primeras mutaciones hacen que las células crezcan más rápidamente que sus vecinas o que vivan durante un periodo más prolongado, como resultado de lo cual aparece una población de células portadoras de las mismas alteraciones genéticas que denominamos clona tumoral. La sucesiva acumulación de mutaciones hace que vayan apareciendo nuevos clones tumorales, con nuevas alteraciones genéticas, que tienen ventajas proliferativas sobre los que tienen menos alteraciones genéticas que son sustituidos de manera paulatina. De esta manera, la clona tumoral va acumulando mutaciones somáticas que le confieren, no sólo la capacidad de proliferar indiscriminadamente, sino también de metastatizar y adquirir resistencia a las drogas empleadas para tratar la enfermedad.

La acumulación de nuevas mutaciones en las células tumorales puede ser consecuencia de que el tejido esté expuesto de manera continuada a agentes mutágenos, a que haya un defecto en los mecanismos reparadores del DNA secundarios a

alteraciones en los genes encargados de controlar este proceso o a que haya un defecto en la capacidad de reconocer y responder al daño genético ¹.

La mayoría de las mutaciones responsables de la aparición de células cancerosas tienen lugar en células somáticas; no obstante, la existencia de cánceres en los que se demuestra una predisposición hereditaria a padecerlos, pone de manifiesto que mutaciones en las células germinales también están implicadas en el desarrollo del cáncer, pudiendo contribuir bien directamente, a través de mutaciones que se transmiten de padres a hijos y que son compensadas por la existencia de un alelo normal, como ocurre en el caso del retinoblastoma, o bien porque las mutaciones heredadas se producen en genes que intervienen en la corrección de errores de replicación del DNA y se favorece la acumulación de mutaciones, como es el caso del Síndrome de Lynch.

Oncogenes

Los primeros genes implicados en el desarrollo de los tumores que se describieron fueron denominados oncogenes, y su descubrimiento se produjo al estudiar los virus que producían tumores en animales. La mayoría de los virus DNA producen tumores tras un período largo de latencia, mientras que los virus RNA lo hacen tras un período corto. El primer virus capaz de producir tumores fue descrito por Peyton Rous en 1911 y producía sarcomas en pollos. En los años siguientes, se han descrito hasta una cincuentena de nuevos virus que producen diferentes tipos de tumores en distintas especies animales. Aunque los virus RNA pueden inducir cáncer en primates, no se ha encontrado ninguna conexión entre estos virus y la aparición de cáncer en humanos, con la excepción de los virus HTLV-1 y VIH. El estudio de los retrovirus oncogénicos permitió descubrir que su genoma incluía secuencias que no existían en los virus normales. A estos genes víricos capaces de inducir tumores se les denominó oncogenes retrovirales.

Ahora bien, estudios de hibridación mostraron que las secuencias oncogénicas de los retrovirus se encontraban también en las células somáticas normales, de dónde eran secuestradas por los retrovirus en el curso del proceso de replicación de virus no tumorigénicos, concluyéndose que los oncogenes retrovíricos eran genes mutados procedentes de células somáticas. A los oncogenes de los retrovirus se les denominó con un nombre precedido por la letra v- (por ejemplo, v-sis), mientras

que a los genes no transformantes presentes en las células somáticas, también denominados protooncogenes, se les denominó precedidos por la letra c- (por ejemplo, c-sis); la mayoría de estos genes están implicados en la regulación de la proliferación y diferenciación celular.

Aunque los primeros protooncogenes se descubrieron por homología con oncogenes retrovíricos, posteriormente se han descrito nuevos protooncogenes que no forman parte del genoma de retrovirus oncogénicos.

Los protooncogenes están presentes en todas las células del organismo y son imprescindibles para el crecimiento, proliferación y supervivencia de las células no tumorales. Cuando uno de los alelos de estos genes se altera como consecuencia de una mutación puntual, delección, inserción, amplificación, translocación cromosómica, etc., se produce bien un incremento de la función de la proteína mutada o la generación de proteínas mutadas con funciones diferentes y, como consecuencia, se altera la vía metabólica en la que están implicadas, produciéndose una desregulación de los mecanismos normales de proliferación, diferenciación y supervivencia celular que favorece la aparición de tumores. El hecho de que sea suficiente la alteración de uno de los dos alelos de los protooncogenes hace que las alteraciones de estos genes sean consideradas dominantes ².

Estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado que algunos virus DNA también están asociados con el desarrollo del cáncer, como en el caso del papilomavirus y el cáncer de cuello uterino, el virus de Epstein Barr y el linfoma de Burkitt, etc. Experimentos realizados en cultivos celulares con estos virus han puesto de manifiesto que, tras la infección, los virus DNA estimulan la síntesis del DNA de la célula hospedadora con el fin de activarla y favorecer su propia replicación. Para ello, los virus DNA codifican genes cuyas proteínas activan otros genes que son claves para el desarrollo de la transformación tumoral al interactuar con proteínas codificadas por otros genes de las células infectadas. Así, se demostró que uno de los genes del virus SV40 interactuaba con una proteína presente en el núcleo de las células denominada p53 y que esta interacción era responsable de la aparición del fenotipo tumoral.

La secuencia de acontecimientos característicos de la proliferación de las células normales se da en los siguientes pasos:

1. El crecimiento celular comienza por la unión de un factor de crecimiento a su receptor específico en la membrana celular.

2. La unión del ligando al receptor supone la activación transitoria y limitada del receptor, que activa a varias proteínas transductoras de señales existente en la capa interna de la membrana plasmática.
3. La transmisión por el citosol, a través de segundos mensajeros, de la señal traducida hace que llegue al núcleo.
4. La llegada de la señal al núcleo induce y activa a factores reguladores de la transcripción génica cuyo papel es esencial para controlar el crecimiento celular ¹.

Los oncogenes y las oncoproteínas pueden agruparse así, según el papel que desempeñen en la cascada de transducción de señales y en la regulación del ciclo celular. Según esto, dentro de sus principales productos podemos encontrar:

- *Oncogenes relacionados con factores de crecimiento*: los factores de crecimiento actúan uniéndose a receptores de membrana celular que a su vez interaccionan con proteínas que traducen y amplifican un estímulo en el interior de la célula. El primer oncogén de este tipo conocido fue v-sis que corresponde al factor de crecimiento de plaquetas tipo B (PDGF-B). Constituye uno de los factores de crecimiento mayoritario de la sangre en humanos y es un potente mitógeno de células del tejido conectivo y células gliales en cultivo ³.
- *Receptores de los factores de crecimiento*: son proteínas transmembrana, con un ligando de unión situado fuera de la célula y un dominio intracitoplasmático que tiene actividad tirosina quinasa. La actividad quinasa sufre una activación transitoria cuando el receptor capta su factor de crecimiento específico, a lo que sigue rápido la dimerización del receptor y la fosforilación de la tirosina de diferentes sustratos que forman parte de la cascada de señalización. Las versiones oncogénicas de estos receptores pueden dimerizar y activarse sin necesidad de unirse al factor de crecimiento correspondiente; de esta forma, el receptor mutado libera hacia la célula continuas señales que estimulan la mitosis. Dentro de este grupo se encuentran los receptores erbB y ret, de los que comentaremos brevemente su características dada su importancia en Oncología ⁴.

Oncogen *ErbB2 (HER2/neu)*

El gen neu se localiza en el cromosoma 17 y codifica una glicoproteína transmembrana de 185 KDa que se denomina p185neu, HER2, HER2/neu o erbB2. Este oncogén pertenece al grupo de receptores del factor de crecimiento epidérmico con actividad quinasa de tirosinas. Posee tres dominios estructurales: externo, transmembrana y citoplasmático. Hay dos regiones ricas en cisteína en el dominio extracelular

y la función de fosforilación de tirosinas reside en el dominio citoplasmático. Con la llegada del ligando (factor de crecimiento epidérmico), se produce un cambio conformacional y su fosforilación, así como la liberación de los factores reguladores que podrían representar substratos y que se encuentran unidos a la forma inactiva del dominio catalítico, citoplasmático ^{5, 6}.

Aproximadamente entre el 20-30% de los cánceres de mama tienen amplificado o sobreexpresado el oncogén erbB2. La determinación de la sobreexpresión de erbB2 se realiza mediante múltiples procedimientos entre los que se encuentran la inmunohistoquímica, la hibridación *in situ* con fluorescencia, la hibridación genómica comparada, etc. Como en otros receptores de superficie celular, la forma soluble del dominio extracelular de p185^{HER2/neu}, se puede desprender de la superficie de las células tumorales y detectarse en el suero mediante pruebas basadas en la técnica de ELISA.

Parece que la amplificación del gen *y*, en consecuencia, la sobreexpresión de su proteína, puede contribuir a la transformación celular y a la carcinogénesis, así como a la progresión tumoral. También parece jugar un papel importante en las metástasis dado que existe una incidencia aumentada de metástasis viscerales y de micrometástasis en médula ósea en pacientes que lo sobreexpresan. Muchos estudios han mostrado asociación entre la sobreexpresión de erbB2 y otros factores pronósticos adversos como aneuploidía, incremento de la fase S, proliferación celular rápida, bajo contenido de receptores de estrógenos y progesterona, estadios avanzados, número de ganglios metastásicos afectados y alto grado histológico. La recaída temprana del cáncer de mama, así como la muerte ocasionada por la enfermedad, están relacionadas con su sobreexpresión en tumores de mama sin afectación ganglionar. En los tumores con afectación ganglionar, también parece que la sobreexpresión de erbB2 predice una supervivencia libre de enfermedad y una supervivencia global más corta ⁷.

La sobreexpresión o amplificación del gen erbB2, no sólo tiene utilidad clínica como marcador pronóstico, sino también tiene utilidad clínica en la selección de pacientes para tratamiento sistémico con quimioterapia, tratamiento hormonal o terapias biológicas. Actualmente tiene un gran interés pronóstico la detección de casos de cáncer de mama que presenten ausencia combinada de expresión de la proteína HER2/neu y receptores hormonales, los denominados casos triples negativos, que constituyen un subgrupo definido de tumores que requieren una aproximación terapéutica específica ^{8, 9}.

Oncogen *RET*

El oncogén *RET* pertenece al subgrupo de receptores transmembrana con actividad tirosin kinasa. Está implicado en el desarrollo de múltiples enfermedades neuroendocrinas humanas. Se considera el único oncogén que se puede heredar con una alteración en una de sus copias, produciendo el síndrome MEN de tipo 2A y 2B (neoplasia endocrina múltiple) y el carcinoma medular de tiroides familiar, que pueden predisponer a desarrollar distintos tipos de tumores endocrinos. La alteración del gen *RET* en la línea germinal mediante mutaciones de tipo *missense* o *non-sense* también producen la enfermedad de Hirschsprung. La activación del gen *RET* mediante reordenamientos somáticos con otros genes producen cáncer papilar de tiroides en población general.

El gen *RET* ocupa 80 kilobases de ADN y posee 21 exones. La proteína normal posee un dominio extracelular y de unión al ligando en cuyo interior hay una región rica en cisteína y con afinidad por el calcio; la región transmembrana conecta la región externa con el dominio intracelular, donde se encuentran dos regiones con actividad quinasa sobre tirosinas. La proteína *RET* es uno de los componentes del receptor para el factor neurotrófico derivado de la glía o GDNF (*Glial-cell-line-Derived Neurotrophic Factor*). Éste es un factor esencial para el desarrollo del riñón y el sistema nervioso entérico, siendo además capaz de mantener la supervivencia de neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central y de alguna neuronas motoras del periférico ^{10,11}.

Las mutaciones activantes del gen *RET* se han asociado con el desarrollo tumoral, mientras que las mutaciones que se asocian con pérdida de función son las responsables del megacolon congénito. No obstante, algunas mutaciones pueden tener un efecto dual ¹².

Proteínas citoplasmáticas trasmisoras de señales

Se han encontrado varios ejemplos de oncoproteínas con funciones similares a las de las proteínas citoplasmáticas normales que intervienen en la transducción de señales, una de ellas es la oncoproteína Ras. La mayoría de estas proteínas se encuentran estratégicamente situadas en la parte interna de la membrana plasmática, donde reciben las señales procedentes del exterior de la célula (ej. mediante la activación de los receptores de factores de crecimiento) y la transmiten al núcleo celular. Una mutación puntual del gen *RAS* es la anomalía más frecuente de los oncogenes dominantes identificados en los tumores humanos. La frecuencia de estas

mutaciones varía de unos tumores a otros, pero en algunos tipos es muy alta, por ejemplo en el 90% de los adenocarcinomas pancreáticos y de los colangiocarcinomas; en un 50% de los carcinomas de colon, endometrio y tiroides, y en el 30% de los adenocarcinomas de pulmón y de las leucemias mieloides ¹³.

La proteína codificada por el gen RAS juega un importante papel en la mitogénesis inducida por los factores de crecimiento. Las proteínas ras normales oscilan entre una forma activada de transmisión de señales y un estado inactivo, en este último estado las proteínas captan difosfato de guanosina (GDP). Cuando la célula es estimulada por los factores de crecimiento, ras se activa intercambiando GDP por GTP; esta activación provoca a su vez una excitación de la vía MAP cinasa. Las MAP cinasas activadas tienen como dianas a factores nucleares de transcripción, por lo que estimulan mitogénesis. En las células normales, el estado de activación de la proteína ras es transitorio porque su actividad intrínseca GTPasa hidroliza GTP, convirtiéndose en GDP, lo que determina que ras recupere su estado inactivo. Gran importancia tienen en este proceso las proteínas activadoras de la GTPasa (llamadas GAP o PAG) que determinan una espectacular aceleración de la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas ras normales. Las proteínas ras mutantes se unen a la GAP, pero esta unión no estimula la actividad de la GTPasa, por tanto, las proteínas mutantes están siempre activadas debido a una incapacidad para hidrolizar el GTP, lo que induce una estimulación continua de las células mediante la transmisión de las señales promotoras del crecimiento al núcleo.

La activación por mutaciones de Ras promueve la oncogénesis por múltiples procesos celulares, como la expresión de genes, la progresión en el ciclo celular, la proliferación celular, supervivencia de la célula, y migración celular. Las rutas de señalización de Ras son bien conocidas en la iniciación tumoral, pero se conoce en menor medida su contribución a la invasión y metástasis ^{13, 14}.

Oncoproteínas de unión al ADN

La replicación del ADN está regulada por genes cuyos productos se encuentran en el núcleo, donde controlan la transcripción de los genes relacionados con el crecimiento. Los factores de transcripción contienen secuencias específicas de aminoácidos que les permiten unirse al ADN o dimerizar sus enlaces.

En el núcleo celular se han localizado oncoproteínas, productos de los protooncogenes myc, myb, jun y fos, etc., los cuales son genes de respuesta temprana a la

estimulación por factores de transcripción. De ellos el gen *myc* es el que con mayor frecuencia está implicado en tumores humanos ¹⁵.

El protooncogen *c-myc* se expresa prácticamente en casi todas las células eucarióticas y pertenece a los genes de respuesta de crecimiento precoz, genes que se activan rápidamente cuando las células en reposo reciben la señal que promueve su división. En contraste con la expresión regulada de *c-myc* durante la proliferación celular normal, las versiones oncogénicas se expresan de forma persistente, o incluso, en algunos casos, con expresión excesiva de la proteína *myc*; esto puede conducir a una transcripción continua de genes diana críticos y, posiblemente, a la transformación neoplásica.

Apoptosis

La apoptosis es otro de los mecanismos celulares implicados en el desarrollo tumoral. Se conoce que *myc* no sólo controla el crecimiento celular, también puede dirigir la muerte celular mediante la apoptosis. Por tanto, cuando la activación del gen se produce en ausencia de señales de supervivencia (factores de crecimiento) las células sufren apoptosis. Existen dos vías principales de apoptosis, una desencadenada por proteínas que contienen un dominio homólogo al dominio 3 de BCL2, con capacidad para inhibir BCL2 y BCL-XL, que normalmente inhiben la apoptosis, una segunda vía se activa por la unión del ligando de Fas, TRAIL o TNF alfa a sus receptores, lo que activa la vía de las caspasas y favorece la muerte celular. Algunos de los genes implicados en estas vías, como BCL2, están sobre expresado en ciertos tumores favoreciendo la supervivencia de las células tumorales ¹⁶.

Aunque durante muchos años se consideró que, con la excepción del gen RET, los oncogenes no podían transmitirse mutados en línea germinal, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que esto no es así y que, al igual que con RET, otros oncogenes, entre los que se encuentra RAS, pueden heredarse con mutaciones asociadas a trastornos del desarrollo ¹⁷.

El progreso llevado a cabo en los últimos 20 años en materia biológica, genética y biotecnológica ha llevado al desarrollo de nuevos diseños en fármacos contra el cáncer. Se ha producido un cambio entre agentes citotóxicos no específicos a fármacos basados en nuevas dianas moleculares. El mecanismo se diseña para actuar en dianas moleculares y celulares que están implicadas en la formación, crecimiento y progresión de los tumores humanos. Estos agentes serán más selectivos con células

tumorales que con células normales por lo que tendrán mayor actividad antitumoral y menor toxicidad. Dentro de estas terapias moleculares basadas en los oncogenes, se encuentran el trastuzumab, (Herceptin®), imatinib (Gleevec®) y gefinitib (Iressa®). La última década ha sido muy importante en el descubrimiento de nuevos oncogenes y rutas de señalización en la transcripción como dianas moleculares potenciales para el tratamiento contra el cáncer¹⁸.

Genes supresores de tumores

Los tumores pueden desarrollarse como consecuencia de alteraciones en genes que estimulan la proliferación celular, como es el caso de los protooncogenes, pero también pueden ser el resultado de la pérdida de función de genes que codifican proteínas que frenan la proliferación celular. Los estudios llevados a cabo en pacientes con retinoblastoma mostraron la existencia de pérdidas de alelos (pérdida de heterocigosidad) en las células tumorales; estos datos, junto con la constatación de que la fusión de células tumorales con células normales puede revertir el fenotipo tumoral, y la observación de que ratones carentes de determinados genes desarrollan tumores con más facilidad, han puesto de manifiesto la existencia de genes que, en condiciones normales, ejercen una función represora de la proliferación celular, y cuya pérdida de función favorece el desarrollo del fenotipo tumoral. Inicialmente, a estos genes se les denominó erróneamente antioncogenes, hoy los conocemos como genes supresores de tumores.

Como hemos señalado anteriormente, los estudios iniciales con el virus SV40, pusieron de manifiesto que ejercía su acción tumorigénica interaccionando con la proteína nuclear p53 que, inicialmente, se consideró estaba codificada por un protooncogén, ya que al interaccionar con las proteínas del virus SV40 activaba la capacidad transformante. Estudios posteriores, pusieron de manifiesto que esta hipótesis era incorrecta, dado que la célula en la que se realizaron los estudios era un clon que presentaba un alelo del gen p53 mutado. Más tarde, se demostró que un elevado número de tumores humanos no sólo eran portadores de mutaciones somáticas en el gen p53, sino que algunos de ellos presentaban con pérdidas en el otro alelo. Hoy sabemos que el gen p53 germinal no tiene ninguna actividad transformante, sino que, al contrario, es inhibidor de la transformación celular. De manera que hoy se considera que el gen p53 pertenece a la familia de genes supresores de tumores y que las proteínas de los virus DNA favorecen el desarrollo de tumores

al secuestrar la proteína p53 y evitar que ejerza su acción inhibitoria del desarrollo tumoral. La proteína p53 es una proteína nuclear que interviene en el control del ciclo celular, en la replicación del DNA y en la reparación del mismo, manteniendo la estabilidad del genoma y, además, regula la apoptosis.

Los genes supresores de tumores presentan mutaciones somáticas en los tumores esporádicos y mutaciones germinales en los tumores hereditarios. Estos genes fueron aislados inicialmente usando métodos de clonaje posicional clásicos; no obstante, la utilización de nuevas metodologías basadas en la técnica de PCR o en los microarrays, está permitiendo caracterizar una gran cantidad de nuevos genes que se inactivan en diferentes etapas del proceso de transformación tumoral, de manera que actualmente la familia de genes supresores de tumores incluye genes que codifican proteínas implicadas en diferentes funciones relacionadas con la diferenciación y proliferación celular, apoptosis y reparación del daño celular. Para que los genes supresores de tumores favorezcan el desarrollo tumoral es necesario que las proteínas codificadas por ellos no sean funcionales, lo que supone bien que se alteren los dos alelos o que la mutación de uno de los alelos de lugar a una proteína que inactive la del alelo normal, por lo que las alteraciones de estos genes son consideradas recesivas¹⁹.

Los genes supresores codifican proteínas implicadas en el desarrollo tumoral actuando principalmente a nivel del control del ciclo celular, aunque en los últimos años se está expandiendo el concepto de gen supresor de tumores. Comentaremos brevemente las características de los genes Rb y p53.

El gen RB1

El gen RB1 está localizado en el cromosoma 13q14.2. Contiene 27 exones que ocupan 180 Kb. Se transcribe en un RNA mensajero de 4.7 Kb. El gen contiene un total de 46 secuencias Alu, así como varias secuencias repetitivas L1. La fase de lectura abierta de 2.7 Kb codifica una fosfoproteína de 110 KDa, expresada ubicuamente, la cual forma parte de una pequeña familia de proteínas nucleares que comparten una secuencia significativamente parecida en dos áreas discontinuas llamadas "pockets"²⁰. La proteína Rb contiene tres dominios distintos: la región amino terminal, los dominios centrales A y B, separados por una región de unión y la región carboxilo terminal. La integridad estructural de los dominios A/B se requiere para la interacción de Rb con proteínas que poseen un motivo LxCxE, el cual es clave para que las oncoproteínas virales interaccionen con Rb. Existen

proteínas que interaccionan con el extremo N-terminal de Rb, como son la proteína de la matriz nuclear de 84 KDa, una proteína de choque térmico de 70 KDa, una kinasa activa en fases G2/M y el factor que autoriza la replicación MCM7. Además del motivo LxCxE, ciertas proteínas poseen una secuencia específica de unión al dominio C-terminal, como es el caso del factor de transcripción E2F. De esta forma se incrementa la posibilidad de que Rb pueda unirse a varias proteínas simultáneamente ^{21, 22}.

El gen RB1 fue el primer gen supresor de tumores identificado y aislado por clonaje posicional a partir de retinoblastomas familiares. Las mutaciones que afectan al dominio central promueven el desarrollo del tumor y, además, esta región es diana de oncoproteínas virales que interrumpen la función del gen ²¹.

La relevancia de la proteína Rb radica en que la progresión del ciclo celular desde la fase G1 hasta la fase S requiere la inactivación de Rb por fosforilación secundaria a la actividad de proteínas kinasas acopladas con sus ciclinas correspondientes (CDKs)²³. Además, Rb puede reprimir la transcripción uniéndose directamente al dominio de transactivación de la proteína E2F. La familia E2F es un grupo de factores de transcripción que se unen a los promotores de ciertos genes relacionados con la entrada en fase S y la síntesis de DNA. La interacción de Rb con E2F bloquea la transcripción mediada por E2F y, de esta forma, la progresión del ciclo celular²⁴.

Por otra parte, Rb es capaz de reprimir la transcripción por contacto directo con la maquinaria de transcripción basal, así como por su interacción con otros co-represores transcripcionales como RBP1 y CtIP. Esta actividad represora se relaciona con la alteración de la estructura de la cromatina altamente empaquetada. La estructura de la cromatina puede alterarse por acetilación y desacetilación de histonas. Las histona acetiltransferasas (HATs) se asocian con factores de transcripción, actuando como coactivadores transcripcionales al cambiar la estructura de la cromatina permitiendo el acceso de los factores de transcripción. Por el contrario, las histona desacetilasas (HDACs) se asocian con la inhibición de la transcripción y se encuentran en complejos correpresores. Las HDACs comprenden una familia de siete proteínas, de las cuales, 1, 2 y 3 interaccionan con Rb. El complejo Rb – HDAC puede reprimir activamente la transcripción y regular la acetilación de histonas en el promotor de los genes diana ²⁵.

La pérdida de función de Rb activa la ruta apoptótica de p53, probablemente porque la pérdida de Rb conduce a la liberación de E2F, lo cual dispara la apoptosis por activación de p14ARF (componente de la ruta de p53) y quizás otras proteínas proapoptóticas²⁶. No obstante, la pérdida de función de Rb puede inducir apoptosis independiente de p53 disminuyendo la expresión de proteínas antiapoptóticas como TRAF2.

Gen P53

p53 es un gen supresor de tumores ubicado en el brazo corto del cromosoma 17, en la posición 17p13.1 y tiene un tamaño de 20 Kb. Consta de 11 exones, de los cuales el primero, que dista 8-10 Kb del segundo exón, no es codificante²⁷.

La proteína p53 fue descrita por primera vez en 1979 como una proteína relacionada con la transformación y con el antígeno T grande del virus tumoral de DNA, SV40. Se identificó en varias estructuras nucleares, incluyendo el nucleolo y los cuerpos nucleares. p53 es una fosfoproteína nuclear con cinco regiones funcionales conservadas, designadas del I a V^{28, 29}.

- Región I o región de transactivación, localizada en la zona N-terminal (residuos 1 a 42). Interacciona con los componentes de la maquinaria transcripcional, como la proteína de unión a TATA, así como los factores asociados a TBP y las proteínas coactivadoras p300/CBP. La oncoproteína Mdm2 se une a p53 en esta región. La interacción se realiza entre un pequeño dominio hidrofóbico (120 aminoácidos) en la región N-terminal de Mdm2 y un péptido α -hélice anfipático de 15 aminoácidos de esta región de p53. Este dominio posee también una secuencia de exportación nuclear.
- Región II o región rica en poliprolina (residuos 61 a 94), que posee cinco repeticiones PXXP. Es importante para la actividad supresora de tumores de p53. En esta región se localiza un polimorfismo en el codon 72 que tiene importancia funcional.
- Región III, núcleo central (residuos 97 a 300), que contiene un dominio específico de unión al DNA. La mayoría de las mutaciones *missense* de p53 se localizan en esta porción de la proteína, conduciendo a la pérdida de su función como factor de transcripción.
- Región IV o región de tetramerización (residuos 324 a 355); incluida en la región C-terminal interviene en la formación de la estructura tetrámerica de p53, imprescindible para el correcto funcionamiento de la proteína.

- Región V, corresponde a la región C-terminal (residuos 311 a 393); contiene secuencias de localización nuclear y de exportación nuclear, siendo la responsable de la localización subcelular de la proteína p53. También posee una secuencia de unión inespecífica a RNA y DNA y actividades de anillamiento al DNA de hebra única. La región C-terminal también funciona como un dominio regulador negativo.

p53 es un gen supresor de tumores que pertenece a una pequeña familia de proteínas estructuralmente parecidas, que incluye también a p63 y p73. Es un inhibidor del crecimiento extremadamente eficiente, induciendo la parada del ciclo celular y/o la muerte apoptótica, dependiendo del tipo celular y el microambiente. Aunque el gen p53 es indudablemente un supresor tumoral, no posee las características de un supresor de tumores según el modelo de dos pasos de Knudson, en el cual ambos alelos deben perderse para que se desarrolle un tumor. La haploinsuficiencia (una dosis reducida del gen p53) puede ser suficiente para provocar la transformación neoplásica³⁰.

- **Activación de p53.** La proteína p53 está expresada constitutivamente en todos los tipos celulares, pero no se acumula en la célula debido a su rápida degradación en el proteosoma. Los niveles de proteína p53 se incrementan drásticamente en respuesta a diversos tipos de estrés, incluida la radiación ionizante, radiación UV, privación de factores de crecimiento, tratamiento quimioterápico, activación de oncogenes, choque térmico o infección por virus³¹.

Se han descrito al menos dos rutas que conducen a la estabilización de p53:

- Respuesta a estrés genotóxico, como el daño en el DNA causado por radiación ionizante o ultravioleta. Las kinasas inducidas por estrés, incluyendo ATM, ATR, CHK2 y HIPK2 fosforilan gran cantidad de residuos de serina y treonina en el dominio de transactivación N-terminal de p53 lo que inhibe la unión de su regulador negativo, Mdm2, y potencia la regulación transcripcional de los genes diana de p53.
- Inducción de p14ARF en respuesta a señales mitogénicas aberrantes, como la sobreexpresión de Myc, la activación de E2F-1 por E1A o la expresión de Ras activado. p14ARF puede estabilizar p53 uniéndose a Mdm2 y secuestrándolo en el nucleolo. Esta ruta sirve como una unión entre las funciones supresoras del crecimiento de p53 y las funciones promotoras del crecimiento de E2F-1, de manera que las señales mitogénicas aberrantes disparan la respuesta compensatoria para limitar la proliferación³².

No obstante, además de los residuos de serina y treonina N-terminales, otras zonas de p53 sufren modificaciones postraduccionales, incluyendo fosforilación, acetilación y sumoilación. La fosforilación de p53 por JNK en la Thr81 está implicada en la estabilización de p53 en respuesta a la radiación UV y la kinasa 3 parecida a Polo contribuye a la fosforilación de p53 en la Ser20 (el residuo diana de Chk2) en respuesta a radicales libres³³.

- **Activación de la transcripción.** Para activar la transcripción es necesario que p53 actúe como un homotetrámero, y esto sólo ocurre cuando está activado. p53 puede inducir la parada del ciclo celular transitoria en G1 o G2, activando los genes diana como p21 y 14-3-3 σ . La parada del ciclo celular ante una situación de estrés podría evitar la progresión del ciclo bajo condiciones inapropiadas evitando la acumulación de errores genéticos. p53 también puede iniciar la parada permanente del ciclo celular, o senescencia, a través de la transactivación de p21³⁴.
- **Apoptosis.** p53 puede iniciar apoptosis induciendo la expresión de proteínas relacionadas con las dos rutas apoptóticas principales, intrínseca y extrínseca.

La ruta intrínseca se centra en la mitocondria, la cual contiene los factores apoptóticos clave. Las situaciones de estrés inducen la acumulación de p53 en este orgánulo celular. Esta redistribución mitocondrial de p53 precede a la eliminación del citocromo c y la activación de las caspasas y sólo ocurre durante la muerte celular dependiente de p53. Los principales reguladores de la ruta intrínseca son los miembros de la familia Bcl-2, cuya transcripción también está controlada por p53.

La vía extrínseca se induce tras la unión de una proteína extracelular a un receptor que posee en su región intracelular el denominado dominio “death”, necesario para la transmisión de la señal apoptótica. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor TNF. Además, p53 puede iniciar la apoptosis de forma independiente de la transcripción, posiblemente a través de interacciones físicas con miembros de la superfamilia de helicasas DNA que contienen DexH³⁵.

- **Reparación del DNA.** p53 está relacionada con varias rutas de reparación del DNA. La proteína p53 potencia la reparación por escisión de nucleótidos a través de la transactivación de GADD45. En la reparación por escisión de bases (BER)

y la reparación por recombinación homóloga (HRR), p53 actúa de forma independiente de la transcripción, al activar la ruta BER, quizás a través de una asociación con la endonucleasa AP (APE) y/o DNA polimerasa β . Por el contrario, p53 regula negativamente la ruta HRR al inhibir Rad51. Además, se ha observado que en las células deficientes en p53, las tasas de recombinación tienden a ser significativamente elevadas³⁶.

En los últimos años, y con la intención de simplificar la definición de gen supresor, se han añadido diferentes epítetos a los genes supresores de tumores. Así, para explicar el papel que desempeña el gen APC en el proceso de desarrollo tumoral, se creó el término de “guardabarreras” (“gatekeeper”). Este término engloba a genes supresores de tumores que están mutados en el proceso inicial del desarrollo tumoral. Las proteínas codificadas por estos genes actuarían como barreras y, al estar mutados y funcionar de manera anómala, facilitarían la aparición de mutaciones en otros protooncogenes y genes supresores de tumores que inducirían el desarrollo del tumor. En este grupo se han incluido todos los genes supresores de tumores que inhiben de manera directa la proliferación celular (supresión de la proliferación, inducción de apoptosis o diferenciación celular). De esta manera, el gen p53 puede ser considerado como un gen “gatekeeper” pero en lugar de estar implicado en la iniciación del proceso, intervendría en la progresión del mismo. Así pues, los genes “gatekeepers” podrían subdividirse en “iniciadores”, “de progresión” y “de metástasis”. Por lo tanto, los genes “gatekeeper” se caracterizan porque en condiciones normales actúan directamente evitando el desarrollo del tumor y la pérdida de su función es un paso inevitable en el proceso de acumulación de mutaciones en el genoma que caracteriza el proceso de desarrollo tumoral. La restauración de la función normal de estos genes permite recuperar un fenotipo no tumoral en el caso de que no se hayan acumulado mutaciones en otros oncogenes o genes supresores de tumores³⁷.

El segundo gran grupo de genes supresores se engloban bajo la denominación de vigilantes (“caretaker”). Estos genes actúan controlando el desarrollo tumoral indirectamente al asegurar la fidelidad de las secuencias del DNA a través de los mecanismos de reparación del mismo; por ello, la mayoría de los genes incluidos en este grupo son genes que codifican proteínas que intervienen en los procesos de reparación del DNA. La pérdida de función de estos genes predispone al cáncer al permitir un incremento en el número de mutaciones, lo que aumenta la posibilidad de que se produzca una mutación en un gen “gatekeeper”. El restablecimiento de

la función de un gen “caretaker” no detiene el desarrollo tumoral si ya se ha producido la mutación de un gen “gatekeeper”. El gen p53 también puede incluirse dentro del grupo de genes “caretakers” ya que interviene en los procesos de reparación del DNA^{37, 38}.

Existe un tercer grupo de genes que fueron denominados “ambientales” “landscaper” porque se encontraron mutados no en las células tumorales sino en células estromales que rodean las células tumorales. Se especuló con que estos genes regulan el medio ambiente en el que crecen las células tumorales regulando las proteínas de la matriz, los marcadores de superficie, las proteínas de adhesión, etc. La pérdida de función de estos genes favorecería la transformación neoplásica y el crecimiento de las células tumorales. Este último grupo de genes supresores de tumores no está reconocido como tal en el momento actual³⁹.

Los mecanismos de inactivación de los genes supresores de tumores son variados e incluyen, además de las mutaciones clásicas, la haploinsuficiencia, que puede estar mediada por pérdida de heterocigosidad o por la presencia de otras proteínas mutadas que actúan como dominantes negativas. En este sentido, modificaciones epigenéticas como la metilación de las regiones promotoras o la remodelación de la cromatina permiten explicar este fenómeno⁴⁰.

El concepto clásico de gen como una unidad de genoma que contiene la información para la síntesis de una proteína está siendo modificado para incluir unidades transcripcionales que no necesariamente codifican proteínas. Dentro de esta nueva definición de gen se incluyen los segmentos del genoma implicados en la producción de rRNA, tRNA, noRNA, etc, y, más recientemente, los miRNAs⁴¹. Los genes microRNA se caracterizan porque no codifican proteínas sino RNA monocatenario formado por entre 21 y 23 nucleótidos cuya función es regular la expresión de otros genes al anillar con secuencias complementarias de mRNAs y bloquear la traducción o facilitar la degradación del mRNA. Dentro de los miRNA existen algunos que funcionan como genes supresores de tumores y otros como oncogenes. El estudio de los miRNA ha mostrado que se localizan en regiones del genoma implicadas en pérdidas, amplificaciones o reordenamientos, de manera que las regiones de los cromosomas implicadas en translocaciones cromosómicas en las que no se detectan oncogenes o genes supresores de tumores, contienen microRNAs. Algunos genes supresores están directamente implicados en el desarrollo tumoral al controlar procesos como la diferenciación celular y la apoptosis mientras que otros actúan

regulando directamente oncogenes y genes supresores de tumores. El mejor conocimiento de la función de estos genes y de su implicación en el desarrollo tumoral permitirá definir nuevos biomarcadores con utilidad en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer⁴².

En definitiva, en los últimos años, y aunque se mantiene estable el concepto de que el cáncer es el resultado de mutaciones en el DNA, estamos asistiendo a la aparición de nuevos paradigmas que aumentan nuestro conocimiento de los mecanismos de la tumorigénesis. Así, la regulación epigenética de la expresión génica a través de la metilación de las regiones promotoras de los genes, de las modificaciones en las histonas o de la remodelación de la cromatina, permiten explicar los cambios en los niveles de expresión de oncogenes y genes supresores de tumores en ausencia de mutaciones en el ADN. Estos hallazgos han mejorado nuestro conocimiento sobre las bases moleculares del cáncer y han permitido aumentar el arsenal terapéutico. Por otro lado, la caracterización de unidades transcripcionales que no codifican proteínas, pero cuyas mutaciones son relevantes para la función celular, como es el caso de los miRNA, está permitiendo explicar los mecanismos por los que determinadas traslocaciones cromosómicas están implicados en el desarrollo tumoral y comprender mejor los mecanismos de regulación génica a la par que amplía el campo de estudio a ese 90% del genoma no relacionado con los genes clásicos pero que también está implicado en el desarrollo tumoral.

Bibliografía

- 1 Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. Garland Science, New York, 2006.
- 2 Croce CM. Oncogenes and cancer. *New Engl. J. Med.* 2008; 358: 502-511.
- 3 Andrae J, Gallini R, Betsholz C. Role of platelet-derived growth factor in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008; 22: 1276-1312.
- 4 Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 13:211-225.
- 5 Brennan PJ, Kumagai T, Berezov A, Murali R, Greene MI. HER2/neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene.* 2000; 19: 6093-101.
- 6 Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene.* 2000; 19: 6102-14.
- 7 Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2007; 19: 56-62.
- 8 Murphy CG, Fornier M. HER2-positive breast cancer: beyond trastuzumab. *Oncology* 2010; 24: 410-415.
- 9 Irwin WJ, Carey LA. What is triple-negative breast cancer?. *Eur. J. Cancer* 2008; 44: 2799-2805.
- 10 Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 367-75.

- 11 Plaza-Menacho I, Burzynski GM, de Groot JW, Eggen BJJ, Hofstra RMW. Current concepts in RET-related genetics, signalling and therapeutics. *TRENDS Genet.* 2006; 22: 627-636.
- 12 Takahashi M. Co-segregation of MEN2 and Hirschprung's disease: the same mutation of RET with both gain and loss of function?. *Hum. Mutat.* 1999; 13: 331-336.
- 13 Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogene: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3: 459-465.
- 14 Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem.* 2005; 386:193-205.
- 15 Popescu NC, Zimonjic DB. Chromosome-mediated alterations of the MYC gene in human cancer. *J Cell Mol Med.* 2002; 6: 151-9.
- 16 Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Cancer.* 2009; 9: 501-507.
- 17 Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2007; 7: 295-308.
- 18 Stegmeier F, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M. Targeted cancer therapies in the twenty-first century: lessons from imatinib. *Curr. Pharmacol. Ther.* 2010; 87: 543-552.
- 19 Hinds PW, Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev.* 1994 Feb;4(1):135-41.
- 20 Toguchida, J., McGee, T. L., Paterson, J. C., Eagle, J. R., Tucker, S., Yandell, D. W., Dryja, T. P. Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Genomics* 17: 535-543, 1993
- 21 Nevins, J. R. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum. Molec. Genet.* 10: 699-703, 2001
- 22 Poznic M. Retinoblastoma protein: a central processing unit. *J. Biosci.* 2009; 34: 305-312.
- 23 Harbour JW, Luo RX, Dei Sante A et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progresively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 1999; 98: 859 – 869.
- 24 Adadne J, Shao Z, Robbins PD. The retinoblastoma susceptibility gene product represses transcription when directly bound to the promoter. *J Biol Chem* 1995; 270: 8837 – 8843.
- 25 Luo RX, Postigo AA, Dean DC. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 1998; 92: 463 – 473.
- 26 Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat. cell Biol.* 2000; 2: E65-67
- 27 Bourdon, J.-C. p53 and its isoforms in cancer. *Brit. J. Cancer* 97: 277-282, 2007
- 28 El-Deiry WS, Kern SK, Pietenpol JA et al. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1992; 1: 45 – 48.
- 29 Levine, A. J., Momand, J., Finlay, C. A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991
- 30 Varley JM, McGown G, Thorncroft M et al. Are there low-penetrance p53 alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 995 – 1006.
- 31 McGill G, Fisher DE. P53 and cancer therapy: a doubledged sword [comment]. *J Clin Invest* 1999; 104: 223 – 225.
- 32 Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 731 - 737.
- 33 Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2764 – 2772.
- 34 Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2784 – 2791.
- 35 Peter ME, Krammer PH. The cd95(apo-1/fas) disc and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10: 26 – 35.
- 36 Zhou J, Ahn J, Wilson SH. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J* 2001; 20: 914 – 923.
- 37 Kinzler K, Vogelstein B. Lessons from hereditary colon cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
- 38 Langauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-649.

- 39 Kinzler K, Vogelstein B: Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998, 280: 1036-1037.
- 40 Macleod K. Tumor supresor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2000; 10: 81-93.
- 41 Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogénesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.
- 42 Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* 2007; 302: 1-12.

Técnicas de diagnóstico molecular

M^a Isabel Tejada Mínguez
Elena Beristain Mendizábal
Cristina Martínez- Bouzas

Laboratorio de Genética Molecular
Hospital de Cruces. Baracaldo. Bilbao

Introducción

Las técnicas de Diagnóstico Molecular, que comprenden el estudio y análisis de las moléculas de la herencia, los ácidos nucleicos ADN y ARN, desempeñan un papel cada vez más importante en el diagnóstico en Medicina. Los ácidos nucleicos son el ADN o ácido desoxirribonucleico y el ARN o ácido ribonucleico, del que hay a su vez tres tipos: ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y ARN mensajero (ARNm). La especie humana tiene 23 pares de cromosomas, orgánulos en los que se empaqueta el ADN en el núcleo de las células, aunque también hay ADN en las mitocondrias. En el ADN genómico nuclear se encuentran los genes (unos 22-25.000 en la especie humana), que a su vez presentan intrones y exones, siendo estos últimos los fragmentos codificantes. El ARN mensajero resulta de la transcripción de esos exones y, a su vez, se traduce en proteínas, moléculas que finalmente realizarán su función tanto en la célula como en el organismo, tanto de tipo estructural como funcional y metabólico. El ADN genómico está en todas las células nucleadas del organismo, por el contrario el ARN mensajero se encuentra sólo en las células en las que ese gen se expresa. Por ello, al realizar un diagnóstico estudiando el ADN, se obtendrá información de las características estructurales de un gen (por ejemplo si existe o no una mutación) pero no de cómo esa mutación está implicada en el trastorno celular. El estudio del ARN mensajero nos indicará en cambio una información más funcional de la célula, o sea, nos permitirá saber cómo influye en la producción de proteína, y de esta forma, veremos las consecuencias de una mutación, es decir, los cambios en la cantidad o tamaño del ARN y consecuentemente de la proteína. Para trabajar en Diagnóstico Molecular, el ARNm se puede transformar en el laboratorio en otra muestra que es el ADN complementario (ADNc). Se

trata de una molécula que se produce *In Vitro*, utilizando una reacción de retro-transcripción a partir del ARN mensajero. Como el ADNc deriva del ARNm su estructura estará formada solamente por exones del gen, sin intrones.

En un laboratorio de Diagnóstico molecular, no sólo es importante conocer en cada caso cuál es la molécula de elección, sino también cuál es la muestra biológica más adecuada para obtener esa molécula. En el caso del cáncer hereditario, si lo que queremos por ejemplo es averiguar si en un paciente hay mutaciones germinales (aquellas que están en todas las células y se transmiten a la generación siguiente), una simple muestra de sangre nos bastará para el diagnóstico, esté donde esté el tumor. En cambio, las mutaciones somáticas (aquellas que aparecen de novo en un individuo y que sólo están en algún tipo celular del mismo) generalmente no se transmiten (salvo que el tipo celular en el que se hayan producido de novo sean los gametos) porque la única manera de estudiarlas es tomando la muestra del tejido afectado.

En la práctica diaria, los genetistas y expertos en el laboratorio de Diagnóstico molecular deben indicar a los clínicos en cada caso, cuál es la muestra que se necesita, para qué, en qué condiciones las tienen que enviar y qué técnicas se van a realizar con ellas. Este capítulo pretende tratar de todo esto de una forma rápida y sencilla. Para los que quieran profundizar más existe una extensa literatura al respecto, por lo que hemos preferido no ir dando citas en el texto, ya que se pueden consultar diversos manuales, desde los más sencillos ^{1,2}, pasando por otros más específicos ^{3,7} y hasta el más completo existente para profesionales del laboratorio ⁸, no olvidándonos por supuesto de las inmensas herramientas que nos facilita hoy día Internet, de las que citamos sólo un par de ellas ^{9,10} por su gran utilidad. Sólo las técnicas más recientes, no compendiadas todavía en los manuales citados están referenciadas en este capítulo.

Extracción de ADN y ARN a partir de muestras biológicas.

Existe una gran cantidad de muestras a partir de las cuales se puede obtener ADN y ARN. Citaremos entre otras las más utilizadas, como la sangre periférica, las células epiteliales bucales, la médula ósea, los ganglios, los tejidos tumorales, el líquido amniótico, las vellosidades coriales y muy recientemente, las blastómeras obtenidas para el Diagnóstico Preimplantacional.

De todas ellas, la sangre periférica es la fuente más asequible y la que más se emplea para extraer el ADN genómico, ya que proporciona un ADN abundante y de alta calidad y no conlleva más molestias que un simple pinchazo. Las células nucleadas que en ella se encuentran, los leucocitos, representan la mayor fuente de ADN para los estudios de rutina en Medicina. Se ha de trabajar de preferencia con sangre total, sin separar sus componentes, y sin coagular, lo que se consigue colocándola en tubos con el anticoagulante etilendiaminotetracético (EDTA). A partir de unos 10 ml a 20 ml de sangre recogidos en buenas condiciones, se obtienen suficientes microgramos de ADN como para realizar todo tipo de análisis.

Pero en el caso de querer estudiar mutaciones somáticas, en las que un sólo tejido está alterado, es necesario extraer el ADN del propio tejido afectado (por ejemplo en los tumores o en los aspirados de médula ósea), ya que en sangre total no detectaríamos la mutación. Lo ideal en estos casos es que el tejido llegue al laboratorio en fresco (por ejemplo directamente del quirófano en el caso de la extracción de un tumor) y se procese de inmediato, o se congele para su conservación hasta la extracción, bien a -70°C , bien sumergiéndolo directamente en nitrógeno líquido, pero también se consigue aislar ADN de manera satisfactoria a partir de especímenes patológicos conservados en parafina. La calidad del ADN que se obtiene en estos casos dependerá de la edad del tejido y de las condiciones de conservación.

En el caso de Síndromes hereditarios graves, en los que se plantee un Diagnóstico prenatal, tendremos que utilizar muestras fetales. La biopsia de vellosidades coriales es la mejor fuente de ADN de un feto. La extracción de vellosidades coriales la hacen los ginecólogos con ayuda guiada por ecografía hacia las 10-12 semanas de gestación, y la muestra extraída se coloca enseguida en un tubo estéril con una solución de suero salino fisiológico. Por tener que atravesar tejidos maternos, puede haber células maternas contaminantes, por lo que esa muestra hay que limpiarla concienzudamente bajo un microscopio binocular de bajo aumento. También se pueden utilizar las células contenidas en el líquido amniótico, que se extrae por medio de una amniocentesis o punción transabdominal ecoguiada. Como dichas células no son abundantes se han de cultivar, lo que enlentece el estudio prenatal y de ahí su menor uso. Pero para algunos diagnósticos, las técnicas de PCR que a continuación veremos pueden solventar este problema.

Con respecto a las extracciones de ARN, lo más importante a tener en cuenta es la facilidad de degradación enzimática de esta molécula por las ribonucleasas (RNA-

sas). Como las ribonucleasas son enzimas muy estables y activas, presentes en múltiples sistemas biológicos, las precauciones que se han de tomar a la hora de extraer una muestra para ARN han de ser extremas. Todo el material que entre en contacto con la muestra debe estar libre de RNAsas y ha de estar completamente esterilizado, así como los materiales y soluciones utilizadas, que han de estar tratadas con inhibidores de las RNAsas como el dietilpírocarbonato (DEPC). Si se utilizan tejidos líquidos (sangre y aspirado medular) para ARN, éstos han de estar anticoagulados para una buena obtención del mismo. Debido al problema mencionado de la degradación, se han comercializado recientemente tubos especiales que combinan un anticoagulante, con reactivos libres de RNAsas que mantienen la estabilidad del ARN. Para la extracción de ARN de tejidos sólidos, ésta se debe hacer a poder ser de inmediato o si no es posible, se ha de congelar el tejido antes de su procesamiento. Como en el caso del ADN, si la extracción va a ser inmediata, el tejido se colocará en tubos con suero fisiológico, pero en este caso además con inhibidores de RNAsas, DEPC, etc.

Protocolos de extracción del ADN

Como existe una gran variedad de fuentes a partir de las cuales se puede obtener ADN, se han desarrollado muy diversos protocolos de extracción, que se pueden llevar a cabo tanto de forma automática como manual. Estas técnicas de extracción de ADN son relativamente sencillas y básicamente las mismas para todo tipo de células. En todos los casos, el objetivo es obtener la máxima cantidad de ADN y de óptima calidad y pureza, evitando toda destrucción enzimática o mecánica del mismo.

Todo Protocolo ha de constar de las siguientes partes:

- 1 Una lisis celular con mezcla de sus componentes, ya sea por métodos mecánicos, osmóticos y/o químicos como con detergentes que disuelven las membranas celulares.
- 2 Una incubación con un enzima (proteínasa K) para liberar al ADN de las proteínas que tiene asociadas.
- 3 Una separación del ADN del resto de constituyentes de la célula utilizando bien una mezcla con fenol-cloroformo o bien mediante soluciones salinas sobresaturadas.
- 4 Una precipitación del ADN mediante la adición de etanol frío. El ADN genómico tiene tal peso molecular, que este precipitado es visible en forma de filamentos semejantes a un trozo de algodón (si hay suficiente material), y

- puede ser extraído fácilmente de la solución con un gancho de vidrio. Caso de pequeñas cantidades, se separa de la solución mediante centrifugación.
- 5 Por último, el ADN se disuelve nuevamente en agua destilada o en una solución de agua y TE (Tris-HCl+EDTA).

A partir de ahí, el ADN disuelto se cuantifica y se realizan las técnicas analíticas correspondientes, o se conserva congelado a -20°C o a $-70-80^{\circ}\text{C}$, hasta su utilización.

Estos Protocolos varían para cada muestra sobre todo en el manejo inicial de la misma, como se describe muy someramente a continuación para las muestras más habitualmente utilizadas en los estudios de cáncer familiar:

Sangre periférica

Para obtener buenos resultados, lo ideal es que la sangre se procese dentro de las 24 horas siguientes a la extracción. Pero en el caso de que no pueda ser así, la muestra se puede congelar a -20°C el tiempo necesario y descongelarla justo antes de que se vaya a extraer el ADN. En ambos casos, primero se lava la sangre con una solución salina de suero fisiológico y, mediante centrifugaciones sucesivas, se va recogiendo el botón celular. Posteriormente, esta masa celular se mezcla vigorosamente con una solución hipotónica (normalmente agua destilada) para producir la lisis de los eritrocitos, y los leucocitos se recuperan nuevamente por centrifugación. En este punto del proceso, nuevamente y si es necesario se pueden congelar los leucocitos sin ningún problema a -20°C hasta poder seguir con el proceso. A continuación (o descongelando previamente el botón celular a temperatura ambiente) se añade un tampón de lisis de leucocitos, un detergente (SDS o dodecil sulfato de sodio al 10 % P/V) y una solución de proteinasa K y se incuba durante toda la noche a 37°C . A la mañana siguiente, el ADN se somete a su precipitación y dilución según se ha descrito.

En los últimos años, debido al auge que han tomado las técnicas de ADN y a la cada vez mayor cantidad de extracciones que se realizan, se han comenzado a comercializar los llamados “robots”, que son aparatos que realizan automáticamente todos estos pasos. Su eficiencia se basa en que permiten extraer el ADN de la sangre muy puro y en unas cuantas horas, así como tratar muchas muestras simultáneamente. En el caso de grandes centros de referencia es una opción rentable, no así para los laboratorios pequeños clínicos hospitalarios.

Todo lo aquí expuesto se puede aplicar a la *médula ósea*, pues tratándose de un tejido líquido, su procesamiento es muy parecido salvo pequeñas diferencias que no podemos tratar aquí en profundidad.

Tejido fresco

Los tejidos humanos son una muy buena fuente de ADN genómico por su alta densidad celular. Por ejemplo, un gramo de tejido hepático contiene aproximadamente 10^9 células cuando, para obtener un número equivalente de células nucleadas sanguíneas, se requeriría aproximadamente un litro de sangre. Pero tienen el inconveniente de la facilidad de degradación de los ácidos nucleicos, lo que se soluciona procesándolos tan pronto como sea posible tras su recogida, o congelándolos de inmediato.

Para la extracción de ADN de tejidos, se requieren unos procesos preliminares para romper el tejido en trozos muy finos a partir de los cuales las células se pueden lisar para que las soluciones de extracción del ADN lleguen mejor al mismo. Esto se puede realizar, bien picando finamente la muestra con un bisturí para homogeneizarla, o, en el caso de tejido congelado, aplastándola en un mortero. En todo caso, los fragmentos obtenidos se incubarán posteriormente durante 24 horas con SDS y proteinasa K y se seguirá un proceso similar al indicado para la sangre periférica.

Tejido embebido en parafina

Muy frecuentemente, las muestras de tejidos humanos procedentes de biopsias se encuentran fijadas en formalina y embebidas en parafina, porque así fueron procesadas para su análisis histopatológico. Este método de conservación es excelente para el mantenimiento de la estructura de los tejidos y de los epítomos de sus proteínas, por lo que es utilizado de forma rutinaria por los anatómo-patólogos como método de conservación de muestras, pero provoca que los ácidos nucleicos sufran modificaciones químicas, queden fragmentados y resulten difíciles de extraer. A pesar de todo, hay ocasiones en las que las únicas muestras de tumores o tejidos disponibles se encuentran en estas condiciones, como es el caso de los estudios en individuos fallecidos.

Para trabajar con estas muestras y antes de extraer el ADN, se les ha de quitar la parafina mediante un tratamiento con xileno. Este proceso es muy agresivo y hace que el ADN se degrade por lo que las moléculas resultantes serán escasas y de pequeño tamaño. Posteriormente, hay que cortar el bloque en trozos pequeños como

hemos visto en el caso del tejido fresco. En el caso de biopsias de tumores, es muy importante diferenciar además que parte de la muestra es tejido normal y que parte es tumoral. Para ello, se han implantado hoy día técnicas muy precisas como la microdissección láser que permite obtener las fracciones cortadas directamente en un tubo, evitando la manipulación y facilitando que no se mezclen las fracciones de tejido normal con las tumorales. El resto de la técnica de extracción de ADN será idéntica a la descrita en los apartados anteriores. De una biopsia de algunos miligramos, se pueden recuperar varias docenas de microgramos de ADN de esta forma.

Protocolos de extracción del ARN

Lo que diferencia esta extracción de la del ADN, es que se han de tomar todas las precauciones necesarias en el laboratorio para evitar cualquier fuente de contaminación con RNAsas, pues ya hemos dicho, el ARN se degrada con mucha facilidad por estas enzimas. Por lo tanto, habrá que seguir estas normas para cualquier tipo de muestra o tejido: 1) todas las superficies de trabajo deben estar tratadas con etanol al 70% y con productos especiales como el RNase ZAP[™]; 2) es necesaria la utilización de guantes estériles durante cualquier manipulación del ARN; 3) todo el material fungible con el que se realiza la extracción, tales como tubos y puntas, han de ser certificados libres de nucleasas y en el caso de las puntas deberán además llevar filtro; 4) los tampones, el agua y demás soluciones de trabajo de extracción han de estar certificadas libres de nucleasas. Por último, hay que evitar además la contaminación con ADN, por lo que, en la medida de lo posible, la zona de trabajo del ADN ha de ser diferente a la del ARN y se tendrá que incubar la muestra además con DNAsa para eliminar los posibles restos de ADN.

Siguiendo todas estas precauciones, las técnicas de extracción de ARN consisten en obtener en primer lugar unas células lo más limpias posibles – bien de leucocitos de sangre periférica, bien de células de cualquier otro tejido una vez homogeneizadas-, que posteriormente lisaremos para obtener el ARN. Estas células una vez obtenidas, se pueden congelar a -80°C sin que ello afecte significativamente a la extracción del ARN. En este caso, es aconsejable que el proceso de la congelación se haga en alícuotas debido a la inestabilidad del ARN, para asegurar que mientras se trabaja con un tubo, no se degradan los demás.

A partir de las células, y debido a las precauciones mencionadas, lo aconsejable hoy día es aislar el ARN con algún kit comercializado a tal efecto, lo que nos permite asegurar las extremas condiciones de seguridad del protocolo de trabajo descrito.

Existen diversos kits en el mercado que, básicamente, llevan todos los mismos pasos esenciales:

- 1 Lisis eficaz de las células y desnaturalización de los complejos de nucleoproteínas presentes en los extractos celulares: se utiliza para ello una combinación de detergente (SDS) con tiocianato de guanidina (TCG), que inactiva las RNAsas, permitiendo así que el ARN quede en solución y aislado de proteínas.
- 2 Inactivación de la actividad de las ribonucleasas presentes en la célula: llevado a cabo con la combinación de TCG y β -mercaptoetanol.
- 3 Eliminación de las proteínas: este paso se realiza gracias a la precipitación de las proteínas celulares a altas concentraciones de TCG mientras el ARN permanece en solución. Seguidamente una centrifugación limpia el lisado celular de proteínas y restos, logrando que el ARN precipite selectivamente.
- 4 Eliminación del ADN contaminante de las células: se suele incubar con el enzima DNasa I libre de RNAsas.
5. Dilución del ARN: El ARN total se disuelve en agua también libre de RNAsas. Con este ARN así extraído, se puede trabajar con cualquier técnica analítica para ARN.

Técnicas de análisis del material genético.

A partir del ADN y el ARN extraído, las técnicas de análisis y diagnóstico molecular son idénticas para todo tipo de tejido, e independientes de cual ha sido su protocolo de extracción. Por ello, a partir de aquí ya no nos vamos a referir en este capítulo a la muestra de origen, sino sólo al ácido nucleico utilizado.

Desde que se conoció la longitud del ADN (6×10^9 pares de bases en unos 2 m de longitud por célula), se supo que para analizar esta molécula, se tenía que solventar de alguna manera su tremenda longitud. Además, se sabe hoy día que sólo una parte muy pequeña es codificante: se estima que alrededor del 1% del ADN corresponde a los aproximadamente 25.000 genes existentes, y todo ello se encuentra “junto y revuelto” en esa “sopa” que es la suspensión del ADN una vez extraído. Para individualizar los genes, desde el principio fue evidente que sólo se podría hacer estudiándolos por fragmentos.

El primer paso se dio gracias al descubrimiento, a principios de los años 70, de unos enzimas que actúan como “tijeras” cortando el ADN: las endonucleasas de

restricción. Pronto se descubrió que los fragmentos resultantes se podían estudiar por medio de sondas, describiéndose una técnica fundamental todavía en uso: El Southern Blot. Quince años más tarde, otro hallazgo de vital importancia fue el descubrimiento de otro enzima: la Taq polimerasa, que esta vez, lo que permitía era amplificar “In Vitro” fragmentos muy concretos. Con ella llegó la técnica que “revolucionó” los estudios genéticos, la Reacción en cadena de la Polimerasa o PCR. Estas dos familias de enzimas son auténticas herramientas en la Biología molecular, como lo son también las electroforesis, las sondas, etc., gracias a las cuales es posible hoy día realizar todas las técnicas diagnósticas disponibles. Este capítulo no puede abordar más que de una forma muy resumida todo ello, pues corresponde a manuales más específicos³⁻⁸ la profundización en el tema.

Las herramientas de la Genética Molecular.

Endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son unos enzimas que se caracterizan por cortar en el interior del ADN en zonas con secuencias de bases determinadas y específicas. Las endonucleasas se descubrieron en bacterias y se conocen más de 1.000, nombrándose en la mayoría de los casos por medio de las abreviaturas del microorganismo del que se han extraído. Los puntos de corte corresponden a secuencias de 4, 6 o más bases que se llaman zonas o sitios de restricción y que están repartidas por todo el genoma. La mayoría de los enzimas de restricción que se usan en Genética molecular cortan el ADN en el interior de su zona de reconocimiento, presentando un eje de simetría llamado palindrómico, es decir, la secuencia leída de 5' a 3' es igual a su complementaria, leída también de 5' a 3', o sea a la inversa (Figura 1).

Nombre	Secuencia
Eco RI	5'.....G▼AATT C.....3' 3'.....C TTAA▲G.....5'
Eag I	5'.....C▼GGCC G.....3' 3'.....G CCGG▲C.....5'
Hinf I	5'.....G▼ANT C.....3' 3'.....C TNA▲G.....5'
Pst I	5'.....C TGCA▼G.....3' 3'.....G▲ACGT C.....5'
Not I	5'.....GC▼GGCC GC.....3' 3'.....CG CCGG▲CG.....5'

Figura 1: Algunas endonucleasas de restricción utilizadas en Diagnóstico molecular con sus sitios de restricción o puntos de corte.

Las endonucleasas de restricción fragmentan el ADN en partes siempre iguales y previsible, por lo que una mutación en una zona de restricción altera ese corte y por lo tanto el tamaño del fragmento. Este fue uno de los primeros métodos que permitió detectar de una forma sencilla las mutaciones puntuales. Las aplicaciones de las endonucleasas siguen siendo muy variadas hoy día; en el caso del cáncer por ejemplo en los estudios de metilación del promotor de varios genes. Pero es importante recordar además, que han estado en el origen del descubrimiento de muchos genes, así como de los primeros diagnósticos indirectos, gracias a los RFLPs o Fragmentos de restricción de longitud polimórfica que se pueden producir con sus cortes.

La Taq-polimerasa

Las ADN polimerasas son enzimas que catalizan la incorporación de nucleótidos simples a una molécula creciente de ADN, produciendo así su duplicación. Las ADN polimerasas necesitan un molde monocatenario, y una región bicatenaria para cebar su actuación. Pero la temperatura ideal de actuación de estas enzimas es inferior a la temperatura de unión de la mayoría de cebadores y por supuesto muy inferior a los 95°C necesarios para la desnaturalización del ADN, lo que dificultaba hace unos años las reacciones *In Vitro*. El gran hallazgo relativamente reciente en este campo, fue el descubrimiento de ADN polimerasas en microorganismos que viven en fuentes termales y cuya actividad no se altera a altas temperaturas. La primera de ellas fue la que les dio nombre, la de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq-polimerasa o Taq), pero posteriormente se han aislado enzimas similares en otros organismos termofílicos y se dispone así mismo de Taqs obtenidas por ingeniería genética. El uso principal de las ADN polimerasas termoestables es la PCR, aunque también pueden emplearse en la síntesis del ADNc, en la secuenciación, etc., como veremos en este capítulo.

Electroforesis

Como el ADN está cargado negativamente, se puede migrar mediante electroforesis en un gel de agarosa, colocándolo en los pocillos del gel realizados en el extremo del cátodo de una cubeta, para que se desplace hacia el ánodo. Ésta es la forma de separar los fragmentos de una digestión, o de visualizar si tienen el tamaño adecuado los fragmentos obtenidos tras una amplificación. La agarosa es un polisacárido purificado de agar, gelificante, de cuya concentración depende el nivel de migración. Los fragmentos se separan en función del tamaño, es decir de su peso molecular, migrando más rápidamente los de bajo peso molecular. El voltaje aplicado también interviene en la velocidad de migración. La adición de un colorante –el más utilizado es el azul

de bromofenol- permite visualizar el avance del ADN en el gel. También es importante colocar un marcador de peso molecular con una serie de fragmentos conocidos, que servirá de referencia para saber dónde se sitúa el o los fragmentos que nos interesan. Los fragmentos de ADN se visualizan posteriormente bajo luz ultravioleta, teñidos con bromuro de etidio hasta la fecha el cual, por sus efectos tóxicos está siendo reemplazado por otros compuestos que también se asocian al ADN produciendo fluorescencia, como puede ser el SYBR-Safe u otros semejantes.

Para resolver fragmentos de ADN de entre 1 y 10 kilobases (kb) de tamaño se utilizan geles al 0,8% de agarosa y para los de mayor tamaño, de 0,4%; los fragmentos de menor tamaño se migran en geles de 1,5 a 2,5%. Estos últimos son los utilizados en las electroforesis para visualizar fragmentos obtenidos por PCR pues, como más adelante veremos, son de bajo peso molecular. Para resolver fragmentos muy pequeños, incluso de unos cuantos pares de bases hemos de recurrir a geles de poliacrilamida.

El Southern Blot

Southern, en 1975, describió una técnica por medio de la cual lograba transferir los fragmentos de ADN producidos mediante las endonucleasas de restricción y separados en un gel de electroforesis, a una membrana sólida. Esta membrana, inicialmente de nitrocelulosa -hoy día de nylon- se puede hibridar con diversas sondas de ADN permitiendo un análisis muy preciso de regiones del genoma. Esta técnica histórica lleva su nombre: Southern Blot o Southern Blotting.

La transferencia se realiza con el ADN previamente desnaturalizado para que luego se pueda hibridar, lo que se consigue tratando el gel con hidróxido sódico y posteriormente con una solución neutralizadora. A continuación el gel se coloca en una bandeja con un tampón adecuado y se cubre con la membrana de nylon. Encima se ponen numerosos filtros de papel y un peso, y el conjunto se cierra con film elástico. La solución del tampón, altamente salina, pasará a través del gel hacia el filtro, arrastrando el ADN. Cuando la transferencia se haya completado, la membrana se mete en un horno para fijar el ADN y poder trabajar con seguridad de no perderlo en las hibridaciones.

Sondas de ADN e hibridaciones

Por la especificidad del apareamiento de las bases nitrogenadas del ADN, un fragmento de ADN en forma de cadena única tenderá a unirse –hibridarse- con otro

fragmento que sea exactamente su complementario. Tres puntos son importantes a reseñar cuando se habla de hibridaciones: las sondas, el marcaje y la hibridación.

- **Sondas:** Para que las hibridaciones sean de utilidad analítica, es necesario disponer de fragmentos conocidos –llamados sondas–, y que estos estén marcados para su visualización. Se suelen utilizar tres diferentes tipos de sondas: 1) Las sondas de ADN genómico, que son segmentos de ADN de doble cadena que han sido aislados y amplificados clonándolos en algún vector; 2) Las sondas de ADNc, que son también de ADN de doble cadena pero producido “In Vitro” a partir del ARNm y 3) Las oligosondas, de cadena sencilla, mucho más cortas que las anteriores y sintetizadas químicamente.
- **Marcaje:** Para la visualización del ADN hibridado con alguna sonda, hay que marcar ésta previamente. Son numerosos los tipos de marcaje, desde los radiactivos utilizados durante muchos años, hoy en desuso, hasta todo tipo de moléculas quimioluminiscentes, fluorescentes etc. En todos los casos, se necesitarán técnicas de detección específicas, con sistemas sensibles a las diversas emisiones, desde las auto-radiografías en placa, también en desuso, hasta los modernos sistemas de documentación de geles equipados también para otro tipo de emisiones como la quimioluminiscente o los potentes softwares de detección de fluorescencia de los secuenciadores.
- **Hibridaciones:** Por último, con respecto a las hibridaciones, es importante destacar que es de vital importancia ajustar las condiciones de hibridación (temperaturas y tampones) para que las cadenas complementarias se unan. Estas condiciones dependen de la naturaleza del fragmento problema a hibridar, de la sonda utilizada y del tipo de marcaje, por lo que el conocimiento a fondo de cada caso en concreto es fundamental en el diagnóstico molecular.

Técnicas de amplificación.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR como comúnmente se conoce (del inglés Polymerase chain reaction) es un método enzimático de amplificación de secuencias específicas de ADN, concebido por Kary Mullis y sus colaboradores a principios de los años 80, basándose en las propiedades de la Taq polimerasa. Este método permite la síntesis *in vitro* de un fragmento de ADN de tal forma que, en cada ciclo del proceso, se duplica el número de moléculas existentes previamente, obteniéndose así un número exponencial de copias de la secuencia concreta amplificada. Dicha metodología ha supuesto una auténtica revolución en el campo

de la Biología y la Genética molecular y su aplicación en el diagnóstico genético es en la actualidad imprescindible.

La PCR es una técnica muy simple en el concepto y en la ejecución, pero requiere conocer exactamente la secuencia que se va a amplificar. Con esta secuencia, se diseñan unos pequeños segmentos de nucleótidos - llamados iniciadores, cebadores o *primers*- complementarios a la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas que flanquean dicha secuencia. A partir de estos primers se iniciará la elongación o síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada iniciador (Figura 2).

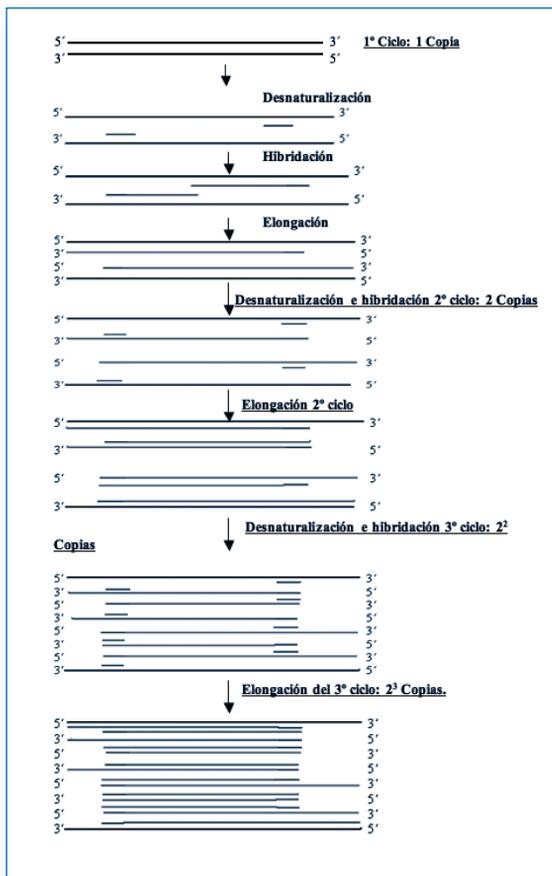


Figura 2: Esquema general del principio de la reacción de la PCR. El número final de copias obtenido será igual a 2 elevado al número de ciclos diseñados.

Para una buena efectividad de la PCR, son importantes los siguientes parámetros: un suministro abundante de *primers* y de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs); una fuente renovada de Taq polimerasa, y unos ciclos precisos y periódicos de cambios

de temperatura. Estos últimos se realizan mayoritariamente en tres etapas: la *desnaturalización* del ADN a unos 95° C, la *hibridación* de los *primers* con las secuencias de interés (entre 50 y 60° C) y la *síntesis* del ADN o *elongación* a +/- 72° C. Las temperaturas varían en esos márgenes en función de la secuencia del fragmento que se desee amplificar, que es lo importante para determinar las condiciones de la reacción. Para poder pasar de una forma eficaz y cómoda de una temperatura a otra, se realiza todo el proceso de forma automática en unos aparatos llamados termocicladores. Con ellos, el poder de la amplificación por PCR es tan alto, que hasta los más pequeños contaminantes pueden ser también amplificados, proporcionando falsos positivos, por lo que el material y las soluciones a emplear deben estar muy controlados.

En la realización de una PCR si se incluye sólo una pareja de iniciadores o *primers*, obtendremos un único producto de PCR, pero pueden añadirse más de una pareja de iniciadores obteniéndose así más de un producto de PCR; esto es lo que se conoce como PCR múltiplex. Para poder incluir más de una pareja de iniciadores en la reacción de PCR es necesario que los productos resultantes de cada par tengan diferente tamaño, pero que las condiciones de amplificación sean las mismas.

Las aplicaciones de la PCR son múltiples y parecen estar sólo limitadas por la imaginación de los científicos. Los productos de PCR se someten a todo tipo de electroforesis y/o técnicas complementarias que se describirán a continuación, para analizar el fragmento amplificado. Por ejemplo: una simple digestión con endonucleasas de restricción de un fragmento PCR, y su posterior migración en un gel de agarosa con tinción de Bromuro de Etidio, nos puede mostrar una mutación de un cambio de base que afecte al sitio de restricción, como se puede apreciar en la Figura 3.



Figura 3: Digestión con un enzima de restricción de un fragmento de PCR de diversos individuos de una familia en donde se segrega un polimorfismo del gen BRCA1. M es un marcador de pesos moleculares y la línea 5 es el producto PCR bruto sin digerir. Las líneas 3, 4 y 7 corresponden a la digestión de los individuos que llevan los dos alelos en homocigosis y las líneas 1, 2, 6 y 8 muestran la digestión de los individuos que llevan los dos alelos polimórficos en heterocigosis.

Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

La RT-PCR es un método sensible y versátil empleado para obtener ADNc libre a partir de ARNm, que puede ser fácilmente adaptado para identificar mutaciones y polimorfismos en las secuencias transcritas y medir la expresión de un gen cuando la cantidad de ARNm es limitante y/o cuando el ARN de interés se expresa en muy bajo nivel.

La RT-PCR utiliza como molde ARNm, y el enzima que sintetiza las nuevas moléculas es la transcriptasa inversa o reversa. La transcriptasa reversa es una enzima utilizada por todos los retrovirus y retrotransposones que transcriben a ADN la información genética del virus o retrovirus -que es ARN-, para que pueda integrarse en el genoma del huésped. Igual que en los organismos vivos, el primer paso de la RT-PCR en el laboratorio es la conversión enzimática del ARN a ADNc de cadena simple, para lo que se utiliza un *primer* sintético de oligodeoxinucleótidos que se hibrida al ARNm y es extendido por la ADN polimerasa dependiente de ARN o transcriptasa reversa. Dependiendo del propósito del experimento, el *primer* para la síntesis del ADNc puede ser específicamente diseñado para hibridarse a una región particular de un ARNm en concreto, o puede unirse a todos los ARNm; en este caso utilizaremos los llamados *random* hexanucleótidos. Estos son *primers* que se unen a zonas del ARN comunes a la mayoría de los ARNm, de forma que son copiados a ADNc todos los ARNm que se han extraído y no los de un gen en concreto.

PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real también llamada PCR cuantitativa a tiempo real (RTQ-PCR), es un método de amplificación y de cuantificación de ADN simultáneamente, de tal forma que después de cada ciclo de amplificación, el ADN es cuantificado. Para ello, se utiliza un marcaje fluorescente que se intercala en las cadenas dobles de ADN que se están sintetizando y modifican las sondas de oligonucleótidos de ADN que fluorescen cuando se hibridan con un ADN complementario. Normalmente, la PCR a tiempo real se utiliza combinada con la RT-PCR, de tal forma que permite cuantificar la abundancia de ARNm, es decir, la expresión relativa de un gen en un tiempo, en una célula particular, o en un tipo de tejido.

Como en las anteriores técnicas de PCR que hemos visto, son necesarios diversos pasos para desarrollar un ensayo de PCR cuantitativa. Esto incluye la obtención de una muestra limpia, el diseño de *primers* específicos, y una optimización de las condiciones de reacción. Para algunos genes, todas estas condiciones de PCR están organizadas en una base de datos accesible on-line: (<http://www.realtimeprimers.org>)

que facilita la realización del ensayo. Como en cualquier otra reacción de PCR, el producto de la PCR en tiempo real se duplica en cada ciclo y las sondas que se unen al ADN de doble cadena emiten fluorescencia que es recogida por el termociclador adecuado para este tipo de reacción, y así se va cuantificando. La gráfica que representa esta fluorescencia con respecto al número de ciclos da una curva sigmoideal. El momento o punto donde la fluorescencia comienza a incrementarse rápidamente, se denomina ciclo *threshold* (Ct). Si se comparan los valores de Ct entre diversas reacciones de un mismo producto, pero de diversos pacientes, o de diferentes tejidos de un mismo paciente, podremos calcular la concentración inicial del ARNm y medir de esa forma si su expresión es normal o está alterada.

Técnicas de detección de mutaciones.

La detección de mutaciones es el aspecto fundamental en el diagnóstico molecular de las enfermedades hereditarias, confirmando la causa genética de la enfermedad, además de contribuir al entendimiento de la estructura de las proteínas, su funcionamiento y expresión. También es importante en el diagnóstico de pacientes asintomáticos, estudiando el modo de herencia en una familia, descubriendo portadores e intentando predecir el fenotipo clínico, sobre todo en los casos de familias con penetrancia incompleta o con nuevas mutaciones. La detección precisa de una mutación la dará en la mayoría de los casos la lectura de su secuencia, pero no siempre se empieza estudiando ésta directamente, ya que existen diversas tecnologías que sirven para identificar la presencia de diferencias en las secuencias sin precisarlas, y así reducir el número de muestras que es necesario secuenciar.

Existen muchos métodos de cribado de mutaciones^{6,7} o, más correctamente hablando, de detección de alteraciones en el ADN, ya que no todas son mutaciones responsables de enfermedad. Cada uno suele ser específico de la secuencia a estudio, del tipo esperado de mutación (mutación puntual, delección, reordenamiento complejo, etc.), del tamaño y estructura del locus y/o gen a estudio, así como de si las mutaciones son conocidas o desconocidas. La fiabilidad y la sensibilidad analítica de las diferentes técnicas varía de una a otra, y de un laboratorio a otro, pero con todas, lo que se pretende es que el estudio de genes de gran tamaño se realice con la mayor rapidez y de la forma más económica posible, ya que de otra manera su abordaje sería sólo posible por muy pocos y escogidos laboratorios.

Hasta hace poco, en el caso de mutaciones conocidas, si se trataba de grandes deleciones, el *Southern Blot* que ya se ha descrito era una buena técnica. Para el caso de mutaciones puntuales, si se sabe o se imagina que éstas alteran un sitio de restricción, podemos usar la técnica del *Corte enzimático*, que consiste en una simple PCR seguida de una digestión con el enzima de restricción adecuado, algo que también se ha visto previamente (Figura 2). Pero como en el caso de los genes que predisponen al cáncer, de lo que se trata es de buscar una mutación desconocida en un primer individuo en la familia o caso índice, disponemos hoy día de numerosas técnicas de cribado, de las que describimos a continuación las más utilizadas:

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

La electroforesis en geles de gradientes desnaturalizantes (DGGE), hace posible la detección de polimorfismos y/o mutaciones del ADN basándose en dos principios: 1) las propiedades de renaturalización de las cadenas de ADN, que pueden formar heteroduplex cuando hay una alteración, debido a un apareamiento incorrecto entre las cadenas normales y las alteradas y 2) la diferente migración de los fragmentos de cadena sencilla en función de su secuencia. La técnica comienza con una PCR del fragmento a estudio en la que, para producir los heteroduplex, se debe añadir después del último ciclo un ciclo de desnaturalización y otro de renaturalización. Los productos de PCR se someten entonces a una electroforesis en un gel de poliacrilamida, bajo condiciones de desnaturalización progresiva (con concentraciones de formamida o urea definidas para cada estudio) con las que el ADN va separando su doble cadena hasta convertirse en ADN de cadena simple. Esta estructura, así modificada, reduce la capacidad de las moléculas para moverse a través del gel, y la migración de los fragmentos se retarda, algo que se favorece además por la utilización de cebadores con una cola de CGs. Como el punto en el que el ADN se separa, llamado punto de fusión o Temperatura de "meeting" (T_m) depende de la secuencia de los nucleótidos, una mutación puntual implicará una modificación de la T_m y la ubicación final de las moléculas en el gel no será la misma. Caso de haber alteraciones, el resultado será la visualización de diferentes bandas en el gel (Figura 3).

La DGGE distingue con precisión los genotipos homocigotos de los heterocigotos para un fragmento determinado de ADN: los individuos homocigotos -tanto si son normales como si están mutados o alterados- formarán homoduplex que migran en una sola banda, pero la migración será diferente si tienen diferente secuencia, aun-

que sólo se diferencien en una sola base. Los genotipos heterocigotos presentarán cuatro combinaciones que corresponden al ADN normal, al mutado y a los dos tipos de heteroduplex posibles que se forman a causa del emparejamiento erróneo y de la desnaturalización rápida en el gel (Figura 4).

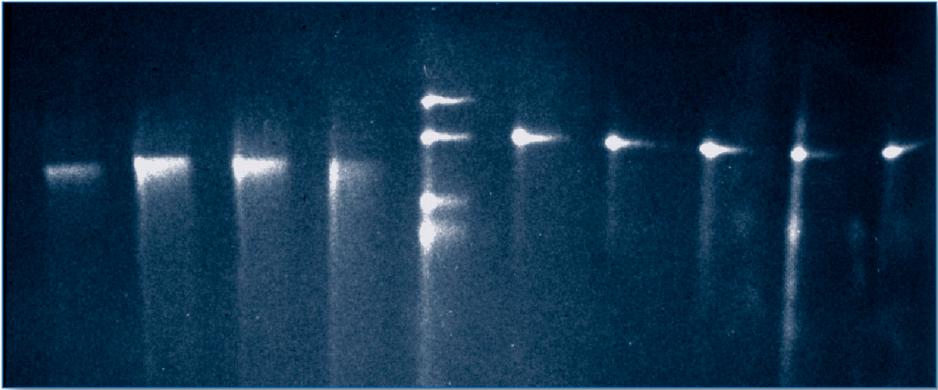


Figura 4: Productos de PCR de un fragmento de ADN que contiene un polimorfismo, migrados en un gel de DGGE. Las cuatro primeras carreras corresponden a una de las variantes en homoduplex y las cinco últimas a la otra variante también en homoduplex. En la 5ª carrera (de izquierda a derecha) un fragmento es heterocigoto, lo que produce las cuatro combinaciones homoduplex y heteroduplex posibles. La visualización se realiza con una simple tinción con Bromuro de Etidio.

La DGGE ha sido una técnica muy utilizada, ya que permite detectar casi el 95% de las diferencias en la composición de las secuencias y no es necesario el uso de isótopos radiactivos. Sin embargo, para cada fragmento a estudio hay que poner a punto las condiciones de desnaturalización utilizando un programa informático complejo, por lo que la puesta a punto inicial es compleja y de mayor coste que otras por los oligonucleótidos con el extremo CG.

Una variante de la DGGE es la electroforesis en geles de gradiente de temperatura (TGGE). En esta variante, las condiciones de desnaturalización progresiva se logran mediante un gradiente de temperatura, y no por cambios en la concentración de los reactivos, como sucede en la DGGE. Este método es interesante porque puede emplearse también para analizar ARN de cadena simple y proteínas.

Conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE)

Los dos principios en los que se basa esta técnica son los mismos que en la DGGE, excepto que aquí los geles no son desnaturalizantes. El método está basado sólo en el principio de que los homoduplex y heteroduplex de ADN tienen diferente movilidad cuando se les somete a un campo eléctrico.

En la CSGE, los productos de PCR son sometidos a un proceso de desnaturalización y posterior reasociación de forma lenta, disminuyendo la temperatura desde 95°C hasta los 20°C. Cualquier acoplamiento erróneo entre las hebras de ADN dará lugar a una estructura tridimensional diferente, cuya movilidad se reducirá proporcionalmente al grado de divergencia de las secuencias (Figura 5).

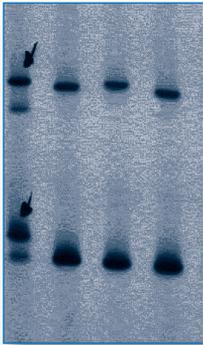


Figura 5: Productos de PCR de los exones 2 y 20 del gen BRCA1 migrados mediante la técnica CSGE y teñidos con plata. Si comparamos la primera carrera con las tres siguientes, se observa la diferente migración que indica la sospecha de una posible mutación en el exón 20.

Las electroforesis en la CSGE se llevan a cabo a unos 210 V durante toda la noche en geles de acrilamida que se suelen teñir con nitrato de plata. Las muestras que presenten más de una banda serán las que posteriormente habrán de ser secuenciadas –como en la DGGE– para determinar el tipo de variación. Este método de búsqueda de mutaciones se ha extendido notablemente dado que tiene una alta especificidad (casi el 100%), una sensibilidad aceptable, –entre 76 y 96% según los diversos estudios–, y no se necesita radiactividad.

Heteroduplex Analysis by Capillary Array Electrophoresis (HA-CAE)

Se ha descrito muy recientemente una variante de la técnica CSGE que es el análisis de los heteroduplex por electroforesis capilar. Es una adaptación de la técnica CSGE a un sistema multicapilar basado en la detección de los fragmentos por fluorescencia. Para ello, se utilizan cebadores o *primers* marcados fluorescentemente en reacciones de PCR “multiplex”, seguido de la formación de heteroduplex y posterior electroforesis en un secuenciador de ADN multicapilar. Es una técnica muy reciente, que parece tener una alta sensibilidad y especificidad, y además es muy rápida, ya que se puede

analizar por ejemplo los exones de los genes BRCA1 y BRCA2 de 2 pacientes de una sola vez, si el secuenciador utilizado contiene 16 capilares ¹¹ (Figura 6)

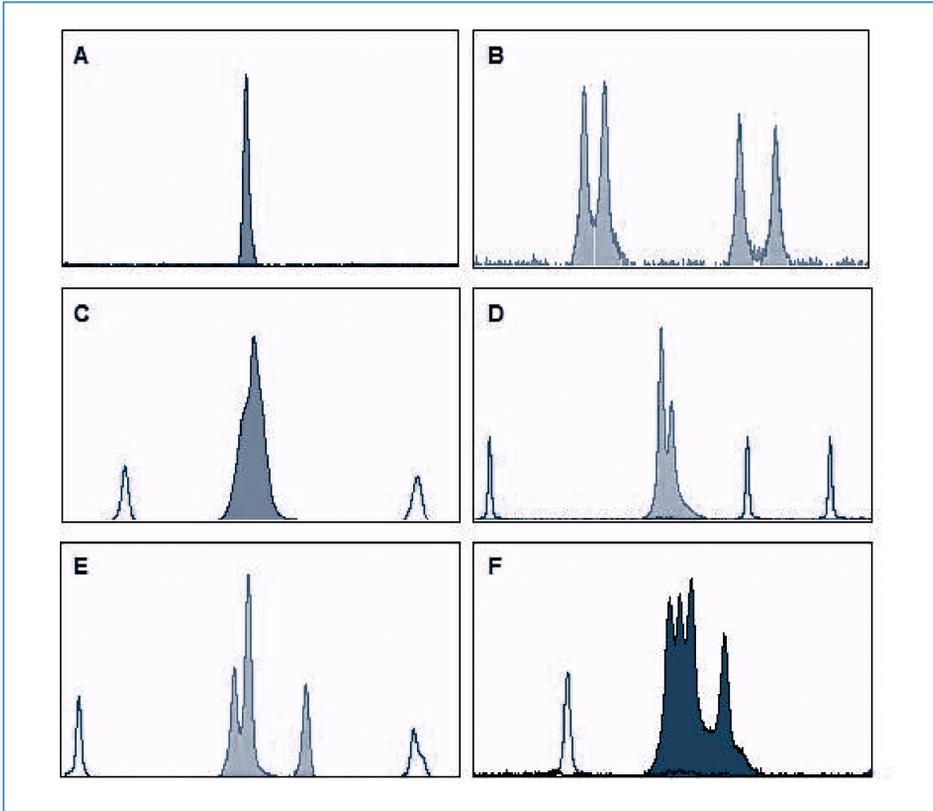


Figura 6: Electroferogramas de análisis de heteroduplex capilar mostrando el patrón normal (A), patrón alterado correspondiente a una mutación del tipo inserción/delección (B), y el amplio rango de patrones que presentan las sustituciones de nucleótido (C-F). B) Mutación deletérea frameshift c.9538_9539delAA (BRCA2); C) polimorfismo missense c.3199G>A, p.N991D (BRCA2); D) mutación missense c.7987C>T (p.L2587F) de BRCA2; E) mutación patogénica non-sense c.7288C>T (p.Q2354X) de BRCA2; F) Mutación missense c.2353C>G (p.L709V). La escala de grises es debida a la utilización de tres colores diferentes (azul, verde y gris), que reflejan los tres fluorocromos empleados (FAM, HEX y NED, respectivamente). Los picos sin fondo (rojos en el original) muestran el estándar de tamaño Genescan ROX-500.

Foto cedida por Eladio Velasco Sampedro, del Instituto de Biología y Genética Molecular de la Universidad de Valladolid.

Por tanto, las ventajas de esta variante frente a la que necesita geles, son la rapidez y el menor coste económico. La desventaja es que requiere de un equipamiento que no está disponible en todos los laboratorios de forma continuada.

Single-Stranded Conformation Polymorphism (SSCP)

La *Single-Stranded Conformation Polymorphism* o SSCP es una técnica sencilla, que se fundamenta en los cambios de conformación que presentan dos cadenas sencillas de ADN que difieren entre sí en un único nucleótido. Los principios en los que se basa son parecidos a los de las tres técnicas que se han expuesto previamente excepto que aquí se migra desde el principio el ADN en forma de cadena sencilla y por lo tanto no se forman heteroduplex. Es por ello una técnica de utilidad para el cromosoma X, así como para estudios de ARN.

El gen que se desea estudiar se amplifica como antes en fragmentos mediante PCR. Los productos de PCR se desnaturalizan a 94°C y se enfrían rápidamente en hielo con el fin de impedir su reasociación. Las moléculas de cadena simple forman estructuras secundarias estables en las que una sola alteración cambia su movilidad en el gel y ese es el principio de la SSCP. La visualización en el mismo se logra generalmente marcando el ADN con un nucleótido radiactivo que se introduce en la PCR (normalmente el ³²P dCTP) y las bandas se detectan en una placa fotográfica tras exposición a -80°C. El método es muy resolutivo y su aplicación es técnicamente simple pero, dado que el cambio de movilidad decrece a medida que aumenta el tamaño del fragmento, esta técnica sólo es útil para fragmentos cortos de ADN (90% de eficacia para fragmentos de unas 200 pb). Si se trata de fragmentos más largos (300-350 pb), el método se vuelve insensible a algunas mutaciones. Además, el comportamiento electroforético de las moléculas de cadena simple es bastante impredecible, ya que depende mucho de la temperatura, de los aditivos y de las condiciones en que ocurre la migración. El límite de detección de este método puede incrementarse de todas formas utilizando ARN ya que su estructura secundaria es mucho más sensible a un cambio de secuencia.

Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

La DHPLC es un método de cromatografía líquida de alto rendimiento que puede detectar diferencias de secuencia tanto de un solo par de bases, como también las inserciones y deleciones. Está basada en los perfiles de desnaturalización que pre-

sentan las moléculas de ADN homoduplex y heteroduplex que se separan por una cromatografía líquida de fase reversa a través de una matriz especial que utiliza un gradiente de concentración de acetonitrilo y una temperatura parcial desnaturante. En este método, el producto de PCR se utiliza directamente, sin pasar por ningún proceso previo como sucede con los tres métodos descritos previamente. A lo largo de la reacción PCR, en un fragmento amplificado de ADN, se crea una mezcla de heteroduplex y homoduplex debido a los nucleótidos que se asocian erróneamente a causa de mutaciones y/o polimorfismos. Si esta mezcla de fragmentos se hace migrar mediante DHPLC en condiciones parcialmente desnaturantes, los heteroduplex fluyen de la columna antes que los homoduplex debido a su temperatura de fusión más baja. Esta técnica requiere una alta optimización de las condiciones para cada fragmento de PCR siendo necesaria la utilización de múltiples temperaturas para alcanzar un grado de sensibilidad del 100% ¹². La DHPLC es por tanto una técnica tremendamente sensible pero muy compleja, que requiere un aparataje costoso y una cuidadosa interpretación. Otra desventaja de esta técnica con respecto a las anteriores, es que la migración y análisis se ha de hacer exon por exón o fragmento por fragmento, por lo que no se pueden realizar amplificaciones múltiples mientras que en las técnicas anteriores se puede llegar a analizar hasta cuatro fragmentos a la vez.

Protein truncating Test (PTT)

La PTT o Test de la proteína truncada es un método diseñado de forma específica para detectar mutaciones que causan la aparición de un codón de parada (o codón stop) prematuro en la secuencia del ADN, produciendo una proteína mas pequeña o proteína truncada. Es un método técnicamente complejo, muy sensible para este tipo de mutaciones pero inaplicable para la detección de otro tipo de variaciones del ADN.

El método consiste en la amplificación mediante PCR de distintas regiones del fragmento a estudio utilizando cebadores que, además de contener su secuencia homóloga, contienen la secuencia del lugar de iniciación de la transcripción para la ARN polimerasa de T7, y un codón ATG de iniciación. Los fragmentos amplificados se utilizan como moldes en una reacción de transcripción *In vitro* utilizando la ARN polimerasa de T7, obteniéndose así moléculas de ARN que son simultáneamente traducidas a proteína en presencia de un aminoácido marcado. Las proteínas obtenidas se cargan en un gel de acrilamida-SDS, que permite detectar su tamaño

y por ello, la aparición de proteínas con un tamaño inferior al esperado respecto a un control de secuencia normal, que sería indicativo de la existencia de una mutación de codón stop.

High-Resolution Melting (HRM)

El análisis por *High Resolution Melting* (HRM) es un nuevo método introducido en 2003 por la Idaho Technology and the University of Utah¹³, para mejorar las técnicas que se han comentado previamente, que utilizaban el llamado punto de fusión o temperatura de *melting* para diferenciar una secuencia de otra mutada. En los últimos años se ha mostrado como una técnica muy prometedora de cribado de mutaciones con numerosas publicaciones que demuestran su aplicabilidad en diversos tipos de variaciones de secuencia (polimorfismos, mutaciones, diferencias epigenéticas, etc) porque utiliza fragmentos amplificados por PCR pero sin necesidad de realizar tratamientos post-PCR.

El análisis por HRM requiere una amplificación inicial por PCR de la secuencia diana en presencia de un marcador de unión al ADN que genera un fuerte señal fluorescente sólo cuando se une a la doble cadena de ADN. Estos productos de PCR se calientan luego forzando al ADN a pasar de cadena doble a cadena sencilla con el resultado de una disminución en la fluorescencia. En el caso de normalidad –la llamada secuencia salvaje-, se produce un perfil o curva de *melting* característico de cada fragmento, con un punto de *melting* típico que es el punto donde la fluorescencia es mayor a una temperatura dada. Las variaciones o mutaciones presentes en otras muestras pueden ser detectadas tanto como un desplazamiento en el punto de *melting* de la curva, o como un cambio en la forma de dicha curva de *melting*. Los perfiles de las curvas de *melting* se comparan utilizando un software específico que determina por sí mismo el genotipo de las muestras analizadas por HRM, siendo por lo tanto un proceso simple y semi-automático, no necesitándose experiencia ni en hibridación ni en marcaje de sondas.

Secuenciación

Para cambios de una o unas pocas bases, la secuenciación es considerada como la técnica última, la definitiva (Gold Standard), aquella por la cual se sabe exactamente si un fragmento está o no alterado y qué cambio lleva. Aunque utilizada en algunos laboratorios como método directo de búsqueda de mutaciones, no es norma general,

debido a su alto coste y al equipamiento que requiere. Por ello se recurre a la secuenciación sólo en aquellos casos en los que se ha visto, mediante cualquiera de las técnicas previamente explicadas, que hay una alteración en la secuencia.

La técnica utilizada hoy día se basa en la ideada por el equipo de Sanger y colaboradores en el año 1977⁸ utilizando ADN polimerasa y los terminadores de cadenas llamados didesoxinucleótidos. Se trata de una síntesis enzimática que, por acción de una ADN polimerasa y a partir de un primer u oligonucleótido cebador de secuencia complementaria a la molécula del ADN a estudio y convenientemente marcado, va incorporando al extremo 3' de la cadena en crecimiento dNTPs (2'-desoxinucleótidos) y ddNTPs (2',3'-didesoxinucleótidos) que se encuentran juntos en la mezcla de reacción. Los ddNTPs difieren de los dNTPs en que les falta el grupo hidroxilo del carbono 3' del azúcar, de manera que su incorporación evita la formación del enlace fosfodiéster entre la cadena en crecimiento y el siguiente nucleótido a incorporar, y esto consigue que no se incorporen más nucleótidos por lo que la cadena que se está sintetizando se detiene. Con ello, se generan al azar fragmentos de ADN de todos los tamaños de forma controlada en posiciones específicas.

Con el gran desarrollo tecnológico que ha habido en los últimos años, las técnicas de secuenciación han mejorado sensiblemente y se han automatizado. Hoy día, las reacciones de secuencia se llevan a cabo en termocicladores y la separación de los fragmentos generados se realiza en un secuenciador automático. La utilización de termocicladores permite controlar las temperaturas automáticamente y poder repetir los ciclos tantas veces como sea necesario, a diferencia del método original en el que solo se realizaba un ciclo. De esta manera se obtiene una elevada sensibilidad al ser necesaria una menor cantidad de ADN. Otra ventaja importante es que se puede llevar a cabo la secuenciación directa a partir de los productos de PCR del fragmento a estudio, mientras que las primeras moléculas secuenciadas con la técnica de Sanger eran a partir de productos clonados cuya obtención era muy costosa y laboriosa.

Otra mejora importante con respecto al método inicial ha sido la referente al tipo y forma de marcaje de los oligonucleótidos ya que al principio, había que trabajar con radiactividad y con cuatro tubos diferentes. Hoy día se utiliza el llamado método de secuenciación de terminadores marcados, en el que se marcan los cuatro ddNTPs con una molécula fluorescente –fluorocromo- diferente cada uno, por lo que la reacción se realiza en un único tubo. Los fragmentos obtenidos se identifican por el último nucleótido de cada fragmento gracias al tipo de molécula fluorescente que tiene li-

gada. Además, en el mismo secuenciador automático se realiza la separación electroforética de los fragmentos y la detección de los productos.

Los secuenciadores contienen un láser que excitan las moléculas fluorescentes en una longitud de onda y la fluorescencia es detectada por una cámara de detección. Los datos obtenidos por esta cámara son transmitidos a un software adecuado que los interpreta y les asigna el nucleótido. Con ello, los resultados se muestran en forma de electroferogramas que presentan a los fragmentos de ADN marcados en forma de picos en el eje de las "Y", con el tiempo de la electroforesis en el eje de las "X". Cada pico es identificado según el fluorocromo usado para los cuatro nucleótidos: A, T, G, o C (Figura 7).

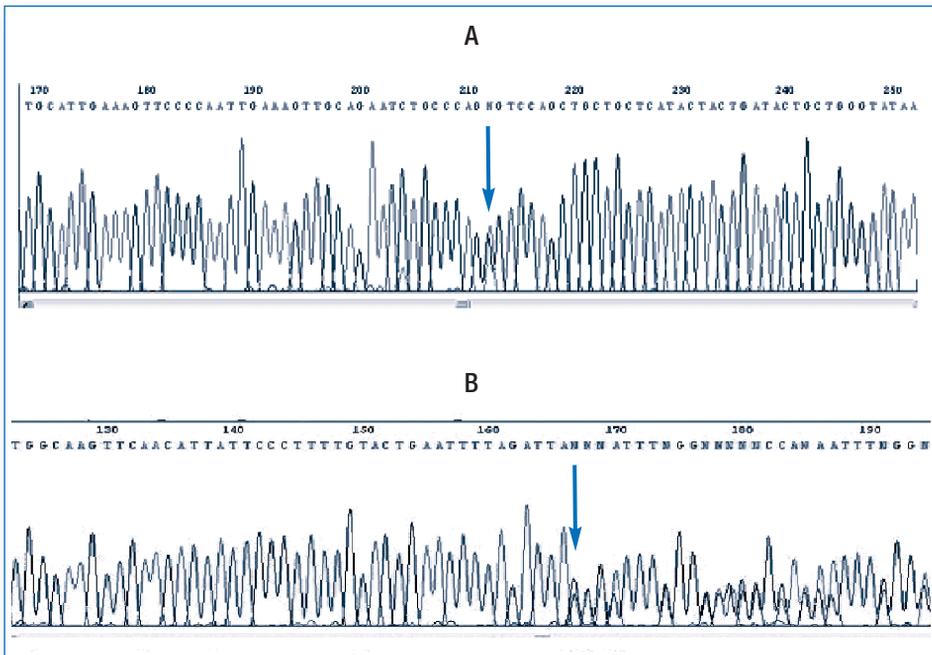


Figura 7. Electroferogramas de secuencias: A) Fragmento del exón 16 del gen BRCA2: la flecha indica una mutación puntual; B) Fragmento del exón 10 del gen CHEK2: la flecha indica la deleción 1100delC.

Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)

Las técnicas descritas hasta aquí, sólo pueden detectar cambios de una o de unas

pocas bases. Para la búsqueda de mutaciones producidas por alteraciones en fragmentos más grandes se ha utilizado mucho el Southern Blot tal y como se ha dicho, pero recientemente se han descrito dos nuevas técnicas: la MLPA y la MAPH, esta última ya en desuso por su compleja manipulación. El MLPA permite detectar cambios en el número de copias de la secuencia del genoma, es decir, permite averiguar si hay duplicaciones, inserciones y deleciones y ello, tanto para fragmentos pequeños, como para fragmentos grandes, del orden de varios exones e incluso de genes enteros. Es una técnica que se ha extendido de forma rapidísima en los últimos tiempos ya que utiliza muy poca cantidad de ADN al basarse en PCR múltiple y permite amplificar simultáneamente hasta 45 secuencias específicas (Figura 8).

El principio de la MLPA ¹⁴ (cuyo protocolo de trabajo esta disponible en la pagina Web: www.mrc-holland.com) se basa en la hibridación del ADN a estudio con dos oligonucleótidos o sondas, seguida por una unión (*ligation*) de ambas sondas y posterior amplificación por PCR de los productos ligados. La sonda de la izquierda presenta una secuencia de unión específica para cada fragmento a estudio y una secuencia terminal que es común a todas las sondas y que posteriormente servirá de región de unión para los cebadores en la PCR. La sonda de la derecha es más larga y esta compuesta por las dos regiones presentes en la sonda de la izquierda mas una secuencia espaciadora. Esta secuencia espaciadora se ha diseñado de manera que tenga diferente número de bases para cada fragmento, con lo que se determina así el tamaño final de cada uno de los productos amplificados por PCR, lo que permite diseñar múltiples fragmentos diferentes que, tras migrar en un secuenciador, se separaran según su tamaño (Figura 8).

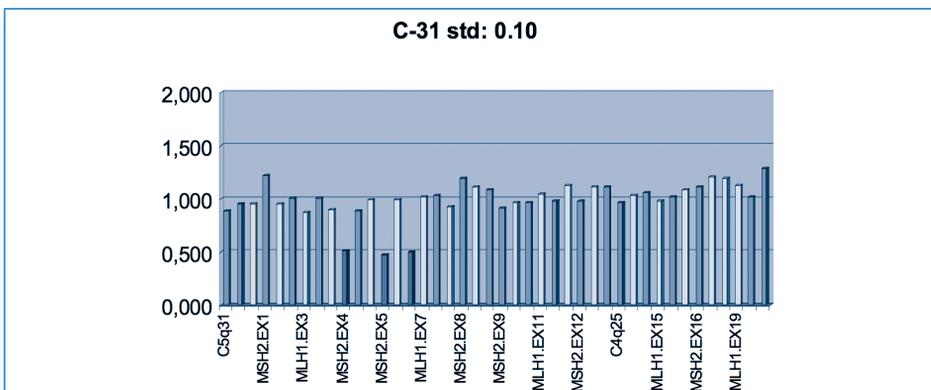


Figura 8: Electroferograma del gen MSH2 mostrando una deleción de los exones 4, 5 y 6 en un caso de Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico.

Como en todas estas técnicas, se requiere un equipamiento adecuado en el laboratorio y un entrenamiento en la interpretación de los electroferogramas, además de sondas específicas diseñadas para cada región del genoma a estudio. Pero como hemos dicho, a pesar de todo ello esta técnica se está implementando de forma muy rápida por su extremada sensibilidad y versatilidad y por el rápido diseño de sondas para diferentes regiones que está realizando el equipo de MRC-Holland.

Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments (QMPSF)

La QMPSF es otro método que ha demostrado ser sensible para la detección de deleciones y duplicaciones, y que por ello es utilizado normalmente en algunos laboratorios de diagnóstico molecular. Se trata de un método por el que secuencias genómicas cortas son amplificadas simultáneamente bajo condiciones de PCR adecuadas utilizando primers marcados, y posteriormente los fragmentos resultantes son migrados en un secuenciador automático. La determinación de las variaciones en el número de copias se consigue normalizando los resultados obtenidos frente a controles normales ¹⁵.

Otras técnicas

Alteraciones epigenéticas

Inestabilidad de microsatélites.

Los microsatélites son secuencias repetitivas cortas de ADN, que se repiten de forma polimórfica en la población. A principios de los años 90 se puso de manifiesto que en algunos tejidos tumorales, se presentaba una mayor inestabilidad en algunos microsatélites (IM), y que ésta iba asociada sobre todo a mutaciones en los genes de reparación de errores de apareamiento del ADN, los Mismatch repair genes (MMR), responsables del cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP).

Hoy día se conocen perfectamente los microsatélites inestables en el CCHNP y existen kits comercializados para su amplificación por PCR, y posterior separación y estudio en un secuenciador automático, por lo que la técnica no merece una mayor explicación en este capítulo. Simplemente señalar, que es importante estudiar tanto el tejido tumoral como el tejido sano para poderlos comparar, y que se considera inestabilidad positiva, cuando se observan diferencias en el número de repeticiones en

más de dos microsatélites informativos, siendo un microsatélite informativo áquel en el que se pueden distinguir los dos alelos, es decir los heterocigotos.

La técnica de inestabilidad de microsatélites permite un cribado previo importante de los casos de CCHNP antes de pasar al estudio de los genes responsables del mismo y es de gran utilidad en la práctica clínica.

Metilación

El cáncer es una patología debida a factores genéticos y ambientales. La estabilidad del genoma así como la correcta expresión génica, están mantenidas en gran medida por un patrón prefijado de metilación del ADN. Este equilibrio se destruye en el cáncer, pues las regiones reguladoras de algunos genes supresores de tumores se hipermetilan (como ocurre en p16, BRCA1, hMLH1 y p14) y ello conduce a la inactivación del gen.

La metilación de la citosina que se localiza en el dinucleótico CpG es la principal modificación epigenética en humanos¹⁶⁻¹⁸. Los dinucleótidos CpG no están distribuidos al azar, sino que existen zonas especialmente ricas en ellos denominadas islas CpGs, que normalmente no están metiladas en tejido normal, y que se localizan en las regiones iniciales de los genes o promotores. Si las islas CpG presentan metilación, los factores de transcripción no pueden unirse y el gen no se transcribe.

La tecnología que ha permitido estudiar la metilación se basa en la modificación del ADN con bisulfito sódico, acoplada con PCR. El tratamiento con bisulfito convierte la C no metilada en T pero mantiene la C metilada. Tras el tratamiento con bisulfito, la amplificación de los fragmentos de interés se lleva a cabo de dos formas: bien mediante cebadores específicos de metilación (en Inglés *MSP* o *methylation-specific polymerase chain reaction*), bien mediante cebadores inespecíficos que amplifican tanto las secuencias metiladas como las no metiladas. También se puede asociar el tratamiento con bisulfito a PCR cuantitativa, o a análisis de restricción o a secuenciación, para realizar otras técnicas complementarias¹⁰.

Pérdida de heterocigosidad

De la misma forma que hemos visto para la IM, la pérdida de heterocigosidad (LOH) de algunos locus o fragmentos concretos de ADN puede ser una señal fiable de que existen anomalías en los genes supresores de tumores. De ahí que es importante su puesta a punto en un laboratorio. Estos estudios permiten extrapolar los resultados de los marcadores con pérdida de heterocigosidad utilizados a la presencia de mutaciones

heterocigotas o incluso homocigotas en el gen supresor adyacente. Los marcadores que se seleccionen para el estudio, igual que en el caso de la IM, han de ser informativos, es decir, heterocigotos, y se han de estudiar en tejido normal y en tejido tumoral. Cuando el locus es informativo, se considera que existe una pérdida de heterocigosidad (LOH) si la señal de intensidad de un alelo frente a otro se reduce de modo apreciable al comparar el amplificado del ADN constitutivo con el del ADN tumoral del locus en estudio.

Análisis de la expresión de los genes mediante *microarrays*.

Un *microarray* es una matriz donde existen miles de sondas de material genético las cuales tienen una secuencia conocida. Al poner una muestra problema en estas matrices, aquellas cadenas que tienen una secuencia complementaria a las del *microarray* se hibridarán. Para analizar los resultados, se han de usar diversos programas informáticos y softwares complejos, y el tratamiento computerizado de los datos permitirá determinar aquellas secuencias que no hibridan, es decir, las que son patológicas.

La tecnología *microarray* se está desarrollando con una gran rapidez. Inicialmente se puso a punto para el estudio de la expresión de los genes, es decir, con sondas de ARN, lo que permite el análisis comparativo y simultáneo de la expresión de cientos de genes en un sólo experimento. Para el estudio de tumores, estos *microarrays* son de extrema utilidad debido a la gran cantidad de proteínas implicadas.

Con el avance de la técnica, sobre todo en el apartado de la inmovilización de las muestras en la matriz, se han desarrollado otros tipos de *microarrays*: de cadenas de oligonucleótidos, de ADNc, de proteínas y de tejidos. A pesar de lo sofisticado de esta técnica, el proceso de laboratorio no es complicado: una hibridación con la muestra problema seguido de la eliminación de todas las cadenas que no se han unido mediante lavados (sólo las moléculas que hibridan permanecerán en el *micorarray*), y el revelado mediante un escáner óptico o con microscopía láser. Dentro de todo este proceso, la fase más importante es el revelado, pues es cuando se visualizan los puntos de la matriz en donde se ha producido hibridación. Suelen emplearse marcadores fluorescentes, que son estimulados por una cierta longitud de onda liberando fotones en una longitud de onda distinta que es detectada por un dispositivo que captura la imagen en forma de puntos de diferente intensidad. Si se emplean varios marcadores se obtienen sucesivas imágenes de la muestra a diferentes longitudes de onda y después se establece un ratio de intensidades. Normalmente se marcan en rojo y verde, uno para

las sondas unidas al *microarray* o soporte y el otro para marcar la muestra a analizar. Según haya hibridación o no y la cantidad que haya de hibridación, obtendremos un patrón de intensidad que ha de ser interpretado. Con toda esta información, se iniciará el análisis de los datos con un software especializado siendo el estudio e interpretación de los resultados el apartado de mayor dificultad y complejidad. Aún así, las aplicaciones de esta tecnología se están extendiendo con una gran rapidez y son muy prometedoras en el campo del Diagnóstico molecular del Cáncer hereditario, pues habiéndose empezado con *microarrays* de expresión como hemos dicho, muy recientemente se ha descrito por ejemplo una plataforma (Zoom-in CGH array)¹⁹ para detectar reordenamientos precisos en los 6 genes más importantes de susceptibilidad al cáncer. Nos espera todavía un gran futuro por delante en el campo de la tecnología molecular.

Resumen

- Las técnicas de Diagnóstico molecular del Cáncer hereditario se realizan a partir de muestras biológicas del paciente con cáncer, pudiéndose también estudiar a sus familiares asintomáticos.
- Los estudios han de partir preferiblemente de sangre periférica, aunque también puede ser útil el estudio de muestra tumoral. En cualquier caso, es importante que el clínico consulte siempre al laboratorio las condiciones de la toma de muestra pues de ella se puede obtener tanto ADN como ARN.
- Las técnicas de análisis del material Genético se basan desde hace unos 30 años en una serie de “herramientas”, -como son las enzimas (de restricción, polimerasas, etc.) y las sondas-, con las que se realizan toda una serie de reacciones (PCR, Southern, hibridaciones, marcajes diversos, etc.).
- Las técnicas de detección de mutaciones son hoy día muy diversas, pero en cualquier caso, lo más importante es utilizar en cada laboratorio aquellas que den una mayor sensibilidad en un cribado inicial, para posteriormente secuenciar y determinar exactamente el cambio en el ADN.
- Para los reordenamientos más complejos, novedosas y prometedoras técnicas como el MLPA y los *microarrays* están logrando descubrir hoy día nuevos y diferentes tipos de mutaciones responsables de la producción de cánceres hereditarios. y se están implantando con rapidez en los laboratorios.

Bibliografía

- 1 Bennet P, Moore G. *Biología molecular para perinatólogos*. Barcelona: Masson SA eds., 1995.
- 2 Brock DJH. *Molecular Genetics for the clinician*. Cambridge University Press, 1998.
- 3 Ausubel FM et al. *Short protocols in molecular biology*. Current protocols publisher, Wiley. 2002.
- 4 Paternak JJ. *An Introduction to Human Molecular Genetics: Mechanisms of Inherited diseases*. Bethesda, Maryland: Bruce A. Roe, Judy S. Crabtree and Akbar S. Khan, editors, Fitzgerald Science Press, 1999.
- 5 *DNA Isolation and Sequencing (Essential Techniques Series)*. Published by John Wiley & Sons, 1996.
- 6 Taylor GR and JNM Day (Editors). *Guide to mutation detection*, John Wiley and sons, 2005.
- 7 Rapley R, Theophilus DMB. *PCR mutation detection protocols: Methods in Molecular Biology*, Rapley R Editor. 2002.
- 8 Sambrook J, Russell DW, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3^a Edition. New York.: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.
- 9 National Human Genome Research Institute, National Institute of Health. *GENETICS The Future of Medicine*: [http:// www.nhgri.nih.gov](http://www.nhgri.nih.gov).
- 10 *Molecular Biology*: http://www.protocol_online.org/prot/Molecular_Biology.
- 11 Velasco E, Infante M, Durán M et al. Heteroduplex analysis by capillary array electrophoresis for rapid mutation detection in large multiexon genes. *Nat Protoc* 2007; 2(1):237-46.
- 12 Gerhardus A, Schleberger H, Schlegelberger B, and Gadzicki D. Diagnostic accuracy of methods for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations: a systematic review. *Eur J Hum Genet* 2007; 15:619-627.
- 13 Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003; 49:853-860.
- 14 Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 2002; 30: e57.
- 15 Casilli F, Di Rocco ZC, Gad S, et al. Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer familias using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutat* 2003; 20: 218–226.
- 16 Ehrlich M. DNA hypomethylation and cancer. En: Melanie Ehrlich, Eaton Publishing, eds. *DNA alterations in cancer: genetic and epigenetic changes*. Natick: 2000, 273-291.
- 17 Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications.. *Biotechniques* 2002; 33:632-49.
- 18 Esteller M, Corn PG, Baylin SB, and Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225-9.
- 19 Staff J, Törngren T, Rambech E, et al. Detection and precise mapping of germline rearrangements in BRCA1, BRCA2, MSH2 and MLH1 using Zoom-in Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Human Mutation* 2008; 29(4), 555-564.

Herramientas estadísticas en el consejo genético: cáncer de mama y ovario familiar

Miguel de la Hoya Mantecón

Laboratorio Oncología Molecular
Hospital Clínico Universitario
San Carlos. Madrid

Puntos clave

- 1) El test genético en *BRCA1* y *BRCA2* no se puede recomendar indiscriminadamente. Uno de los factores determinantes a la hora de recomendar el estudio es la probabilidad pre-test de ser portador de mutación.
- 2) En la actualidad, los modelos que estiman la probabilidad pre-test se basan fundamentalmente en la historia personal y familiar de cáncer de mama y ovario.
- 3) Existen tres aproximaciones para estimar la probabilidad pre-test: las tablas de prevalencia, los modelos empíricos y los modelos genéticos.
- 4) Ninguna de estas aproximaciones puede considerarse superior, pero distintas aproximaciones se pueden ajustar mejor a las características particulares de una familia determinada.
- 5) Independientemente de la aproximación que empleemos, las estimaciones pre-test no podrán ser precisas si el árbol familiar es poco informativo.
- 6) La identificación de una mutación en *BRCA1* o *BRCA2* no implica necesariamente una buena estimación de riesgo.

Necesidad de las herramientas estadísticas en una consulta de consejo genético.

Las mujeres con antecedentes personales y familiares de cáncer de mama compatibles con algún tipo de predisposición hereditaria son relativamente frecuentes en la población general. Gracias a los planes de prevención y a la creciente información que suministran los medios de comunicación, cada vez es más habitual que

estas mujeres busquen asesoramiento en una consulta de cáncer familiar. La identificación de los genes de susceptibilidad BRCA1¹ y BRCA2² transformó profundamente el manejo y el tipo de asesoramiento que podían recibir estas familias. Por primera vez, era posible identificar la alteración genética responsable de la susceptibilidad, distinguir los individuos portadores de los no portadores y ofrecer así un asesoramiento individualizado a cada miembro de la familia interesado. Sin embargo, pese a las ventajas evidentes que la identificación de mutaciones tiene para un correcto asesoramiento, el especialista en cáncer familiar debe valorar cuidadosamente cada caso particular antes de ofrecer la posibilidad de un estudio genético, ya que son muchos los aspectos clínicos, éticos, psicológicos (y en la mayoría de los centros de diagnóstico también económicos) que se deben valorar³.

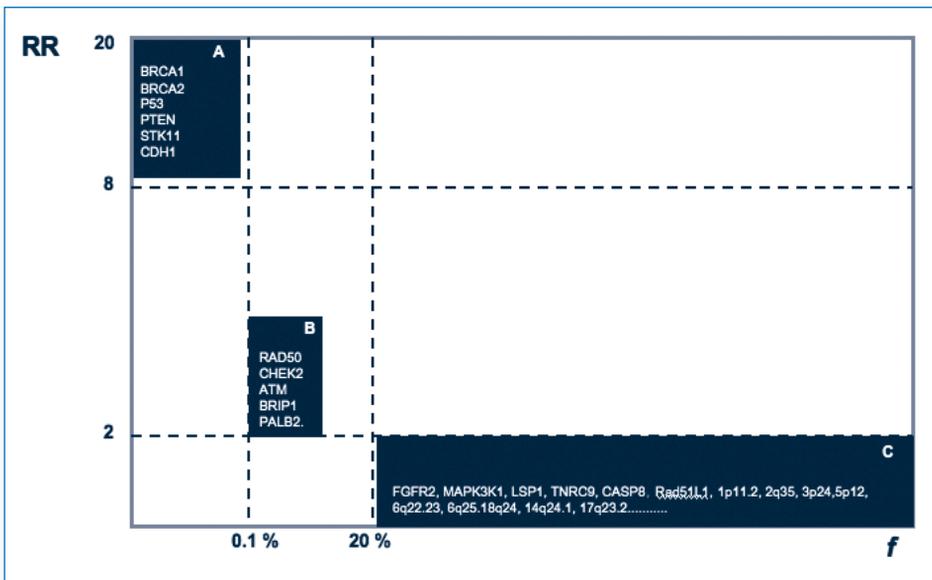


Figura 1: Susceptibilidad genética al cáncer de mama. En función del riesgo y la frecuencia en la población, se definen tres grupos de genes de susceptibilidad (A, B, C). Los genes mostrados en la figura explican un porcentaje pequeño de la susceptibilidad genética al cáncer. Se considera probable que la mayoría de la susceptibilidad no identificada resida en los grupos C y sobretodo B. (adaptado de referencia 5)

Los estudios epidemiológicos demuestran que el cáncer de mama tiene un componente genético muy importante⁴. Se estima que el 90% de los casos se producen en el 50% de la población que ha heredado una mayor susceptibilidad⁴. Además

de BRCA1 y BRCA2, en los últimos años se han identificado otros genes de susceptibilidad al cáncer de mama (Figura 1) ⁵. Sin embargo, el efecto combinado de todos los genes conocidos sólo explica una pequeña fracción de la susceptibilidad genética al cáncer existente en la población ⁴.

Como veremos, lo limitado que es en la actualidad nuestro conocimiento de la susceptibilidad genética al cáncer de mama, unido al hecho de que los varones son en general portadores asintomáticos, dificulta enormemente tanto la identificación de síndromes BRCA1 y BRCA2 como la estimación de riesgo una vez identificada una mutación.

Selección de familias.

El análisis molecular de los genes *BRCA1* y *BRCA2* resulta muy complejo, debido tanto al tamaño de los dos genes como a la distribución aleatoria de mutaciones que se observa en la mayoría de poblaciones. El análisis debe incluir al menos toda la región codificadora de los dos genes (más de 15 Kb), las secuencias intrónicas adyacentes, y un estudio de grandes reordenamientos en los dos loci. Con las técnicas actuales, este proceso puede tardar meses en ser finalizado y requiere importantes recursos humanos y económicos. Las implicaciones emocionales que el test puede desencadenar en la persona sujeta de estudio y/o en otros miembros de la familia no son menores y la obtención de un resultado negativo (no se detecta una mutación) no es en absoluto informativo pues nunca se puede descartar la existencia de una susceptibilidad genética. Por todo ello, para la mejor selección de las familias a las que se les debe recomendar el estudio, es indispensable desarrollar métodos que permitan estimar con precisión la probabilidad pre-test de que una familia sufra un síndrome asociado a uno de estos genes. En función de la aproximación empleada para desarrollar el método, se suele distinguir entre modelos empíricos y modelos genéticos. En general, todos ellos se basan en la historia personal y familiar de cáncer (Figura 2) ⁶⁻¹⁷, sin atender a las características de los tumores. Sin embargo, trabajos recientes demuestran que, en mujeres portadoras de mutaciones en BRCA1, los tumores basales (triple negativo) son especialmente frecuentes¹⁸. Esto sugiere que la caracterización molecular de los tumores podría ayudar en la selección de familias (Tabla 1)¹⁹, aunque hoy en día sigue sin estar claro como implementar estos conocimientos en la consulta de consejo genético.

Denominación	CM	dxCM	CO	dxCO	CMO	CMBI	CMV	Próstata	Páncreas	Colon	Año	Referencia
Penn		■	■		■						1997	6
Myriad		■				■					1998	7
BRCAPRO	■	■		■		■	■				1998	8
Leiden	■	■			■	■					2000	9
Martin et al		■	■		■						2001	10
Vahteristo et al		■	■		■						2001	11
HCSC		■	■		■	■	■				2002	12
Myriad II	■	■		■	■	■	■				2002	13
LAMBDA	■	■			■	■	■				2003	14
BOADICEA	■	■			■	■	■	■	■		2004	15
Manchester	■	■			■	■	■	■	■		2005	16
FHAT	■	■			■	■	■	■	■	■	2006	17

Figura 2: Modelos estadísticos para predecir la probabilidad pre-test de ser portador. La figura muestra como los modelos más recientes incorporan más variables predictivas. Todos los modelos indicados son logísticos, con la excepción de los modelos BRCAPRO y BOADICEA que son modelos genéticos (destacados en negrita). CM, número de cánceres de mama en la familia. dxCM, edad media de diagnóstico del cáncer de mama. CO, número de cánceres de ovario en la familia, dxCO, edad media de diagnóstico de cáncer de ovario. CMO, cáncer de mama y ovario en una misma mujer, CMBI, cáncer de mama bilateral. CMV, cáncer de mama en varón.

Tabla 1. Fenotipo en tumores de mama asociados a mutaciones en BRCA1 y BRCA2.

Fenotipo del tumor	BRCA1 (%)	Esporádicos (%)	BRCA2 (%)
Alto grado	66	36	41
Receptor de Estrógeno (RE) negativo	90	35	34
ERBB2-negativo	97	85	97
Amplificación de c-Myc	53	23-31	62
Carcinoma medular	13	2	3
Presencia de carcinoma ductal <i>in situ</i>	41	56	52
Borde continuo	51	20	36
Infiltración linfocitaria	13	3	4
Mutación en TP53	67	35	63
Fenotipo basal en tumores RE negativo	88	45	-
Expresión de EGRR	67	21	8

Adaptado de la referencia 19

Modelos empíricos

Se han desarrollado diversos modelos empíricos que permiten estimar una pro-

babilidad *pre-test* de ser portador de mutación en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. El fundamento de todos ellos es similar. Se parte de una serie de familias a las que previamente se les ha realizado el test genético y se intenta identificar características fenotípicas que se asocien con la presencia de mutación. Una vez identificadas las variables de interés, se construye un modelo estadístico multivariable (generalmente mediante regresión logística) que predice la probabilidad de que una familia con una determinada combinación de variables sea portadora de mutación.

El primer modelo empírico fue desarrollado en 1997 ⁶. Se analizaron las historias personales y familiares de mujeres con cáncer de mama que tras acudir a una consulta de consejo genético (por propia iniciativa o aconsejadas por su médico) habían decidido realizarse un análisis molecular del gen *BRCA1* por tener antecedentes familiares (en total, 169 familias). Se evaluaron como posibles variables de riesgo el número de cánceres de mama unilateral (CM), cánceres de mama bilaterales (CMbi), cánceres de ovario (CO), cánceres de mama y ovario en una misma mujer (CMO) y las edades media de diagnóstico de los cánceres de mama (dxCM) y ovario (dxCO). El análisis indicó que la edad media al diagnóstico de CM, la presencia de al menos un caso de CO (independientemente de la edad de diagnóstico) y la presencia de al menos un caso de CMO (independientemente de la edad de diagnóstico) se asociaban significativamente con la existencia de mutaciones patogénicas en la familia. Por el contrario, el número total de CM descritos en el pedigrí, la presencia de CMbi, o la edad media de diagnóstico de CO no se asociaban. A partir de estos datos, se desarrolló un modelo multivariable y de acuerdo al mismo, se tabularon las probabilidades de que una familia fuera portadora de mutación en *BRCA1* en función de su edad media de diagnóstico de CM y de si existían casos de CO o casos de CMO.

En 1998, Frank y col ⁶ desarrollaron un nuevo modelo en el que se incluía por primera vez el estudio molecular del gen *BRCA2*. El modelo se desarrolló a partir de 238 familias que cumplían unos criterios de inclusión muy estrictos (en todas ellas el caso índice era una mujer diagnosticada de CM antes de los 50 años o diagnosticada de CO y al menos un pariente en primer o segundo grado tenía un diagnóstico de CM antes de los 50 años o de CO a cualquier edad). En los últimos años se han desarrollado muchos otros modelos similares en distintas poblaciones. La Figura 2 resume las características más relevantes de algunos de estos modelos. Como se puede observar, todos los modelos coinciden en identificar al número de CO y a la edad media de diagnóstico de CM como variables predictivas. También es interesante señalar que el número de cánceres de mama en la familia no se asocia

con la presencia de mutación. Este dato es relevante, pues un número elevado de CM en la familia (independientemente de la edad de diagnóstico o la presencia de bilateralidad) es uno de los motivos más frecuentes por los que una mujer acude a una consulta de consejo genético.

Se ha desarrollado un modelo empírico a partir de familias con síndrome mama/ovario españolas ⁷. Dos son las razones que impulsaron a la realización de este modelo. Por un lado, los modelos publicados hasta la fecha se habían realizado en poblaciones distintas a la española y no estaba muy claro hasta que punto sería correcto aplicarlos a nuestra población. Por otro lado, se deseaba realizar un modelo que partiera de criterios de inclusión menos estrictos que los de modelos anteriores y más útiles desde el punto de vista de una consulta de consejo genético. En concreto, el modelo se desarrolló a partir de familias con 3 o más miembros afectados de cáncer de mama/ovario en dos generaciones. Se eligió ese criterio porque la mayoría de consultas de cáncer familiar españolas consideran que se debe recomendar el test genético a todas las familias que cumplen estos criterios y sin embargo sólo el 30% de las familias con estos criterios son portadoras de mutación. En la tabla 2 se identifican una serie de variables que se asocian con la presencia de mutación en nuestra serie de familias: la presencia de al menos un CO, un CMO, un CMbi, un cáncer de mama en varón (CMV) y la edad media de diagnóstico de cáncer de mama (6 años menor que en las familias negativas). La edad media de diagnóstico de CO tampoco se asoció con la presencia de mutación en nuestra serie. La tabla 3 muestra un análisis similar comparando familias BRCA1 y familias BRCA2. Como se puede observar, casos de CMV se observaron exclusivamente asociados a mutaciones BRCA2. La presencia de CO era más frecuente en familias con mutaciones en BRCA1, aunque la asociación no es suficientemente fuerte como para poder discriminar ambos síndromes. A partir de estos datos creamos un modelo multivariable mediante regresión logística. La edad media de diagnóstico de CM (excluyendo la edad de diagnóstico de los posibles cánceres de mama en varón) y el número de cánceres de ovario aparecen como factores

Variable	BRCA positivas (N=68)	BRCA negativas (N=143)	p
CO	57%	26%	<0,00001
CMO	24%	6%	0,0003
CMbi	40%	22%	0,006
CMV	15%	2%	0,0003
dxCM	44 años	50 años	<0,00001
>4CM	3%	7%	ns
dxCO	49 años	49 años	ns

Tabla 2. Variables fenotípicas en 211 familias mama/ovario españolas

predictivos. En el análisis multivariable se perdían como variables predictivas tanto el CMbi como el CMO y el CMV. Eso era debido a que cualquiera de las tres manifestaciones era poco frecuente en nuestra serie de familias. Sin embargo, los estudios monovariantes indicaban que las tres se asociaban estrechamente a la presencia de mutación. Para no perder esta información, decidimos crear una variable completamente artefactual que englobara las tres manifestaciones clínicas. Sin embargo, debido a esta aproximación, el peso relativo como factor de riesgo del CMbi, el CMO y el CMO en el modelo es equivalente, cuando en la realidad el peso es distinto (Tabla 2). El modelo multivariable, denominado HCSC, y un ejemplo de su utilización se muestran en la Figura 3. En la Figura 4 se muestran los datos de un estudio que demuestra que el poder discriminatorio del modelo HCSC es superior al de un experto en cáncer familiar. Los resultados se muestran en forma de curva ROC. Estas son representaciones gráficas de la sensibilidad (en este caso, % de familias con mutación en BRCA que son seleccionadas por el modelo para test genético) frente a la especificidad (% de familias sin mutación que el modelo no selecciona para test genético). El área bajo la curva indica la capacidad discriminatoria. Un área de 0.5 indica una capacidad discriminatoria nula (equivalente al azar). Un área bajo la curva de 1 indicaría una capacidad discriminatoria total. En general se considera buena discriminación si el área está por encima de 0.8.

Variable	BRCA1 (n=38)	BRCA2 (n=31)	p
CMV	----	32%	0,0001
CO	71%	42%	0,01
CMO	32%	13%	0,07
CMbi	40%	39%	
dxCM	44 años	44 años	

Tabla 3. Variables que distinguen los síndromes BRCA1 y BRCA2

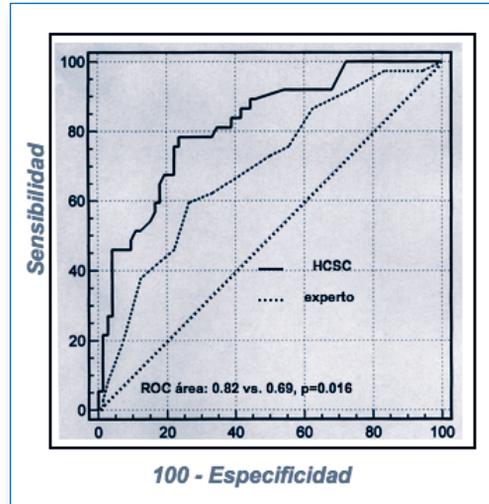
En los modelos empíricos publicados hasta la fecha, las variables investigadas se restringen básicamente al número, naturaleza y/o edad de diagnóstico de los tumores presentes en cada pedigrí. Sin embargo, nada impide que estos modelos incorporen otro tipo de variables, como podría ser las características anatomopatológicas de los tumores diagnosticados en la familia (Tabla 1).

Modelos genéticos

Una aproximación alternativa para seleccionar familias es basar las predicciones en un modelo genético de la enfermedad lo más ajustado posible a la realidad.

Figura 4. Análisis retrospectivo del modelo HCSC. En el análisis se empleó una serie consecutiva de 109 familias españolas con tres o más casos de cáncer de mama/ovario. En todas ellas se había realizado un estudio de mutaciones germinales en BRCA1 y BRCA2. Ninguna de estas familias se había empleado para desarrollar el modelo. Se calculó la probabilidad pre-test que el modelo asignaba a cada familia y en paralelo, se solicitó a un especialista en cáncer familiar que asignara una probabilidad subjetiva a cada familia (sin la asistencia de ningún otro modelo probabilístico). A partir

de los datos reales del resultado del test, se calculó la sensibilidad y especificidad del modelo HCSC y del especialista. La figura muestra una representación de la curva ROC en ambos casos. El área de la curva fue significativamente mayor en el caso del modelo, indicando que mejora el poder discriminador de un consejero experto. Eligiendo como punto de corte una probabilidad del 8%, el modelo consigue identificar a todas las familias portadoras (sensibilidad del 100%), reduciendo el número de test no informativos en un 28%. Eligiendo como punto de corte una probabilidad superior al 10%, la sensibilidad es del 92% y se reduce el número de test no informativos al 50%.



mente basada en el teorema de Bayes) para comparar la probabilidad de que una determinada historia personal y/o familiar de cáncer se deba a un síndrome genético (de acuerdo a nuestro modelo) y la probabilidad de que se deba al azar (teniendo en cuenta la incidencia de la enfermedad en la población general). El primer modelo genético de susceptibilidad a cáncer de mama fue desarrollado por Claus y colaboradores²⁰. El modelo era relativamente sencillo y consideraba la presencia en la población de un único gen de alta penetrancia y herencia dominante. Posteriormente, tras la identificación de dos genes de alta penetrancia (BRCA1 y BRCA2), Parmigiani y col⁸ modificaron el modelo de Claus para poder incorporar el efecto simultáneo en la población de dos genes con prevalencias y penetrancia distintas.

Antoniou y col han desarrollado un modelo genético que pretende reflejar la susceptibilidad genética al cáncer de mama de forma más fiel¹⁵. El modelo, denominado

BOADICEA (del inglés, Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm), incorpora el efecto simultáneo de dos genes de susceptibilidad de alta penetrancia (como el modelo BRCA1 y BRCA2) y, a diferencia del modelo BRCA1 y BRCA2, considera que la agregación familiar no explicada por estos dos genes se explica a partir de un componente poligénico que representa el efecto multiplicativo de múltiples loci de baja penetrancia. La versión más reciente del modelo BOADICEA incorpora sofisticaciones como el hecho de que el componente poligénico actúe como modificador del riesgo en portadores de mutación en BRCA1 y BRCA2 ²¹.

Es importante señalar que la utilidad de los modelos genéticos (a diferencia de lo que ocurre con los modelos empíricos antes mencionados) no se limitan a estimar la probabilidad de que una familia sea portadora de mutación. Se pueden utilizar, por ejemplo, para estimar la penetrancia de los genes BRCA1 y BRCA2 ^{21, 22}.

Datos de prevalencia

Una tercera alternativa para calcular la probabilidad de ser portador de mutación, que consiste simplemente en clasificar la familias en categorías definidas según la historia de cáncer de mama y ovario que presenten (nada impediría que se clasificaran en función de las características anatomopatológicas de los tumores), enmarcar nuestra familia problema en una de dichas categorías, y asumir que la probabilidad de identificar una mutación en la familia es igual a la frecuencia con que se han encontrado mutaciones en esa determinada categoría de familias. Evidentemente, la utilidad de este método dependerá mucho de lo bien que se ajuste nuestra familia problema a una de las categorías predefinidas y del número de familias analizada previamente en cada categoría.

Siguiendo esta estrategia, Frank y col presentaron en el año 2002 los datos derivados del estudio completo de BRCA1 y BRCA2 realizado por los laboratorios Myriad en 10.000 familias clasificadas en 42 categorías ¹³. Los datos se actualizan continuamente y se pueden consultar fácilmente en internet (<http://www.myriadtests.com>). Existen categorías de familias para las que el tamaño muestral es grande y el dato de prevalencia puede considerarse muy aproximado. Para otras categorías, por el contrario, el número de familias analizado sigue siendo bajo y en consecuencia la estimación de penetrancia imprecisa.

¿Qué aproximación debemos emplear para estimar la probabilidad pre-test?

Se han publicado numerosos estudios que comparan la eficacia de los distintos modelos a la hora de seleccionar familias para test genético en el contexto de una consulta de cáncer familiar^{23,27}. Estos estudios de validación deben interpretarse con cautela, ya que por un lado el número de familias implicadas es relativamente bajo y por otro, los criterios clínicos de inclusión de familias en los estudios de validación no se corresponden siempre con aquellos para los que fue desarrollado cada modelo que se pretende validar. Sin embargo, analizados en conjunto, los estudios indican que la capacidad discriminadora que ofrecen es aceptable, sin observarse diferencias significativas entre los distintos modelos. Es interesante señalar que, en general, los modelos tienden a subestimar la frecuencia de mutaciones en familias de bajo riesgo (pocos antecedentes familiares) y a sobrestimarlo en familias de riesgo elevado (muchos antecedentes familiares)^{24,27}.

Aunque la capacidad discriminadora de los modelos sea equivalente, hay diferencias importantes que debemos tener siempre en cuenta. Los modelos genéticos estiman la probabilidad de que un individuo dado sea portador de una mutación. Por tanto, dado que los métodos de análisis de mutaciones actuales en el mejor de los casos tienen una sensibilidad del 90%, en una serie determinada de familias esperaríamos detectar un número de mutaciones menor que el predicho por el modelo (la última versión del modelo BOADICEA tiene en cuenta la sensibilidad del método de detección)²¹. Los modelos empíricos, por contra, estiman la probabilidad de que detectemos una mutación en una familia siempre que empleemos un método de detección de mutaciones con sensibilidad equivalente al método usado para desarrollar el modelo. Eso quiere decir que si empleamos un método más sensible podemos detectar más mutaciones de las predichas por el modelo. Por ejemplo, en el desarrollo de muchos de modelos publicados hasta la fecha no se ha tenido en cuenta la presencia de grandes reordenamientos genéticos. Hoy sabemos que en población española, los reordenamientos genéticos representan alrededor del 10% de todas las mutaciones en BRCA1 (y un porcentaje muy inferior de las mutaciones en BRCA2)^{28,29}. Por tanto, si el análisis de mutaciones que estamos realizando incluye el estudio de este tipo de alteraciones podemos esperar una frecuencia de mutaciones superior a la predicha por los modelos.

La principal ventaja de los modelos empíricos es que permiten calcular la probabilidad pre-test de un modo sencillo en el poco tiempo del que normalmente se

dispone en una consulta. Sin embargo, también presentan limitaciones. Aunque en la práctica diaria muchas veces no se tiene en cuenta, su utilización está en principio limitada a familias que cumplan unos criterios de selección similares a los de las familias que se emplearon originalmente para desarrollar el modelo (así por ejemplo, no sería correcto aplicar un modelo empírico desarrollado en familias con al menos 3 casos de cáncer de mama para predecir la probabilidad pre-test en una familia con dos casos de cáncer de mama). Además, es importante tener en cuenta que estos modelos no predicen la probabilidad de que una familia sea portadora de mutación, si no la probabilidad de que se encuentre una mutación en esta familia. En este sentido, también será importante valorar en cada modelo no sólo los criterios clínicos que cumplían las familias utilizadas para derivar el modelo, sino otros parámetros que pueden influir en la probabilidad de encontrar una mutación, como son la sensibilidad del método de análisis y el método de elección del individuo probando de cada familia.

La utilización de un modelo genético evita la mayoría de los problemas asociados a la ambigüedad en la definición de historia familiar, pero no permite un cálculo manual y se necesita tiempo adicional para introducir correctamente los datos del árbol familiar en un ordenador. Hay que tener en cuenta que un pequeño error en la descripción del pedigrí puede variar sustancialmente la estimación de riesgo que proporcionan estos modelos. Recientemente, Evans y col han estimado que el empleo de modelos de riesgo asistidos por ordenador multiplica por 30 el tiempo requerido para la estimación de riesgo ¹⁶. Por otro lado, para que los modelos genéticos proporcionen estimaciones de riesgo precisas, se necesitan datos epidemiológicos de la población problema que no siempre son conocidos. Así, el modelo BRAPRO necesita datos de prevalencia y penetrancia de mutaciones en BRCA1 y BRCA2 en la población de estudio, y la utilización de modelos más sofisticados, como el modelo BODICEA, requeriría de datos epidemiológicos referidos a genes que ni siquiera están bien caracterizados.

Existen por otro lado problemas comunes a la utilización de cualquier método de estimación de riesgo en cáncer de mama/ovario. Quizás el más importante esté relacionado con el grado de información que suministra una historia familiar. El grado de información variará en función del número de mujeres y hombres presentes en cada pedigrí (los hombres en general serán sanos y no informativos), así como de las edades de las mujeres sanas (las mujeres sanas por debajo de los 40 años no son informativas, pues incluso siendo portadoras de una mutación, lo

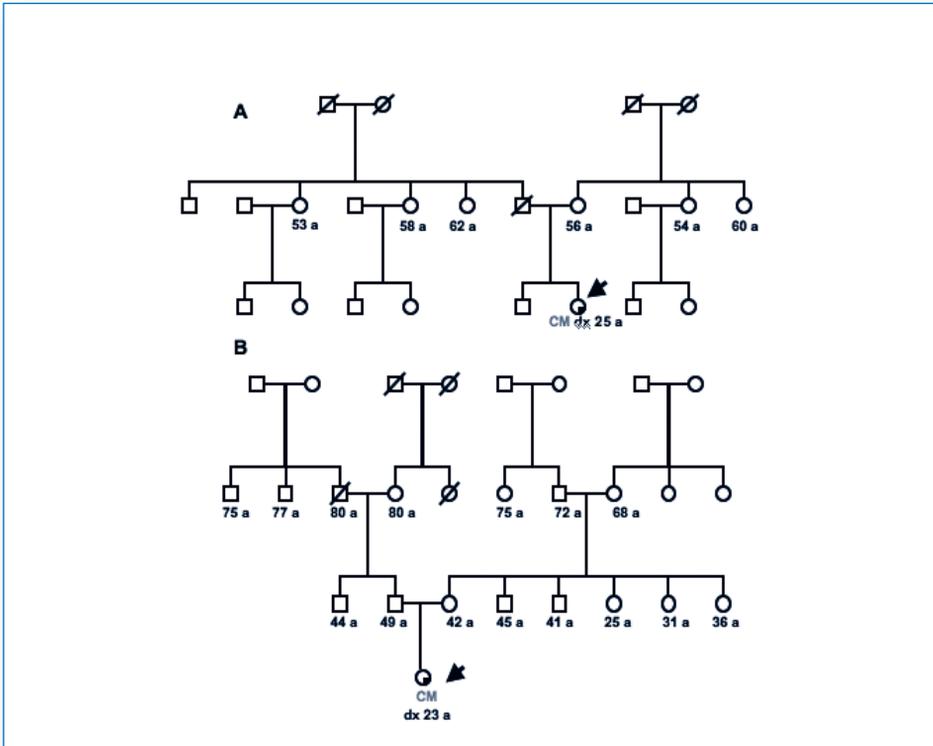


Figura 5. Información suministrada por el pedigrí. Para poder estimar adecuadamente la probabilidad pre test de que una familia sea portadora de mutación, el pedigrí debe ser informativo. Sin embargo, debido a la naturaleza de los síndromes mama/ovario, muchos elementos de un pedigrí no son informativos (en especial los hombres sanos y las mujeres sanas jóvenes). Este elemento de incertidumbre no está tratado adecuadamente en los modelos predictivos actuales. En la figura mostramos el caso de dos mujeres con cáncer de mama a edades muy tempranas que acuden a la consulta de consejo genético. Los modelos actuales (y en especial los modelos empíricos) predicen una probabilidad pre-test de ser portador idéntica en ambos casos. Sin embargo, hay importantes diferencias entre los dos pedigrís. El pedigrí A puede considerarse informativo, pues por ambas ramas existe un número alto de mujeres a edades relativamente avanzadas. El caso índice no tiene antecedentes familiares aunque podía tenerlos. El caso B es bien distinto. Por la rama materna hay varias tías sanas, pero a edades jóvenes y por tanto poco informativas. Por otro lado, por la rama paterna sólo hay hombres. Por tanto, el caso índice no tiene antecedentes pero tampoco tenía posibilidad de tenerlos. El pedigrí B es poco informativo. No se detectó mutación patógena en el caso A, y sin embargo si se detectó en el caso B. Un modelo que tuviera en cuenta el “grado de información” de cada pedigrí habría asignado probabilidades pre-test distintas en las dos familias.

normal es que a esas edades no hayan manifestado la enfermedad). Cuanto mayor sea “el grado de información” suministrado por un pedigrí, mayor será la precisión con la que podremos estimar el riesgo (independientemente del método que elijamos). Sin embargo hoy en día no sabemos cuantificar adecuadamente el “grado de información” de un pedigrí, aunque existe al menos un estudio que demuestra la importancia de tener en cuenta esta variable³⁰. En la Figura 5 se ilustra con un ejemplo este problema.

En resumen, debemos ser conscientes de las ventajas, inconvenientes y limitaciones de cada una de las aproximaciones, sin poder afirmar de ninguna que sea superior o más recomendable que otras. Muy al contrario, en la mayoría de casos distintas aproximaciones pueden ser complementarias.

Estimación de Riesgo en Portadores de Mutación.

Las primeras estimaciones de penetrancia en portadoras de mutación germinal en BRCA1 y BRCA2 (riesgo acumulado de desarrollar cáncer a lo largo de la vida) sugerían un riesgo de desarrollar cáncer muy elevado (del 100% combinando el riesgo de cáncer de mama y cáncer de ovario)^{31, 32}. Pronto se hizo evidente que se estaba sobreestimando el riesgo. Las estimaciones se realizaron en las mismas familias que se habían empleado para identificar los genes BRCA1 y BRCA2 por análisis de ligamiento. Lógicamente, aquellas familias presentaban una carga de cáncer de mama y ovario muy elevada y se adujo que ese sesgo en la selección de familias era la causa de la sobrestimación del riesgo. Por ello, se realizaron nuevos estudios denominados poblacionales³³⁻³⁸. En esencia, no se partía de familias de alto riesgo sino de casos consecutivos de cáncer de mama u ovario (independientemente de los antecedentes familiares). Ello obligó a realizar los estudios en poblaciones muy concretas donde unas pocas mutaciones fundadoras explican la mayoría de las mutaciones. Los estudios poblacionales llegaron a estimaciones de penetrancia mucho más bajas y en algunos casos a resultados paradójicos como la ausencia de riesgo aumentado respecto a la población general³⁷. Era evidente que aquellas estimaciones estaban infravalorando el riesgo y no eran de utilidad en una consulta de consejo genético. En una tercera fase, más reciente, se han realizado estudios de penetrancia en familias seleccionadas precisamente por acudir a las consultas de consejo genético³⁹⁻⁴². Estos estudios (incluido un estudio reciente en población española)⁴² han generado unas estimaciones de penetrancia intermedias. Simplifi-

cando, el riesgo acumulado de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida estaría en torno al 50% tanto en portadores de mutación patogénica en BRCA1 como en portadores de mutación en BRCA2 (las estimaciones tienden a mostrar un riesgo algo menor en portadores de mutación en BRCA2, pero las diferencias no son significativas). En el caso de riesgo de cáncer de ovario se observan diferencias claras entre ambos genes. En el caso de BRCA1 el riesgo se sitúa en torno al 35%-40% y se reduce a la mitad en el caso de BRCA2.

Las Figuras 6 y 7 resumen los datos de numerosos estudios de penetrancia, haciendo énfasis en las distintas aproximaciones empleadas. Inevitablemente, las dis-

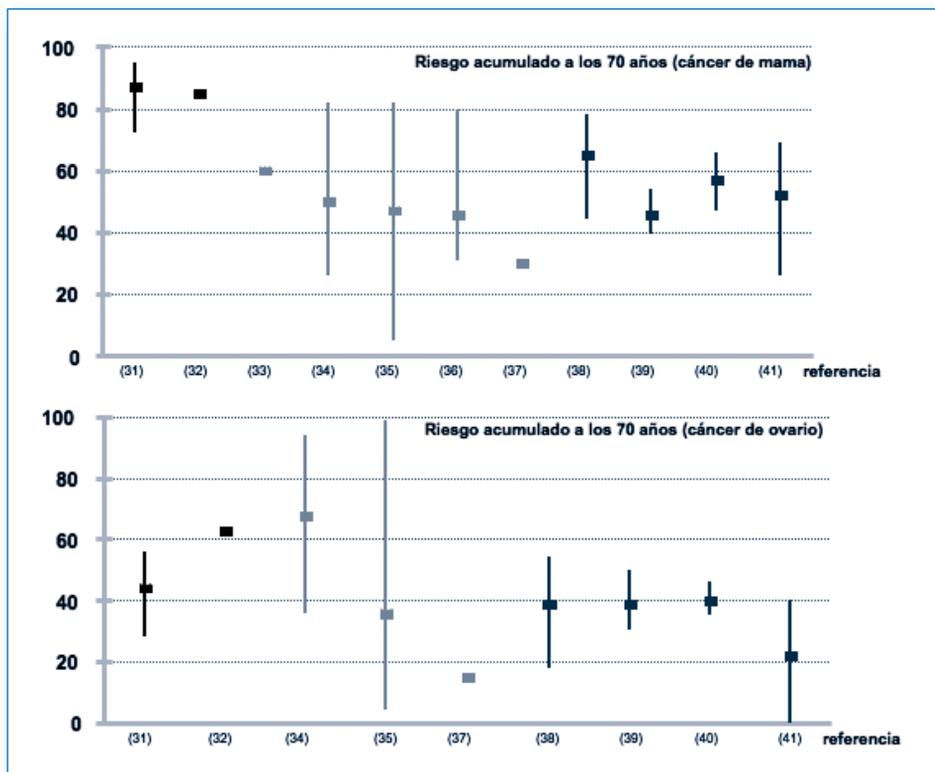


Figura 6. Estimaciones de penetrancia en BRCA1. Se indica para los distintos estudios la estimación de penetrancia (riesgo acumulado) a los 70 años y el intervalo de confianza (95% CI). En negro se han representado estudios realizados a partir de familias de ligamiento. En gris claro se han representado estudios poblacionales. En gris oscuro se han representado estudios realizados en familias seleccionadas en consultas de consejo genético.

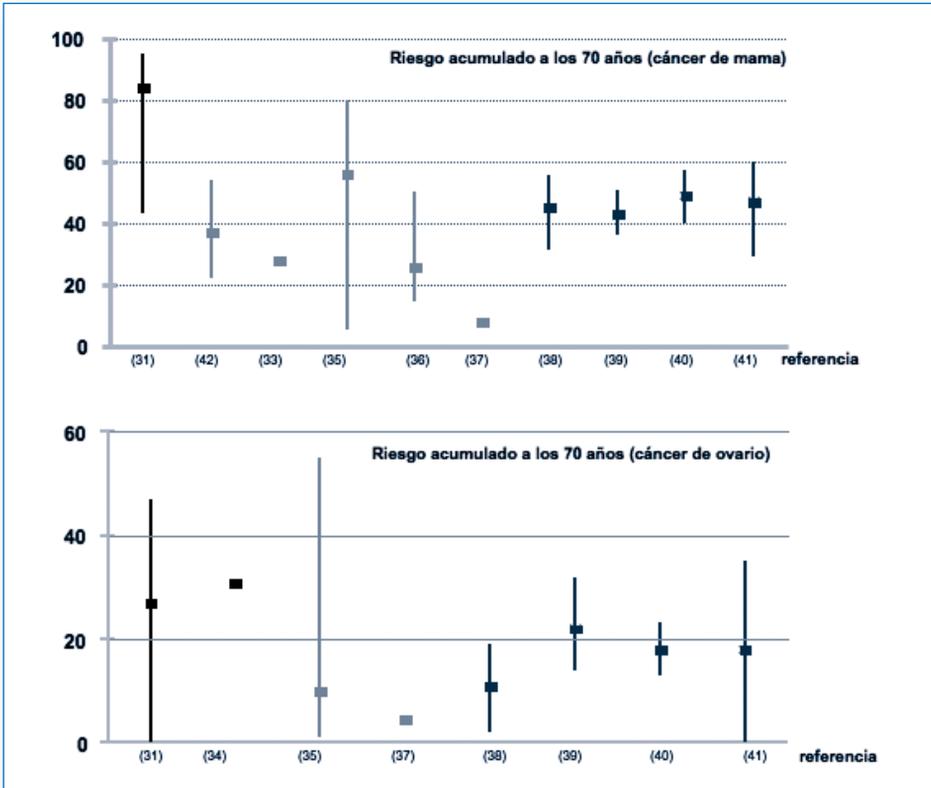


Figura 7. Estimaciones de penetrancia en BRCA1. Se indica para los distintos estudios la estimación de penetrancia (riesgo acumulado) a los 70 años y el intervalo de confianza (95% CI). En negro se han representado estudios realizados a partir de familias de ligamiento. En gris claro se han representado estudios poblacionales. En gris oscuro se han representado estudios realizados en familias seleccionadas en consultas de consejo genético.

tintas aproximaciones estadísticas empleadas para estimar la penetrancia introducen distintos sesgos con importantes consecuencias en el resultado del análisis⁴³. Sin embargo, no es menos cierto que las diferencias en las estimaciones de penetrancia entre estudios, más allá de los problemas metodológicos, responden en parte a una realidad biológica. En palabras de uno de los mayores expertos en el campo: “No se debe suponer que hay unos únicos valores de penetrancia que deben aplicarse a todos los portadores. Muy al contrario, el riesgo está influenciado por numerosos factores genéticos y ambientales y se espera que esté correlacionado con los antecedentes familiares del portador”⁴⁴.

En este sentido, es oportuno recordar que la existencia de genes (se suele hablar de genes, aunque sea más correcto hablar de alelos) modificadores del riesgo en portadores de mutación en BRCA1 y BRCA2 ha sido durante muchos años un tema recurrente de investigación, aunque sin resultados concluyentes. Recientemente se han podido caracterizar algunos alelos modificadores del riesgo (particularmente en portadores de mutación en BRCA2) de forma consistente (Tabla 4) y es previsible que en el futuro inmediato, con la realización de estudios pangenómicos, se caractericen muchos más. En portadores de mutación en BRCA2, los alelos modificadores del riesgo ya identificados permiten individualizar las estimaciones de riesgo de forma significativa. Por ejemplo, el genotipado de dos genes modificadores de riesgo (FGFR y TNRC9) permite identificar (en población Británica) un grupo de mujeres portadoras de mutación en BRCA2 de alto riesgo (7% de las portadoras) y un grupo de mujeres portadoras de bajo riesgo (20% de las portadoras). En el primer grupo el riesgo acumulado de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida es de más del 65%, pero se reduce al 40%⁴⁶ en el segundo grupo. Por tanto, empezamos a comprobar que la existencia de genes modificadores del riesgo explica al menos en parte las diferencias en las estimaciones de penetrancia antes comentadas.

Tabla 4. Genes Modificadores del Riesgo en portadores de mutación en BRCA1 y BRCA2.

Gen	BRCA1 (HR)	p	BRCA2 (HR)	p	Referencia
Rad51	1.01		3.18	0.0007	45
FGFR	1.02		1.32	1.7x10-8	46
TNRC9	1.11	0.004	1.15	0.009	46
MAPK3K1	0.99		1.12	0.02	46
LSP1	0.99		1.16	2.8x10-4	47
2q35	1.14	0.005	1.18	0.008	47

Probablemente, para estimar la probabilidad de desarrollar la enfermedad en nuestro portador problema, lo más correcto sea valorar cuidadosamente que estudios existentes se ajustan mejor a las características de nuestra familia problema y realizar estimaciones de riesgo a partir de los mismos. Tan incorrecto será aplicar las estimaciones de riesgo derivadas de estudios de ligamiento a una familia de bajo riesgo como aplicar estimaciones derivadas de estudios poblacionales a una familia con múltiples casos. Dicho de otro modo, la estimación de riesgo en una mujer portadora de mutación en BRCA1 y BRCA2 no se puede considerar independiente de la historia familiar. La Figura 8 muestra ejemplos de la importancia que la historia familiar tiene en la estimación de riesgo en portadores.

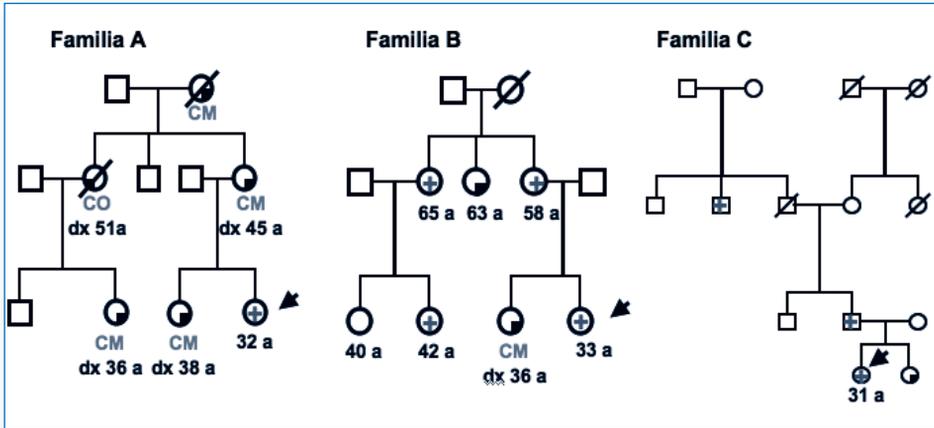


Figura 8. Importancia de la historia familiar en la estimación de riesgo en portadores. La estimación de riesgo no es independiente de la historia familiar. La figura muestra tres familias con mutación patológica en BRCA1. Se señalan tres mujeres sanas portadoras a las que debemos asesorar. Para ello, lo primero es realizar una estimación de riesgo. La historia familiar A sugiere alto riesgo. Las estimaciones de penetrancia en familias con estos antecedentes así lo confirman. La familia B presenta una historia de bajo riesgo y de hecho, como se puede observar, se han detectado varias portadoras sanas a edades avanzadas. Es razonable estimar que el riesgo de desarrollar cáncer en la portadora sana de la familia A es superior al de la portadora sana de la familia B. Sin embargo, no contamos con herramientas estadísticas adecuadas para cuantificar la diferencia. Probablemente, en la estimación del riesgo interviene factores genéticos (naturaleza particular de la mutación e influencia de genes modificadores) y factores ambientales que hoy no son bien comprendidos. Las familias A y B, con presencia de numerosas mujeres, tiene historias familiares informativas. La familia C introduce una complicación añadida. La mutación se ha transmitido por vía paterna. En esta rama de las familias no hay mujeres. La historia no suministraba información que permitiera estimar adecuadamente la probabilidad de ser portador, y por la misma razón tampoco suministra información para estimar el riesgo asociado en la portadora sana.

Bibliografía

- 1 Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtignian S et al, A strong candidate for the breast cancer and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266:66-71.
- 2 Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal L, Mangion J et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q12 (1995) *Science* 265:2088-90.
- 3 Ang P and Garber JE. Genetic Susceptibility for Breast Cancer-Risk Assessment and Counseling. *Semin. Oncol* 2001;28:419-433.
- 4 Pharoah PD, Antoniou AC, Easton DF, Ponder BA. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:2796-803.
- 5 Garcia-Closas M, Chanock S. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status. *Clin Cancer Res.* 2008 ;14:8000-9.
- 6 Couch FJ, DeShano ML, Blakwood MA, Calzone K, Stopfer J, Campeau L et al. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997; 336:1409-1415.
- 7 Frank TS, Manley SA, Olopade OI, Cummings S, Garber JE, Berhardt B et al. Sequence Analysis of BRCA1 and BRCA2: Correlation of Mutations with Family History and Ovarian Cancer Risk. *J Med Genet* 1998; 16:2417-2425.
- 8 Parmigiani G, Bery DA and Aguilar O. Determining Carrier Probabilities for Breast Cancer-Susceptibility Genes BRCA1 and BRCA2 *Am J Hum Genet* 1998; 62:148-158.
- 9 Peelen T. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Leiden. Año 2000.
- 10 Martin AM, Blackwood MA, Antin-Ozerkis D, Shih HA, Calzone K, Colligon TA et al. Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast-ovarian families from a breast cancer risk evaluation clinic. *J Clin Oncol.* 2001 Apr 15;19:2247-53.
- 11 Vahteristo P, Eerola H, Tamminen A, Karvinen P, Eerola H, Eklund C et al. A probability model for predicting BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and breast-ovarian cancer families. *British J Cancer* 2001; 84:704-708.
- 12 de la Hoya, Osorio A, Godino J, Sulleiro S, Tosar A, Pérez-Segura P et al. Association between BRCA1 and BRCA2 Mutations and Cancer Phenotype in Spanish Breast/Ovarian Cancer Families: Implications for Genetic Testing *Int J Cancer* 2002; 97:466-471.
- 13 Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulik M, Ward BE, Lingenfelter B et al. Clinical Characteristics of Individuals With Germline Mutations in BRCA1 and BRCA2: Analysis of 10,000 Individuals. *J Clin Oncol* 2002; 20:1480-1490.
- 14 Apicella C, Andrews L, Hodgson SV, Fisher SA, Lewis CM, Solomon E et al. Log odds of carrying an Ancestral Mutation in BRCA1 or BRCA2 for a Defined personal and family history in an Ashkenazi Jewish woman (LAMBDA). *Breast Cancer Res.* 2003;5:R206-16. Epub 2003 Aug 28.
- 15 Antoniou AC, Pharoah PPD, Smith P and Easton DF. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 2004; 91:1580-1590.
- 16 Evans DG, Eccles DM, Rahman N, Young K, Bulman M, Amir E et al. A new scoring system for the chance of identifying a BRCA1/2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO. *J Med Genet* 2005; 41:474-480.
- 17 Oros KK, Ghadirian P, Maugard CM, Perret C, Paredes Y, Mes-Masson AM, Application of BRCA1 and BRCA2 mutation carrier prediction models in breast and/or ovarian cancer families of French Canadian descent *Clin Genet.* 2006;70:320-9.
- 18 Melchor L, Benitez J. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis* 2008; 29(8):1475-1482
- 19 Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of BRCAness in Sporadic Cancers *Nat Rev Cancer* 2004;

- 4:814-819.
- 20 Claus EB, Rish N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* 1994; 73:643-651.
 - 21 Antoniou AC, Cunningham AP, Peto J, Evans DG, Lalloo F, Narod SA, The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancers: updates and extensions. *Br J Cancer*. 2008 Apr 22;98(8):1457-66.
 - 22 Marroni F, Aretini P, D'Andrea E, Caligo MA, Cortesi L, Viel A et al. Penetrance of breast and ovarian cancer in a large series of families tested for BRCA1/2 mutations. *Eur J Hum Genet* 2004; 12:899-906.
 - 23 de la Hoya M, Díez O, Pérez-Segura P, Godino J, Fernandez JM, Sanz J et al. Pre-test prediction models of BRCA1 or BRCA2 mutation in breast/ovarian families attending familial cancer clinics. *J Med Genet* 2003; 40:503-510.
 - 24 Antoniou AC, Hardy R, Walker L, Evans DG, Shenton A, Eeles R et al. Predicting the likelihood of carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation: validation of BOADICEA, BRCAPRO, IBIS, Myriad and the Manchester scoring system using data from UK genetics clinics. *J Med Genet*. 2008; 45:425-31.
 - 25 Panchal SM, Ennis M, Canon S, Bordeleau LJ. Selecting a BRCA risk assessment model for use in a familial cancer clinic. *BMC Med Genet*. 2008 ;9:116
 - 26 Jacobi CE, de Bock GH, Siegerink B, van Asperen CJ. Differences and similarities in breast cancer risk assessment models in clinical practice: which model to choose?. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115:381-90.
 - 27 Kurian AW, Gong GD, John EM, Miron A, Felberg A, Phipps AI, Performance of prediction models for BRCA mutation carriage in three racial/ethnic groups: findings from the Northern California Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:1084-91.
 - 28 de la Hoya M, Gutiérrez-Enríquez S, Velasco E, Osorio A, Sanchez de Abajo A, Vega A et al, Genomic rearrangements at the BRCA1 locus in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Clin Chem*. 2006;52:1480-5.
 - 29 Gutiérrez-Enríquez S, de la Hoya M, Martínez-Bouzas C, Sanchez de Abajo A, Ramón y Cajal T, Llorc G, Screening for large rearrangements of the BRCA2 gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;103:103-7.
 - 30 Weitzel JN, Lagos VI, Cullinane CA, Gambol PJ, Culver JO, Blazer KR et al. Limited family structure and BRCA gene mutation status in single cases of breast cancer. *JAMA*. 2007; 297:2587-95.
 - 31 Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1998; 62:676-89.
 - 32 Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. *Am J Hum Genet*. 1995;56:265-71
 - 33 Warner E, Foulkes W, Goodwin P, Meschino W, Blondal J, Paterson C, Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:1241-7.
 - 34 Antoniou AC, Gayther SA, Stratton JF, Ponder BA, Easton DF. Risk models for familial ovarian and breast cancer. *Genet Epidemiol*. 2000;18:173-90
 - 35 Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer* 2000; 83:1301-1308
 - 36 Satagopan JM, Offit K, Foulkes W, Robson ME, Wacholder S, Eng CM. The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10:467-73.
 - 37 Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 68(3):700-10.

- 38 Thorlacius S, Struewing JP, Hartge P, Olafsdottir GH, Sigvaldason H, Tryggvadottir L, Population-based study of risk of breast cancer in carriers of BRCA2 mutation. *Lancet*. 1998; 352:1337-9.
- 39 Antoniou AC, Pharoah PD, 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. *Am J Hum Genet* 2003; 72:1117-30.
- 40 Chen S, Iversen ES, Friebel T, Finkelstein D, Weber BL, Eisen A ET AL. Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample *J Clin Oncol*. 2006;24(6):863-71.
- 41 Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance Chen S, Parmigiani G. *J Clin Oncol*. 2007; 25:1329-33.
- 42 Milne RL, Osorio A, Cajal TR, Vega A, Llorc G, de la Hoya M et al. The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. *Clin Cancer Res*. 2008;14:2861-9.
- 43 Begg CB. On the use of familial aggregation in population-based case probands for calculating penetrance. *J Natl Cancer Inst* 2002; 21:1221-6.
- 44 Antoniou AC, Pharoah PD, Easton DF, Evans DG. BRCA1 and BRCA2 cancer risks. *J Clin Oncol*. 2006 Jul 10;24(20):3312-3.
- 45 Antoniou AC, Sinilnikova OM, Simard J, Léoné M, Dumont M, Neuhausen SL et al. RAD51 135G—>C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. *Am J Hum Genet*. 2007; 81:1186-200.
- 46 Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, Healey S, Pooley KA, Schmutzler RK, Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet*. 2008; 82:937-48.
- 47 Antoniou AC, Sinilnikova OM, McGuffog L, Healey S, Nevanlinna H, Heikkinen T. Common variants in LSP1, 2q35 and 8q24 and breast cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Hum Mol Genet*. 2009;18:4442-5

Genes de baja penetrancia y cáncer

Ana Osorio Cabrero

Centro de Diagnóstico de Mama.
Centro Nacional de Investigaciones
Oncológicas (CNIO). Madrid

Genes de baja penetrancia. El modelo poligénico

Los genes de baja penetrancia como factores de susceptibilidad en el cáncer esporádico

Hasta finales del XX, la investigación sobre los factores causantes de la susceptibilidad heredada a padecer cáncer, estuvo centrada en la identificación de genes de alta penetrancia o alta susceptibilidad. Mutaciones germinales en estos genes, dan lugar a un patrón de herencia mendeliano, en el que la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad se transmite, en general, de forma autosómica dominante, aunque también existen síndromes que presentan un patrón de herencia recesivo ¹. Ejemplos clásicos de genes de alta penetrancia son *BRCA1* y *BRCA2*, implicados en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario ^{2,3}, el gen *APC* ⁴ implicado en el cáncer de colon polipósico familiar, *MLH1* y *MSH2* ^{5,6} asociados al cáncer de colon no polipósico y muchos otros, ampliamente revisados en otros capítulos de esta publicación.

La frecuencia de las mutaciones en estos genes es muy baja en la población general (<0.005), pero cuando aparecen, el riesgo que confieren a padecer cáncer es muy alto (riesgo relativo mayor de 10) dando lugar a estos patrones de herencia mendeliana (Figura 1).

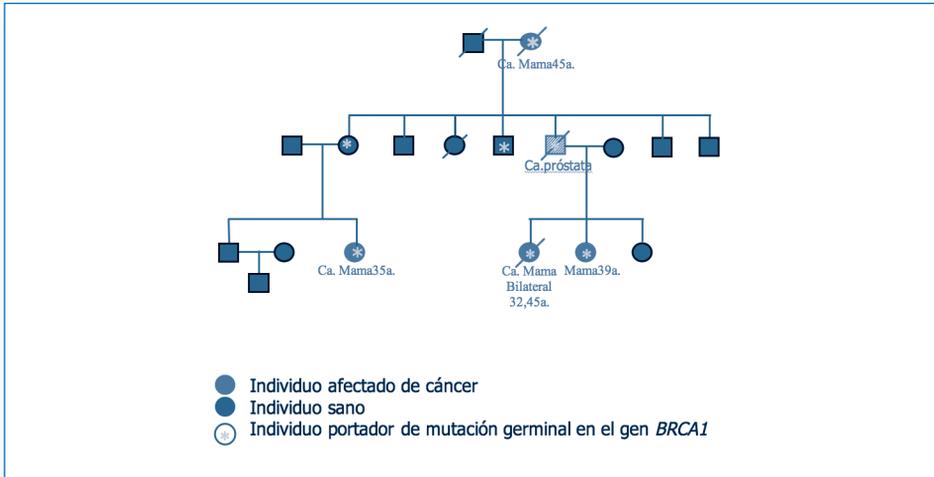


Figura 1: Familia portadora de mutación germinal en el gen *BRCA1*. Aunque la penetrancia de estas mutaciones no es completa, la presencia de las mismas es suficiente para que los individuos portadores presenten una susceptibilidad muy alta a desarrollar cáncer de mama y otros tumores relacionados, como cáncer de ovario ó próstata. Esto da lugar a un patrón en el que el cáncer aparece como un carácter que se hereda de forma autosómica dominante. Además se observan otras características, como la aparición del tumor a edad temprana o la presencia de bilateralidad en caso de que el cáncer afecte a órganos pares.

Sin embargo, estos que podemos considerar como claramente hereditarios, globalmente tan sólo representan el 1% de los casos de cáncer, que la mayor parte de las veces aparecen de forma esporádica. Esta mayoría de cánceres, presenta también un componente hereditario que reside en los genes de baja penetrancia. A diferencia de los anteriores, las variantes en los genes de baja penetrancia son comunes en la población general (frecuencia >0.05) y el riesgo que confieren a padecer la enfermedad es bajo (incremento del riesgo menor a 1.5 veces el poblacional). A nivel individual, cada variante modificaría muy poco el riesgo, pero en unión con otros factores, tanto genéticos como ambientales, serían responsables de las diferencias en la susceptibilidad a padecer cáncer que existen entre los individuos de la población general (Figura 2).

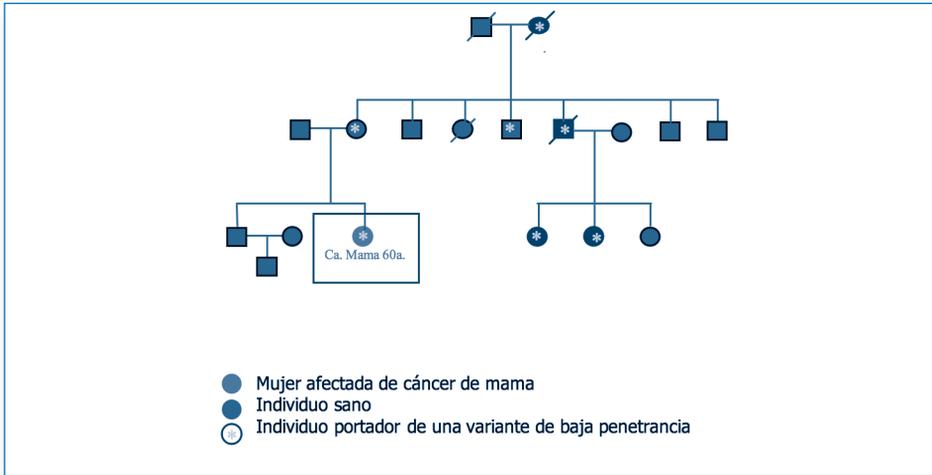


Figura 2. Se presenta la misma estructura familiar que en la Figura 1, pero en este caso lo que se está heredando es una variante de baja penetrancia. La variante incrementa ligeramente el riesgo a padecer cáncer de mama, pero su sola presencia no es suficiente para provocar la aparición de la enfermedad. Solamente en conjunción con otros factores de riesgo genéticos y ambientales, se llegaría a desarrollar el cáncer de mama, que aparecería como un caso esporádico en la población y se desarrollaría a una edad más tardía que encajaría con la edad media de aparición del cáncer de mama.

Actualmente se piensa que existen muchas de estas variantes, que aparecen en diferentes combinaciones en los distintos individuos de la población general, dando lugar a un rango de susceptibilidades que provocaría las diferencias interindividuales a padecer cáncer. La identificación de estas variantes, así como las interacciones que existen entre los riesgos asociados a las mismas cuando aparecen en un mismo individuo, entraña numerosas dificultades y es un campo en el que queda mucho por explorar. Sin embargo, en los últimos dos años, se ha producido un gran avance en el descubrimiento de algunas de estas variantes a través de los estudios de asociación de genoma completo, conocidos comúnmente como *GWAS* (*Genome Wide Association Studies*), que trataremos más adelante en este capítulo.

El modelo poligénico en los patrones de cáncer hereditario. El cáncer de mama como modelo.

En la mayoría de los síndromes de cáncer hereditario, existe un porcentaje de los casos que no se explican por mutaciones en los genes de alta penetrancia co-

nocidos. El síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, CMOH, es uno de los más llamativos en este sentido, ya que en general, se considera que tan solo entre un 20-25% de los casos de alto riesgo se explican por mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*. Esto significa que en la mayoría de los casos, el exceso de riesgo familiar que se observa no tiene una causa genética conocida. A pesar de que se han llevado a cabo varios estudios de ligamiento ^{7, 8, 9, 10, 11}, no se ha identificado ningún otro gen de alto riesgo específicamente implicado en el síndrome, desde que se descubrieran *BRCA1* y *BRCA2* hace ya 15 años. Esto ha llevado a la aceptación del modelo poligénico ¹², que explicaría la mayoría del exceso de riesgo familiar observado, por la combinación de variantes de riesgo bajo o moderado que se acumularían en estas familias y serían responsables de la susceptibilidad observada.

Por lo tanto, podemos afirmar que los genes de baja o moderada penetrancia, estarían implicados, no solo en la susceptibilidad genética a desarrollar cáncer de mama esporádico, sino que su acumulación y combinación, también podría dar explicación a muchos de los patrones familiares que se observan.

En la Figura 3 se ilustra de forma muy sencilla el modelo poligénico. En un extremo de la gráfica se sitúan los genes de alta penetrancia *BRCA1* y *BRCA2*, cuyas mutaciones confieren un riesgo relativo de más de 10 veces y presentan una frecuencia muy baja en la población general. Teóricamente, serían necesarios otros 4 genes de este tipo (genéricamente *BRCA3*) para explicar el exceso de riesgo familiar observado y cada uno de ellos estaría implicado de forma individual en un grupo de casos. La estrategia para identificar estos genes sería la clásica de análisis de ligamiento y como hemos mencionado, ninguno ha sido identificado desde el descubrimiento de *BRCA1* y *BRCA2*.

En el otro extremo, estarían los genes de baja penetrancia que combinados entre sí darían explicación al exceso de riesgo familiar constituyendo el modelo poligénico. Cada alelo de bajo riesgo, contribuiría a una cierta proporción del efecto genético global dependiendo de su frecuencia y de su “fuerza” en términos de riesgo. Asumiendo un riesgo relativo individual de 1.5 y un modelo dominante con efecto multiplicativo, serían necesarias entre 10-20 variantes comunes o varios cientos de variantes raras para explicar el total del exceso de riesgo familiar ¹³. La estrategia para encontrar este tipo de variantes son los estudios de asociación y como veremos más adelante, algunas de ellas han sido identificadas en los últimos años.

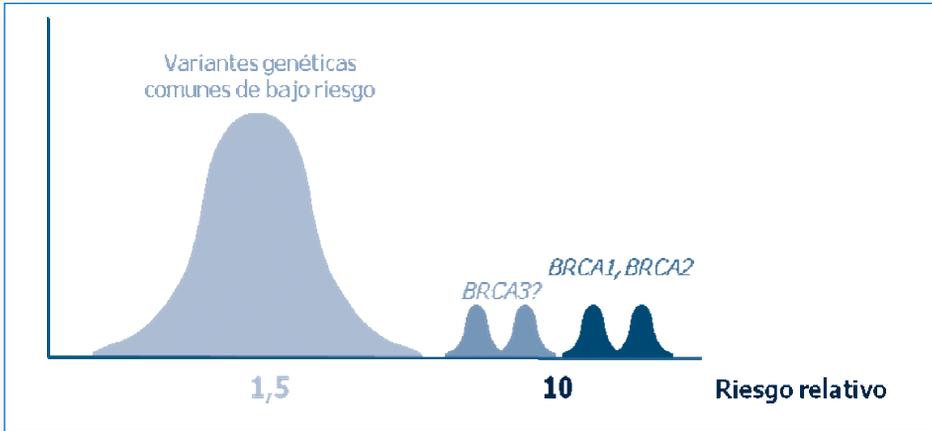


Figura 3: Adaptada de Ponder et al., 2005¹³. Modelo propuesto para explicar el exceso de riesgo familiar observado en cáncer de mama, dependiendo de la frecuencia y del riesgo relativo causado por los distintos tipos de variantes genéticas.

Tipos de variantes genéticas que actúan como alelos de baja penetrancia.

Genes candidatos.

Los genes candidatos deben cumplir dos características principales, la primera es que exista una posible relación funcional entre el gen de interés y la etiología de la enfermedad. En el caso del cáncer, serían candidatos aquellos genes implicados en procesos celulares, cuya alteración pueda potencialmente modificar el riesgo a padecer un tumor. Algunos ejemplos serían los genes que participan en el metabolismo y detoxificación de carcinógenos, reguladores del ciclo celular, reparación del DNA o apoptosis. Por otra parte, para cada tipo de tumor, existen genes candidatos específicos que participan en rutas implicadas en el desarrollo de órganos concretos, como pueden ser los involucrados en el metabolismo de las hormonas esteroides en el cáncer de mama.

La segunda característica es que los genes presenten variantes en su secuencia, que sean polimórficas en la población general y que al mismo tiempo tengan alguna repercusión funcional. En este sentido, los SNPs o Polimorfismos de cambio de un Solo Nucleótido, son las variantes genéticas que se consideran como mejores candidatas a representar variantes de baja penetrancia.

Variantes genéticas candidatas: SNPs

Los SNPs son cambios de un solo nucleótido en la secuencia de DNA (Figura 3). Para que una variante se considere SNP, debe ocurrir en al menos el 1% de la población general. Suponen la forma más abundante de variación genética, con un rango de frecuencia que va desde 1 cada 300 hasta 1 cada 2000 pares de bases. En los inicios de la secuenciación completa del genoma humano, se identificaron más de 1.4 millones de SNPs ¹⁴. Actualmente, los datos de la literatura sugieren que existen al menos 10 millones de SNPs con una frecuencia del alelo menor (minor allele frequency, MAF) mayor del 1% y 5 millones con MAF>10% ¹⁵, pero los estudios de secuenciación a gran escala que se han realizado recientemente indican que estas estimaciones pueden ser incluso bajas ¹⁶. El hecho de que los SNPs sean tan numerosos y estén repartidos al azar a lo largo de todo el genoma, es una de las características que les convierte en marcadores genéticos ideales para identificar genes de baja penetrancia. Otra ventaja que presentan es que son fáciles de determinar de manera inequívoca utilizando multitud de técnicas disponibles actualmente en los laboratorios de biología molecular.

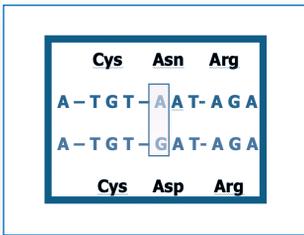


Figura 4: En azul claro se representa lo que sería una secuencia de nucleótidos que codifica para unos aminoácidos concretos. Debajo, la misma secuencia pero una de los nucleótidos ha cambiado (A/G). Si este cambio aparece con una frecuencia de al menos el 1% en la población general, se considera un SNP. En este caso la presencia del SNP da lugar a un cambio de aminoácido en la proteína codificada.

De especial interés son aquellos SNPs que se encuentran en la zona codificante (cSNPs) ó reguladora (rSNPs) de los genes, ya que en estos casos, el cambio de nucleótido, pueden traducirse en un cambio de aminoácido en la proteína codificada o en una alteración en el nivel de expresión del gen respectivamente. En cualquiera de estos dos casos, el SNP en cuestión puede tener una repercusión funcional, de manera que cumpliría el segundo criterio para representar una variante de baja penetrancia. El análisis de este tipo de SNPs es lo que se conoce como “método directo”, ya que se asume que es el propio SNP la variante causante de la susceptibilidad dentro del gen estudiado.

Sin embargo, estos suponen una minoría dentro de la totalidad de los SNPs presentes en el genoma, siendo más abundantes aquellos que se encuentran fuera de las zonas no codificantes o bien dentro, pero sin dar lugar a un cambio de aminoácido. Estos SNPs no tienen repercusión funcional, pero se pueden utilizar como marcadores para identificar la variante causal utilizando lo que llamamos “método indirecto”. En la Figura 5 se representa un esquema de ambas estrategias, que se desarrollarán con más detalle en apartados posteriores dentro del capítulo.

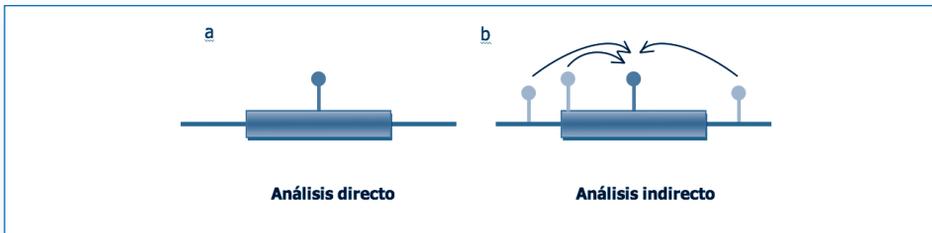


Figura 5: búsqueda de variantes de baja penetrancia por método directo e indirecto

a: se selecciona un solo SNP para el estudio (en azul oscuro) en base a la información previa de que puede tener una repercusión funcional. Se estudia asumiendo que es la variante de baja penetrancia causal.

b: se seleccionan uno o varios SNPs para el estudio (en azul oscuro), como marcadores genéticos sin repercusión funcional, pero que están cercanos a la variante causal (en azul claro) y nos darán información sobre la misma.

Métodos para la identificación de variantes de baja penetrancia: los estudios de asociación.

La estrategia principal para la identificación de los genes de baja penetrancia es el estudio de asociación, en el que se compara la frecuencia de una variante genética en un grupo individuos afectados de la enfermedad (casos) con un grupo de individuos sanos (controles) (Figura 6). Cuando la distribución de frecuencias difiere entre los dos grupos de forma estadísticamente significativa, se puede asumir que existe una asociación entre la variante genética y la enfermedad. Aunque la estrategia de identificación está clara, son muy pocos los genes de baja penetrancia identificados hasta el momento, ya que, como veremos más adelante son muchas las limitaciones que surgen.



Figura 6: Adaptada de Hirschhorn et al., 2005. Los círculos y cuadrados azules de la izquierda representan un grupo de casos y los de la derecha un grupo de controles pareados con los casos por sexo y edad. El círculo blanco sería una variante de baja penetrancia candidata, en este caso es más frecuente en los casos que en los controles y al comparar su frecuencia entre ambos grupos, encontraríamos que se asocia con un riesgo incrementado a padecer la enfermedad que se esté estudiando.

Estudios de asociación: método del gen candidato.

Los primeros estudios de asociación estaban siempre basados en el análisis de genes candidatos, potencialmente implicados en los procesos de carcinogénesis (ver apartado Genes Candidatos). En principio, esta aproximación parecía la ideal, ya que maximizando la verosimilitud biológica, las posibilidades de éxito son mayores. Sin embargo, este tipo de análisis depende del conocimiento que se tenga en el momento de la funcionalidad de los genes y como normalmente este conocimiento es limitado, la estrategia no ha sido particularmente exitosa. Hay que mencionar sin embargo, que sí se han identificado alelos de bajo o moderado riesgo siguiendo esta estrategia en algunos tipos de cáncer, como por ejemplo el cáncer de tiroides¹⁷ o cáncer de mama como veremos más adelante.

Además del elegir el gen candidato, hay que determinar también los polimorfismos genéticos candidatos dentro de ese gen. En este sentido existen también dos estrategias para abordar el estudio: a) escoger un solo polimorfismo para el análisis, que hipotetizamos como variante causal ó b) analizar una serie de polimorfismos marcadores que cubran toda la secuencia del gen candidato (Figura 3).

La primera estrategia ha sido la más utilizada en los primeros estudios de asociación, debido fundamentalmente a que antes de la secuenciación del genoma humano, el conocimiento de la distribución de los polimorfismos en los genes era

limitado. Los polimorfismos conocidos dentro de cada gen eran pocos y no todos presentaban las características de frecuencia adecuadas para ser evaluados en un estudio de asociación. Sin embargo, esta aproximación también ha sido de nuevo poco exitosa por la limitación de la información disponible.

La segunda estrategia es más efectiva que la primera, ya que nos permite pasar de evaluar un polimorfismo dentro de un gen a evaluar el gen entero como candidato. Esto se consigue analizando una batería de polimorfismos que cubran la secuencia completa del gen, cuyo único requisito es que la frecuencia que presentan en la población sea lo suficientemente alta como para tener la potencia estadística necesaria para detectar la asociación. No es necesario que los polimorfismos tengan repercusión funcional, ya que se están utilizando como marcadores, de manera que el estudio no se limita a polimorfismos en zonas codificantes o reguladoras, si no que cualquier polimorfismo que se encuentre en el gen de interés es válido para el estudio. Para cada gen puede haber decenas o incluso cientos de polimorfismos que evidentemente no se analizarían en su totalidad. En este punto hay que introducir el concepto de desequilibrio de ligamiento (LD) que hace referencia al hecho de que dos SNPs que se encuentran físicamente cerca, tienden a localizarse en el mismo haplotipo más frecuentemente de lo que cabría esperar por azar. De esta forma, unos SNPs nos dan información sobre los que tienen físicamente más cercanos y solamente es necesario analizar unos cuantos para obtener la información total (Figura 7).

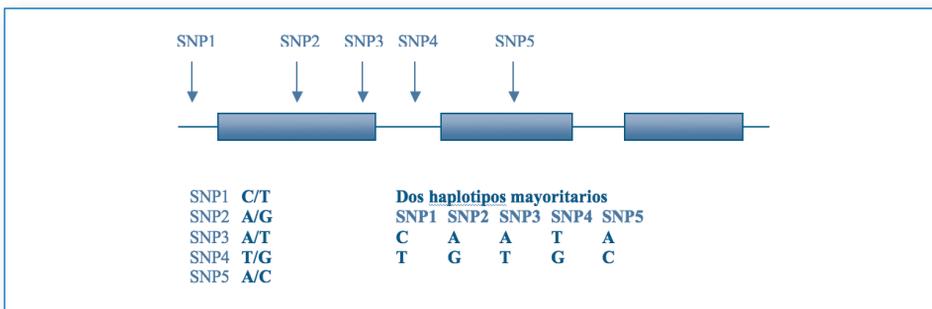


Figura 7: Los 5 SNPs se encuentran cercanos dentro de un gen y están en desequilibrio de ligamiento. Si existen dos *haplotipos* (combinaciones de alelos) mayoritarios, una vez establecidos, con analizar uno de los 5 SNPs, tendremos la información sobre los otros cuatro. En este caso, si en el SNP1 encontramos una C, sabremos que la secuencia de alelos en el haplotipo será CAATA, sin tener que analizar los otros cuatro.

Sobra decir que esta segunda aproximación solamente ha sido posible a raíz de la secuenciación del genoma humano y la identificación creciente de SNPs, unido al rápido desarrollo de métodos de genotipado masivo de los mismos.

Limitaciones principales de los estudios de asociación basados en el método del gen candidato.

Como ya hemos mencionado, el estudio de asociación es una simple comparación de frecuencias alélicas de un polimorfismo o polimorfismos entre un grupo de casos y un grupo de controles. Aunque el diseño es sencillo, las limitaciones son muchas, ya que estamos tratando de identificar efectos de riesgo muy pequeños con muy poca información previa sobre los genes candidatos. Podríamos hablar por tanto, de dos factores, que son los principales causantes de la falta de éxito de los estudios de asociación ¹⁸:

- el primero es un tamaño insuficiente de la muestra analizada (bajo número de casos y controles), que conlleva una falta de poder estadístico del análisis provocando una alta tasa de falsos positivos. Una forma de minimizar estos errores es exigir niveles de significación estadística más estrictos que los que se consideran apropiados en otros contextos. Según Pharoah et al, exigir un nivel de significación de 10^{-4} para un estudio de “gen candidato”, evitaría muchos de estos errores. Este valor sería notablemente inferior a los exigidos para otro tipo de estudios estadísticos que oscilan entre $p=0.05$ y $p=0.01$. Resulta evidente que conseguir el número suficiente de casos y controles para llegar a esos niveles de significación es cuando menos difícil, por no decir prácticamente imposible para cierto tipo de tumores.
- el segundo es, como ya se ha comentado anteriormente, las limitaciones existentes para la elección de genes candidatos.

Existen otras fuentes de error, que aunque más fácilmente evitables siguen siendo muy comunes en los estudios de asociación. Una de ellas es la selección inadecuada de los controles, que siempre tienen que estar perfectamente pareados con los casos en cuando a sexo y edad y por supuesto, pertenecer a la misma población.

Identificación de alelos raros de moderada penetrancia en cáncer de mama mediante el método del gen candidato.

Dado que en este capítulo hemos tomado como ejemplo el cáncer de mama para explicar diferentes conceptos, es necesario hacer un comentario sobre los nuevos genes de moderado riesgo que se han identificado recientemente implicados en esta

enfermedad mediante el método del gen candidato. Estos estudios se han centrado en el análisis de variantes genéticas en genes que codifican para proteínas implicadas en los mismos procesos biológicos que BRCA1 y BRCA2. Hasta la fecha se han identificado al menos cuatro genes mediante esta estrategia: *CHEK2*¹⁹, *ATM*²⁰, *BRIP1*²¹ y *PALB2*²². Las variantes de riesgo en estos genes se han identificado mediante estudios de asociación comparando series amplias (>1000 casos) de cáncer de mama familiar con controles y en la mayoría de los casos han sido mutaciones que dan lugar a una proteína truncada y tenían una frecuencia baja en la población general ($\leq 0.6\%$ de heterocigotos). Si tenemos en cuenta la función de los genes, la prevalencia de las mutaciones en la población y la consecuencia biológica de las mismas, la similitud con las mutaciones en los genes de alto riesgo *BRCA1* y *BRCA2* es muy alta. Sin embargo, si tenemos en cuenta el riesgo que se ha estimado para estas mutaciones, que sería alrededor de dos veces el de la población general, se encuentran más cerca de los alelos de bajo riesgo representados por los SNPs. Es precisamente este riesgo moderado, el que hace que la segregación de las mutaciones con la enfermedad no sea completa en las familias.

Estudios de asociación de genoma completo, la era de los GWAS.

En los últimos años, los estudios de asociación en todo el genoma o GWAS, han emergido como una auténtica revolución en la identificación de variantes de bajo riesgo tanto en tumores como en otras enfermedades, en las que se considera que el componente genético tiene un peso importante. El principio de los GWAS es el mismo que el de los estudios de asociación, con la importante diferencia de que en vez de analizar un SNP o grupo discreto de SNPs, se analizan cientos de miles de SNPs marcadores del genoma completo. La ventaja de esta estrategia, es que al realizarse un barrido en todo el genoma, no es necesario disponer de información previa sobre la probabilidad *a priori* que puede tener un gen determinado, por su función, de ser causante de la susceptibilidad, eliminando todas las limitaciones que en este sentido tiene la estrategia del “gen candidato”. Por otra parte, lo que parecía una aproximación de difícil aplicación, ha sido posible en los últimos años gracias a la convergencia de las nuevas tecnologías que permiten genotipar cientos de miles de SNPs a la vez en una sola muestra²³, junto con una anotación exhaustiva de los mismos en las bases de datos públicas y la determinación de los patrones de LD a gran escala a través del proyecto HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ha sido a partir del año 2007, cuando han surgido decenas de publicaciones describiendo regiones candidatas a contener genes de baja penetrancia en los tumores más comunes como cáncer de mama ^{24, 25, 26, 27, 28, 29}, próstata ^{30, 31, 32, 33, 34, 35}, colon ^{36, 37, 38, 39, 40, 41}, pulmón ^{42, 43, 44} o vejiga ^{45, 46} entre otros. Al contrario de los estudios de gen-candidato, los resultados de los GWAS están siendo muy prometedores, identificando loci inesperados y apuntando a nuevas vías implicadas en la patogénesis de estas enfermedades.

Resultados de GWAS en cáncer de mama. Identificación de alelos de baja penetrancia. Limitaciones del diseño.

Siguiendo con el modelo de cáncer de mama, hasta la fecha se han descrito once variantes de baja susceptibilidad en cáncer de mama validadas, nueve de las cuales han sido identificadas a través de GWAS. En la Tabla 1 se resumen las características de las mismas, así como el p-valor que presentaron en el estudio de asociación que en el caso de los GWAS, se ha establecido en un máximo de 10^{-7} para considerarlo como estadísticamente significativo.

Tabla 1. Resumen de las 11 variantes de bajo riesgo asociadas con cáncer de mama (modificado de ⁴⁷)

Genes cerca de la región	Locus	Variante	MAFa	Riesgo relativo por alelo (95%IC) ^b	p-valor	Referencia
FGFR2	10q26	rs2981582	0.38	1.26 (1.23-1.30)	2x10 ⁻⁷⁶	24
	10q26	rs1219648	0.39	1.32 (1.17-1.49)	1.1x10 ⁻¹⁰	26
TNRC9/LOC643714	16q12	rs3803662	0.25	1.20 (1.16-1.24)	1x10 ⁻³⁶	24
	16q12	rs3803662	0.27	1.28 (1.21-1.35)	5.9x10 ⁻¹⁹	27
NEK10/SLC4A7	3p24	rs4973768	0.46	1.11 (1.08-1.13)	4.1x10 ⁻²³	48
MAP3K1/MGC33648/MIER3	5q11	rs889312	0.28	1.13 (1.10-1.16)	7x10 ⁻²⁰	24
ESR1	6q25	rs2046210	0.36	1.29 (1.21-1.37)	2.0x10 ⁻¹⁵	29
TNP1/IGFBP5/IGFBP2/TNS1	2q35	rs13387042	0.50	1.20 (1.14-1.26)	1.3x10 ⁻¹³	27
FAM84B/c-MYC	8q24	rs13281615	0.40	1.08 (1.05-1.11)	5x10 ⁻¹²	24
MRPS30/FGFR10	5p12	rs10941679	0.24	1.19 (1.13-1.26)	2.9x10 ⁻¹¹	27
LSP1/H19	11p15	rs3817198	0.30	1.07 (1.04-1.11)	3x10 ⁻⁹	24
COX11/STXBP4/TOM1L1	17q22	rs6504950	0.27	0.95 (0.92-0.97)	1.4x10 ⁻⁸	48
CASP8	10p14	rs1053485	0.13	0.88 (0.84-0.92)	11x10 ⁻⁷	49

^a MAFA= minor allele frequency (frecuencia del alelo menos común).

^b riesgo por alelo asumiendo un efecto multiplicativo y relativo al homocigoto para el alelo común.

Como se puede observar, todos los alelos identificados confieren un riesgo relativo muy bajo y son comunes en la población general, como corresponde al concepto de gen de baja penetrancia previamente definido.

Una de las limitaciones que por ahora presentan este tipo de estudios es que, por el propio diseño del estudio, el mecanismo biológico subyacente a las asociaciones encontradas es aún desconocido. De hecho, no está claro que ninguna de estas variantes sea la causal o simplemente esté en LD con otra que sea la que realmente tiene una repercusión en la susceptibilidad desde el punto de vista funcional. En el caso del cáncer de mama, solamente la asociación con *FGFR2* ha sido concretada, a través de estudios epidemiológicos y funcionales, a dos variantes que posiblemente son las causales por afectar a la expresión del gen⁵⁰. Es muy importante resaltar que la mayoría de las variantes identificadas se encuentran en intrones o regiones intergénicas y no en regiones codificantes donde a priori se esperarían encontrar la mayoría de los cambios con repercusión funcional. El ejemplo más llamativo es el del locus 8q24, que es una región que se ha identificado como de susceptibilidad para varios tipos de cáncer, además de cáncer de mama y que se encuentra a cientos de kilobases del gen más cercano.

Por otra parte, este tipo de aproximación está enfocada a la identificación de alelos comunes en la población general, ya que no tienen suficiente poder estadístico para detectar efectos de riesgo causados por variantes raras. Teniendo en cuenta que en el caso del cáncer de mama, las variantes raras de moderado riesgo forman parte de la arquitectura genética de la enfermedad, es evidente que con los GWAS no sería suficiente para captar toda la variabilidad genética subyacente al riesgo.

Pero quizá el tema más debatido en cuanto a los resultados de los GWAS reside en cuál es su utilidad clínica potencial. Es evidente que la utilidad es muy limitada si consideramos los SNPs a nivel individual, ya que a este nivel, el incremento en el riesgo que suponen es mínimo. El futuro está en utilizar la combinación de SNPs para establecer perfiles de riesgo poligénicos. Estos perfiles podrían permitir estratificar a la población en grupos de riesgo, en el contexto de programas de cribado y en combinación con factores de riesgo ambientales⁵¹.

Estrategias para identificar nuevos loci de susceptibilidad

A pesar de los importantes descubrimientos recientes tratados en este capítulo, es indudable que las variantes de baja penetrancia identificadas hasta el momento explican una fracción muy pequeña del riesgo de cáncer, en el caso del cáncer de mama, aproximadamente un 5% del exceso de riesgo familiar observado. Sería deseable mejorar el poder estadístico de los GWAS, sin necesidad de incrementar al tamaño muestral ni los costes experimentales. Una manera de hacerlo es utilizar poblaciones enriquecidas en “predisposición genética”, utilizando casos con historia familiar de cáncer o edad de aparición temprana para la fase de descubrimiento, tal y como se hizo en el estudio de Easton y colaboradores para cáncer de mama²⁴. Otra posibilidad es realizar un análisis conjunto de los datos ya publicados para incrementar el poder estadístico sin necesidad de coste adicional y permitir el análisis de interacciones entre genes. Otra posible mejora es homogeneizar los casos estratificándolos por subgrupos histológicos por ejemplo para identificar efectos que puedan ocurrir en un tipo determinado pero que se diluirían al utilizar la muestra global.

Por último, la estrategia más exhaustiva para comprender la arquitectura genética del cáncer y de otras enfermedades complejas sería una resecuenciación del genoma completo en una cohorte amplia de casos y controles. Esta aproximación no tendría la limitación de tener que elegir genes candidatos y capturaría el rango completo de variantes comunes, raras, codificantes y no codificantes, cubriendo todo el abanico de posibles alelos de susceptibilidad. Aunque a corto plazo no sea factible, el reciente desarrollo de las tecnologías de ultrasecuenciación⁵², permitirá conseguir este objetivo en un futuro.

Bibliografía

- 1 Wayte, N., Da Silva, L., Chenevix-Trench, G. & Lakhani, S. R. (2008). What's in a cancer syndrome? Genes, phenotype and pathology. *Pathology* 40, 247-59.
- 2 Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B. & King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250, 1684-9.
- 3 Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D. & et al. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265, 2088-90.
- 4 Bodmer, W. F., Bailey, C. J., Bodmer, J., Bussey, H. J., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F. C., Murday, V. A., Rider, S. H., Scambler, P. & et al. (1987). Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328, 614-6.

- 5 Lindblom, A., Tannergard, P., Werelius, B. & Nordenskjold, M. (1993). Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* 5, 279-82.
- 6 Peltomaki, P., Aaltonen, L. A., Sistonen, P. et al. (1993). Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260, 810-2.
- 7 Bergman, A., Karlsson, P., Berggren, J. et al. (2007). Genome-wide linkage scan for breast cancer susceptibility loci in Swedish hereditary non-BRCA1/2 families: suggestive linkage to 10q23.32-q25.3. *Genes Chromosomes Cancer* 46, 302-9.
- 8 Gonzalez-Neira, A., Rosa-Rosa, J. M., Osorio, A., et al (2007). Genomewide high-density SNP linkage analysis of non-BRCA1/2 breast cancer families identifies various candidate regions and has greater power than microsatellite studies. *BMC Genomics* 8, 299.
- 9 Rosa-Rosa, J. M., Pita, G., Urioste, M., et al (2009). Genome-wide linkage scan reveals three putative breast-cancer-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 84, 115-22.
- 10 Smith, P., McGuffog, L., Easton, D. F. et al. (2006). A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 646-55.
- 11 Thompson, D., Szabo, C. I., Mangion, J., et al (2002). Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 827-31.
- 12 Antoniou, A. C. & Easton, D. F. (2003). Polygenic inheritance of breast cancer: Implications for design of association studies. *Genet Epidemiol* 25, 190-202.
- 13 Ponder, B. A., Antoniou, A., Dunning, A. et al (2005). Polygenic inherited predisposition to breast cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 35-41.
- 14 Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- 15 Reich, D. E., Gabriel, S. B. & Altshuler, D. (2003). Quality and completeness of SNP databases. *Nat Genet* 33, 457-8.
- 16 Hayden, E. C. (2008). International genome project launched. *Nature* 451, 378-9.
- 17 Landa, I., Ruiz-Llorente, S., Montero-Conde, C. et al (2009). The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet* 5, e1000637.
- 18 Pharoah, P. D. P., Dunning, A. M., Ponder, B. A. J. & Easton, D. F. (2004). Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nature Reviews Cancer* 4, 850-860.
- 19 Meijers-Heijboer, H., van den Ouweland, A., Klijn, J. et al (2002). Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 31, 55-9.
- 20 Renwick, A., Thompson, D., Seal, S., et al (2006). ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 38, 873-5.
- 21 Seal, S., Thompson, D., Renwick, A., et al (2006). Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 38, 1239-41.
- 22 Rahman, N., Seal, S., Thompson, D. et al (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 39, 165-7.
- 23 Ding, C. & Jin, S. (2009). High-throughput methods for SNP genotyping. *Methods Mol Biol* 578, 245-54.
- 24 Easton, D. F., Pooley, K. A., Dunning, A. M. et al. (2007). Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447, 1087-93.
- 25 Gold, B., Kirchhoff, T., Stefanov, S. et al. (2008). Genome-wide association study provides evidence for a breast cancer risk locus at 6q22.33. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4340-5.
- 26 Hunter, D. J., Kraft, P., Jacobs, K. B. et al. (2007). A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 39, 870-4.

- 27 Stacey, S. N., Manolescu, A., Sulem, P. et al. (2007). Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* 39, 865-9.
- 28 Thomas, G., Jacobs, K. B., Kraft, P., et al (2009). A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). *Nat Genet* 41, 579-84.
- 29 Zheng, W., Long, J., Gao, Y. T., et al. (2009). Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1. *Nat Genet* 41, 324-8.
- 30 Duggan, D., Zheng, S. L., Knowlton, M. et al. (2007). Two genome-wide association studies of aggressive prostate cancer implicate putative prostate tumor suppressor gene DAB2IP. *J Natl Cancer Inst* 99, 1836-44.
- 31 Eeles, R. A., Kote-Jarai, Z., Al Olama, A. et al. (2009). Identification of seven new prostate cancer susceptibility loci through a genome-wide association study. *Nat Genet* 41, 1116-21.
- 32 Gudmundsson, J., Sulem, P., Gudbjartsson, D. F. et al. (2009). Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet* 41, 1122-6.
- 33 Gudmundsson, J., Sulem, P., Manolescu, A. et al (2007). Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nat Genet* 39, 631-7.
- 34 Thomas, G., Jacobs, K. B., Yeager, M. et al. (2008). Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet* 40, 310-5.
- 35 Yeager, M., Orr, N., Hayes, R. B., Jacobs, K. B. et al. (2007). Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nat Genet* 39, 645-9.
- 36 Broderick, P., Carvajal-Carmona, L., Pittman, A. M. et al. (2007). A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* 39, 1315-7.
- 37 Houlston, R. S., Webb, E., Broderick, P. et al. (2008). Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet* 40, 1426-35.
- 38 Tenesa, A., Farrington, S. M., Prendergast, J. G., et al. (2008). Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nat Genet* 40, 631-7.
- 39 Tomlinson, I., Webb, E., Carvajal-Carmona, L. et al. (2007). A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet* 39, 984-8.
- 40 Tomlinson, I. P., Webb, E., Carvajal-Carmona, L., et al. (2008). A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet* 40, 623-30.
- 41 Zanke, B. W., Greenwood, C. M., Rangrej, J. et al. (2007). Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet* 39, 989-94.
- 42 Amos, C. I., Wu, X., Broderick, P., Gorlov, I. P. et al. (2008). Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 40, 616-22.
- 43 Broderick, P., Wang, Y., Vijayakrishnan, J. et al. (2009). Deciphering the impact of common genetic variation on lung cancer risk: a genome-wide association study. *Cancer Res* 69, 6633-41.
- 44 Landi, M. T., Chatterjee, N., Yu, K. et al. (2009). A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet* 85, 679-91.
- 45 Wu, X., Ye, Y., Kiemeny, L. A., Sulem, P. et al. (2009). Genetic variation in the prostate stem cell antigen gene PSCA confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* 41, 991-5.
- 46 Kiemeny, L. A., Thorlacius, S., Sulem, P. et al. (2008). Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer. *Nat Genet* 40, 1307-12.
- 47 Ghoussaini, M. & Pharoah, P. D. (2009). Polygenic susceptibility to breast cancer: current state-of-the-art. *Future Oncol* 5, 689-701.

- 48 Ahmed, S., Thomas, G., Ghoussaini, M. et al. (2009). Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. *Nat Genet* 41, 585-90.
- 49 Cox, A., Dunning, A. M., Garcia-Closas, M. et al. (2007). A common coding variant in *CASP8* is associated with breast cancer risk. *Nat Genet* 39, 352-8.
- 50 Meyer, K. B., Maia, A. T., O'Reilly, M., Teschendorff, A. E., Chin, S. F., Caldas, C. & Ponder, B. A. (2008). Allele-specific up-regulation of *FGFR2* increases susceptibility to breast cancer. *PLoS Biol* 6, e108.
- 51 Pharoah, P. D., Antoniou, A. C., Easton, D. F. & Ponder, B. A. (2008). Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. *N Engl J Med* 358, 2796-803.
- 52 Ansorge, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol* 25, 195-203.

Detección de síndromes hereditarios: ¿ante que síndrome nos encontramos?

Miguel Urioste Azcorra

Dpto. Genética Humana. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Madrid

Introducción

El asesoramiento genético en cáncer es una actividad sanitaria relativamente reciente, consecuencia de la identificación y caracterización de las bases genéticas de algo más de una docena de síndromes con una marcada predisposición al cáncer, en la pasada década. Saber que ciertos individuos heredaban de sus padres genes alterados que les predisponían a desarrollar neoplasias a edades jóvenes, pronto se convirtió en un serio problema sanitario que requería soluciones eficaces. En pocos años se ha llegado a tener una idea bastante precisa de la magnitud del cáncer hereditario, una porción significativa de profesionales conoce el problema y son capaces de identificar familias en las que existe agregación de tumores, se han creado algunas unidades multidisciplinarias donde acuden las familias para ser evaluadas, existen laboratorios capacitados para analizar los genes responsables de los síndromes de predisposición al cáncer, y en unos pocos centros hospitalarios hay unidades especializadas en el seguimiento de pacientes con alto riesgo para cáncer. Aunque es evidente el avance en estos pocos años, aún queda mucho por aprender y más aún por hacer en la atención de familias con algún tipo de cáncer hereditario.

Cuando un individuo consulta por sus antecedentes personales y/o familiares de cáncer, la primera pregunta que se le plantea al profesional que le atiende es si está o no está ante un posible caso de cáncer hereditario. En la actualidad existen unos 100 ó 200 diferentes síndromes de predisposición al cáncer (SPC), algunos de los cuales se citan más adelante. La cuestión no es que el profesional sepa en detalle las características de cada uno de estos SPCs. Primero, y elemento esencial de todo el proceso, es el reconocimiento de aquellas circunstancias que caracterizan al cán-

cer hereditario. Saber que se está ante un caso de cáncer hereditario es saber que los miembros de esa familia se van a poder beneficiar del asesoramiento genético, que probablemente pueda efectuarse el estudio de algún gen de susceptibilidad cuyos resultados nos van permitir ofrecer riesgos concretos, y que podrán aplicarse medidas de prevención en los familiares a riesgo.

El primer objetivo de este capítulo es facilitar el reconocimiento del cáncer hereditario; dar a conocer aquellas herramientas que nos pueden ayudar en el proceso de reconocimiento de un SPC. Para ello hay que tener una idea de qué es un síndrome, y qué es el cáncer hereditario. Los SPCs se van a transmitir en las familias de acuerdo a los modelos mendelianos. Por esta razón es imprescindible tener conocimiento de los modelos de herencia y de cómo se construye un árbol familiar. Saber que si en una familia se llega a identificar un modelo de transmisión del cáncer, esto significa que se ha dado un gran paso para el asesoramiento de la familia. Pero cuando se habla de síndromes y de modelos de herencia, conviene estar familiarizados con conceptos de la Genética como son la penetrancia, la expresividad o la heterogeneidad clínica y genética. Dominar estos conceptos es esencial cuando se trabaja con enfermedades genéticas, como es el cáncer hereditario. Por último, es importante que el profesional sanitario aprenda a identificar los rasgos más eficaces para discriminar entre cáncer esporádico y cáncer hereditario.

El segundo objetivo del capítulo es ofrecer información sobre los diferentes SPCs, más con la intención de orientar que de ser exhaustivos. El capítulo finaliza con una serie de tablas en las que se listan los SPCs más habituales y los tipos de tumores que se observan en los SPCs, que pueden ser utilizadas como puerta de entrada a entidades no bien conocidas, o como ayuda o guía ante una sospecha diagnóstica.

Definición de síndrome

El término síndrome se utiliza para referirse a un conjunto de defectos, alteraciones, o síntomas patogénicamente relacionados, en el que puede o no conocerse la causa, y ésta puede o no ser genética. Es decir, hablamos de síndrome cuando identificamos un conjunto de características que diferenciamos de otros conjuntos o características aisladas, y que asumimos tienen una base común ¹.

No todos los signos, anomalías o alteraciones del fenotipo aparecen siempre con la misma frecuencia en el síndrome. Algunos rasgos son comunes, mientras que otros pueden aparecer con poca frecuencia. El término espectro fenotípico se refiere al total de alteraciones o signos que pueden observarse en un síndrome y a su frecuencia en la población con el síndrome. Saber si un determinado signo o alteración es parte de un síndrome no es una tarea sencilla. En general, si su frecuencia en la población de personas con el síndrome es superior a su frecuencia en la población control o general, puede considerarse como parte del síndrome.

En los SPCs, el cáncer suele ser la alteración fenotípica más severa y, en muchos casos, la más característica del síndrome. En algunos síndromes el cáncer es la única manifestación fenotípica, por ejemplo en el Síndrome Li-Fraumeni, en el Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (el síndrome de predisposición al cáncer más frecuente), o en el Cáncer Gástrico Difuso Hereditario. En otros síndromes se observa un conjunto de tumores benignos y malignos afectando a diferentes órganos o tejidos, como ocurre en el síndrome de von Hippel Lindau, o en la Neurofibromatosis. En un tercer tipo de SPCs, el cáncer es un signo más dentro de un conjunto de manifestaciones fenotípicas complejas, como ocurre en el síndrome de Cowden, en el Peutz Jeghers, o en el síndrome de Rothmund-Thompson. En estos síndromes se observan múltiples defectos del desarrollo, tumores benignos y cánceres.

Predisposición hereditaria al cáncer

Aproximadamente un 5-10% de todos los cánceres tiene una base hereditaria ². Dentro de este 5-10%, se engloban todos los síndromes de predisposición al cáncer. El cáncer hereditario es consecuencia de mutaciones en proto-oncogenes, genes supresores de tumores o genes encargados de la reparación, integridad o estabilidad del ADN. Todos estos genes han sido comentados en un capítulo previo. En la mayoría de los casos las mutaciones en estos genes son altamente penetrantes ³. Se suele heredar una copia mutada de uno de estos genes, si bien esta circunstancia no es suficiente para el desarrollo del tumor. El cáncer sólo llegará a manifestarse tras la acumulación de nuevas mutaciones somáticas. Es decir, en la mayoría de los SPCs se hereda la predisposición a desarrollar cáncer de acuerdo a patrones mendelianos.

La mayoría de los SPCs son poco frecuentes, y en todos ellos el riesgo para cáncer excede el riesgo poblacional, si bien las cifras de riesgo son muy diferentes de unos a otros. Además, estos síndromes manifiestan una gran variabilidad en su expresividad, de modo que, dentro de una misma familia podemos observar marcadas diferencias en la edad de aparición, el tipo de tumor, su localización, o en la agresividad o tasa de supervivencia.

La identificación de familias con SPCs es clínicamente relevante ya que el riesgo de sus miembros para desarrollar cáncer es muy elevado. Sin una adecuada historia familiar, muchos SPCs pueden no ser identificados y ser considerados como tumores de carácter esporádico. La historia familiar es sin duda la herramienta más eficaz para determinar la probabilidad de que una determinada familia tenga un SPCs, y para poder llevar a cabo el proceso de asesoramiento genético ⁴.

Modelos de herencia

La práctica totalidad de los SPCs conocidos hasta la fecha, son procesos monogénicos y, en consecuencia, se heredan siguiendo patrones mendelianos relativamente sencillos de identificar. Cuando un profesional sanitario se enfrenta a una familia en la que han ocurrido varios casos de cáncer, surgirá la duda de si esos cánceres han ocurrido de acuerdo a un modelo de herencia conocido. Llegar a determinar un patrón de herencia concreto supone un importante avance ya que nos va a permitir precisar los riesgos de cáncer en los miembros de la familia.

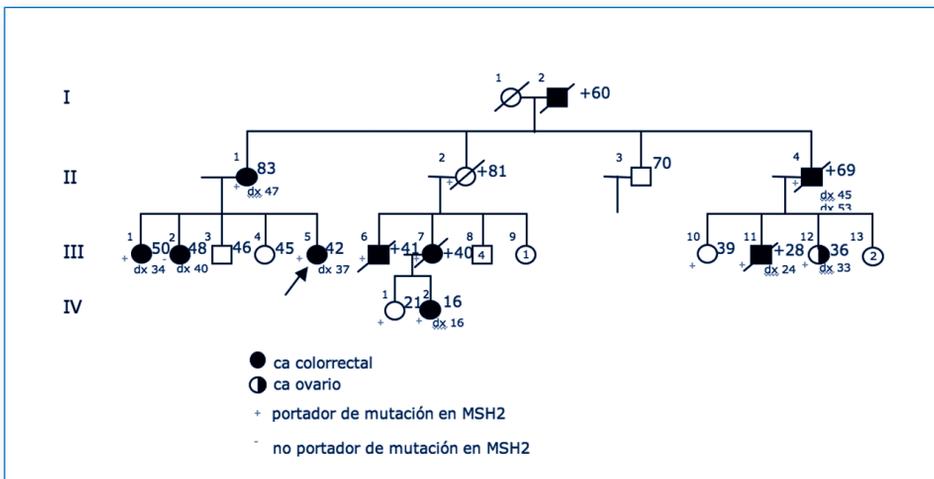
Los patrones de herencia mendelianos dependen de la localización cromosómica del gen responsable y de la clase de fenotipo (una amplia descripción de los modelos de herencia puede obtenerse consultando textos de Genética como el clásico Thompson & Thompson ⁵). Hay dos posibles localizaciones: autosómica, el locus del gen se encuentra en un autosoma (cromosomas del 1 al 22), o sobre un cromosoma sexual (X o Y). En el primer caso hablaremos de herencia autosómica y en el segundo de herencia ligada al sexo y, en concreto, de herencia ligada al X o, mucho menos frecuentemente, de herencia ligada al Y. Respecto al fenotipo, éste puede ser dominante o recesivo. Dominante es el fenotipo que se manifiesta cuando existe un solo alelo variante, independientemente del otro alelo. Recesivo es el fenotipo que se manifiesta cuando ambos alelos son variantes; se necesitan ambas copias del gen alteradas para que aparezca el fenotipo.

Por tanto, podemos esperar sólo cuatro patrones básicos de herencia mendeliana: autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado al sexo dominante y, por último, ligado al sexo recesivo ⁵.

Herencia autosómica dominante

El gen responsable del rasgo o enfermedad se localiza en un autosoma, los cromosomas numerados del 1 al 22, y el fenotipo que se asocia a ese gen se manifiesta independientemente del estado del otro alelo, se manifiesta tanto en heterocigosis como en homocigosis (se dice que un individuo es heterocigoto cuando presenta dos alelos diferentes, uno en cada cromosoma, en un determinado gen; mientras que homocigoto es el individuo que tiene los dos alelos del gen idénticos).

Éste es el modelo de herencia más común en los SPCs. Los síndromes más frecuentes como el Cáncer de Mama y Ovario Hereditario, la Poliposis Adenomatosa Familiar, el Síndrome de Lynch o Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico, se ajustan a este modelo de herencia. Hay que insistir que en estos síndromes y en los restantes SPCs se transmite la susceptibilidad a desarrollar el cáncer; para que aparezca el cáncer es necesario que, a nivel somático, las células acumulen nuevas mutaciones, entre ellas la mutación en el otro alelo, el normal, del gen de que se trate.



Cuadro 1: Familia con Síndrome de Lynch (OMIM#120435), asociada a mutación germinal en *MSH2*, modelo de herencia autosómica dominante

En el Cuadro 1 puede verse la genealogía de una familia con síndrome de Lynch y en la que puede deducirse una herencia autosómica dominante. El probandus y consultante, identificable por estar marcado con una flecha en el árbol (individuo III-5), es una mujer joven que consulta por haber tenido un adenocarcinoma de colon a los 37 años. Puede observarse en la familia que el cáncer, frecuente pero no exclusivamente colorrectal, se ha transmitido verticalmente, afectando a cuatro generaciones consecutivas. El cáncer lo transmiten tanto las mujeres como los varones, existe transmisión de varón a varón y resultan afectados por igual mujeres y varones. La probabilidad de que un individuo transmita el gen mutado a su descendencia es de 1 en 2 (50%). Esto es porque existen sólo dos posibilidades reales: el individuo transmite a su descendencia el cromosoma con la copia normal del gen o bien el cromosoma con la copia alterada. Los individuos que transmiten la enfermedad son afectados, han tenido cáncer, excepto el individuo II-2 en el Cuadro 1. Esta mujer falleció con 81 años sin haber desarrollado la enfermedad, no tuvo cáncer a pesar de ser portadora del gen alterado que ha transmitido al menos a dos de sus hijos, que han desarrollado cáncer colorrectal. En esta mujer ha ocurrido una falta de penetrancia. La penetrancia es la probabilidad de que un gen tenga manifestación en el fenotipo. Se dice que la penetrancia es completa cuando siempre que el gen está presente, se manifiesta el rasgo o la enfermedad. En el resto de los casos la penetrancia es incompleta y suele expresarse como un porcentaje. Si un determinado rasgo tiene una penetrancia del 90%, quiere decir que de cada 100 individuos que tengan el gen responsable, 90 manifestarán el rasgo y 10 no lo manifestarán. Una penetrancia incompleta puede confundir la interpretación del modelo de herencia y del asesoramiento, ya que un individuo que no presenta el rasgo aparentemente interrumpe la transmisión vertical de la patología, y hace pensar que no ha heredado el gen alterado y, por tanto, no va a transmitir la enfermedad.

En el Cuadro 1 podemos también observar como las manifestaciones fenotípicas difieren entre los distintos individuos portadores de la mutación en *MSH2*. Algunos pacientes han desarrollado cáncer colorrectal a edades muy tempranas, por ejemplo la mujer IV.2 con tan solo 16 años. Otros miembros de la familia han tenido dos tumores colorrectales (el individuo II-4), otros han padecido cáncer de ovario (III-12), etc. Es decir el fenotipo (fenotipo son las características físicas y/o bioquímicas observables de la expresión de un gen), asociado a la alteración genética no siempre es el mismo y no siempre tiene la misma severidad. Esta circunstancia se conoce como expresividad variable del fenotipo. No siempre van a aparecer el mismo número de tumores ni el mismo tipo de tumor, ni en la misma localización, ni a la

misma edad. Un ejemplo muy llamativo de expresividad variable es el de los fenotipos asociados a mutaciones en el gen *PTEN*. Pacientes que presentan mutaciones en este gen, incluso las mismas mutaciones, pueden tener un fenotipo reconocible como síndrome de Cowden, o el fenotipo del síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, o en algunos casos, el fenotipo del síndrome de Proteus (ver Tabla 1), u otros fenotipos menos frecuentes ⁶. Además, el riesgo de cáncer asociado a cada una de estas entidades probablemente no es el mismo. Mientras que los pacientes con síndrome de Cowden tienen riesgos elevados para cáncer de mama, carcinoma papilar de tiroides y carcinoma de endometrio, estos riesgos no parecen ser los mismos para pacientes con el síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, y muy probablemente son aún menores para pacientes con fenotipo Proteus.

Tanto la penetrancia incompleta como la expresividad variable son factores que deben ser tenidos en cuenta a la hora de valorar un árbol familiar y, sobre todo, a la hora del asesoramiento genético de los pacientes. En el Cuadro 1, la mujer II-2 que falleció con 81 años, era portadora asintomática de una mutación en el gen *MSH2*. Su padre también era portador de la mutación y falleció a los 60 años, y dos de sus hijos han desarrollado ya la enfermedad. Sin embargo, no podemos asegurar que el individuo III-10 o el IV-1, se vayan a beneficiar por esa misma falta de penetrancia observada en su tía y abuela, respectivamente. La penetrancia del cáncer colorrectal en el síndrome de Lynch es del 80%. Esto quiere decir que de cada 100 individuos portadores de una mutación en un gen de reparación del ADN (asumiendo la misma capacidad patogénica para todas las mutaciones en cada uno de estos genes), 80 van a desarrollar cáncer colorrectal, a una edad media de 45 años, y 20 no van a tener este cáncer. Además, como podemos deducir del árbol mostrado en el Cuadro 1, la mutación en *MSH2* identificada en esta familia muestra expresividad variable y la imposibilidad para predecir un fenotipo debe ser comunicada al paciente a la hora del asesoramiento.

Para terminar con el árbol del Cuadro 1, llamar la atención sobre el miembro de familia III-2. Se trata de una mujer de 48 años que tuvo cáncer colorrectal a los 40. Su madre de 83 años con cáncer colorrectal a los 47, y sus hermanas de 50 y 42 con diagnósticos de cáncer colorrectal a los 34 y 37, son portadoras de la mutación familiar en el gen *MSH2*. En ella hubiera sido esperable la detección de esta misma mutación familiar. Sin embargo, ésta no ha aparecido en el estudio de su sangre periférica. La paciente III-2 ha tenido un cáncer colorrectal esporádico, no asociado a mutaciones germinales en genes de susceptibilidad, en el seno de una familia con

un síndrome de Lynch causado por mutación en el gen *MSH2*. Esta circunstancia se conoce como fenocopia, el fenotipo es el mismo pero la causa es distinta. En los otros miembros de la familia la causa es la mutación en *MSH2*, mientras que en la mujer III-2 la causa es la interacción normal genotipo-ambiente. El hallazgo no es excepcional pues el cáncer es una enfermedad frecuente y, en consecuencia, en una familia con un SPCs, un porcentaje significativo, hasta un tercio ⁷, de los individuos no portadores podrían desarrollar cáncer esporádico.

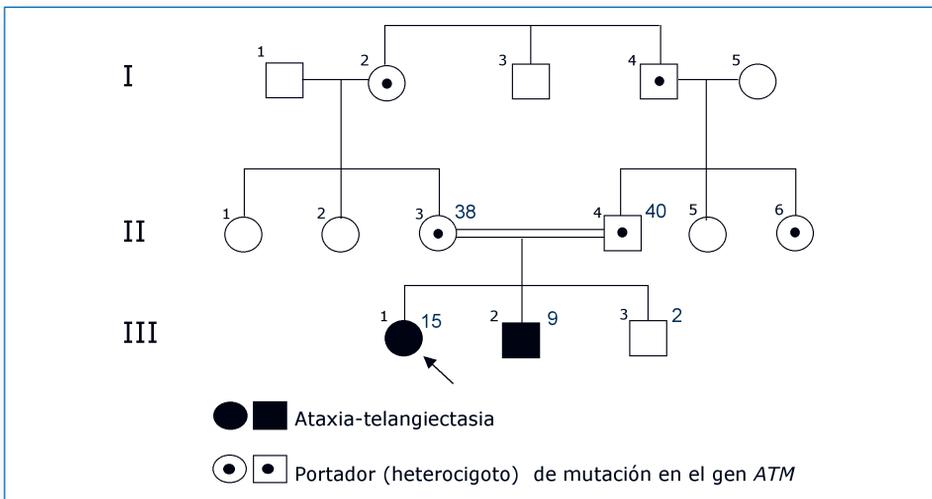
El Síndrome de Lynch al igual que muchos otros SPCs, es heterogéneo desde el punto de vista genético. Distintas mutaciones en el gen *MSH2* por ejemplo, pueden producir el mismo fenotipo: cáncer colorrectal, gástrico, de ovario, etc. Esta heterogeneidad genética se conoce como alélica: distintas mutaciones en *MSH2*, es decir, distintos alelos del gen originan idéntico fenotipo. Pero además el síndrome también muestra heterogeneidad genética de locus, que implica que distintos genes en distintos loci son capaces de producir el mismo fenotipo. De hecho se conocen al menos 7 diferentes genes encargados de la reparación de los daños en el ADN, cuyas mutaciones son responsables de la aparición del Síndrome de Lynch ⁸.

En resumen, es conveniente que la persona que deba valorar familias con posible cáncer hereditario esté familiarizada con conceptos como penetrancia, expresividad variable, fenocopias, o heterogeneidad genética, ya que son factores que si no se tienen presente pueden conducir a graves errores. Además, es conveniente tener presente que algunos rasgos fenotípicos de los SPCs pueden estar limitados por el sexo (cáncer de testículo o de endometrio) o influidos por el sexo (cáncer de mama). Este hecho también puede inducir a error a la hora de valorar el riesgo en familias en las que hay mayor presencia de uno de los sexos.

Herencia autosómica recesiva

Se dice que una herencia es autosómica recesiva cuando el fenotipo sólo aparece en estado de homocigosis, en contraste con las entidades dominantes en las que las manifestaciones fenotípicas aparecen en estado de heterocigosis. Los individuos afectados, homocigotos, han heredado una copia mutada del gen de cada uno de sus padres, que, en la mayoría de los casos, suelen ser heterocigotos (portadores) para la mutación.

En el Cuadro 2 se muestra un árbol de una familia con Ataxia-Telangiectasia, un ejemplo de SPCs con herencia autosómica recesiva. El probandus es una niña actualmente de 15 años, diagnosticada a los 2 años de Ataxia-Telangiectasia. La paciente tiene dos hermanos más jóvenes, uno afectado y otro sano. Ambos padres son jóvenes y no muestran signos de la enfermedad. En el árbol familiar es evidente que los casos han aparecido en una única generación (la generación III). Esta distribución horizontal de los casos difiere de la vertical que caracteriza al patrón de herencia autosómico dominante. Resultan afectados por igual las mujeres y los hombres. Vemos además, que los padres de los individuos afectados son sanos, no muestran signos de la enfermedad. Esto es así porque para que la enfermedad aparezca es necesario tener mutadas las dos copias del gen en cuestión, y los padres son portadores de sólo una copia anómala del gen. El riesgo para los descendientes en la herencia recesiva se muestran en el Cuadro 3. La situación más común es cuando ambos padres son portadores de un alelo recesivo (situación A en el Cuadro 3), y en tal caso, el riesgo de tener un descendiente afectado es de 1 en 4 (25%). Sin embargo, también hay que esperar las situaciones B en la que unos de los padres es afectado (homocigoto) y el otro portador (heterocigoto), o la C en la que ambos padres son afectados. En las dos situaciones los riesgos son claramente diferentes.



Cuadro 2: Familia con Ataxia-telangiectasia (OMIM#208900), ejemplo de herencia autosómica recesiva

Por definición, los trastornos recesivos sólo se manifiestan en situación de homocigosis, cuando las dos copias del gen son anómalas. En el Cuadro 2, los dos individuos afectados, III-1 y III-2, tienen mutadas ambas copias del gen *ATM*. Cada una de estas mutaciones la han heredado de uno de sus padres que son heterocigotos para la mutación y, como suele ocurrir, no presentan signos de Ataxia-telangiectasia. Una única copia anómala del gen no tiene repercusión en el fenotipo. La mayoría de estas copias anómalas se encuentran en individuos que no manifiestan la enfermedad. En estas circunstancias, estos genes pueden permanecer ocultos dentro de una misma familia y ser transmitidos de generación en generación sin evidencia alguna de su presencia. Sin embargo, la enfermedad puede aparecer en la familia cuando se unen dos miembros de la misma. Esta circunstancia se denomina consanguinidad y es un fenómeno frecuente en trastornos que siguen un patrón de herencia autosómico recesivo. En el Cuadro 2 observamos como los padres de los niños afectados (II-3 y II-4, la consanguinidad se representa con línea de unión entre ambos doble), son miembros de la misma familia (primos hermanos) y ambos son portadores de una copia mutada del gen *ATM*. La frecuencia de portadores de mutaciones en el *ATM* en la población general se ha estimado es del 1% ⁹, por tanto la probabilidad de que dos miembros de la población general no emparentados tengan un hijo con Ataxia Telangiectasia es de 1 en 40.000 ($1/100 \times 1/100 \times 1/4$, es decir probabilidad de que un padre sea portador 1/100, multiplicado por la probabilidad de que el otro padre también sea portador 1/100, y multiplicado por la probabilidad de que dos portadores de un gen recesivo tengan un hijo afectado 1/4). Lógicamente estas cifras cambian cuando se habla de individuos de la misma familia donde existe una probabilidad mucho más alta de que ambos individuos sean portadores del mismo gen recesivo. Además la probabilidad de que exista consanguinidad se incrementa en la medida que la enfermedad aparecida en la familia es más rara, ya que al ser más baja la frecuencia de portadores en la población general es más improbable que éstos se encuentren por azar.

Como se ha dicho y de acuerdo con los modelos clásicos de herencia recesiva, los portadores de una única copia alterada de un gen recesivo no manifiestan signos de la enfermedad. Esto no siempre es así, y de hecho, en la actualidad se conocen numerosas entidades recesivas en las que los portadores manifiestan bien una forma atenuada de la enfermedad, o bien ciertos rasgos de la enfermedad. En esta línea, los pacientes con Ataxia Telangiectasia muestran susceptibilidad a desarrollar cáncer, el 38% de los pacientes lo desarrollan, en especial leucemias y linfomas, y las portadoras de mutaciones en el *ATM* podrían también tener un riesgo incrementado

para desarrollar cáncer de mama ⁹. Este incremento del riesgo podría estar en relación con el daño en el ADN inducido por la exposición a radiación ionizante, a la que los portadores en *ATM* podrían mostrar una especial sensibilidad ¹⁰.

El fenotipo de los afectados por síndromes recesivos suele ser más uniforme que el de los cuadros dominantes, presentan una expresión menos variable. Esta mayor uniformidad, probablemente guarda relación con la falta del efecto modulador que ejerce la presencia de un alelo sano. Un reducido número de SPCs muestra una herencia autosómica recesiva. Se trata de entidades que suelen manifestarse en el momento del nacimiento o que se detectan en los primeros meses de vida. Además, muchos tienen cuadros clínicos severos en los que el cáncer suele ser una manifestación más dentro de un fenotipo complejo.

Herencia ligada al sexo

Es aquella herencia asociada a genes localizados en los cromosomas sexuales X e Y. El 95% del contenido genético del cromosoma Y es específico del sexo masculino y tiene que ver con la determinación de la masculinidad, mientras que menos del 5% está compuesto por genes incluidos dentro de la región pseudoautosómica ¹¹. En el catálogo OMIM de Victor McKusick ¹², se recogen tan sólo 60 entradas relacionadas con genes en el cromosoma Y y dada su escasa relación con el cáncer hereditario, no parece éste el lugar más adecuado para extenderse en este modelo de herencia.

A

Progenie de portador (R/r)* y portador (R/r)

	R	r
R	R/R sano	R/r sano, portador
r	R/r sano, portador	r/r afectado

¼ sanos ½ sanos, portadores ¼ afectados

* R: alelo normal r: alelo mutante

B

Progenie de portador (R/r) y afectado (r/r)

	R	r
r	R/r sano, portador	r/r afectado
r	R/r sano, portador	r/r afectado

½ sanos , portadores ½ afectados

C

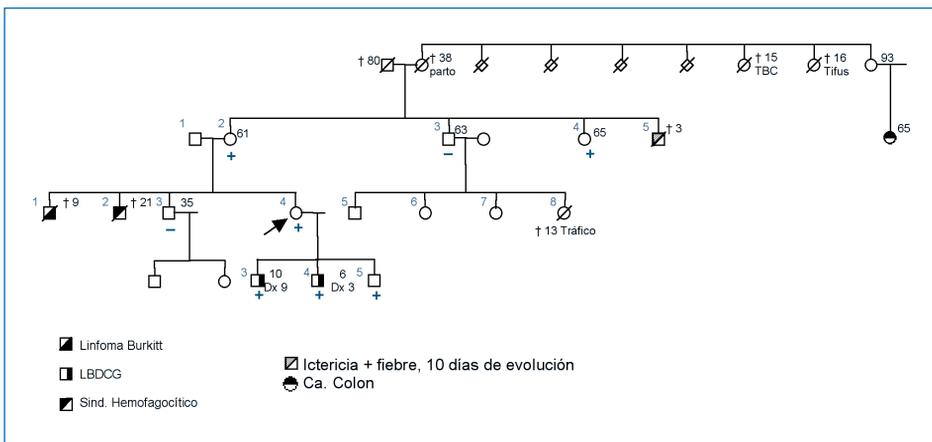
Progenie de afectado (r/r) y afectado (r/r)

	r	r
r	r/r afectado	r/r afectado
r	r/r afectado	r/r afectado

100% afectados

Cuadro 3: Herencia recesiva: riesgos para los descendientes en las tres posibles situaciones.

En cambio existen varios SPCs con herencia ligada al cromosoma X tanto recesiva como dominante. Un ejemplo de herencia ligada al X recesiva puede observarse en el Cuadro 4. La consultante es una mujer joven, sin antecedentes personales de cáncer ni enfermedad conocida, con tres hijos pequeños, dos de los cuales han tenido linfoma B difuso de células grandes a los 3 y 9 años de edad. El tercer hijo está sano. La consultante ha tenido tres hermanos, uno vive sano con 35, y los otros dos fallecieron, a los 9 años por un linfoma de Burkitt, y el otro hermano a los 21, por un síndrome hemofagocítico. En la generación anterior, una hermana de la madre de la consultante falleció a los 3 años por un cuadro con fiebre e ictericia que duró diez días. En el resto de la historia no aparecen otros datos de interés.



Cuadro 4: Herencia ligada al X recesiva. Familia con el Síndrome Linfoproliferativo ligado al X o enfermedad de Duncan (OMIM#308240)

La distribución de los casos en el árbol en el Cuadro 4, sugiere la herencia ligada al sexo: sólo aparecen varones afectados y las mujeres parecen actuar como transmisoras. En efecto, en esta herencia, el fenotipo se expresa en todos los varones que han heredado la mutación. El trastorno prácticamente queda restringido a los varones, ya que solamente las mujeres que sean homocigotas para la mutación manifestarán el fenotipo, con la excepción de los casos poco comunes de heterocigotas sintomáticas, que manifiestan signos de la enfermedad habitualmente con menor severidad o gravedad clínica que los varones afectados. Éste es un fenómeno que guarda estrecha relación con la inactivación del X⁵. Sin embargo, por lo general, las heterocigotas para una patología ligada al X recesiva no manifiestan signos de la enfermedad.

Los varones afectados transmiten el X portador del gen anómalo, a todas sus hijas que serán portadoras y transmisoras de la enfermedad. Los hijos varones de éstas tendrán un riesgo de un 50% de heredar el cromosoma X anómalo y, en consecuencia, de manifestar la enfermedad. En cambio, los hijos de varones afectados no van a recibir el X anómalo y no padecerán ni transmitirán la enfermedad. La no transmisión varón-varón es una de las características de la herencia ligada al X y un factor diferenciador con la herencia autosómica dominante.

En la herencia ligada al X dominante la enfermedad se manifestará habitualmente en las mujeres heterocigotas. Según este modelo, todas las hijas de un varón afectado, manifestarán la enfermedad, y ninguno de los hijos varones resultará afectado. En cambio las mujeres afectadas transmitirán la enfermedad de manera idéntica a la observada en el modelo autosómico dominante: el riesgo de que sus hijos, de ambos sexos, resulten afectados será del 50%.

En la herencia ligada al X dominante puede ocurrir que la alteración genética sea letal en varones, dada su condición de hemicígotos para el cromosoma X. En esta situación se observan familias en las que sólo resultan afectadas las mujeres y como consecuencia, la enfermedad sólo es transmitida por estas mujeres afectadas.

CONSTRUCCIÓN DEL ÁRBOL FAMILIAR

Los SPCs como la mayoría de las enfermedades genéticas se transmiten en las familias siguiendo alguno de los modelos de herencia comentados. Para averiguar el modelo de herencia es muy útil el dibujo del árbol familiar o pedigree de la familia. Éste consiste en la representación gráfica de las relaciones y de las características que nos interesan de los distintos miembros de la familia. Para la elaboración del árbol familiar se utilizan una serie de símbolos estandarizados, algunos de los más habituales se recogen en el Cuadro 5. Una relación más detallada de la simbología utilizada en la construcción de pedigrees humanos puede encontrarse en ¹³.

Para la construcción de árboles de familias con sospecha de SPCs hay que tener presente:

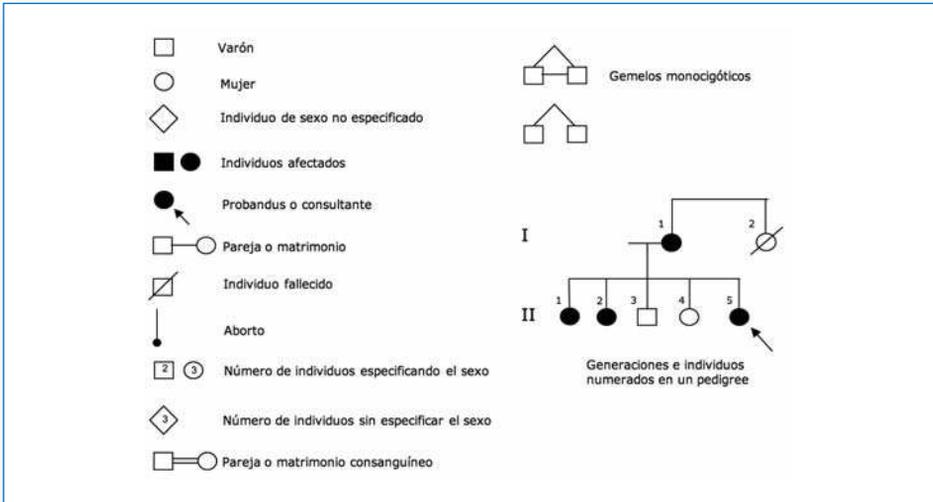
- 1.- A partir del probandus o del consultante, recoger información de las generaciones posteriores, si las hubiera, y anteriores al mismo, intentando obtener datos de al menos tres generaciones en la rama familiar de nuestro interés.

- 2.- Marcar en el pedigree todos los casos de cáncer y lesiones preneoplásicas ocurridos, indicando:
 - Localización del tumor
 - Tipo de tumor
 - Edad actual del paciente y en el momento del diagnóstico del cáncer.
 - Lugar y fecha de intervención del cáncer y de otros tratamientos, si procede. Es importante obtener esta información pues en muchos casos va a ser necesario contactar con los centros hospitalarios donde atendieron a miembros de la familia, para obtener, previa firma de consentimiento por parte del paciente, material biológico donde realizar estudios genéticos específicos. Además no hay que olvidar que, en la medida que sea posible, debe intentarse documentar los casos de cáncer ocurridos en la familia, mediante informes clínicos, patológicos, necrológicos, etc.

- 3.- Recoger la información de los individuos no afectados y de los ya fallecidos, indicando edad y causa del fallecimiento. Señalar también los abortos o recién nacidos muertos si los hubo, y la causa de los mismos si se conoce.

- 4.- Obtener la mayor información posible de otras enfermedades de origen genético o de defectos del desarrollo, anomalías congénitas o retraso mental, que pudiera haber en la familia, indicando en el pedigree los individuos afectados. Observar si alguno de estos problemas segrega con el cáncer en la familia.

Una vez reunida la información y determinada la estructura de la familia con todos los miembros, hay que ver si la aparición de los tumores se ajusta a alguno de los modelos de herencia comentados y cabe pensar en algún SPC. Tener presente que hoy en día es común encontrar familias de tamaño pequeño y recordar que una gran mayoría de los SPCs sigue una herencia autosómica dominante, que es muy común la penetrancia incompleta y una gran variabilidad en la expresión fenotípica de los SPCs. Si no se tienen presentes todos estos factores, puede hacerse difícil la interpretación de un árbol familiar con un posible SPC.



Cuadro 5: Algunos de los símbolos más frecuentemente utilizados en la construcción del árbol familiar

Características del cáncer hereditario

El cáncer hereditario y, a la postre, los SPCs, presenta una serie de características que lo diferencian del cáncer de ocurrencia esporádica. El cáncer es una enfermedad común. Uno de cada dos varones y una de cada tres mujeres van a desarrollar cáncer a lo largo de su vida en USA ⁷. Esta alta incidencia hace que sea habitual encontrar ocurrencias de tumores en la práctica totalidad de las familias. El 90-95% de todos los tumores van a ser esporádicos, en cuya aparición los factores ambientales van a tener un peso importante (un completo listado de los factores ambientales con efecto carcinogénico conocido o sospechoso, puede encontrarse en el capítulo primero de libro de K. Schneider ¹⁴).

Sólo un 5-10% de las neoplasias muestran agregación familiar o un marcado carácter hereditario. Reconocer estos casos tiene un enorme interés sanitario ya que a través del asesoramiento genético de las familias puede lograrse una efectiva reducción de la mortalidad por cáncer. En las familias con algún tipo de cáncer hereditario suele observarse alguna o varias de las siguientes características:

1.- Alta incidencia de cáncer en la familia. Junto con la edad de aparición, éste suele

ser el hecho que más llama la atención y la principal causa de consulta. Suele observarse una agregación de cánceres que va más allá de la mera concurrencia debida al azar.

- 2.- Ocurrencia del mismo tipo de cáncer. Generalmente se observa cómo el mismo tipo de cáncer (colon, próstata, mama, gástrico o cualquier otro) aparecen en una generación y en la siguiente, de acuerdo a un modelo de herencia autosómica dominante que es la más frecuente en los SPCs. A veces puede observarse una frecuencia anormalmente elevada de tumores en una única generación, cuya explicación podría estar en la existencia en la familia de una posible mutación en un gen autosómico recesivo.
- 3.- Aparición del cáncer a edad temprana. Suele ser una importante señal de alerta, tanto para pacientes como para profesionales sanitarios. Los SPCs son en su mayoría entidades con expresión en la edad adulta. El cáncer aparece a edades variables aunque es infrecuente observar cánceres congénitos. El cáncer hereditario suele aparecer entre 10-20 años antes de la edad en la que es frecuente ese mismo tipo de cáncer en su forma esporádica. Por ejemplo, la edad media de aparición del cáncer colorrectal esporádico es de 64 años en nuestro medio, mientras que la edad media de aparición del cáncer colorrectal asociado al síndrome de Lynch es de 44 años, es decir, 20 años más joven ¹⁵. También en nuestro país, la media de aparición del cáncer de mama es de 57-58 años ¹⁶. Por el contrario, los cánceres de mama asociados a mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* tienen una edad media de aparición de 43 años ¹⁷.
- 4.- Bilateralidad en el caso de afectación de órganos pares. La bilateralidad es un criterio importante para investigar la heredabilidad de un tumor. Es frecuente observar bilateralidad en los casos hereditarios de retinoblastoma, de cáncer de mama y en los cánceres renales
- 5.- Multifocalidad. No es raro observar que los tumores hereditarios se inician de manera independiente en varios focos repartidos por el órgano donde asientan, en vez de aparecer en un único foco. Para considerar que se trata de una multifocalidad asociada a un tumor hereditario sería necesario descartar que se trata de diseminación de un único tumor primario, y demostrar que cada foco constituye un clon independiente.

- 6.- Aparición de varios cánceres en el mismo individuo. No es frecuente pero, cuando se observa, debe hacer sospechar un cáncer hereditario. En todos los casos va a ser importante determinar si se trata de neoplasias primarias o de recurrencias de un tumor anterior. Sólo cuando se trata de varias neoplasias primarias es más probable que se trate de un síndrome de cáncer hereditario. También tener presente que segundas neoplasias pueden guardar relación con el tratamiento de neoplasias anteriores. Por ejemplo, las mujeres que recibieron radioterapia para el tratamiento de un linfoma de Hodgkin, tienen un riesgo incrementado para desarrollar posteriormente cáncer de mama ¹⁸.
- 7.- Asociación del cáncer con defectos del desarrollo. Como puede deducirse de las Tablas 1 y 2, muchos de los síndromes de cáncer hereditario se caracterizan por presentar un fenotipo complejo donde el cáncer es un rasgo más de un fenotipo en el que son comunes defectos del desarrollo mayores y menores. El síndrome de Rothmund-Thompson está caracterizado por una talla pequeña, cataratas juveniles y otros defectos oculares, alteraciones en la erupción de los dientes, defectos por reducción de extremidades, ausencia de rótula, retraso mental en el 10% de los casos, etc. Los pacientes con el síndrome tienen un riesgo incrementado para desarrollar carcinoma basocelular, osteosarcomas o carcinomas de células escamosas ¹⁹. Por su parte, el síndrome de Beckwith-Wiedemann se caracteriza por sobrecrecimiento, occipucio prominente, macroglosia, cardiomegalia, hiperplasia pancreática, nefromegalia, edad ósea acelerada, onfalocele, pliegues característicos en los lóbulos de las orejas, y riesgo incrementado para desarrollar tumor de Wilms, carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma, carcinoma adrenortical, gonadoblastoma, teratoma gástrico congénito, rabdomiosarcoma o neuroblastoma ²¹. Es decir ambos síndromes presentan un amplio espectro fenotípico en el que aparecen múltiples defectos del desarrollo junto al cáncer.

Cuando en una familia se observa alguna o varias de estas características, es conveniente remitirla a una unidad especializada en cáncer hereditario para asesoramiento y realización de pruebas genéticas específicas si procede. La familia podrá conocer los riesgos para cánceres específicos, se podrán establecer las oportunas medidas de vigilancia y seguimiento y programar aquellas que permitan hacer una prevención primaria de los tumores en los individuos a riesgo. Es decir, la identificación y evaluación de familias con SPCs facilita una efectiva reducción de la mortalidad por cáncer.

Síndromes de predisposición hereditaria al cáncer

Hasta la fecha se han descrito entre 100 y 200 síndromes de predisposición hereditaria al cáncer. En las Tablas 1 y 2 se muestran algunos de estos SPCs. En la Tabla 1 se muestran los más frecuentes, en los que se conoce el gen o los genes responsables y algunos datos de frecuencia o penetrancia. En la Tabla 2 aparece un segundo grupo de SPCs, casi todos ellos menos frecuentes y peor conocidos que los incluidos en la Tabla 1. Las Tablas 1 y 2 se han confeccionado con la información procedente de los trabajos de Volgestein ², Naqy y Cols ²², Lindor y Greene ²³ y Marsh y Zori ²⁴, y con la información obtenida en el catálogo de Vistor McKusick ¹². Para terminar con la relación de entidades en las que existe un incremento del riesgo para desarrollar cáncer, en la Tabla 3 se listan los síndromes cromosómicos en los que existe riesgo para cáncer.

En las tres Tablas se han listado por orden alfabético las entidades con predisposición hereditaria al cáncer, incluyendo en todas ellas una referencia de la literatura. En las siguientes columnas, en los casos en los que procede, se ha incluido el gen o el mecanismo causal del síndrome, su localización cromosómica, y el número con el que la entidad se reconoce en el catálogo OMIM ¹². En la Tabla 1 se han añadido nuevas columnas con la incidencia del síndrome en la población, la penetrancia y el riesgo para desarrollar cáncer.

Para terminar, en las Tablas 4 a 12, ambas inclusive, se han ordenado distintos tipos de cáncer por localizaciones, órganos y sistemas:

Tabla 4: Cabeza y Cuello

Tabla 5: Sistemas Cardiovascular y Respiratorio

Tabla 6: Tejido Conectivo y Piel

Tabla 7: Sistema Endocrino

Tabla 8: Sistema Gastrointestinal

Tabla 9: Sistemas Hematológico y Linfático

Tabla 10: Mama y aparato Reproductor de ambos sexos

Tabla 11: Sistema Nervioso Central

Tabla 12: Aparato Urinario

En todas las Tablas, en la columna más a la derecha, se muestran las siglas de las entidades con predisposición al cáncer en las que aparecen esos tipos de tumores.

En la Tabla 13 se incluye el listado de las abreviaturas que aparecen en las Tablas 4 a 12 y el síndrome de predisposición al cáncer al que corresponden.

TABLA 1: Síndromes más comunes de predisposición al cáncer.

Nombre del síndrome	Genes responsables	Localización Cromosómica	Nº OMIM	Modelo de herencia	Penetrancia	Incidencia	Otras denominaciones abreviaturas	Riesgo cáncer
Adenoma de hipófisis aislado familiar ²⁵	AIP	11q13.3	102200	AD	Desconocida			Desc.
Anemia de Fanconi ²⁶	FANCA FANCB FANCC FANCD1 (BRCA2) FANCD2 FANCE FANCF FANCG FANCL FANCI FANCI FANCI FANL FANCM FANCN (PALB2)	16q24.3 Xp22.31 9q22.3 13q12.3 3p25.3 6p22-p21 11p15 9p13 2p16.1 15q25-q26 17q22 2p16.1 14q21.3 16p12	227650	AR	100% en hh	1/360.000	Panцитopenia de Fanconi. FAN	50%
Ataxia-telangiectasia ⁹	ATM	11q22.3	208900	AR	100% en hh	1/30.000-1/100.000	Síndrome de Louis-Barr. AT	30-40%
Beckwith-Wiedemann, síndrome de ²⁷	KIP2 Otros genes en 11p15.5	11p15.5	130650	AD	Incompleta	1/14000	Síndrome EMG. SBW	8-20%
Birt-Hogg-Dubé, síndrome de ²⁸	FLCN	17p11.2	135150	AD	Desconocida, reducida	Raro	BHD	Desc.
Bloom, síndrome de ²⁹	RECQL3	15q26.1	210900	AR	100%	Raro	BLM	20%
Cáncer de mama y ovario hereditarios ³⁰	BRCA1 BRCA2	17q21 13q12.3	114480	AD	60%	1/500-1/2500	CMOH	60%
Carcinoma gástrico difuso hereditario ³¹	CDH1	16q22.1	137215	AD	70-80%	Raro	CGD	70-80%
Carcinoma renal papilar hereditario ³²	MET	7q31	605074	AD	Alta	Raro	CRPH	Alto

TABLA 1 (cont.): Síndromes más comunes de predisposición al cáncer.

Nombre del síndrome	Genes responsables	Localización Cromosómica	Nº OMIM	Modelo de herencia	Penetrancia	Incidencia	Otras denominaciones abreviaturas	Riesgo cáncer
Complejo de Carney ³³	PRKRA1A	17q23-q24	160980	AD	Desconocida, reducida	Raro	Síndrome NAME; síndrome LAMB; Enfermedad adrenocortical nodular; Mixoma-Displasia adrenocortical. CC	Desc
Costello, síndrome de ³⁴	HRAS	11p15.5	218040	AD			Síndrome Facio-cutáneo-esquelético (FCS)	10-15%
Esclerosis Tuberosa ³⁵	TSC1 TSC2	9q34 16p13.3	191100	AD	95-100%	1/ 6000-10000	Enfermedad de Bourneville; Epiloia. ET	Desc
Gorlin, síndrome de ^{36, 37 *}	PTCH1 PTCH2	9q22.3 1p32	109400	AD	90-97%	1/57000	Síndrome de nevus basocelular; Síndrome de Gorlin; Síndrome de Gorlin-Goltz; Quinta facomatosis. SG	90%
Hiperparatiroidismo ³⁸	HRPT2	1q25-q31	145001	AD	90%	Raro	Hiperparatiroidismo y tumores de mandíbula. HPT	
Leiomiomatosis uterina y cancer renal hereditarios ^{39, 40}	FH	1q42.1	605839	AD	Desconocida	Raro	LCR	15-60%
Li-Fraumeni, síndrome de ⁴¹	TP53	17p13.1	151623	AD	90-95%	Raro	SLF	90%
Lynch, síndrome de ^{8, 42}	MSH2 MLH1 MSH6 PMS2 PMS1 MLH3 TFGBR2	2p22-p21 3p21.3 2p16 7p22 2q31-q33 14q24.3 3p22	120435	AD	80-90%	1/200-1/1000	Síndrome de Lynch, tipos 1 y 2; Cáncer colorrectal no polipósico hereditario; CCNPH; HNPCC; Síndrome de Muir Torre. SL	80% (¿)

TABLA 1 (cont.): Síndromes más comunes de predisposición al cáncer.

Nombre del síndrome	Genes responsables	Localización Cromosómica	Nº OMIM	Modelo de herencia	Penetrancia	Incidencia	Otras denominaciones abreviaturas	Riesgo cáncer
Melanoma maligno familiar ^{43, 44}	CDKN2A CDK4	9p21 12q14	155600	AD	30% a los 50a	1/10000	Síndrome del nevus displásico. MMF	90%
Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1 ^{45, 46}	MEN1	11q13	131100	AD	100% a los 60a	2-10/100000	Síndrome de Wermer; Síndrome de Zollinger-Elison. MEN1	<10%
Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 ⁴⁶	RET	10q11.2	171400	AD	70-100%	1/25000	Carcinoma medular de tiroides familiar; Síndrome de Simple. MEN2	70% a los 70a
Neurofibromatosis tipo 1 ^{47, 48}	NF1	17q11.2	162200	AD	100%	1/3500	Enfermedad de von Recklinghausen. NF1	2-5%
Neurofibromatosis tipo 2 ⁴⁹	NF2	22q12.2	101000	AR	100% a los 60a	1/40000	NF2	Desc.
Nijmegen, síndrome de ¹⁹	NBS1	8q21	251260	AD	100%	Raro	Síndrome de roturas de Nijmegen; Síndrome de Seemanova; Variante 1 de Ataxia telangiectasia; Síndrome de roturas de Berlín. SN	
Paraganglioma familiar ^{50, 51}	SDHB SDHC SDHD SDH5	1p36.1-p35 1q21 11q23 11q13.1	168000	AD	75% SDHB 90% SDHD Resto desconocida	Raro	PF	75% SDHB 90% SDHD Resto desc.
Peutz-Jeghers, síndrome de ⁵²	STK11	19p13.3	175200	AD	95-100%	1/120000	Síndrome de pólipos y manchas. SPJ	50%

TABLA 1 (cont.): Síndromes más comunes de predisposición al cáncer.

Nombre del síndrome	Genes responsables	Localización Cromosómica	Nº OMIM	Modelo de herencia	Penetrancia	Incidencia	Otras denominaciones abreviaturas	Riesgo cáncer
PTEN-hamartomas, síndrome de ^{6, 53}	PTEN	10q23.31	158350 153480 176920	AD AD esporádico	Cowden: 99%	Cowden: 1/200000	Síndrome de Cowden (SC); Enfermedad de Lhermitte-Duclos; Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba (BRR); Síndrome de Bannayan-Zonana; Síndrome de Riley-Smith; Síndrome de Ruvalcaba-Myhre; Lipomatosis encefalo-cra-neo-cutánea; Síndrome de Proteus (SP)	SC 50%
Poliposis Adenomatosa Familiar ⁵⁴	APC	5q21-q22	175100	AD	100%	1/6000-1/13000	Síndrome de Gardner. PAF	100%
Poliposis asociada a MYH ^{55, 56}	MYH	1p34.3-p32.1	604933	AR	Alta en hh	Raro	MYH	Alto en hh
Poliposis juvenil ⁵⁷	SMAD4 BMPR1A	18q21.1 10q22.3	174900	AD	90-100%	1/100000	PJ	20%
Retinoblastoma hereditario ⁵⁸	RB1	13q14.1	180200	AD	90%	1/13500-1/25000	RB	90%
Rothmund-Thomson, síndrome de ¹⁹	RECQL4	8q24.3	268400	AR	100% en hh	Raro	SRT	Desc
Simpson-Golabi-Behmel, síndrome de ⁵⁹	GPC3 CXORF5	Xq26 Xp22	312870	LX-R	Desconocida	Raro	Síndrome del "bulldog". SGB	
Síndrome linfoproliferativo autoinmune ⁶⁰	FAS FASL CASP10 CASP8	10q24.1 1q23 2q33-q34 2q33-q34	601859	AD	100%	Raro	Síndrome de Canale-Smith. ALPS	Desc

TABLA 1 (cont.): Síndromes más comunes de predisposición al cáncer.

Nombre del síndrome	Genes responsables	Localización Cromosómica	Nº OMIM	Modelo de herencia	Penetrancia	Incidencia	Otras denominaciones abreviaturas	Riesgo cáncer
Síndrome linfoproliferativo ligado al X ⁶¹	SH2	Xq25	308240	LX-R	Desconocida	Raro	Enfermedad de Duncan; Síndrome de Purtilo; Susceptibilidad familiar a la infección por virus Epstein-Barr. SLPLX	
Sotos, síndrome de ^{27, 62}	NSD1	5q35	117550	esporádico	100%	Raro	Gigantismo cerebral. SS	2-3%
Tumor estromal gastrointestinal familiar ⁶³	KIT	4p12	606764	AD	Desconocida	Raro	GIST	
Tumor de Wilms familiar ^{64, 65}	WT1	11p13	194070	AD	100%	1/10000	Nefroblastoma familiar. TWF	100%
Turcot, síndrome de ⁶⁶	APC MSH2 MLH1	5q21-q22 2p22-p21 3p21.3	276300	AD	80-100%	Raro	ST	80-100%
von Hippel-Lindau, síndrome de ⁶⁷	VHL	3p26-p25	193300	AD	90-95%	1/36000-1/45500	VHL	45%
Werner, síndrome de ¹⁹	RECQL2	8p12-p11.2	277700	AR	100%	1/50000-1/1000000	Progeria del adulto. SW	10%
Xeroderma pigmentosum ⁶⁸	XPA XPC ERCC2 ERCC3 ERCC4 ERCC5 DDB2 POLH	9q22.3 3p25 19q13.2-q13.3 2q21 16p13.3-p13.13 13q33 11p12-p11 6p21.1-p12	278700 278720 278730 610651 278760 278780 278740 278750	AR AR AR AR AR AR AR AR	100%	1/250000-1/1000000		90%

AD: autosómico dominante

AR: autosómico recesivo

LX-R: ligado al X recesivo

hh: homocigotos

* Mutaciones germinales que predisponen a la aparición de meduloblastoma se han descrito en el gen *SUFU* (OMIM#607035)⁶⁹

** Otras formas de susceptibilidad a cáncer colorectal se han asociado a mutaciones en el gen *AXIN2* (OMIM#604025)⁷⁰

*** Mutaciones bialélicas en *BRCA2* se han descrito en tumor de Wilms familiar⁷¹

TABLA 2: Otros síndromes de predisposición hereditaria al cáncer

Nombre del síndrome	Genes responsables	Localización Cromosómica	Nº OMIM	Modelo de herencia	Otras denominaciones abreviaturas
Bazex, síndrome de ⁷²	-	Xq24-q27	301845	LX-D	Síndrome de Bazex-Dupre-Christol. BDC
Cáncer no medular de tiroides familiar ⁷³	-	-	188550	AD	Carcinoma papilar de tiroides familiar. CNMTF
Cáncer de próstata familiar ⁷⁴	-	-	176807	AD	CPF
Cáncer de testículo familiar ⁷⁵	-	-	273300		CTF
Carcinoma de células escamosas esofágico ⁷⁶	-	-	133239	AD	CCEE
Carcinoma renal de células claras familiar ³²	*	-	144700	AD	Hipernefroma. CRCCF
Chediak-Higashi, síndrome de ⁷⁷	LYST	1q42.2-q42.2	214500	AR	SCH
Currarino, síndrome de ⁷⁸	HLXB9	7q36	176450	AD	Triada de Currarino. TC
Denys-Drash, síndrome de ⁷⁹	WT1	11p13	194080	AD	Pseudohermafroditismo y tumor de Wilms. SDD
Diamond-Blackfan, síndrome de ⁸⁰	RPS19	19q13.2	105650	AD	Anemia de Diamond-Blackfan; Síndrome de Aase-Smith. SDB
Disqueratosis congénita ⁸¹	DKC1	Xq28	305000	LX-R	Síndrome de Zinsser-Cole-Engman. DQC
Esófago de Barret ⁸²	-	-	109350	AD	Metaplasia de Barrett; Reflujo gastroesofágico. EB
Ferguson-Smith, síndrome de ⁸³	-	-	132800	AD	SFS
Glioma cerebral familiar ⁸⁴	-	-	137800	AD? AR?	GCF
Hemihipertrofia ⁸⁵	-	-	235000	AR? Multifactorial?	Hemihiperplasia. HH
Insensibilidad a los andrógenos, síndrome de ⁸⁶	AR (DHTR)	Xq11-q12	300068	LX-R	Feminización testicular. SIA
Linfoma de Hodgkin familiar ⁸⁷	-	-	236000	AR	LHF
Melanoma-astrocitoma, síndrome de ⁸⁸	CDKN2A	9p21	155755	AD	SMA
Melanosis neurocutánea ⁸⁹	-	-	249400	esporádico	MN
Neutropenia congénita severa ⁹⁰	-	-	202700	AR	Enfermedad de Kostmann. NCS
Ollier, síndrome de ⁹¹	PTHR1	3p22-p21.1	166000	AD?	Encondromatosis múltiple; Síndrome de Maffucci. SO
Pancreatitis hereditaria ⁹²	-	-	167800	AD	PH

TABLA 2: Otros síndromes de predisposición hereditaria al cáncer. (Continuación)

Nombre del síndrome	Genes responsables	Localización Cromosómica	Nº OMIM	Modelo de herencia	Otras denominaciones abreviaturas
Poliposis mixta hereditaria ⁹³	-	-	601228	AD	PMH
Reifenstein, síndrome de ⁹⁴	AR (DHTR)	Xq11-q12	312300	LX-R	Síndrome de insensibilidad parcial a los andrógenos. SR
Shwachman-Diamond, síndrome de ⁹⁵	SBDS	7q11	260400	AR	Lipomatosis congénita del páncreas; Síndrome de Shwachman-Bodian. SSD
Síndrome de predisposición a tumores rabdoideos ⁹⁶	SMARCB1	22q11	609322	AD?	SPTTR
Tilosis palmoplantar con cáncer esofágico ⁹⁷	-	-	148500	AD	TCE
Trombocitopenia amegacariocítica congénita ⁹⁸	MPL	1p34	604498	AR	TAC
Trombocitopenia familiar con predisposición a la leucemia mieloide aguda ⁹⁹	CBFA2	21q22.3	601399	AD	Trastorno familiar de las plaquetas asociado a leucemia mieloide aguda. TF
WAGR, síndrome de ¹⁰⁰	Síndrome de genes contiguos (AN2, WT1)	11p13	194072	AD	Síndrome de tumor de Wilms-aniridia-anomalías genitourinarias-retraso mental. WAGR
Wiskott-Aldrich, síndrome de ¹⁰¹	WAS	Xp11.23-p11.22	301000	LX-R	Síndrome de eczema-trombocitopenia-inmunodeficiencia. SWA

AD: autosómico dominante
 AR: autosómico recesivo
 LX-D: ligado al X dominante
 LX-R: ligado al X recesivo

* En varias familias con CRCCF se han identificado translocaciones cromosómicas constitucionales implicando al cromosoma 3 que segregan con la enfermedad (revisado en¹⁰²)

TABLA 3: Síndromes cromosómicos en los que se ha descrito un incremento del riesgo de cáncer

Nombre del síndrome	Alteración cromosómica	Incidencia	Otras denominaciones Abreviaturas
Síndrome de Down ⁽¹⁰³⁾	Trisomía 21	1/650 RNV	Trisomía 21. SDo
Síndrome de Klinefelter ⁽¹⁰⁴⁾	1 ó más cromosomas X extras en varones	47, XXY: 1/2000 RNV 48, XXXY: 1/50.000 RNV 48, XXXY: 49, XXXYY; y mosaicos: 1/20.000 RNV	SKI
Síndrome de Turner ⁽¹⁰⁵⁾	X	1/4000-1/8000 RNV	Síndrome de Ullrich-Turner. STu
Trisomía 8 en mosaico ⁽¹⁰⁶⁾	Cromosoma 8 extra en algunas células, órganos o sistemas	Desconocida	T8

RNV: Recién nacidos vivos

TABLA 4: Cabeza y cuello

Boca	Carcinoma	BLM
	Carcinoma de células escamosas	XP, DQC
	Neuromas cutaneomucosos	MEN2
	Tumor osificante mandibular	HPT
Nariz	Carcinoma de células escamosas	FAN, BLM, XP, DQC
	Hamartomas	ET
	Melanoma de la mucosa nasal	SW
Oído	Schwanoma vestibular	NF2
	Tumor de sacos endolinfáticos	VHL
Ojo	Carcinoma de células escamosas	XP
	Glioma óptico	NF1
	Hamartomas del iris (nódulos de Lisch)	NF1
	Hemangioblastoma	VHL
	Melanoma ocular	SLF, CMOH, MN
	Pinealoma	RB
	Retinoblastoma	RB

TABLA 5: Cardiovascular y respiratorio

Corazón	Fibroma cardíaco	SG
	Rabdomioma	ET
	Neurofibroma mixoide	CC
	Mixoma	CC
Laringe	Carcinoma	BLM
		SL
Pulmón	Carcinoma	BLM
		SLF, SPJ, RB, XP
Faringe	Carcinoma de células escamosas	XP

TABLA 6: Conectivo y piel

Hueso	Sarcoma Ewing	RB
	Osteomas	PAF
	Osteosarcoma	SLF, RB, SRT, SW, SO
Tejidos blandos	Carcinoma sebáceo	SL(*)
	Fibroma	SC, CC, XP
	Leiomioma	LCR
	Leiomiomasarcoma	AT, SLF, HH, T8
	Lipoma	BHD, SC, PAF, MEN1, SP
	Liposarcoma	SLF, CC
	Neurofibroma	NF1, NF2
	Neurofibrosarcoma	NF1
	Rabdomiosarcoma	SBW, SLF, XP
	Sarcoma de tejidos blandos inespecífico	SLF, SW
	Tumor desmoide	PAF
Piel	Angiofibroma facial	ET
	Angiosarcoma cutáneo	XP
	Carcinoma basocelular	SG, BLM, PAF, SRT, XP, BDC
	Carcinoma de células escamosas	FAN, SRT, XP, DQC
	Carcinoma no melanoma	SG, XP, SW, FAN, BLM, SFS
	Colagenoma	MEN1
	Epiteliomas	XP
	Fibroangioma facial	MEN1
	Fibrofolículo	BHD
	Hamartomas	SC
	Melanoma	CC
	Mixoma cutáneo	MMF, XP, SW, RB, SMA, AT, SC, SLF, MN
	Nevi displásicos	CC
	Quistes epidermoides	MMF, CC
	Quistes sebáceos	PAF
	Tricolemoma/tricodiscoma/folículo	SC, BHD
	Tumor glándulas sebáceas	SL(*)
Teratoma	Teratoma presacro	TC

(*) En síndrome de Muir Torre

TABLA 7: Endocrino

Suprarrenales	Adenoma	MEN1
	Hemangioma	VHL
	Carcinoma adrenocortical	SBW, SLF, CC, HH
	Feocromocitoma	MEN2, NF1, VHL, PF
Paratiroides	Adenoma/hiperplasia	BHD, MEN1, MEN2, HPT
	Carcinoma	MEN1
Hipófisis	Adenoma	MEN1, CC
Tiroides	Carcinoma inespecífico	CC, SW
	Adenoma	CC, ET
	Carcinoma folicular	SC, PAF, SW
	Carcinoma medular	MEN2
	Carcinoma papilar	SC, PAF, CC, CNMTF
Tejido paraganglionar	Paraganglioma	PF, VHL, MEN2, NF1

TABLA 8: Gastrointestinal

Ampolla de Vater	Carcinoma periampular	PAF
Conducto biliar	Carcinoma	CMOH, PAF, SL
Colon/recto	Adenocarcinoma	SL, PAF, PJ, MYH, PMH, BLM, CMOH, SLF, CC, SPJ, ST
Esófago	Carcinoma	BLM, TCE, FAN, EB, CCEE
Estómago	Adenocarcinoma	SL, CGD, PAF, CMOH, AT, BLM, PJ, SLF, SW, XP
	Hamartoma	PJ, SG, SPJ
	Teratoma gástrico congénito	SBW
	Tumor carcinoide	MEN1, NF1
	Tumor desmoide	PAF
	Tumor estromal	GIST
Hígado	Carcinoma hepatocelular	ALPS, SBW, FAN
	Hepatoblastoma	PAF, SBW, SW, HH
Intestino delgado	Adenocarcinoma	PAF, SL, PJ, SPJ
	Hamartoma	PJ
	Tumor estromal	GIST
Páncreas	Adenoma	VHL
	Carcinoma	CMOH, SL, AT, BLM, MMF, SMA, PJ, CC, SPJ, VHL, PH, PAF, DQC
	Gastrinoma	MEN1, VHL
	Quistes	VHL
Pólipos colónicos	Adenomas	PAF, SL, PMH, MYH
	Hamartomas	SC, SPJ, PMH, ET
	Hamartomas juveniles	PJ
	Juveniles atípicos	PMH
	Poliposis adenomatosa	PAF
Vesícula	Carcinoma	CMOH

TABLA 9: Hematológico y linfático

Leucemia	Aguda inespecífica	RB, SW, XP, SDB, SLF, STu, SSD, TAC, T8
	Linfoblástica aguda	BLM, SLF, AT, SN, SDo
	Mieloide aguda	FAN, SDB, SW, SDo, NCS, SSD, TF
	Linfocítica crónica	AT
Linfoma	No Hodgkin inespecífico	BLM, RB, SLPLX, AT, SN, ALPS, SWA
	No Hodgkin de células B	ALPS, AT, SLPLX
	No Hodgkin de células T	AT
	Hodgkin	ALPS, LHF, AT, SWA, SN, DQC

TABLA 10: Mama y aparato reproductor de ambos sexos

Cérvix	Cáncer de tipo no especificado	BLM
Mama	Adenocarcinoma en mujeres	CMOH, AT, SC, SL, SLF, SPJ, SW, XP, BLM
	Adenocarcinoma en varones	CMOH, SC, SKI, SR
	Sarcoma	SLF
Ovario	Adenocarcinoma	CMOH, SL, SPJ, SC, AT, SG
	Células germinales	STu
	Células granulosa	SPJ, SO
	Fibroma	SG
Peritoneo	Carcinoma seroso papilar	CMOH
Próstata	Carcinoma	CPF, CMOH
Testículo	Tumor de células germinales	SKI, CC, SPJ, XP, SIA, CTF
	Gonadoblastoma	SDD, WAGR, SBW
	Tumor de células germinales extragonadal	SKI, T8
	Tumor de células de Sertoli/Leydig	CC, CTF
Útero	Carcinoma de endometrio	SL, SC, SPJ, XP
	Leiomiomas uterinos	LCR, CC, SC
	Sarcoma	SLF
Vulva	Carcinoma de células escamosas	FAN

TABLA 11: Nervioso Central

Cerebro	Astrocitoma	GCF, NF1, ET, SMA
	Ependimoma	NF1, NF2, ET
	Gangliocitoma cerebelar	SC
	Glioblastoma	SC, ST, RB
	Glioma	NF2, ST, AT, RB
	Glioma óptico	NF1
	Hemangioblastoma	VHL
	Meduloblastoma	AT, SG, PAF, ST, SPTR
	Meningioma	NF1, NF2, SG, SW, SC
	Tumor plexos coroideos	SLF
Cualquier tipo de tumor	SLF, XP, FAN	
Sistema nervioso	Hemangioma medular	VHL
	Neuroblastoma	SBW, SLF
	Neurofibroma (medular)	NF1, NF2
	Paraganglioma	VHL, PF
	Schwanoma	NF2, NF1

TABLA 12: Urinario

Pelvis renal	Células transicionales	SL
Riñón	Adenoma	VHL
	Angiomiolipoma	ET
	Carcinoma de células renales, células claras	VHL, BHD, SC, CRCCF, SW
	Carcinoma de células renales, papilar	CRPH, LCR, ET, HPT, BHD
	Lipoma	ET
	Oncocitoma	ET, BHD
	Quistes	VHL
	Tumor rabdoide	SPTR
	Wilms	TWF, WAGR, SBW, HPT, SDD, HH, SGB, SS, T8, ET
Uréter	Carcinoma	SL
Vejiga	Carcinoma	SL, SW

TABLA 13: Abreviaturas utilizadas en las Tablas 4-12

ALPS	Síndrome linfoproliferativo autoinmune	SBW	Síndrome de Beckwith Wiedemann
AT	Ataxia Telangiectasia	SC	Síndrome de Cowden
BDC	Síndrome de Bazex	SCH	Síndrome de Chediak-Higashi
BHD	Birt-Hogg-Dubé, síndrome de	SDB	Síndrome de Diamond-Blackfand
BLM	Bloom, síndrome de	SDD	Síndrome de Denys-Drash
CC	Complejo de Carney	SDo	Síndrome de Down
CCEE	Carcinoma de células escamosas esofágico	SFS	Síndrome de Ferguson-Smith
CGD	Carcinoma gástrico difuso hereditario	SG	Síndrome de Gorlin
CMOH	Carcinoma de mama/ovario hereditario	SIA	Síndrome de insensibilidad a los andrógenos
CNMTF	Carcinoma no medular de tiroides familiar	SGB	Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel
CPF	Cáncer de próstata familiar	SKI	Síndrome de Klinefelter
CRCCF	Carcinoma renal de células claras familiar	SL	Síndrome de Lynch
CRPH	Carcinoma renal papilar hereditario	SLF	Síndrome de Li-Fraumeni
CTF	Cáncer de testículo familiar	SLPLX	Síndrome linfoproliferativo ligado al X
DQC	Disqueratosis congénita	SMA	Síndrome de melanoma astrocitoma
EB	Esófago de Barrett	SN	Síndrome de Nijmegen
ET	Esclerosis tuberosa	SO	Síndrome de Ollier
FAN	Anemia de Fanconi	SP	Síndrome de Proteus
GCF	Glioma cerebral familiar	SPJ	Síndrome de Peutz-Jeghers
GIST	Tumor estromal gastrointestinal	SPTR	Síndrome de predisposición a tumores rabdoideos
HH	Hemihipertrofia	SR	Síndrome de Reifenstein
HPT	Hiperparatiroidismo	SRT	Síndrome de Rothmund-Thompson
LCR	Leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditarios	SS	Síndrome de Sotos
LHF	Linfoma Hodgkin familiar	SSD	Síndrome de Shwachman-Diamond
MEN1	Neoplasia endocrina múltiple tipo 1	ST	Síndrome de Turcot
MEN2	Neoplasia endocrina múltiple tipo 2	STu	Síndrome de Turner
MMF	Melanoma maligno familiar	SW	Síndrome de Werner
MN	Melanosis neurocutánea	SWA	Síndrome de Wiskott-Aldrich
MYH	Poliposis asociada a MYH	T8	Trisomía 8
NCS	Neutropenia congénita severa	TAC	Trombocitopenia amegacariocítica congénita
NF1	Neurofibromatosis tipo 1	TCE	Tilosis palmoplantar y cáncer esofágico
NF2	Neurofibromatosis tipo 2	TF	Trombocitopenia familiar con predisposición LMA
PAF	Poliposis adenomatosa familiar	TWF	Tumor de Wilms familiar
PF	Paraganglioma familiar	VHL	Síndrome de von Hippel Lindau
PH	Pancreatitis hereditaria	XP	Xeroderma pigmentosum
PJ	Poliposis juvenil	WAGR	Síndrome de WAGR
PMH	Poliposis mixta hereditaria		
RB	Retinoblastoma		

Bibliografía

- 1 Cohen MJ. *The Child with Multiple Birth Defects*, 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1997.
- 2 Bert Vogelstein KWK. *The Genetic Basis of Human Cancer*, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 2002.
- 3 Ponder BA. Cancer genetics. *Nature* 2001;411(6835):336-41.
- 4 Frank SA. Genetic predisposition to cancer - insights from population genetics. *Nat Rev Genet* 2004;5(10):764-72.
- 5 Nussbaum R.L. MRR, Willard H.F. *Thompson & Thompson: Genetics in Medicine*, Sixth edition ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001.
- 6 Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat* 2003;22(3):183-98.
- 7 ASCO. Cancer Facts & Figures 2005, Appendix- Genetic Differential Diagnoses by Organ System Neoplasms. <http://www.asco.org/ac/>.
- 8 Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338(21):1481-7.
- 9 Broeks A, Urbanus JH, Floore AN, et al. ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. *Am J Hum Genet* 2000;66(2):494-500.
- 10 Worgul BV, Smilenov L, Brenner DJ, et al. Mice heterozygous for the ATM gene are more sensitive to both X-ray and heavy ion exposure than are wildtypes. *Adv Space Res* 2005;35(2):254-9.
- 11 Willard HF. Tales of the Y chromosome. *Nature* 2003;423(6942):810-1, 813.
- 12 McKusick V. Online Mendelian Inheritance in Man (TM). McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- 13 Bennett RL, Steinhaus KA, Uhrich SB, et al. Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. Pedigree Standardization Task Force of the National Society of Genetic Counselors. *Am J Hum Genet* 1995;56(3):745-52.
- 14 Schneider K. *Counselling About Cancer. Strategies for Genetic Counselling.*, Second edition ed. New York: Wiley-Liss, 2002.
- 15 Casimiro C. [Etiopathogenic factors in colorectal cancer. Nutritional and life-style aspects. 2.]. *Nutr Hosp* 2002;17(3):128-38.
- 16 Mahillo Ramos E LCA, Ruiz Simón A, Lluch Hernández A, Munárriz B, Pastor Borgoñón M, Antón Torres A, Alba Conejo E, Martínez del Prado P, Martín Jiménez M. Estudio epidemiológico del grupo GEICAM sobre el cáncer de mama en España (1994-1997). Proyecto "El Álamo II".
- 17 Diez O, Osorio A, Duran M, et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat* 2003;22(4):301-12.
- 18 Guibout C, Adjadj E, Rubino C, et al. Malignant breast tumors after radiotherapy for a first cancer during childhood. *J Clin Oncol* 2005;23(1):197-204.
- 19 Duker NJ. Chromosome breakage syndromes and cancer. *Am J Med Genet* 2002;115(3):125-9.
- 20 Rump P, Zeegers MP, van Essen AJ. Tumor risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: A review and meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2005;136(1):95-104.
- 21 Offit K. *Clinical Cancer Genetics*. New York: Wiley-Liss, 1998.
- 22 Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 2004;23(38):6445-70.
- 23 Lindor NM, Greene MH. The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(14):1039-71.
- 24 Marsh D, Zori R. Genetic insights into familial cancers— update and recent discoveries. *Cancer Lett* 2002;181(2):125-64.

- 25 Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, *et al.* Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* 2006;312 (5777):1228-30.
- 26 Zhi G, Wilson JB, Chen X, *et al.* Fanconi anemia complementation group FANCD2 protein serine 331 phosphorylation is important for fanconi anemia pathway function and BRCA2 interaction. *Cancer Res* 2009;69(22):8775-83.
- 27 Lapunzina P. Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: a comprehensive review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005;137C(1):53-71.
- 28 Schmidt LS, Nickerson ML, Warren MB, *et al.* Germline BHD-mutation spectrum and phenotype analysis of a large cohort of families with Birt-Hogg-Dube syndrome. *Am J Hum Genet* 2005;76(6):1023-33.
- 29 Wu L, Hickson ID. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 2003;426(6968):870-4.
- 30 Milne RL, Osorio A, Cajal TR, *et al.* The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. *Clin Cancer Res* 2008;14(9):2861-9.
- 31 Fitzgerald RC, Caldas C. Familial gastric cancer - clinical management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20(4):735-43.
- 32 Bodmer D, van den Hurk W, van Groningen JJ, *et al.* Understanding familial and non-familial renal cell cancer. *Hum Mol Genet* 2002;11(20):2489-98.
- 33 Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(9):4041-6.
- 34 White SM, Graham JM, Jr., Kerr B, *et al.* The adult phenotype in Costello syndrome. *Am J Med Genet A* 2005;136(2):128-35.
- 35 Mak BC, Yeung RS. The tuberous sclerosis complex genes in tumor development. *Cancer Invest* 2004;22(4):588-603.
- 36 High A, Zedan W. Basal cell nevus syndrome. *Curr Opin Oncol* 2005;17(2):160-6.
- 37 Fan Z, Li J, Du J, *et al.* A missense mutation in PTCH2 underlies dominantly inherited NBCCS in a Chinese family. *J Med Genet* 2008;45(5):303-8.
- 38 Carpten JD, Robbins CM, Villablanca A, *et al.* HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Nat Genet* 2002;32(4):676-80.
- 39 Toro JR, Nickerson ML, Wei MH, *et al.* Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *Am J Hum Genet* 2003;73(1):95-106.
- 40 Wei MH, Toure O, Glenn GM, *et al.* Novel mutations in FH and expansion of the spectrum of phenotypes expressed in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Med Genet* 2006;43(1):18-27.
- 41 Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, *et al.* Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003;63(20):6643-50.
- 42 Vasen HF, Moslein G, Alonso A, *et al.* Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet* 2007;44(6):353-62.
- 43 Bataille V. Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer* 2003;39(10): 1341-7.
- 44 Laud K, Marian C, Avril MF, *et al.* Comprehensive analysis of cdkn2a (p16ink4a/p14arf) and cdkn2b genes in 53 melanoma index cases considered to be at heightened risk of melanoma. *J Med Genet* 2005.
- 45 Bassett JH, Forbes SA, Pannett AA, *et al.* Characterization of mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Am J Hum Genet* 1998;62(2):232-44.
- 46 Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer* 2005;5(5):367-75.

- 47 Arun D, Gutmann DH. Recent advances in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol* 2004;17(2):101-5.
- 48 Lazaro C, Ravella A, Gaona A, et al. Neurofibromatosis type 1 due to germ-line mosaicism in a clinically normal father. *N Engl J Med* 1994;331(21): 1403-7.
- 49 Baser ME, Kuramoto L, Joe H, et al. Genotype-phenotype correlations for nervous system tumors in neurofibromatosis 2: a population-based study. *Am J Hum Genet* 2004;75(2):231-9.
- 50 Pawlu C, Bausch B, Neumann HP. Mutations of the SDHB and SDHD genes. *Fam Cancer* 2005;4(1):49-54.
- 51 Ricketts CJ, Forman JR, Rattenbury E, et al. Tumour Risks and Genotype-Phenotype-Proteotype Analysis in 358 Patients with Germline Mutations in SDHB and SDHD. *Hum Mutat* 2009.
- 52 Yee NS, Furth EE, Pack M. Clinicopathologic and molecular features of pancreatic adenocarcinoma associated with Peutz-Jeghers syndrome. *Cancer Biol Ther* 2003;2(1):38-47.
- 53 Nelen MR, Kremer H, Konings IB, et al. Novel PTEN mutations in patients with Cowden disease: absence of clear genotype-phenotype correlations. *Eur J Hum Genet* 1999;7(3):267-73.
- 54 Jo WS, Chung DC. Genetics of hereditary colorectal cancer. *Semin Oncol* 2005;32(1):11-23.
- 55 Poulsen ML, Bisgaard ML. MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Curr Genomics* 2008;9(6):420-35.
- 56 Leite JS, Isidro G, Martins M, et al. Is prophylactic colectomy indicated in patients with MYH-associated polyposis? *Colorectal Dis* 2005;7(4):327-31.
- 57 Handra-Luca A, Condroyer C, de Moncuit C, et al. Vessels' morphology in SMAD4 and BMPR1A-related juvenile polyposis. *Am J Med Genet A* 2005; 138A(2):113-7.
- 58 Alonso J, Garcia-Miguel P, Abelairas J, et al. Spectrum of germline RB1 gene mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mutat* 2001;17(5):412-22.
- 59 Gillan TL, Hughes R, Godbout R, et al. The Simpson-Golabi-Behmel gene, GPC3, is not involved in sporadic Wilms tumorigenesis. *Am J Med Genet A* 2003;122(1):30-6.
- 60 Poppema S, Maggio E, van den Berg A. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. *Leuk Lymphoma* 2004;45(3):423-31.
- 61 Sumegi J, Seemayer TA, Huang D, et al. A spectrum of mutations in SH2D1A that causes X-linked lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus-associated illnesses. *Leuk Lymphoma* 2002;43(6):1189-201.
- 62 Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, et al. Genotype-Phenotype Associations in Sotos Syndrome: An Analysis of 266 Individuals with NSD1 Aberrations. *Am J Hum Genet* 2005;77(2).
- 63 Li FP, Fletcher JA, Heinrich MC, et al. Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: phenotypic and molecular features in a kindred. *J Clin Oncol* 2005;23(12):2735-43.
- 64 Rahman N, Arbour L, Houlston R, et al. Penetrance of mutations in the familial Wilms tumor gene FWT1. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(8):650-2.
- 65 Ruteshouser EC, Huff V. Familial Wilms tumor. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004;129(1):29-34.
- 66 Lucci-Cordisco E, Zito I, Gensini F, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and related conditions. *Am J Med Genet A* 2003;122(4):325-34.
- 67 Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(24):4991-5004.
- 68 Norgauer J, Idzko M, Panther E, et al. Xeroderma pigmentosum. *Eur J Dermatol* 2003;13(1):4-9.
- 69 Taylor MD, Liu L, Raffel C, et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002;31(3):306-10.
- 70 Lammi L, Arte S, Somer M, et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 2004;74(5):1043-50.

- 71 Reid S, Renwick A, Seal S, *et al.* Biallelic BRCA2 mutations are associated with multiple malignancies in childhood including familial Wilms tumour. *J Med Genet* 2005;42(2):147-51.
- 72 Stone SP, Buescher LS. Life-threatening paraneoplastic cutaneous syndromes. *Clin Dermatol* 2005;23(3):301-6.
- 73 Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;361(9356):501-11.
- 74 Deutsch E, Maggiorella L, Eschwege P, *et al.* Environmental, genetic, and molecular features of prostate cancer. *Lancet Oncol* 2004;5(5):303-13.
- 75 Hemminki K, Li X. Familial risk in testicular cancer as a clue to a heritable and environmental aetiology. *Br J Cancer* 2004;90(9):1765-70.
- 76 Hu N, Wang C, Han XY, *et al.* Evaluation of BRCA2 in the genetic susceptibility of familial esophageal cancer. *Oncogene* 2004;23(3):852-8.
- 77 Ward DM, Shiflett SL, Kaplan J. Chediak-Higashi syndrome: a clinical and molecular view of a rare lysosomal storage disorder. *Curr Mol Med* 2002;2(5):469-77.
- 78 Urioste M, Garcia-Andrade Mdel C, Valle L, *et al.* Malignant degeneration of presacral teratoma in the Currarino anomaly. *Am J Med Genet A* 2004;128(3):299-304.
- 79 Little S, Hanks S, King-Underwood L, *et al.* A WT1 exon 1 mutation in a child diagnosed with Denys-Drash syndrome. *Pediatr Nephrol* 2005;20(1):81-5.
- 80 Perkins SL. Pediatric red cell disorders and pure red cell aplasia. *Am J Clin Pathol* 2004;122 Suppl:S70-86.
- 81 Marrone A, Walne A, Dokal I. Dyskeratosis congenita: telomerase, telomeres and anticipation. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15(3):249-57.
- 82 Shaheen NJ. Advances in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2005;128(6):1554-66.
- 83 Richards FM, Goudie DR, Cooper WN, *et al.* Mapping the multiple self-healing squamous epithelioma (MSSE) gene and investigation of xeroderma pigmentosum group A (XPA) and PATCHED (PTCH) as candidate genes. *Hum Genet* 1997;101(3):317-22.
- 84 de Andrade M, Barnholtz JS, Amos CI, *et al.* Segregation analysis of cancer in families of glioma patients. *Genet Epidemiol* 2001;20(2):258-70.
- 85 Hoyme HE, Seaver LH, Jones KL, *et al.* Isolated hemihyperplasia (hemihypertrophy): report of a prospective multicenter study of the incidence of neoplasia and review. *Am J Med Genet* 1998;79(4):274-8.
- 86 Alvarez NR, Lee TM, Solorzano CC. Complete androgen insensitivity syndrome: the role of the endocrine surgeon. *Am Surg* 2005;71(3):241-3.
- 87 Kamper PM, Kjeldsen E, Clausen N, *et al.* Epstein-Barr virus-associated familial Hodgkin lymphoma: paediatric onset in three of five siblings. *Br J Haematol* 2005;129(5):615-7.
- 88 Azizi E, Friedman J, Pavlotsky F, *et al.* Familial cutaneous malignant melanoma and tumors of the nervous system. A hereditary cancer syndrome. *Cancer* 1995;76(9):1571-8.
- 89 Koksai N, Bayram Y, Murat I, *et al.* Neurocutaneous melanosis with transposition of the great arteries and renal agenesis. *Pediatr Dermatol* 2003;20(4):332-4.
- 90 Berliner N, Horwitz M, Loughran TP, Jr. Congenital and acquired neutropenia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004:63-79.
- 91 Noel G, Feuvret L, Calugaru V, *et al.* Chondrosarcomas of the base of the skull in Ollier's disease or Maffucci's syndrome—three case reports and review of the literature. *Acta Oncol* 2004;43(8):705-10.
- 92 Audrezet MP, Chen JM, Le Marechal C, *et al.* Determination of the relative contribution of three genes—the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, the cationic trypsinogen gene, and the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene—to the etiology of idiopathic chronic pancreatitis. *Eur J Hum Genet* 2002;10(2):100-6.

- 93 Jaeger EE, Woodford-Richens KL, Lockett M, *et al.* An ancestral Ashkenazi haplotype at the HMPS/CRAC1 locus on 15q13-q14 is associated with hereditary mixed polyposis syndrome. *Am J Hum Genet* 2003;72(5):1261-7.
- 94 Umar A, Berrevoets CA, Van NM, *et al.* Functional analysis of a novel androgen receptor mutation, Q902K, in an individual with partial androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(1):507-15.
- 95 Ancliff PJ. Congenital neutropenia. *Blood Rev* 2003;17(4):209-16.
- 96 Taylor MD, Gokgoz N, Andrulis IL, *et al.* Familial posterior fossa brain tumors of infancy secondary to germline mutation of the hSNF5 gene. *Am J Hum Genet* 2000;66(4):1403-6.
- 97 Risk JM, Evans KE, Jones J, *et al.* Characterization of a 500 kb region on 17q25 and the exclusion of candidate genes as the familial Tylosis Oesophageal Cancer (TOC) locus. *Oncogene* 2002;21(41):6395-402.
- 98 Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, *et al.* c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 2001;97(1):139-46.
- 99 Minelli A, Maserati E, Rossi G, *et al.* Familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia: genetic heterogeneity and progression to leukemia via acquisition of clonal chromosome anomalies. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40(3):165-71.
- 100 Dome JS, Coppes MJ. Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr* 2002;14(1):5-11.
- 101 Ochs HD, Notarangelo LD. X-linked immunodeficiencies. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004;4(5):339-48.
- 102 Valle L, Cascon A, Melchor L, *et al.* About the origin and development of hereditary conventional renal cell carcinoma in a four-generation t(3;8)(p14.1;q24.23) family. *Eur J Hum Genet* 2005;13(5):570-8.
- 103 Hitzler JK, Zipursky A. Origins of leukaemia in children with Down syndrome. *Nat Rev Cancer* 2005;5(1):11-20.
- 104 Weiss JR, Moysich KB, Swede H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(1):20-6.
- 105 Kocova M, Basheska N, Papazovska A, *et al.* Girls with Turner's syndrome with spontaneous menarche have an increased risk of endometrial carcinoma: a case report and review from the literature. *Gynecol Oncol* 2005;96(3):840-5.
- 106 Schinzel A. *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man*, second edition ed. Berlin: Walter de Gruyter, 2001.

Convertir las alteraciones genéticas hereditarias de susceptibilidad al cáncer en oportunidades terapéuticas

Judith Blamaña Gelpí
Jordi Rodón Ahnert

Servicio de Oncología Médica
Hospital Universitario Vall d'Hebrón.
Barcelona

Introducción: Nuevos fármacos y cáncer hereditario.

Los síndromes hereditarios de predisposición al cáncer son enfermedades genéticas poco frecuentes que por las alteraciones en oncogenes o genes supresores implican un riesgo aumentado de desarrollar un cáncer. Las personas afectas de alguna predisposición genética al cáncer tienen un riesgo elevado de sufrir algún tipo de tumor el cual, a pesar de las técnicas de detección precoz, prevención y tratamiento (cirugía, radioterapia y quimioterapias adyuvantes) pueden presentar diseminación metastásica y causar eventualmente el fallecimiento del paciente. Por su naturaleza poco frecuente (menos de 1 cada 2.000 ciudadanos) se suelen clasificar dentro del grupo de Enfermedades Raras (Enfermedades Raras, un enfoque práctico. Instituto de Investigación de Enfermedades Raras. Instituto de Salud Carlos III).

A pesar de ser enfermedades en las que se conoce, por lo menos, el evento iniciador del tumor (la alteración genética que define el síndrome), al desarrollar un cáncer avanzado éste se suele tratar independientemente de esta información. Con frecuencia tanto el tratamiento de pacientes individuales como la investigación en oncología ha ignorado durante décadas que los tumores raros y aquellos casos que se dan en un contexto de síndrome hereditario o en un contexto de vulnerabilidad son importantes modelos para el mejor entendimiento de la fisiopatología del cáncer y que los logros en este tipo de tumores han abierto nuevos caminos de innovación.

En este capítulo proponemos un cambio del paradigma de la investigación y manejo terapéutico de los tumores que ocurren en el contexto de síndromes hereditarios, en paralelo al cambio que se está estableciendo en todo el campo de la

Convertir las alteraciones genéticas hereditarias de susceptibilidad al cáncer en oportunidades terapéuticas

oncología. Actualmente la investigación se va alejando del concepto de tratar una enfermedad basado en la localización del tumor inicial (colon, mama, próstata...) y va focalizando la atención en las vías de señalización del cáncer y el desarrollo de fármacos que inhiban esas vías (figura 1). Aquí se describirán las razones por las que tratamientos dirigidos a déficits genéticos podrían suponer un gran avance en el manejo de síndromes hereditarios, las dificultades para acceder a dichos tratamientos, así como dos ejemplos (inhibidores de PARP en el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario y cáncer colorrectal hereditario con inestabilidad de microsatélites) que ilustran cómo este nuevo paradigma ha empezado a aplicarse en estos síndromes y cómo puede extrapolarse de forma secundaria al tratamiento del cáncer esporádico.

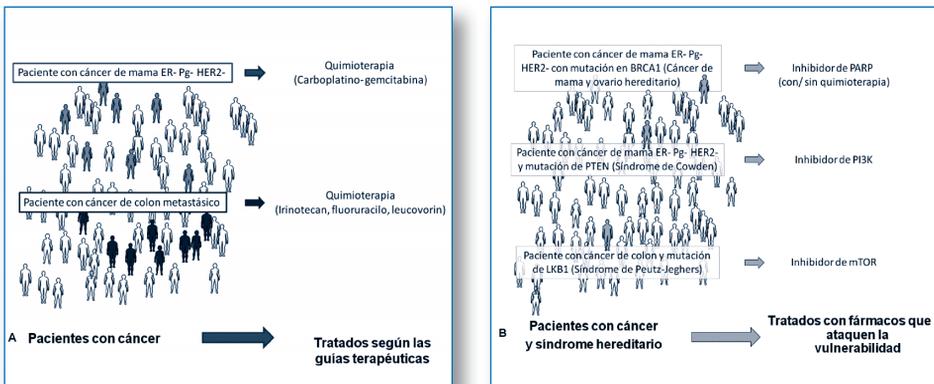


Figura 1. Cambio de paradigma en el tratamiento del cáncer en el contexto de un síndrome hereditario. A. Los tumores se tratan según su localización anatómica y las guías terapéuticas basadas en resultados de ensayos clínicos específicos para cada localización anatómica. B. Los tumores se tratan en base a alteraciones moleculares conocidas, procurando explotar el "contexto de vulnerabilidad" del tumor.

Adicción a oncogenes, contexto de vulnerabilidad y cáncer hereditario

Las alteraciones moleculares que acumulan las células tumorales son las responsables de la transformación maligna y desregulación de procesos como el control de la división y el ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis y la invasión celular ¹. Estas alteraciones son debidas a mutaciones y trastornos epigenéticos que provocan

una expresión alterada de proteínas en los procesos descritos. Aunque estas alteraciones pueden ser múltiples, parece haber una jerarquía entre las mismas, siendo algunas de ellas clave para la transformación de una célula en tumoral. La inhibición de estas alteraciones puede dar lugar a una inhibición del crecimiento del tumor. Esta aparente dependencia de un cáncer en unos pocos genes se ha constatado en modelos animales, estudios mecanísticos en cultivos celulares y en ensayos clínicos. Es lo que ha llevado a la definición del fenómeno de “adicción a un oncogen”, cuyo reconocimiento ha dado lugar al desarrollo de terapias moleculares específicas ².

La explotación terapéutica de este fenómeno implica, sin embargo, no solo el conocimiento de cada una de las diferentes alteraciones moleculares de cada tumor y su papel, sino también su jerarquía y las relaciones entre las múltiples alteraciones presentes en cada caso. Es por esto que parece más útil la determinación de un “contexto de vulnerabilidad”, concepto más amplio que engloba alteraciones moleculares que determinan una dependencia observada en una diana molecular regulable con tratamientos disponibles ³. Estos dos fenómenos, relacionados entre ellos, parecen darse con frecuencia en el cáncer hereditario.

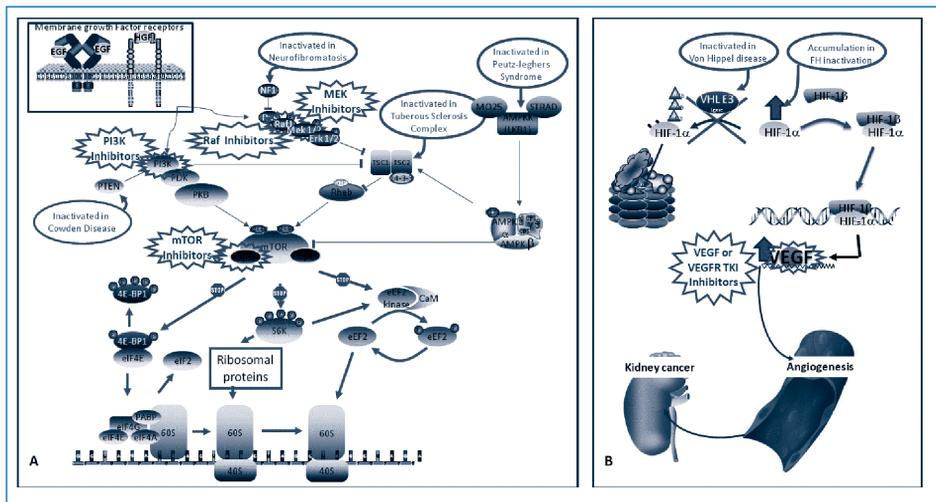


Figura 2. Algunas de las vías moleculares alteradas en diferentes síndromes hereditarios y fármacos específicos de dianas moleculares. A. Vías de PI3K/ AKT/ mTOR y de Ras/Raf/MAPK. B. Vía de la hipoxia y angiogénesis.

Convertir las alteraciones genéticas hereditarias de susceptibilidad al cáncer en oportunidades terapéuticas

El cáncer que se observa en un síndrome hereditario presenta una alteración genética conocida en línea germinal y es la responsable de la susceptibilidad al cáncer. A menudo se trata de oncogenes iniciadores del proceso de malignización y los tumores que derivan de síndromes con dichas alteraciones dependerán de éstas en su iniciación y probablemente en su mantenimiento. Hipotéticamente, si estas alteraciones se pudieran revertir (terapia génica) o al menos controlar farmacológicamente (terapias dirigidas a dianas moleculares), cabría esperar una estabilización tumoral. La tabla 1 y la figura 2 resumen los diferentes síndromes hereditarios, sus alteraciones genéticas (como potenciales dianas terapéuticas) y las vías de señalización celular afectadas por dichas alteraciones.

Tabla 1. Relación entre algunos síndromes hereditarios, sus alteraciones genéticas como potenciales dianas terapéuticas y familias de fármacos

Síndrome	Alteración genética	Biología molecular	Diana terapéutica	Principales familias de fármacos	Ejemplos
Cáncer de mama y ovario hereditario	BRCA1 o BRCA2	Reparación del DNA	Enzimas de las vías NER, BER, HR, NHEJ, MMR y del metabolismo de telomerasas ¹	Inhibidores de PARP (vía de BER)	Olaparib (AZD2281), AGO12699, BSI201
Carcinoma renal papilar hereditario	MET	Activación aberrante de c-Met	MET (dominio TK), vías de transducción de señales	Inhibidores de MET (TKI)	XL880, ARQ197, GCD265
Síndrome de Gorlin	PTCH	Activación aberrante de la vía de Sonic Hedgehog	SMO	Inhibidores de SMO	GDC0449, LDE225
Síndrome de Von Hippel-Lindau	VHL	Respuesta celular ante hipoxia (HIF1alpha)	Angiogénesis y factores de crecimiento celular (PDGF, TGFa). Vías de transducción de señales	AntiVEGF, inhibidores de receptores de VEGF, Inhibidores de HIF1alpha*, inhibidores del proteosoma, inhibidores de mTOR.	Bevacizumab, sunitinib, pazopanib.
Tumor estromal gastrointestinal familiar	KIT	Vías de transducción de señales	Dominio TK de c-KIT. HSP90	Inhibidores de KIT (TKI)	Imatinib
Neoplasia Múltiple tipo 2	RET	Activación de RET	RET, vías de transducción de señales, o HSP70	Inhibidores de RET (TKI), inhibidores de PI3K o MEK, inhibidores de HSP70*	XL184
Síndrome de PTEN-hamartomas, (Síndrome de Cowden)	PTEN	Perdida de función de PTEN, principal inhibidor de la vía PI3K/Akt/mTOR. Posible alteración de la reparación del DNA	Vía PI3K/Akt/mTOR HR	Análogos de rapamicina, inhibidores de PI3K, inhibidores duales PI3K-mTOR, inhibidores AKT. Inhibidores PARP	Temsirolimus, Everolimus, XL147, XI765, BKM120, BEZ235.

Síndrome	Alteración genética	Biología molecular	Diana terapéutica	Principales familias de fármacos	Ejemplos
Síndrome de Peutz-Jeghers	LKB1-STK11	La pérdida de función de LKB1 (serina/ treonina quinasa activa mTOR, activando angiogenesis (VEGF, Hif1-alfa) y el crecimiento celular (eIF4E y la quinasa ribosómica S6)	Vía mTOR	Análogos de rapamicina, inhibidores duales PI3K-mTOR	Temsirolimus, Everolimus, XL765, BEZ235.
Esclerosis Tuberosa	TSC1 o TSC2	Hamartina (TSC1) y tuberina (TSC2) forman un complejo regulador negativo de la vía PI3K/Akt/mTOR	Vía PI3K/Akt/mTOR	Análogos de rapamicina, inhibidores de PI3K, inhibidores duales PI3K-mTOR, inhibidores AKT.	Temsirolimus, Everolimus, XL147, XI765, BKM120, BEZ235.
Leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditarios	FH	Actividad fumarato hidratasa disminuida y acumulación inadecuada de HIF alpha. Respuesta celular ante hipoxia alterada	Angiogénesis y factores de crecimiento celular (PDGF, TGFa). Vías de transducción de señales.	AntiVEGF, inhibidores de receptores de VEGF, Inhibidores de HIF1 alpha*, inhibidores del proteasoma, inhibidores de mTOR.	Bevacizumab, sunitinib, pazopanib.
Neurofibromatosis tipo 2	NF2	La alteración de merlina trastorna la función de GTPasas (Rac), alterando la señalización de EGFR y Notch	EGFR, proteínas de transducción de señales.	Inhibidores de EGFR, inhibidores de PI3K.	Cetuximab, erlotinib, XL147, BKM120
Poliposis Adenomatosa Familiar	APC	APC es el regulador negativo de la vía Wnt al regular la degradación de b-catenina por el proteosoma. Inestabilidad cromosómica.	Vía de WNT	Inhibidores de COX2 (anticuerpos contra Wnt y Frizzled y pequeñas moléculas contra miembros de la vía WNT están en desarrollo preclínico)	Celecoxib.
Síndrome de Lynch	MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, PMS1	Hipermutabilidad por pérdida de genes de reparación del DNA (mismatch repair system).	Sistemas de reparación del AD. Vía PI3K/Akt/mTOR	Inhibidores de PARP	Temsirolimus, Everolimus, XL147, XI765, BKM120, BEZ235.
Melanoma maligno familiar	CDKN2A, CDK4	Regulación del ciclo celular	Ciclinas dependientes de quinasa que regulan el ciclo celular	Análogos de rapamicina, inhibidores de PI3K, inhibidores duales PI3K-mTOR, inhibidores AKT**. Inhibidores diferentes CDKs4	Seliciclib, MKC-1, AT7519

* Primeros fármacos en desarrollo inicial.

** Basado en estudios preclínicos iniciales.

1 Nucleotide-excision repair (NER), base-excision repair (BER), homologous recombination (HR), non-homologous end joining (NHEJ), mismatch repair (MMR) and telomerase metabolism

2 TK: tirosin-quinasa

3 TKI: Inhibidores del dominio tirosin-quinasa

4 CDK Ciclinas dependientes de quinasa

Acceso de pacientes con síndromes hereditarios y cáncer avanzado a tratamientos dirigidos a dianas terapéuticas

El avance en un mejor conocimiento y tratamiento de las Enfermedades Raras puede verse dificultado por la falta de referencia a profesionales cualificados y especializados, la falta de conocimiento científico de estas entidades por su infrecuencia (lo que origina dificultades para desarrollar las herramientas terapéuticas) y las desigualdades en el acceso al tratamiento y el cuidado. De ahí que hagan falta estrategias innovadoras en el diseño de ensayos clínicos y en la facilitación del acceso de estos pacientes a nuevos fármacos que, aunque desarrollados en Oncología para otras indicaciones, puedan ser especialmente beneficiosos en estos síndromes. En esta sección se describen las diferentes estrategias por las que un facultativo podría ofrecer algunos de estos fármacos, aprobados o en desarrollo, a pacientes cuya enfermedad tumoral se produzca en el contexto de un síndrome hereditario (tabla 2).

La disponibilidad y participación en ensayos clínicos sería la opción primordial, ya que daría acceso al paciente a un fármaco potencialmente beneficioso y el conocimiento generado permitiría avanzar la investigación en este campo. Sin embargo, dada la infrecuencia con la que se presentan los síndromes hereditarios y el hecho de que predispongan a tumores con histologías inusuales (carcinoma papilar renal y gen MET, meduloblastoma y gen PTCH, leiomiomas uterinos y gen FH...), la elaboración de ensayos clínicos específicos resulta compleja. El reclutamiento puede verse dificultado por la distancia física entre el centro de referencia y el paciente, así como por el escaso interés que genera en la industria farmacéutica patologías infrecuentes, lo cual hace que el desarrollo de estos deba ser promocionado por organismos gubernamentales o grupos cooperativos con recursos limitados.

Por otro lado, cabe la posibilidad que el fármaco deseado ya esté aprobado para la indicación específica (sunitinib y cáncer de renal) o, aunque esté aprobado para otra indicación, se pueda justificar su utilización través de la solicitud de un Uso Compasivo. Estas dos opciones, aunque sencillas, están dificultadas por la lentitud del proceso mismo de aprobación de fármacos nuevos.

Para facilitar el desarrollo y aprobación de fármacos para poblaciones especiales, se creó la figura de Medicamentos Huérfanos (EC Regulation on Orphan Medicinal Products). Se cataloga así a aquellos fármacos que sirven para tratar afecciones poco

Tabla 2. Diferentes procesos para acceder a fármacos dirigidos a dianas moleculares para pacientes con cáncer avanzado en el contexto de un síndrome hereditario.

Proceso	Pros	Contras	Ejemplos
Fármaco aprobado para una indicación específica	Disponibilidad del fármaco en cuestión.	La aprobación de un fármaco requiere un largo y tedioso proceso, en el que se debe demostrar eficacia.	Sunitinib en cáncer renal, disponible para tratar casos en el contexto de Síndrome de Von Hippel-Lindau
Uso compasivo	Proceso administrativo relativamente fácil.	El fármaco debe estar comercializado. El uso Compasivo debe ser aprobado.	Temsirolimus o Everolimus en el tratamiento de un cáncer en el contexto de Síndrome de Cowden.
Medicamentos huérfanos	Los incentivos para los promotores pueden facilitar el desarrollo.	No garantiza su uso en la condición designada, y no implica necesariamente que el producto satisfaga los criterios de eficacia, seguridad y calidad o su disponibilidad.	Olaparib en cáncer de ovario (en proceso).
Ensayos clínicos específicos para el síndrome genético en concreto	Es el tipo de investigación que más claramente impacta en el avance del conocimiento de estas enfermedades.	Escaso interés de la industria farmacéutica en patologías infrecuentes	Inhibidores de PARP en pacientes con cáncer de mama u ovario y mutación en BRCA1 o 2
Ensayos Fase I	Un resultado positivo suele cambiar el paradigma de tratamiento.	Distancia entre el paciente y el centro donde se realiza el ensayo clínico. Falta de información adecuada sobre disponibilidad y criterios de inclusión.	Ensayos clínicos en cáncer de mama con inhibidores de PI3K, para tratar casos en el contexto de Síndrome de Cowden.
	En nuestro país existe una amplia gama de centros donde se realizan ensayos clínicos de este tipo de gran calidad. Acceso al fármaco de forma precoz. Criterios de inclusión laxos, donde los tratamientos previos y el tipo tumoral no suelen ser restrictivos.	La poca experiencia con el fármaco puede exponer a riesgos añadidos. Por cuestiones éticas, solo recomendable en casos de cáncer avanzado.	Inhibidores de Sonic Hedgehog para tratar casos de meduloblastoma avanzado ó múltiples carcinomas basocelulares en el contexto de Síndrome de Gorlin.

RCp: Respuesta completa patológica;
NR: no reportada.
AC: Adriamicina y ciclofosfamida;

FAC: Fluoracilo, adriamicina, ciclofosfamida;
FEC: Fluoracilo, epirubicina, ciclofosfamida;
AT: Adriamicina y taxol.

frecuentes y, por tanto medicamentos poco rentables, por lo que organismos gubernamentales otorgan incentivos para los promotores (exclusividad comercial, asistencia en la elaboración de protocolos, facilidad de acceso al procedimiento centralizado de comercialización, exención de tasas y subvenciones europeas para su investigación). Estos incentivos, sin embargo, no excluyen la necesidad de la elaboración de ensayos clínicos que demuestren su eficacia, por lo que la accesibilidad al medicamento antes de su aprobación resulta comprometida.

Finalmente, cabe la posibilidad de la participación de pacientes con síndromes hereditarios y cáncer en ensayos clínicos Fase I. La mayoría de las veces estos estudios farmacológicos no están restringidos a histologías concretas y se realizan al principio del desarrollo clínico de un compuesto farmacológico. Con frecuencia son la única vía factible de acceder a un fármaco en desarrollo para pacientes con enfermedades tumorales poco frecuentes. Sin embargo, por el hecho de tratarse de estudios con medicamentos en sus etapas más iniciales de desarrollo implican potenciales riesgos añadidos para el paciente (efectos secundarios imprevistos, ineficacia o infratratamiento), que deberán tenerse en cuenta para ofrecer estos tratamientos en casos concretos de pacientes con cáncer avanzado y síndrome hereditario.

Terapias dirigidas en síndromes de predisposición hereditaria al cáncer

BRCA1/BRCA2: quimiosensibilidad e inhibidores de PARP.

BRCA1 y BRCA2 son dos proteínas a las que se les atribuye múltiples funciones celulares, como la transcripción, control del ciclo celular, ubiquitinización, estabilidad de la cromatina, y una de las mejor estudiadas que es su papel en la reparación del ADN. Las células deficientes en BRCA1 o BRCA2 tienen un defecto en la reparación de roturas de cadena doble por el mecanismo de reparación homóloga (RH), un mecanismo libre de errores. Este defecto lleva a la reparación de dichas lesiones por otros mecanismos que pueden ser más proclives a causar errores mutagénicos y finalmente causar inestabilidad genética (*single-strand annealing*, *SSA*, y *non-homologous end-joining*, *NHEJ*). Se conoce que esta inestabilidad genética es la causante de la predisposición a acumular mutaciones en otros genes y a la susceptibilidad al cáncer de mama y ovario, principalmente.

Por otro lado, algunos fármacos que dañan el ADN pueden causar roturas de cadena doble de forma directa o indirecta. En ausencia de BRCA1/2, por lo tanto cuando una vía de reparación del ADN se encuentra alterada, el efecto tóxico del fármaco conduce a la apoptosis celular. Varios estudios preclínicos con cultivos celulares y en modelos animales han demostrado la hipersensibilidad de las células deficientes en BRCA1/2 a agentes como el cisplatino y carboplatino, etopósido, mitomicina C, bleomicina, temozolamida, antraciclinas, irinotecán y radiaciones ionizantes ^{4, 7}. Asimismo, algunos de estos estudios han demostrado que la sensibilidad a estos fármacos

se revierte con la restauración de la función de BRCA1⁴. Por otro lado, la proteína BRCA1 puede verse también implicada en la respuesta a agentes antimicrotúbulos como los taxanos (paclitaxel y docetaxel) y los alcaloides de la vinca (vincristina y vinorelbina). En este caso, las células deficientes en BRCA1/2 han demostrado a nivel preclínico una resistencia a paclitaxel/docetaxel, que en el caso de BRCA1 se revierte con reconstitución de la expresión de BRCA1^{5,8}. Con respecto a la resistencia a anti-microtúbulos, Chabaliier y colaboradores concluyen que en células BRCA1 deficientes esta resistencia se debería a la inactivación precoz del checkpoint mitótico, causando un inicio prematuro de la anafase, separación prematura de las cromátides hermanas e impidiendo el efecto citotóxico de los antimicrotúbulos⁹. Puede verse un esquema gráfico de esta quimiomodulación en la figura 3.

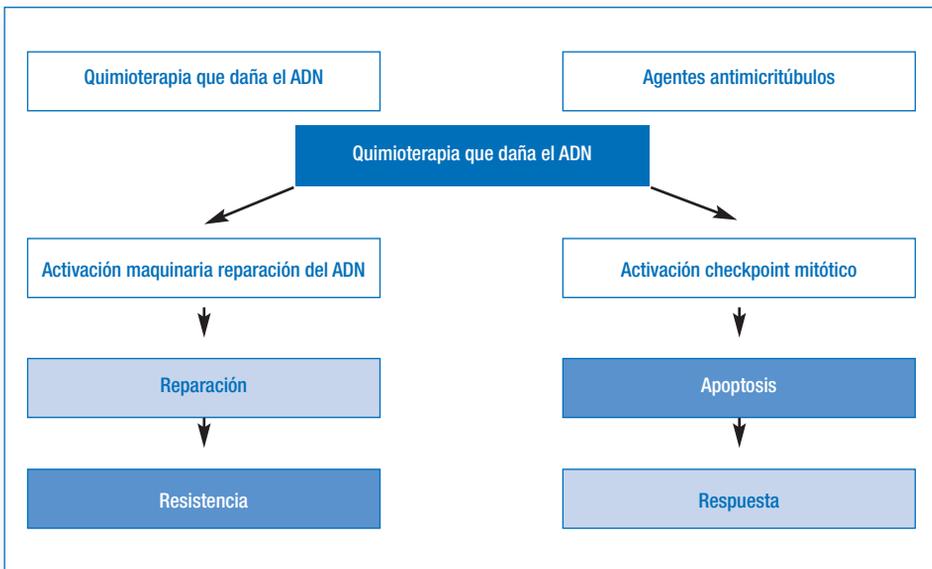


Figura 3. Papel de BRCA1 como modulador de respuesta a la quimioterapia a nivel preclínico (adaptado de Harkin et al).

A nivel clínico se ha examinado el valor predictivo y pronóstico del estatus de BRCA1/2. La interpretación de estos estudios está dificultada porque tienen una naturaleza retrospectiva e incluyen tanto a pacientes BRCA1 como BRCA2, a pesar de que los tumores asociados a estos genes presentan perfiles moleculares distintos. Cabe destacar el estudio de Rennert y colaboradores¹⁰, realizado en una cohorte de más de 1200 pacientes con cáncer de mama infiltrante de descendencia judía

ashkenazi y con un seguimiento mínimo de 10 años desde el diagnóstico inicial del tumor. Los datos de supervivencia a los 10 años en función del estatus genético y el tratamiento con quimioterapia adyuvante (esquemas CMF o FAC) mostraron una reducción del 52% de mortalidad por cáncer de mama (OR 0.48, IC 95% 0.19-1.21, $p=0.12$) en las mujeres con cáncer de mama y mutación en *BRCA1* que recibieron quimioterapia en comparación con las mujeres no portadoras. Estos resultados sugieren a nivel clínico que el estatus de *BRCA1* puede ser un factor predictivo de quimiosensibilidad en el cáncer de mama, a pesar de que el estudio incluye sólo las mutaciones fundadoras Ashkenazi. Recientemente, Goodwin y colaboradores (comunicación oral, ESMO 2008) comunicaron el pronóstico de pacientes con cáncer de mama y portadoras de mutación en *BRCA1* o *BRCA2* versus pacientes sin mutación en una cohorte internacional. El estudio reportó por primera vez que las pacientes con cáncer de mama y mutación en *BRCA2* que no habían recibido quimioterapia adyuvante tenían un peor pronóstico (HR 3.62) de forma estadísticamente significativa, así como las pacientes con mutación en *BRCA1* (aunque sin alcanzar la significación estadística).

Otra forma de analizar la quimiosensibilidad de los tumores de mama en función del estatus genético de BRCA es estudiar el porcentaje de respuestas completas patológicas después de un tratamiento neoadyuvante (previo a la cirugía). En la tabla 1 se presenta un resumen de los principales estudios comunicados o publicados que analizan el valor predictivo de BRCA a la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama. Podemos destacar de esta tabla la elevada sensibilidad de los tumores con mutación en *BRCA1* al cisplatino, así como a la quimioterapia con antraciclinas.

En cuanto al cáncer de ovario, un estudio retrospectivo analizó la supervivencia global por estadio y estatus genético de *BRCA1/2* en pacientes de descendencia judía ashkenazi y seguimiento a más de 6 años y concluyó que las pacientes con cáncer de ovario estadios III/IV con mutación en *BRCA1/2* alcanzaban una mayor supervivencia global respecto a las no portadoras (mediana de supervivencia de 55.7 meses versus 37.9 meses, $p=0.002$, con 28% de reducción de mortalidad a 5 años). Los autores del estudio concluyen que esta diferencia en supervivencia puede deberse al papel modulador de BRCA en la respuesta a la quimioterapia, especialmente los platinos¹¹. Este estudio vino a confirmar los resultados de una docena de estudios previos, de los cuales la mayoría concluían que el estatus de mutación en BRCA confería un mejor pronóstico en el cáncer de ovario. Considerando la relevancia del estatus de

BRCA en determinar el pronóstico y la respuesta a la quimioterapia en cáncer de ovario, y teniendo en cuenta que entre un 8%-13% de las neoplasias de ovario se asocian a mutación a BRCA, y entre un 9%-15% de las neoplasias esporádicas pueden tener silenciamiento epigenético de *BRCA1*, cabe el planteamiento de si los ensayos clínicos en cáncer de ovario deberían estratificar por el estatus de BRCA para que no se produjeran desproporciones en el porcentaje de estas pacientes en cada rama de tratamiento. Asimismo, dado el impacto beneficioso en supervivencia de estas pacientes, pueden plantearse estrategias de reducción de riesgo de otras neoplasias en mujeres con cáncer de ovario y portadoras de mutación.

El conocimiento más profundo de los distintos mecanismos de reparación del ADN y el papel de las proteínas BRCA1 y BRCA2 en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga ha conducido a la explotación del concepto de letalidad sintética y al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer. Cuando se produce una rotura de cadena doble del ADN, BRCA1 actúa como mediador de señalización del daño y activa el complejo BARD1, así como el reclutamiento de RAD51 y BRCA2 para reparar la rotura de cadena doble mediante recombinación homóloga. Si este mecanismo de reparación no funciona correctamente, la célula se repara mediante otros procesos que pueden conducir al cúmulo de mutaciones e inestabilidad genómica o a la muerte celular (figura 4).

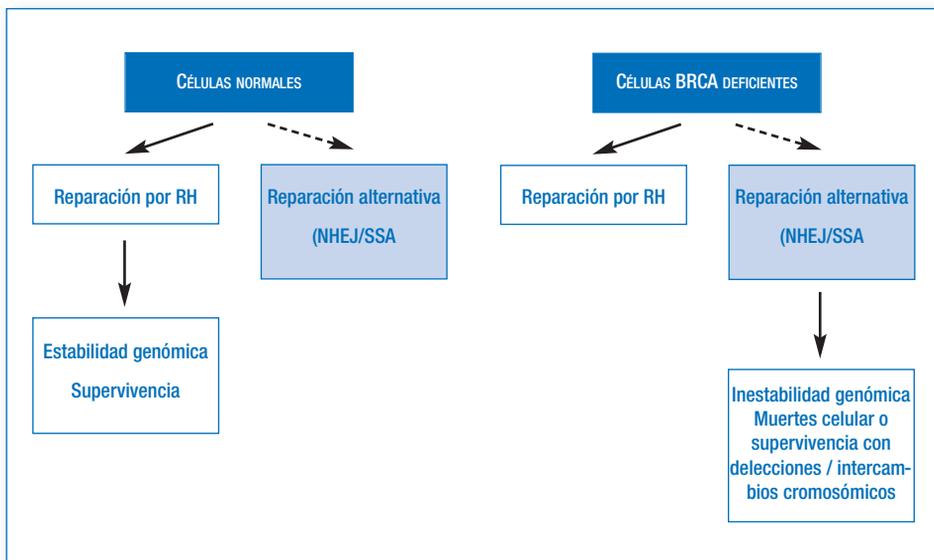


Figura 4. Papel de la recombinación homóloga en la reparación del ADN.

Por otro lado, Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP1) es una de las enzimas implicadas en la reparación de excisión de bases (BER), el principal mecanismo de reparación de las roturas de cadena simple del ADN. La inhibición de PARP1 puede llevar a un aumento de roturas de cadena simple en el ADN a lo largo del ciclo celular. En la fase-S, la acumulación de roturas de cadena simple induce el colapso de la horquilla de replicación, dando lugar a roturas de cadena doble que requieren el proceso de RH para repararse adecuadamente. En ausencia de BRCA1 o BRCA2, este proceso no puede llevarse a cabo y se produce, por tanto, un proceso de letalidad sintética que ha conducido al desarrollo de inhibidores del PARP como una nueva estrategia terapéutica dirigida contra células tumorales deficientes en BRCA. Por otro lado, el hecho de que las células normales (no tumorales) de personas portadoras de una mutación sean heterocigotas para BRCA, y por tanto conservan intacta la capacidad de RH, hace que los inhibidores de PARP dispongan de una amplia ventana terapéutica (máxima letalidad tumoral con mínima toxicidad en tejidos sanos).

En el año 2005 se publicaron dos trabajos ^{12, 13} preclínicos que demostraban el concepto de letalidad sintética en células BRCA deficientes después de la exposición a inhibidores del PARP. Además, la inhibición de PARP también era capaz de inhibir la formación de tumores BRCA2-deficientes implantados en ratones atímicos. Asimismo, esta letalidad sintética se ha demostrado también en ausencia de otras proteínas implicadas en la vía de señalización del daño genómico o necesarias para la recombinación homóloga, como XRCC, RAD51, RAD54, DSS1, RPA1, NBS1, ATR, ATM, CHK1, CHK2, FANCD2, FANCA o FANCC ¹⁴, lo cual amplía las opciones potenciales de tumores sensibles al mismo tratamiento.

Clínicamente, el primer estudio fase I con inhibidores del PARP (Olaparib) que incluye portadores de mutación en BRCA, ha demostrado que la administración de Olaparib vía oral en tumores BRCA-deficientes de pacientes previamente multitratados es efectiva para obtener respuesta tumoral con muy poca toxicidad relevante ¹⁵. Asimismo, dos estudios fase II recientemente comunicados en el congreso ASCO 2009 en pacientes con mutación en BRCA y cáncer de mama o cáncer de ovario avanzado, respectivamente, han demostrado que una dosis de 400mg/12horas de olaparib en administración continua tiene una elevada tasa de respuestas objetivas y de supervivencia libre de progresión (en cáncer de mama: 41% respuestas objetivas y 5.7 meses de supervivencia libre de progresión; y en cáncer de ovario: 33% respuestas objetivas (61% si reincluyen las respuestas por marcador tumoral) y 5.8 meses de supervivencia libre de progresión) ^{16, 17}.

Actualmente ha finalizado el reclutamiento de un estudio fase 2 randomizado de dos dosis distintas de olaparib versus adriamicina liposomal en portadoras de mutación en BRCA con cáncer de ovario avanzado y se están diseñando estudios fase 3 que conduzcan a la aprobación de este medicamento para este tipo de pacientes.

Como ejemplo de la extrapolación al cáncer esporádico se están también desarrollando otros inhibidores de PARP para administración combinada con quimioterapia para potenciar su efecto aditivo o sinérgico en cáncer esporádico con características similares a los tumores BRCA-deficientes. Se ha observado que los tumores de mama basal-like (representados mayoritariamente por tumores triple negativos: receptores de estrógeno y progesterona negativos, y ausencia de sobreexpresión de HER2Neu) comparten características similares a los tumores BRCA1-deficientes, como ser de alto grado, expresión de CK5/6, CK14, CK17, cadherina, alta inestabilidad cromosómica y elevada quimiosensibilidad con mal pronóstico en ausencia de tratamiento con quimioterapia). Esta observación ha conducido a extrapolar al cáncer esporádico los conocimientos obtenidos del cáncer hereditario y la realización de un ensayo clínico fase 2 randomizado en cáncer de mama triple negativo que compara la eficacia de la administración de quimioterapia sola versus quimioterapia con BSI-201 (inhibidor del PARP ev). Los resultados del estudio fueron reportados de forma definitiva en el congreso SABCs 2009 y demostraron una mayor tasa de respuestas objetivas y supervivencia libre de progresión y global en las pacientes tratadas con la combinación versus las pacientes tratadas con la quimioterapia sola (49% versus 28% de respuestas objetivas; 7.2 meses versus 4.1 meses de supervivencia libre de progresión; y 10.6 meses versus 7.6 meses de supervivencia global).

Sin duda alguna, el desarrollo de los inhibidores del PARP ha supuesto un avance médico en el tratamiento dirigido de este tipo de tumores, permitiendo una terapia más individualizada y dirigida al defecto tumoral. Ha significado la utilización de mutaciones cancerígenas como dianas terapéuticas específicas y la posibilidad de aplicar los mismos tratamientos a tumores esporádicos con características moleculares similares. Sin embargo, se ha observado que algunas células tumorales BRCA-deficientes pueden recuperar su capacidad de recombinación homóloga después del tratamiento con inhibidores del PARP o con cisplatino por un mecanismo de re-conversión génica que devuelve la capacidad de sintetizar proteína funcional^{18, 20}. Será importante discernir los mecanismos de resistencia y cómo superarlos para ampliar las opciones terapéuticas de estos pacientes.

Cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélites: su papel pronóstico y predictivo de respuesta a la quimioterapia y futuras terapias

En un subgrupo de paciente con cáncer colorrectal (CCR) existe inactivación de los genes encargados de la reparación de los desapareamientos de bases del ADN (Mismatch Repair System, MMR). La inactivación hereditaria de estos genes se conoce como Síndrome de Lynch, mientras que en el cáncer esporádico este mismo tipo de alteración puede deberse al silenciamiento epigenético del gen (generalmente *MLH1*) que codifica para la proteína de reparación del desapareamiento. Esta alteración en el MMR system conduce a la aparición de la inestabilidad de microsatélites (IMS) en el tumor, al cúmulo de mutaciones en genes supresores del cáncer y la predisposición al mismo. Desde que se identificó esta vía de oncogénesis del CCR se ha estudiado el papel pronóstico y el potencial papel predictivo de respuesta a la quimioterapia de los tumores con IMS debido a su implicación en una vía de reparación del ADN.

Varios estudios retrospectivos de casos, así como un estudio de base poblacional, encontraron que los CCR con IMS presentaban un pronóstico de supervivencia favorable en comparación con los CCR sin IMS, y que era independiente del estadio tumoral^{21,22}. Resultados similares se observaron también entre los participantes de estudios fase III de adyuvancia en CCR, en los que los pacientes con CCR estadios II-III e IMS que no recibían quimioterapia adyuvante mostraban una supervivencia global superior que los pacientes sin IMS no tratados²³. Finalmente, un metanálisis de 32 estudios que incluye más de 1200 pacientes con CCR e IMS demostró una reducción de riesgo de mortalidad del 35% en pacientes con CCR e IMS comparado con pacientes sin IMS²⁴. Sin embargo, aunque se cree que este mejor pronóstico puede estar en relación con la infiltración linfocítica peritumoral que se observa con frecuencia en estos casos, se desconoce el mecanismo exacto que explica este fenómeno en los tumores con IMS.

Respecto al papel predictivo de la IMS frente a la quimioterapia, algunos estudios retrospectivos demostraron que los CCR esporádicos con IMS no se beneficiaban de la quimioterapia basada en 5-FU en comparación con los tumores sin IMS y el metanálisis publicado en el año 2005 en pacientes con CCR estadio II-III incluidos en ensayos randomizados corroboró dicho resultado^{23,26}. Respecto al papel de la IMS frente a la respuesta a la quimioterapia basada en irinotecan, hay datos de estudios preclínicos que sugieren un aumento de quimiosensibilidad

de estas células al irinotecán ²⁷ y un estudio retrospectivo en pacientes con estadio III concluye que los tumores con IMS tratados con irinotecán tienen una mejor supervivencia libre de progresión a 5 años comparado con los tumores sin IMS tratados con la misma quimioterapia ²⁸. Sin embargo, otro estudio reportado recientemente en ASCO 2009 no confirma dicho resultado ²⁹. Estos estudios, de todas formas, probablemente puedan tener mayor repercusión en el contexto metastático que en adyuvancia ya que los esquemas de tratamiento adyuvante en CCR no incluyen el irinotecán.

Con la evidencia acumulada hasta el momento hay un estudio en marcha del grupo ECOG que randomiza a los pacientes con CCR estadio II a recibir quimioterapia adyuvante (basada en FOLFOLX) en función de la presencia de IMS/18q intacto (bajo riesgo, no quimioterapia) o la ausencia de IMS/18q desbalanceado (alto riesgo, sí quimioterapia). Sin embargo, este estudio no responderá a la pregunta de si la IMS es predictiva de respuesta a la quimioterapia basada en FOLFOX porque sólo los pacientes sin IMS son tratados con quimioterapia. En conclusión, actualmente algunos grupos afirman que la IMS puede considerarse un factor pronóstico y predictivo independiente en el CCR estadio II y que los pacientes con IMS en este contexto podrían ahorrarse el tratamiento adyuvante debido a su favorable pronóstico y escaso beneficio.

Finalmente, a nivel preclínico se están llevando a cabo estudios para identificar dianas terapéuticas específicas en células tumorales con IMS. Un trabajo reciente ⁽³⁰⁾ concluye que la vía de PI3K puede ser de especial relevancia en estas células e inhibirse de forma robusta con rapamicina. Asimismo, datos preclínicos sugieren que los inhibidores del PARP pueden ser una opción terapéutica en tumores con IMS, ya que de forma secundaria causan mutaciones en genes implicados en la reparación de roturas de cadena doble, como *MRE11A* y *RAD50* ³¹.

Conclusiones

En conclusión, las alteraciones moleculares y genéticas que conducen a la aparición de tumores con una predisposición hereditaria están sirviendo como modelo para traducir estas mutaciones cancerígenas en dianas terapéuticas específicas con posibilidad de disponer de amplia ventana terapéutica (eficacia elevada y poca toxicidad). Asimismo, la extrapolación a tumores esporádicos con características biológicas similares

puede permitir la aplicación de estas nuevas terapias a grupos más amplios de pacientes conservando su eficacia de forma individualizada. Finalmente, aunque se están ensayando estos tratamientos en el contexto metastático, se espera que algunos de estos fármacos puedan aplicarse en fases más iniciales de la enfermedad, ya sea como tratamiento adyuvante o como estrategias preventivas.

Referencias

- 1 Hallmarks of cáncer. Hanahan. *Cell*, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000
- 2 Weinstein IB, Joe A. Oncogene Addiction. *Cancer Res* 2008; 68: (9). May 1, 2008
- 3 Von Hoff. Improving the Quality of Cancer Clinical Trials: Workshop Summary (2008). National Cancer Policy Forum.
- 4 Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2003 Oct 1;63(19):6221-8.
- 5 Tassone P, Tagliaferri P, Perricelli A, Blotta S, Quaresima B, Martelli ML, Goel A, Barbieri V, Costanzo F, Boland CR, Venuta S. BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2003 Apr 22;88(8):1285-91.
- 6 Evers B, Drost R, Schut E, de Bruin M, van der Burg E, Derksen PW, Holstege H, Liu X, van Drunen E, Beverloo HB, Smith GC, Martin NM, Lau A, O'Connor MJ, Jonkers J. Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin. *Clin Cancer Res*. 2008 Jun 15;14(12):3916-25
- 7 Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM, Borst P, Jonkers J. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 4;105(44):17079-84.
- 8 Mullan PB, Quinn JE, Gilmore PM, McWilliams S, Andrews H, Gervin C, McCabe N, McKenna S, White P, Song YH, Maheswaran S, Liu E, Haber DA, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene*. 2001 Sep 27;20(43):6123-31.
- 9 Chabaliere C, Lamare C, Racca C, Privat M, Valette A, Larminat F. BRCA1 downregulation leads to premature inactivation of spindle checkpoint and confers paclitaxel resistance. *Cell Cycle*. 2006 May;5(9):1001-7.
- 10 Rennert G, Bisland-Naggan S, Barnett-Griness O, Bar-Joseph N, Zhang S, Rennert HS, Narod SA. Clinical outcomes of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *N Engl J Med*. 2007 Jul 12;357(2):115-23.
- 11 Chetrit A, Hirsh-Yechezkel G, Ben-David Y, Lubin F, Friedman E, Sadetzki S. Effect of BRCA1/2 mutations on long-term survival of patients with invasive ovarian cancer: the national Israeli study of ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 1;26(1):20-5.
- 12 Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):917-21.

- 13 Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):913-7.
- 14 McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, Giavara S, O'Connor MJ, Tutt AN, Zdzienicka MZ, Smith GC, Ashworth A. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res*. 2006 Aug 15;66(16):8109-15.
- 15 Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, de Bono JS. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*. 2009 Jul 9;361(2):123-34.
- 16 A. Tutt, M. Robson, J. E. Garber, S. Domchek, M. W. Audeh, J. N. Weitzel, M. Friedlander, J. Carmichael. Phase II trial of the oral PARP inhibitor olaparib in BRCA-deficient advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 27:18s, 2009 (suppl; abstr CRA501)
- 17 M. W. Audeh, R. T. Penson, M. Friedlander, B. Powell, K. M. Bell-McGuinn, C. Scott, J. N. Weitzel, J. Carmichael, A. TuttPhase II trial of the oral PARP inhibitor olaparib (AZD2281) in BRCA-deficient advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 5500)
- 18 Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, Agarwal MK, Higgins J, Friedman C, Villegas E, Jacquemont C, Farrugia DJ, Couch FJ, Urban N, Taniguchi T. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1116-20.
- 19 Edwards SL, Brough R, Lord CJ, Natrajan R, Vatcheva R, Levine DA, Boyd J, Reis-Filho JS, Ashworth A. Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1111-5.
- 20 Swisher EM, Sakai W, Karlan BY, Wurzl K, Urban N, Taniguchi T. Secondary BRCA1 mutations in BRCA1-mutated ovarian carcinomas with platinum resistance. *Cancer Res*. 2008 Apr 15;68(8):2581-6.
- 21 Lanza G, Gafà R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006 May 20;24(15):2359-67.
- 22 Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, Slattery ML. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Sep;10(9):917-23.
- 23 Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):247-57.
- 24 Popat S, Hubner R, Houlston RSSystematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005 Jan 20;23(3):609-18.
- 25 Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, Piñol V, Xicola RM, Bujanda L, Reñé JM, Clofent J, Bessa X, Morillas JD, Nicolás-Pérez D, Payá A, Alenda C; Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut*. 2006 Jun;55(6):848-55.
- 26 Sargent DJ, abstract #4008 2008 ASCO annual meeting. *J Clin Oncol* 2008; 26 (suppl 15).
- 27 Vilar E, Scaltriti M, Balmaña J, Saura C, Guzman M, Arribas J, Baselga J, Tabernero J. Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2008 Nov 18;99(10):1607-12.
- 28 Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, Jewell SD, Mayer RJ, Goldberg RM, Saltz LB, Warren RS, Redston M. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 10;27(11):1814-21.

Convertir las alteraciones genéticas hereditarias de susceptibilidad al cáncer en oportunidades terapéuticas

- 29 S. Tejpar, F. Bosman, M. Delorenzi, R. Fiocca, P. Yan, D. Klingbiel, D. Dietrich, E. Van Cutsem, R. Labianca, A. Roth. Microsatellite instability (MSI) in stage II and III colon cancer treated with 5FU-LV or 5FU-LV and irinotecan (PETACC 3-EORTC 40993-SAKK 60/00 trial). *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 4001)
- 30 Vilar E, Mukherjee B, Kuick R, Raskin L, Misek DE, Taylor JM, Giordano TJ, Hanash SM, Fearon ER, Rennert G, Gruber SB. Gene expression patterns in mismatch repair-deficient colorectal cancers highlight the potential therapeutic role of inhibitors of the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 15;15(8):2829-39.
- 31 E. Vilar Sanchez, A. Chow, L. Raskin, M. D. Iniesta, B. Mukherjee, S. B. Gruber. Preclinical testing of the PARP inhibitor ABT-888 in microsatellite instable colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 11028)