



Módulo I

**BASES DEL  
CÁNCER  
HEREDITARIO**







# BASES GENÉTICAS DEL CÁNCER



Trinidad Caldés Llopis  
Laboratorio de Oncología Molecular  
Hospital Clínico Universitario San Carlos  
Madrid

## 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 se refleja en la gran heterogeneidad y variabilidad morfológica y pronóstica de los tumores y el gran número de alteraciones moleculares oncogénicas descritas. Éstas 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.<sup>1</sup>.

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<sup>INK4a</sup>*, 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*<sup>2</sup> y *BRCA2*<sup>3</sup>. 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*<sup>3</sup> que esta 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)<sup>4</sup> 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*<sup>5</sup>; el tumor de Wilms, con el gen *Wt1* mutado; las neurofibromatosis de tipo 1 y 2 con alteraciones en los genes *NF1* y *NF2*.

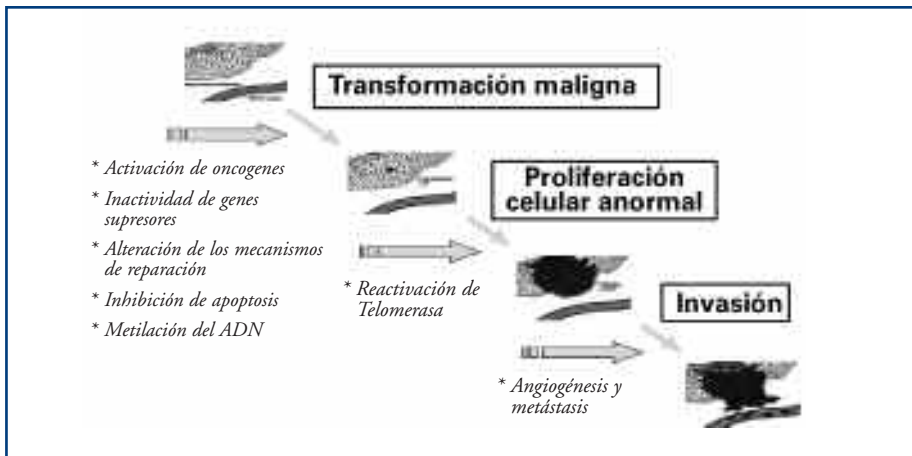
Las causas del cáncer residen en: a) fallos endógenos en procesos celulares y b) agentes externos que pueden alterar nuestros genes. Estos agentes externos se pueden dividir en tres grupos: agentes químicos, algunos naturales, pero la mayoría producidos por la actividad industrial que causan entre un 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 más 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. Posee otras funciones muy importantes como el desarrollo del riñón, cerebro, sistema cardiovascular y pulmonar durante la embriogénesis. Se expresa de forma anómala en otras enfermedades además del cáncer como arteriosclerosis y enfermedades fibroproliferativas. 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. En la mayoría de los tumores de cerebro PDGF ejerce una acción autocrina atribuible a la coexpresión de sus factores (A, B, C y D) y receptores ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Hay otros factores de crecimiento que también son oncogénicos, como EGF, TGF.

### *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 cánceres 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<sup>6</sup>.

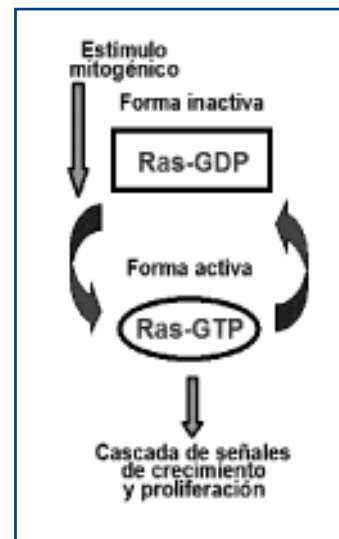
Se han descrito muchos más oncogenes que son homólogos de receptores con actividad tirosina-quinasa, como el oncogén *fms*, receptor para el factor estimulante de la formación de colonias de macrófagos (CSF-1); *c-kit*, el receptor y su ligando; el factor de crecimiento de células hematopoyéticas o stem 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 (GEFs) 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*<sup>7</sup> 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. Las proteínas actúan como transductores de señales de diferentes mitógenos, factores de diferenciación y estímulos externos como cambios osmóticos y radiaciones UV, interaccionando finalmente con un gran número de efectores (entre ellos quinasas) de distintas rutas que influyen en el crecimiento celular y en procesos de proliferación y diferenciación celular y apoptosis (Figura 1). Hay tres efectores principales de Ras: Raf quinasa, RAL-GEFs y PI 3-quinasa. Raf es una serina treonina-quinasa que al interaccionar con Ras sufre un cambio conformacional y se ancla a la membrana plasmática. Raf activado activa una serie de quinasas en cascada que modulan la actividad de factores tanto nucleares como citoplasmáticos. Finalmente, las señales se transmiten al núcleo alterando la transcripción de genes implicados en proliferación y diferenciación. Una de las quinasas implicadas es ERK1

**Figura 2. Vía de activación de Ras**



y 2 que inducen la expresión de *c-fos* (un factor de transcripción que modula la expresión de otros genes) a través de la fosforilación del complejo TCF, y la expresión de dos inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas *p21<sup>WAF1</sup>* y *p16<sup>INKa</sup>*. Ras induce apoptosis, movilidad celular, además de reorganización del citoesqueleto. Ral-GTP activa fosfolipasa D que produce hidrolizados de fosfatidilcolinas que actúan como activadores de proteínas rho. También interacciona con *cdc42* y RACGAP. Rho, Rac y *cdc42* tienen un papel importante en el remodelado del citoesqueleto y activan otra serie de quinasas que regulan la actividad de distintos factores de transcripción que determinan la expresión de determinadas proteínas como, por ejemplo, es el caso de Rho que reprime la expresión de *p21<sup>WAF1</sup>*. El tercer efector, PI 3-quinasa, genera PI (3,4,5) trifosfato que ya actúa como un segundo mensajero de otras rutas de señalización como AKT que inactiva un factor pro-apoptótico Bad. Otros efectores son AF6, proteína-quinasa C-zeta y Nore1.

### *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, colon 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 homología estructural<sup>8</sup>. 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 caseína-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  $TR\alpha 1/c-erbA$ , 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 tiroideas<sup>9</sup>. 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  $TR\beta 1$ , y sugieren que este proceso ocurre en los primeros estadios del tumor. También se han descrito alteraciones a nivel del ARNm de  $TR\alpha 1$  y  $TR\beta 1$ , además de la aparición de transcritos anormales de  $TR\alpha 1$ . En otros cánceres, como el de hígado, hay una mayor expresión de  $TR\beta 1$ , formas truncadas de  $\alpha 1$  y  $\beta 2$ ; 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  $TR\beta 2$  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  $TR\beta$  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  $\beta$ -catenina, que lo activan, o factores como TGF $\beta$  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<sup>KIP1</sup> degradable por Cul-1 y CKS, también dianas de *myc*. De este modo evita la unión de p27<sup>KIP1</sup> 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 tumores<sup>10</sup>. A veces se sobreexpresan por amplificación, como en los neuroblastomas, carcinomas microcíticos de pulmón, carcinomas de mama, estomago, pulmón y colon, o por translocaciones, como ocurre en el 100% de los linfomas de Burkitt.

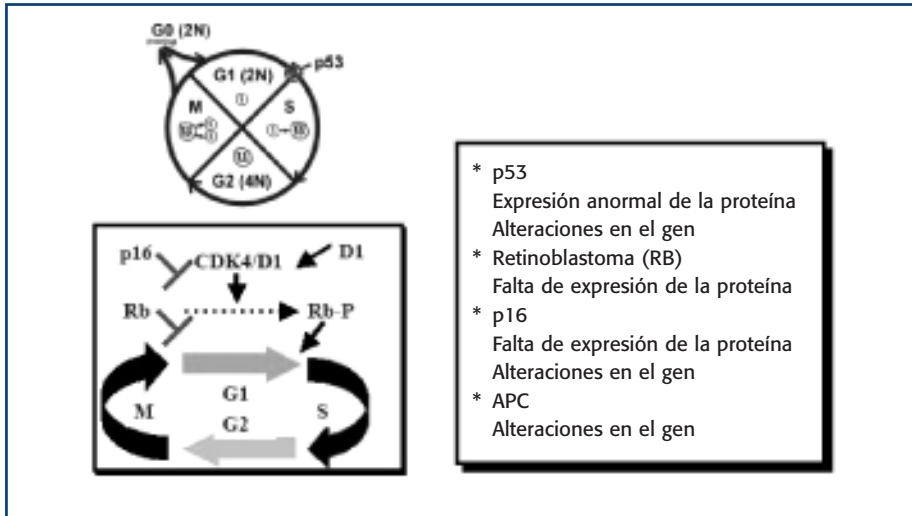
## GENES SUPRESORES DE TUMORES

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. 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. Además, dichos pacientes una vez curados del tumor primario tiene mayor susceptibilidad para contraer un segundo tumor que suele ser osteosarcoma. 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 del brazo largo 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<sup>11</sup>. 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 cual 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 apoptóticos<sup>12</sup>. 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 (Figura 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<sup>13</sup>. La activación de *p53* normal se produce como consecuencia del daño en el ADN celular, que puede ser producido por radiaciones ultravioletas e ionizantes, hipoxia, estrés oxidativo o por tratamiento con agentes modificadores del ADN. Cuando el daño del ADN es detectado se acumula *p53*, que activa diferentes genes como *p21<sup>cip/waf1</sup>* que inhibe la actividad de los complejos ciclina-CDK ciclinaD-cdk4/cdk6, ciclinaE-cdk2, y ciclinaB-cdk1 durante la fase G1, así como la actividad de la subunidad PCNA de la ADN polimerasa. Todos ellos, finalmente, producirían una parada del ciclo celular. Hay otros genes diana de *p53* que tienen otras funciones que no están implicadas en ciclo celular, como es el gen de la trombospondina que está implicado en procesos de metástasis y angiogénesis. También *p53* media actividades no dependientes de transcripción que pueden afectar al ciclo celular, como la inhibición de la entrada en la fase S por unión al factor de replicación del ADN RPA (*replication protein A*). Una vez eliminado el daño del ADN el ciclo celular nuevamente se restablece. Si el daño del ADN es excesivo, imposible de reparar, el aumento masivo de *p53* estimula una serie de

señales que pueden actuar por dos importantes vías a nivel de transcripción: vía de los receptores de muerte que activa la cascada de las caspasas, o por la vía mitocondrial alterando el balance de la familia de las proteínas Bcl-2 hacia factores proapoptóticos como Bax<sup>14</sup>. Pero al mismo tiempo p53 pueden inducir apoptosis por mecanismos independiente de transcripción, como es el caso de la inhibición de la actividad helicasa del factor TFIIH, causando finalmente la muerte celular o apoptosis. Debido a su actividad inhibitoria del crecimiento, en condiciones fisiológicas, p53 se mantiene en bajos niveles a través de una rápida degradación que asegura la supervivencia celular. Los niveles de p53 están regulados por mdm2, una E3 ubiquitin ligasa que se une a p53 para su degradación por el proteosoma (Figura 4).

**Figura 4.** Implicación de p53 en las diferentes vías de señalización

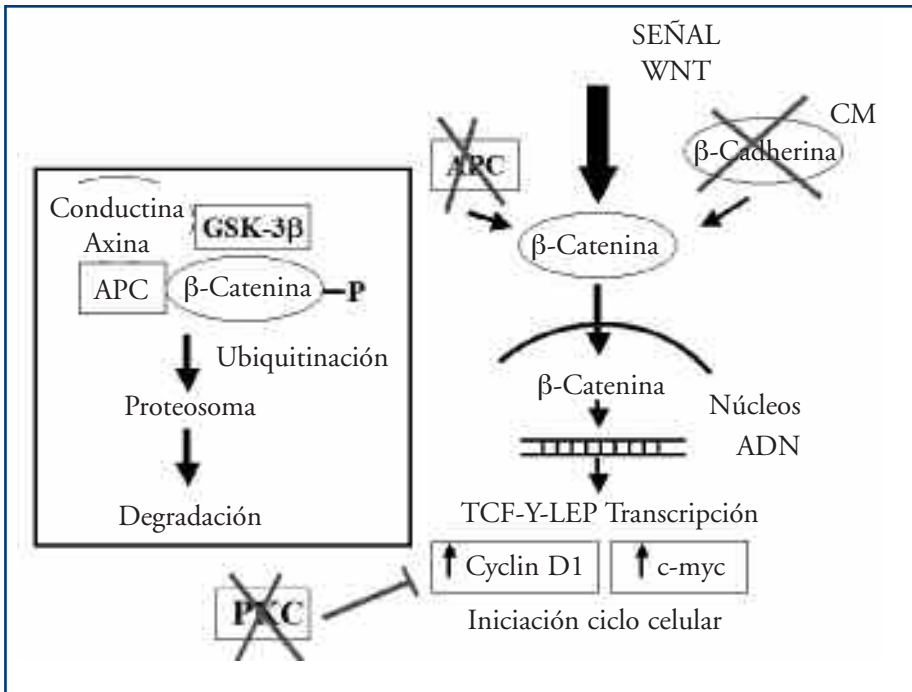


### APC

El análisis genético de las familias FAP (poliposis adenomatosa familiar) llevó a la identificación del gen *APC* y estudios posteriores demostraron su interacción con  $\beta$ -catenina, lo que señala su implicación en la vía de señalización de Wnt<sup>15</sup>. 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 e 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  $\beta$ -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  $\beta$ -catenina junto a axina y el enzima serina-treonín quinasa GSK3, que hacen susceptible a  $\beta$ -catenina a la degradación por proteosoma, APC es importante en la regulación del transporte de  $\beta$ -catenina del núcleo al citoplasma para su destrucción. En ausencia de señal de la vía Wnt las células regulan los niveles de  $\beta$ -catenina por la formación de dicho complejo que fosforila  $\beta$ -catenina preparándola para su ubiquitinación y degradación (Figura 5).

**Figura 5.** Vía de señalización de WNT



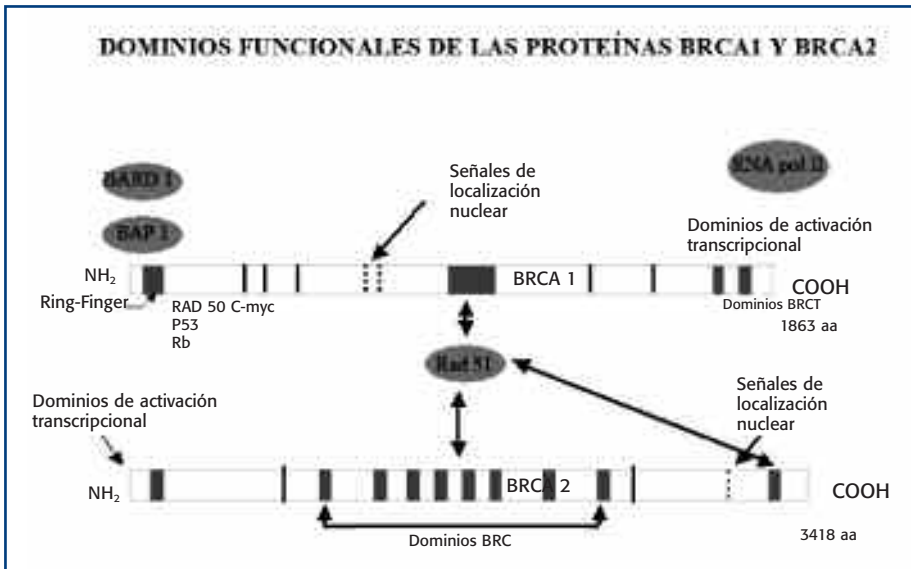
Cuando existe un ligando Wnt que activa dicha vía, ocurren una serie de eventos intracelulares que finalmente desestabilizan el complejo  $\beta$ -catenina/APC/GSK3/axina,  $\beta$ -catenina no fosforilada se transloca al núcleo y actúa como coactivador de los factores de transcripción de TCF/LEF (*T-cell 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 lo tanto, prueban su implicación en los procesos de carcinogénesis

humana, sobre todo a nivel colorrectal<sup>16</sup>. 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 lo 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 heterocigosidad 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. *BRCA1* y *BRCA2* tienen secuencias muy diferentes. *BRCA1* es una proteína de 1.863 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

**Figura 6.** Funciones de las proteínas BRCA1 y BRCA2



BRCT o alterarían el dominio de dimerización. El gen *BRCA2* de 3.418 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<sup>17</sup>. 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 tienen 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 6).

## 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 Excision Repair* o *BER*), mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos (*Nucleotide Excision 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 lo 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 éstos destacan aquellos que codifican para las proteínas del sistema *MMR*.

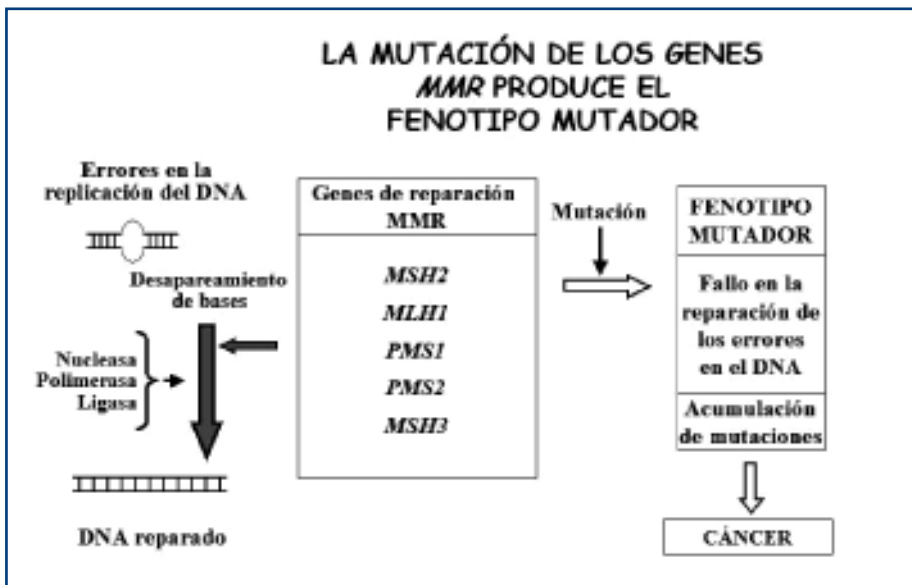
### SISTEMA *MMR* Y CÁNCER

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 lo tanto, las alteraciones que afectan a las proteínas del sistema MMR (proteínas "Mut") conducen a un acúmulo de mutaciones en el ADN<sup>18</sup>. Este hecho ocasiona lo que ha dado en denominarse "Fenotipo Mutador" (Figura 7).

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

**Figura 7.** Mecanismo de reparación de desapareamientos en el ADN





proporcionan al genoma humano un nivel de protección de 100 a 1.000 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 éstos 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 lo 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<sup>19</sup>.

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)<sup>12</sup>.

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<sup>14</sup>. 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. Así mismo, 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 quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son serina/treonina-quinasa 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 quinasa. 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 sólo 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. Así mismo, 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<sup>20</sup>.

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. Así mismo, 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 fludarabina 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 homocigóticamente para p53 presentan una alta incidencia de desarrollo de tumores, al igual que ocurre en humanos con un alelo mutado. Así mismo, la pérdida de p53 confiere resistencia a la inducción de apoptosis por tratamientos anticancerígenos. Por lo 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 apoptosis<sup>21</sup>. 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.

Así mismo, 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. Así mismo, 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

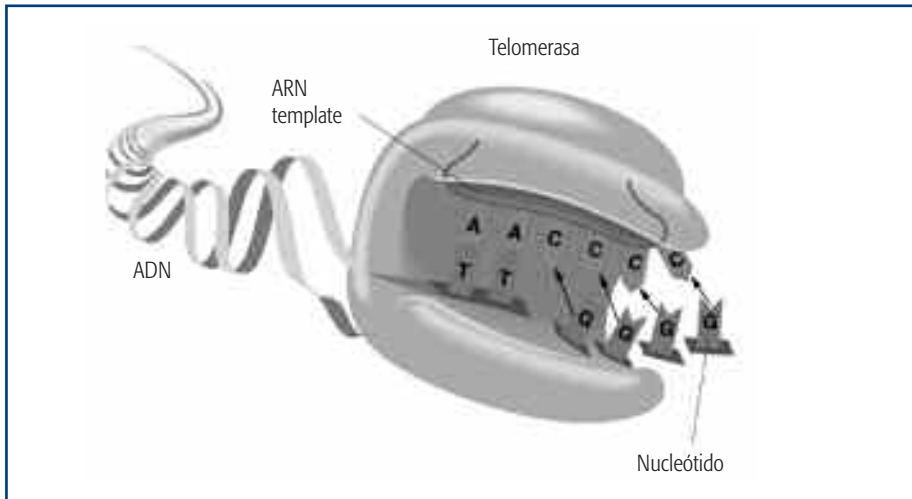
La telomerasa es la enzima que utilizan la mayoría de los organismos eucarióticos para el mantenimiento de sus telómeros. Mediante la incorporación de secuencias teloméricas en el

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 lo 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*).

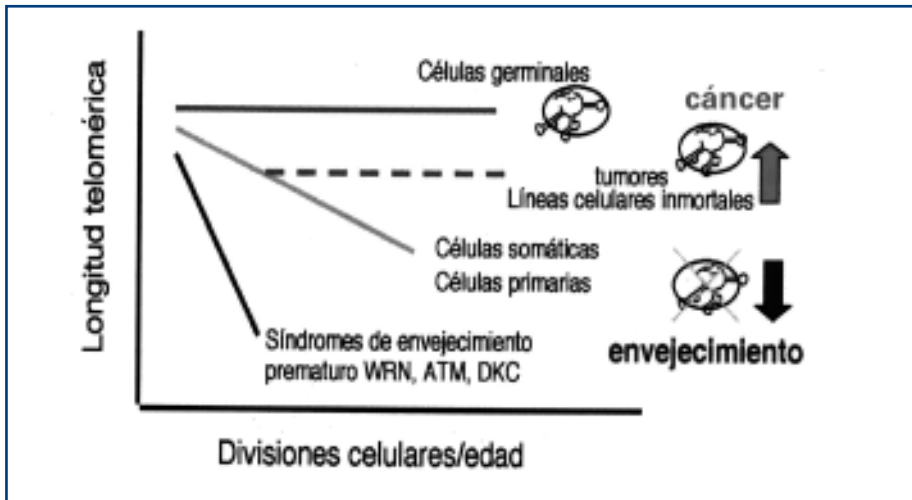
#### TELOMERASA: COMPONENTES Y ACTIVIDAD

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)<sub>n</sub>, está próxima al extremo 5' y comprende 11 nucleótidos de secuencia 5'-CUAACCCUAAC-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 1.132 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).

**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 tejidos sin actividad telomerasa<sup>22</sup>. 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*, *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.

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 9), en los tejidos

**Figura 9.** Telómeros y división celular

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<sup>22</sup>.

### 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<sup>23</sup>. 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 cáncer 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<sup>24</sup>.

#### ***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. Así mismo, 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<sup>25</sup>.

### ***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. Así mismo, 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 lo 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<sup>25</sup>.

### ***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<sup>24</sup>.

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.

## RESUMEN

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 sobre-expresión de genes específicos. 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<sup>INK4a</sup>*, el gen *MLH1* o el gen *BRCA1*.

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*); estos genes se caracterizan por tener herencia autosómica dominante, alta penetrancia y baja frecuencia.

En el cáncer de colon de tipo hereditario está incluido el síndrome HNPCC. Aproximadamente entre 12-15% de los tumores de colon, cursan por la vía carcinogénica del fenotipo mutador y se caracterizan por la inestabilidad en secuencias de microsatélites, siendo éste un indicador de alta tasa de mutación génica. Dentro de ese porcentaje se encuentra el Síndrome de Cáncer Colorrectal no Polipósico (HNPCC). Los genes del sistema MMR están implicados en el desarrollo de tumores humanos a través de la vía del fenotipo mutador; cabe destacar a *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hPMS1* y *hPMS2*.

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, si bien también está presente en algunas patologías como el cáncer.

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. 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, pronóstico y progresión del cáncer.

## 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;2:169-74
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 poliposis. *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): 125-30
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): 585-93
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):627-33
10. Pelengaris S, Khan, M. The many faces of c-myc. *Arch Biochem Biophys* 2003; 416(2): 129-36
11. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*2002;2(12): 910-7
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): 20-1
14. Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev*2002;2: 647-53
15. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes and Dev* 2000;14: 1837-51
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. Venkitaraman A. R. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci* 2001;14: 3591-8
18. Jiricny J, Marra G. DNA repair defects in colon cancer. *Curr Op Gen Dev* 2003;13: 61-9

19. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407: 770-6
20. Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nature Rev* 2002;1: 111-21
21. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000;407: 810-6
22. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and Cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10(7): 677-85
23. Blasco MA. Telomeres and cancer: a tail with many ends. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13(1): 70-6
24. Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2(4): 257-65
25. Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003;21 (10): 2034-43



# TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

■  
M.<sup>a</sup> Isabel Tejada Mínguez y Cristina Martínez Bouzas  
Laboratorio de Genética Molecular  
Hospital de Cruces. Baracaldo (Vizcaya)

## INTRODUCCIÓN

Las técnicas de Diagnóstico Molecular, que comprenden el estudio y análisis de los ácidos nucleicos, ADN y ARN o moléculas de la herencia, 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, formado a su vez por ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y ARN mensajero (ARNm). En el ADN genómico nuclear se encuentran los genes (menos los de las mitocondrias), que a su vez presentan intrones y exones, que son los fragmentos codificantes. El ARN mensajero resulta de la transcripción de esos exones y, a su vez, se traduce en proteínas. 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. 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, otra muestra que se utiliza en el laboratorio es el ADN complementario (ADNc). Se trata de una molécula que se produce *in vitro*, utilizando una reacción

de retrotranscripción 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), así que la única manera de estudiarlas es tomando la muestra del tejido afectado.

En la práctica diaria, los especialistas de laboratorio deben indicar a los clínicos, en cada caso, cuál es la muestra que se necesita, para qué, en qué condiciones la tienen que enviar y qué técnicas se van a realizar con ella. 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, algunos bien sencillos<sup>1-2</sup>, otros mas específicos<sup>3-7</sup> y hasta el más completo existente para profesionales del laboratorio<sup>8</sup>, pasando por las inmensas herramientas que nos facilita hoy día Internet, de las que citamos sólo un par de ellas<sup>9-10</sup> 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 y las vellosidades coriales.

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. Las células nucleadas que en ella se encuentran, los leucocitos, representan la mayor fuente de ADN para los estudios de rutina en Medicina. De preferencia, se ha de trabajar 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 solo tejido está alterado, es necesario extraer el ADN genómico 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  $-70^{\circ}\text{C}$ , 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 12-13 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 entorpece 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 (RNAsas). 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 dietilpircarbonato (DEPC). Con respecto a la recogida de 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 que mantienen la estabilidad del ARN estando libres de RNAsas. 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 éste va a ser inmediato, 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 (proteinasas 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  el tiempo necesario y descongelarla justo antes de que se vaya a extraer el ADN. En ambos casos, primeramente 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$ . 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 sólo 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 pequeños laboratorios clínicos hospitalarios.

### **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, o si queremos estudiar mutaciones somáticas.

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, qué parte de la muestra es tejido normal y qué 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.

### ***Vellosidades coriales***

Las vellosidades coriales son un tejido fresco biológico, por lo que todo lo dicho en ese apartado es de aplicación a estas muestras en cuanto a la extracción del ADN en sí. Sin embargo, como aquí la extracción del ADN se realiza con el fin del Diagnóstico Prenatal, el procesamiento tendrá tres características importantes a tener en cuenta:

1. Se ha de realizar siempre la extracción del ADN de inmediato o, como mucho, en un plazo no inferior a las 24 horas.
2. Se suele disponer de muy poca muestra (para evitar el riesgo del aborto post-biopsia) y de pocas células, ya que las vellosidades coriales son un tejido muy esponjoso de muy baja densidad celular.
3. Es fundamental identificar los restos maternos y separarlos del verdadero tejido fetal, lo que se realiza meticulosamente colocando la muestra en una placa de Petri con un poco de suero fisiológico bajo una lupa binocular. Una vez realizada esta limpieza es cuando se procede a la homogeneización de la muestra de forma mecánica tal y como previamente se ha indicado. En el caso de que existan restos hemáticos –que suele haberlos si la extracción de las vellosidades ha sido realizada vía transabdominal– se ha de realizar además una o varias lisis de eritrocitos con un tampón adecuado, previas a la digestión con proteinasa y al resto del protocolo.

### **Líquido amniótico**

El líquido amniótico no es la muestra de elección para extraer ADN para Diagnóstico Prenatal, debido a que tiene muy pocas células que se suelen cultivar, lo que entorpece el estudio prenatal y de ahí su menor uso. Pero todo laboratorio ha de tener los protocolos de trabajo establecidos, ya que puede ocurrir perfectamente que la gestante acuda tarde al ginecólogo, o que éste no pueda obtener una buena muestra por la mala posición del corion. Además, algunos diagnósticos se pueden solucionar mediante técnicas de PCR –que veremos mas tarde– para las que no se necesita mucho ADN. Son numerosos los protocolos existentes de cultivo de células amnióticas, pero básicamente todos utilizan medios comercializados con sueros sintéticos que llevan los factores de crecimiento. Los cultivos se realizan en “monocapa”, en frascos estériles de cultivo, y cuando se considera que la cantidad de células es la adecuada para extraer el ADN (un mínimo de 4 frascos confluyentes), se separan las células del fondo para dejarlas en suspensión. Para ello, se utiliza generalmente un proteolítico como la tripsina, y las células en suspensión resultantes se tratarán a partir de ahí como en los apartados anteriores para la extracción del ADN. Con este sistema, se pueden obtener cientos de microgramos de ADN en función del tiempo de cultivo y de lo precedido del mismo.

### **PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DEL ARN**

Lo que diferencia esta extracción de la del ADN, es que –en el laboratorio– se han de tomar todas las precauciones necesarias 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<sup>®</sup>; 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 búferes, 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 primero 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, dada la inestabilidad del ARN, para asegurar que, mientras se trabaja con un tubo, no se estropean 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 RNA 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  $\beta$ -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 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 cuál 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.

Para analizar el ADN, el problema que se tuvo que solventar fue la tremenda longitud del ADN existente en las células humanas ( $6 \times 10^9$  pares de bases en unos 2 m de longitud por célula), pero del cuál sólo un porcentaje muy pequeño es codificante. Se estima que sólo el 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 setenta, de unos enzimas que actuaban como "tijeras" cortando el ADN: las endonucleasas de restricción. Pronto se descubrió que

los fragmentos resultantes se podían estudiar por medio de sondas, descubriéndose 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 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 específicos<sup>3-8</sup> 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 puntos 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 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

**Figura 1.** Sitios de restricción o puntos de corte de algunas endonucleasas de restricción utilizadas en diagnóstico molecular

NOMBRE	SECUENCIA
<b>Eco RI</b>	5' ...G <sup>*</sup> AATT C...3' 3' ...C TTAA <sub>Δ</sub> G...5'
<b>Eag I</b>	5' ...C <sup>*</sup> GGCC G...3' 3' ...G CCGG <sub>Δ</sub> C...5'
<b>Hinf I</b>	5' ...G <sup>*</sup> ANTC...3' 3' ...C TNA <sub>Δ</sub> G...5'
<b>Pst I</b>	5' ...C TGCA <sup>*</sup> G...3' 3' ...G <sub>Δ</sub> ACGT C...5'
<b>Not I</b>	5' ...GC <sup>*</sup> GGCC GC...3' 3' ...CG CCGG <sub>Δ</sub> CG...5'
<b>Mnl I</b>	5' ...CCTC(N) <sub>7</sub> <sup>*</sup> ...3' 3' ...GGAG(N) <sub>6</sub> ...5'

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).

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, pero es importante señalar, 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, producidos.

### **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 enormemente 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 Reacción en cadena de la polimerasa o PCR, aunque también pueden emplearse en la síntesis del ADNc, en la secuenciación, etc., como veremos en este capítulo.

### **Electroforesis**

Cuando se digiere el ADN, la solución, en la que se encuentran todos los fragmentos producidos, se puede migrar mediante electroforesis en un gel de agarosa para separar esos fragmentos. Como el ADN está cargado negativamente, se coloca en pocillos en el extremo del cátodo de la cubeta, y se desplaza hacia el ánodo. La agarosa es un polisacárido purificado de agar, gelificante, de cuya concentración depende el nivel de migración. Los fragmentos se separan también 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 –normalmente 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 pueden visualizarse con tinción de bromuro de etidio, un compuesto que se asocia al mismo ADN produciendo fluorescencia bajo luz ultravioleta.

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%. Este tipo de geles es el utilizado 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 los 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 un filtro sólido. Este filtro, 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 el filtro 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, el filtro se mete en un horno para fijar el ADN y poder trabajar con seguridad 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 considerar en esta técnica: 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. Tres diferentes tipos de sondas se pueden describir: 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 ADN complementario, igualmente 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:** Con respecto al marcaje de la sonda, éste puede hacerse mediante radiactividad, o por quimioluminiscencia, y, en ambos casos, la detección del sitio de unión de la sonda con el ADN del filtro se hará por medio de una auto-radiografía en una placa.

**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.

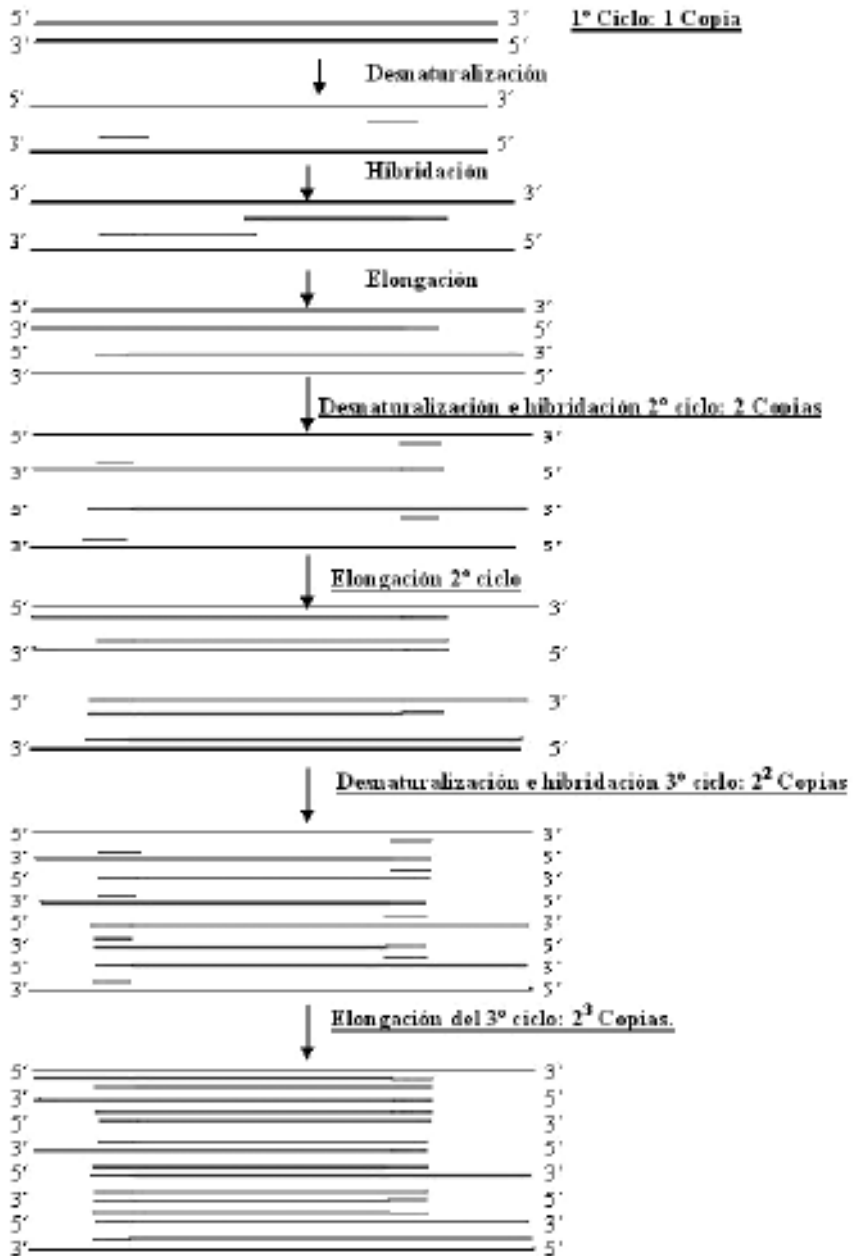
##### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

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 ochenta, 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, obteniéndose un número exponencial de copias de una secuencia específica del ADN. 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).

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 que marca 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

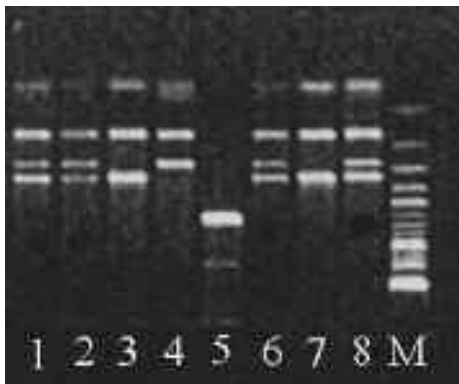
**Figura 2.** Esquema general del principio de la reacción de la PCR. El número final de copias obtenido será igual a 2 elevado al número de ciclos diseñados



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, entre otros usos, por ejemplo, detectar mutaciones en enfermedades hereditarias: una simple digestión con endonucleasas de restricción de un fragmento PCR, y su posterior migración en un gel de agarosa, nos puede mostrar por ejemplo 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

### **RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)**

La RT-PCR es un método sensible y versátil empleado para obtener ADNc a partir de ARN, clonando el extremo 5' y 3' del ARNm y generando ADNc libre. Además, la RT-PCR puede ser fácilmente adaptada 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 ARN, 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 que son 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 con 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.realtimerprimers.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 sigmoidal. 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 un apartado fundamental en el diagnóstico molecular de las enfermedades malignas, 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, 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 siempre 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<sup>6,7</sup> 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.

En el caso de mutaciones conocidas, si se trata de grandes delecciones o reordenamientos, el *Southern Blot* que ya se ha descrito puede ser 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, mayoritariamente se trata de buscar una mutación desconocida en el estudio del caso índice, o primer individuo a estudio en una familia, disponemos de otras técnicas como las que describimos a continuación.

### 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  $T_m$ ) 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. El resultado será, en el caso de haber alteraciones, la visualización de diferentes bandas en el gel (Figura 3).

La DGGE distingue con precisión los genotipos homocigotos de los heterocigotos respecto a 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 en función por tener diferente secuencia. 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 5.<sup>a</sup> 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 es 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 elevado coste por los oligonucleótidos con el extremo CG.

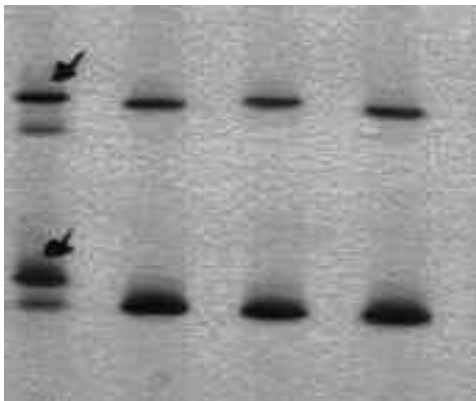
Una variante de la DGGE es la electroforesis en geles de gradiente de temperatura (TGGE). En esta variante, las condiciones de desnaturalización progresiva se logran mediante un gradiente de temperatura, y no por cambios en la concentración de los reactivos, como sucede en la DGGE. Este método es interesante 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 heretoduplex de ADN tienen diferente movilidad cuando se les somete a una electroforesis.

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).

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 sensibilidad, –en torno al 98%–, y que no se necesita radiactividad.



**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 nos indica la sospecha de una posible mutación en el exón 20



Se ha descrito muy recientemente una variante de este método que es la electroforesis capilar sensible a la conformación (*Conformation Sensitive Capillary Electrophoresis* o CSCE). La metodología y los fundamentos de este método son iguales a la CSGE, la diferencia está en que la separación electroforética de las diferentes muestras se realiza en un secuenciador automático capilar. En este caso el polímero que se emplea es especial porque no ha de llevar agentes desnaturizantes como sucedía con el gel<sup>11</sup> (Figura 6).

**Figura 6.** Electroferogramas de análisis de heterodúplex 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 patológica *nonsense* 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

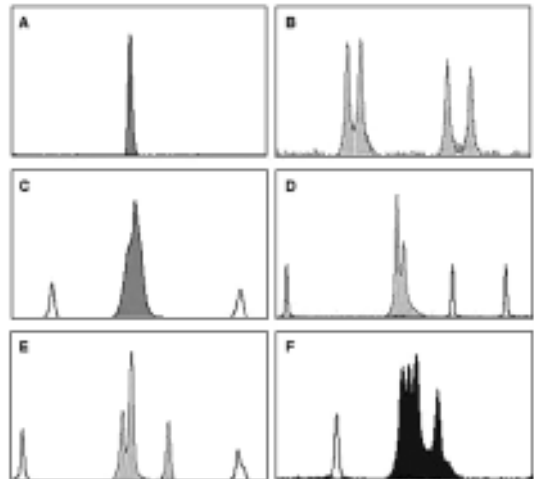


Foto cedida por Eladio Velasco Sampedro, del Instituto de Biología y Genética Molecular de la Universidad de Valladolid.

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 (SSPC)

La *Single-Stranded Conformation Polymorphism* o SSPC 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 técnicas previas (DGGE y CSGE) 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 desee 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 <sup>32</sup>P 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.

#### CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DESNATURALIZANTE DE ALTO RENDIMIENTO (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. En este método, el producto de PCR se utiliza directamente, sin pasar por ningún proceso previo como sucede con los tres métodos descritos previamente. La DHPLC está basada en la elusión diferencial del ADN homoduplex y el heteroduplex cuando migran a través de una columna cromatográfica. 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 desnaturalizantes, los heteroduplex fluyen de la columna antes que los homoduplex debido a su temperatura de fusión más baja. La DHPLC es una técnica tremendamente sensible pero muy compleja, que requiere un aparataje costoso y una cuidada interpretación. Otra desventaja de esta técnica con respecto a las anteriores, es que la migración y análisis se ha de hacer exón por exón, por lo que no se pueden realizar amplificaciones múltiples mientras que en las técnicas anteriores se puede llegar a analizar hasta cuatro exones a la vez.

#### TEST DE LA PROTEÍNA TRUNCADA (PTT)

La PTT 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.

### SECUENCIACIÓN

La secuenciación es la técnica última, la definitiva, aquella por la cual se sabe exactamente si un fragmento está o no mutado y qué cambio lleva, siempre que se trate, como hemos hecho hasta ahora, de cambios de una o unas pocas bases. Aunque utilizada en algunos laboratorios como método directo de búsqueda de mutaciones, esto no es norma general debido a su alto coste y al equipamiento que requiere. Por ello se recurre normalmente 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 1977<sup>8</sup> utilizando ADN polimerasa y los terminadores de cadenas llamados didesoxinucleótidos. Se trataba 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 marcado radiactivamente, 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, por lo que no se incorporan más nucleótidos y 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.

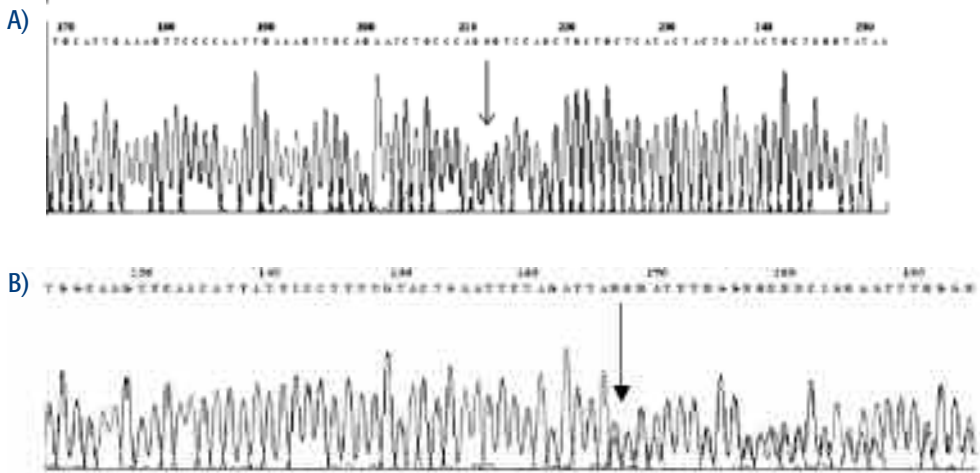
Con el gran desarrollo tecnológico que ha habido en los últimos años en Biología molecular, las técnicas de secuenciación han mejorado sensiblemente y se han automatizado. Hoy día, las reacciones de secuencia se llevan a cabo en termocicladores y la separación de los fragmentos generados se realiza en 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 sólo 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 es más costosa y laboriosa.

Otra mejora importante con respecto al método inicial ha sido con respecto 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 cada uno, por lo que la reacción se realiza en un único tubo. Los fragmentos obtenidos para la secuenciación se identifican por el último nucleótido de cada fragmento gracias al tipo de molécula fluorescente que tiene ligada. 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 excita las moléculas fluorescentes en una longitud de onda. La fluorescencia que emiten entonces los fluoróforos es detectada por una cámara de detección y los datos obtenidos por la cámara son transmitidos hasta un programa de ordenador que los interpreta y les asigna el nucleótido. Con ello, los resultados se muestran en forma de electroferogramas que presentan las bandas (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) del exón 16 del gen BRCA2: la flecha indica una mutación puntual; B) la flecha indica la delección 1100delC del gen CHEK2**

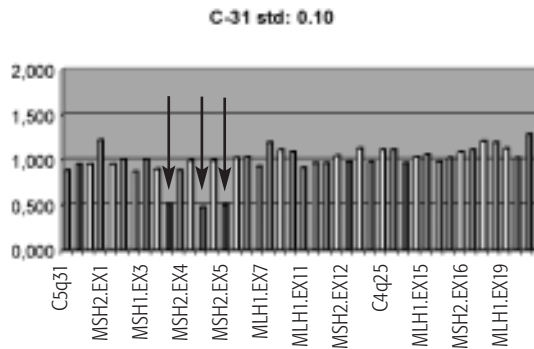


### MULTIPLEX LIGATION DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION O MLPA

Las técnicas descritas hasta aquí sólo pueden detectar cambios de una o de unas pocas bases. Para la búsqueda de mutaciones producidas por alteración en fragmentos más grandes se han descrito muy recientemente dos nuevas técnicas: la MLPA y la MAPH. La 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. Es una técnica que se ha extendido de forma rapidísima en los últimos tiempos, pues utiliza muy poca cantidad de ADN para hacer PCR multiplex y permite amplificar simultáneamente hasta 45 secuencias específicas (Figura 8).

El principio de la MLPA<sup>2</sup> (cuyo protocolo de trabajo está disponible en la pagina Web: [www.mrc-holland.com](http://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 está compuesta por las dos regiones presentes en la sonda de la izquierda más una secuencia espaciadora. Esta secuencia espaciadora, diferente para cada fragmento, es la que determina el tamaño final de la sonda y por lo tanto 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 en el laboratorio adecuado 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.

### 3.8. MULTIPLEX AMPLIFICATION AND PROBE HYBRIDIZATION O MAPH

El método MAPH al igual que el MLPA es una nueva técnica que permite detectar cambios en el número de copias de determinados fragmentos de ADN, pero su fundamento es muy diferente. La MAPH se basa en la recuperación cuantitativa de la sonda después de una hibridación con un ADN genómico inmovilizado en una membrana de nylon<sup>15</sup>. Las sondas de MAPH se crearon inicialmente a partir de pequeños fragmentos de ADN clonado en un vector (BACs o PACs), que se generan por PCR o por enzimas de restricción. El protocolo completo de la técnica de MAPH puede encontrarse publicado en la pagina [www.nottingham.ac.uk/~pdzjala/maph/](http://www.nottingham.ac.uk/~pdzjala/maph/).

Este protocolo consta primero de una desnaturalización del ADN, que se fija en una membrana de nylon; luego se le añade las sondas que se hibridarán con las secuencias complementarias; posteriormente se elimina el exceso de sonda que no se ha unido a su secuencia complementaria con sucesivos lavados. Finalmente, se separan las sondas que se han hibridado al ADN, que se recogen para ser amplificadas por PCR y el producto de PCR se migra en un secuenciador para separar los diferentes tamaños de amplificado.

Esta técnica, semejante a la anterior en cuanto a resultados, tiene como mayor dificultad el que se necesita una cantidad importante de ADN (de 0,5 a 1 microgramo) para que se fije bien al filtro. Por lo demás, su futuro es también prometedor.

## 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 noventa 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 se tiene que estudiar tejido tumoral y tejido sano 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 aquél 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 HNPCC 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 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 humanos<sup>14-16</sup>. 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, acoplada con PCR. El tratamiento con bisulfito cambia la C no metilada a T pero mantienen la C metilada y se asocia mediante una amplificación con cebadores específicos o MSP (*methylation-specific polymerase chain reaction*). También se puede asociar el tratamiento con bisulfito a PCR cuantitativa, o a análisis de restricción o a secuenciación, para realizar otras técnicas complementarias<sup>11</sup>.

### **Pérdida de heterocigosidad**

De la misma forma que hemos visto para la IM, la pérdida de heterocigosidad (LOH) de algunos loci, es una señal fiable de que existen anomalías en los genes supresores tumorales. De ahí que es importante su puesta a punto en un laboratorio. Estos estudios permiten extrapolar la presencia de mutaciones heterocigotas o incluso homocigotas, en el gen supresor adyacente a los marcadores de pérdida de heterocigosidad utilizados. 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) cuando 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 loci 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 hibridan. Para analizar los resultados, se han de usar diversos programas informáticos, 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 solo 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 *microarray*), 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 conocemos 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. Ésta 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 de hibridación, obtenemos un patrón de intensidad que ha de ser interpretado. Con toda esta información se inicia el análisis de los datos con un software especializado y el estudio e interpretación de los resultados es el apartado de mayor dificultad y complejidad. Las aplicaciones de esta tecnología están sólo comenzando, pues habiéndose empezado con *microarrays*, de expresión como hemos dicho, muy recientemente se están fabricando todo tipo de *microarrays* como por ejemplo los CGH- *microarrays* para la hibridación genómica comparada con ADNc, que va a ser de gran utilidad. 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 han de realizar a partir de una muestra biológica del paciente con cáncer, preferiblemente 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 (Southern, hibridaciones, amplificaciones diversas, etc.).
- Las técnicas de detección de mutaciones son diversas, pero en todo caso lo más importante es utilizar aquellas que den una mayor sensibilidad en un cribado inicial, para posteriormente secuenciar y determinar exactamente el cambio en el ADN.
- Novedosas y prometedoras técnicas como la MLPA y los microarrays están descubriendo nuevos y numerosos tipos de mutaciones responsables de cáncer 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, 3ª 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](http://www.protocol_online.org/prot/Molecular_Biology)

11. Esteban-Cardenosa E, Duran M, Infante M, Velasco E, Miner C. High-throughput mutation detection method to scan BRCA1 and BRCA2 based on heteroduplex analysis by capillary array electrophoresis. *Clin Chem* 2004; 50:313-20
12. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 2002; 30: e57
13. Armour JA, Barton DE, Cockburn DJ, Taylor GR. The detection of large deletions or duplications in genomic DNA. *Hum Mutat* 2002; 20: 325-37
14. Ehrlich M. DNA hypomethylation and cancer. En: Melanie Ehrlich, Eaton Publishing, eds. *DNA alterations in cancer: genetic and epigenetic changes*. Natick: 2000, 273-91
15. Fraga MF, Esteller M. DNA methylation: a profile of methods and applications.. *Biotechniques* 2002; 33:632-49
16. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225-9



# 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

## **NECESIDAD DE LAS HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS EN UNA CONSULTA DE CONSEJO GENÉTICO**

Las mujeres con antecedentes personales y familiares que sugieren la existencia de 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 BRCA1<sup>1</sup> y BRCA2<sup>2</sup> 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 valorar<sup>3</sup>. Además, es necesario recordar lo limitada que sigue siendo hoy en día nuestra comprensión de la susceptibilidad genética a este tipo de patologías. Por un lado, los genes BRCA1 y BRCA2 sólo explican un 15-25% de las familias sospechosas de

padecer algún tipo de susceptibilidad genética y no se dispone de una descripción clínica adecuada de los síndromes hereditarios asociados específicamente a defectos en estos genes. Por otro lado, el riesgo conferido por estos genes no está bien definido y por lo tanto la identificación de una mutación patogénica no es sinónimo de una buena estimación de riesgo en todos los casos. Como es lógico, este desconocimiento plantea numerosos problemas en dos etapas fundamentales del proceso de asesoramiento, como son la *selección de familias* que con más probabilidad pueden beneficiarse de un estudio genético y la *estimación de riesgo* una vez identificados los portadores.

En los últimos años se han venido desarrollando diferentes abordajes estadísticos que pretenden ayudar al especialista a tomar decisiones en ambas etapas.

## SELECCIÓN DE FAMILIAS

Sólo un pequeño porcentaje de las mujeres que acuden a una consulta de cáncer familiar preocupadas por sus antecedentes de cáncer de mama/ovario son portadoras de mutación en los genes BRCA1 o BRCA2. Se conocen otros genes de susceptibilidad a cáncer de mama, como TP53, PTEN, ATM o CHEK2, pero su contribución a los síndromes familiares mama/ovario es mucho menor. Para explicar la agregación familiar de cáncer de mama no explicada por estos genes, se ha propuesto la existencia de un gen "BRCA3" que hasta la fecha no ha podido ser identificado, así como complejos modelos poligénicos de susceptibilidad que por el momento no pasan de ser interesantes ejercicios teóricos.

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 intrincas 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, como ya hemos comentado, 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. El método debe ser en la medida de lo posible sencillo y rápido, para que se pueda realizar en el limitado tiempo del que se dispone en una consulta y, además, no debe en principio implicar a

personas (familiares) distintas de aquella que decide acudir a la consulta. Si bien es cierto que es posible identificar familias con alta probabilidad de ser portadoras de mutación en los genes *BRCA1* o *BRCA2* mediante análisis de ligamiento, también lo es que este procedimiento no puede establecerse como método de cribado rutinario en una consulta de consejo genético, pues no cumple ninguno de los criterios anteriores. Por ello, deberemos basar nuestras predicciones en otro tipo de aproximaciones estadísticas, como son los modelos empíricos, los modelos genéticos o las tablas de prevalencia.

### MODELOS EMPÍRICOS

Se han desarrollado diversos modelos empíricos que permiten estimar una probabilidad 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 variables independientes 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 (frecuentemente denominado U Penn) fue desarrollado en 1997<sup>4</sup>. 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) durante el periodo 1993-1995, se había realizado 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 ese mismo año, Shattuck-Eidens y col desarrollaron un modelo predictivo similar a partir de los datos de 798 familias<sup>5</sup>. Este modelo, conocido como Myriad I, predice la probabilidad de ser portador de mutación en *BRCA1* en función de la historia personal del probando (tiene en cuenta su edad de diagnóstico y si se trata de un caso de CM, CO, CMO, CMBI o CMBI+CO) y el número

de familiares con CM, CO y CMO. Todas las familias incluidas en el estudio tenían múltiples casos de cáncer de mama, edades de diagnóstico muy temprana o casos de cáncer de ovario.

En 1998, Frank y col<sup>6</sup> desarrollaron un nuevo modelo en el que se incluía por primera vez el estudio molecular del gen BRCA2. El modelo, conocido como *Myriad II*, se desarrolló a partir de 238 familias. Todas estas familias 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 también antes de los 50 años o CO). En los últimos años se han desarrollado muchos otros modelos similares en distintas poblaciones. La Tabla 1 resume las características más relevantes de algunos de ellos. 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<sup>7</sup>. 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 qué punto sería correcto aplicarlos a nuestra población. Por otro lado, se deseaba

**Tabla 1. Modelos empíricos para calcular la probabilidad de que una familia sea portadora de mutación en BRCA1/BRCA2**

Historia familiar mínima <sup>1</sup>	Variables de riesgo											
	Población	Designación	Gen	Familias	CM	dxCM	CO	dxCO	CMO	CMBI	CMV	Referencia
Sin definir	USA	Penn	BRCA1	169	no	sí	sí	no	sí	no	no	4
Sin definir	USA	Myriad-I	BRCA1	798	sí	sí	sí	no	sí	sí	no	5
1CM<50+1	USA	Myriad-II	BRCA1/2	238	no	sí	sí	no	no	sí	no	6
3CM/CO	Finlandia	Finlandés	BRCA1/2	148	no	sí	sí	no	no	no	no	27
3CM/CO	Holanda	Holandés	BRCA1/2	164	sí	sí	sí	no	no	sí	no	28
3CM/CO	España	HCSC	BRCA1/2	102	no	sí	sí	no	sí	sí	sí	7
2 CM (dx<50 años)	Asquenazí	-	BRCA1/2	424	no	sí	sí	no	no	sí	no	29
2 CM (dx<50 años)	Reino Unido	Manchester	BRCA1/2	422	sí	sí	sí	sí	no	no	sí	19

**Tabla 2.** Variables asociadas a la presencia de mutación en 211 familias mama/ovario españolas

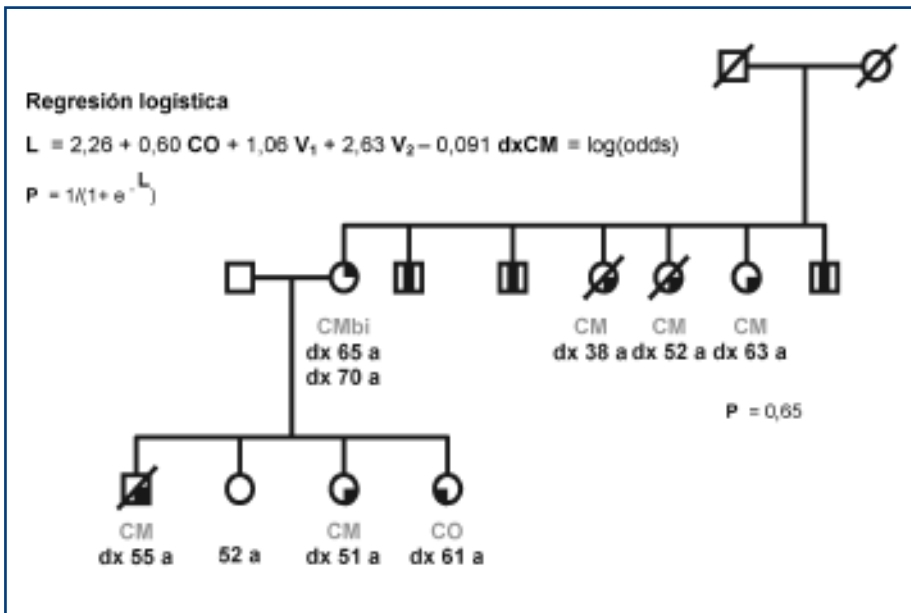
Variable	BRCA positivas (N=68)	BRCA negativas (N=143)	p
CO	57%	26%	<0,00001
CMO	24%	6%	0,0003
CMbi	40%	22%	0,006
CMV	15%	2%	0,0003
dxCM	44 años	50 años	<0,00001
>4CM	3%	7%	ns
dxCO	49 años	49 años	ns

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 cáncer de ovario (CO), un cáncer de mama y ovario en una misma mujer, un cáncer de mama bilateral, un cáncer de mama en varón 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

**Tabla 3.** Variables que distinguen los síndromes BRCA1 y BRCA2

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	-

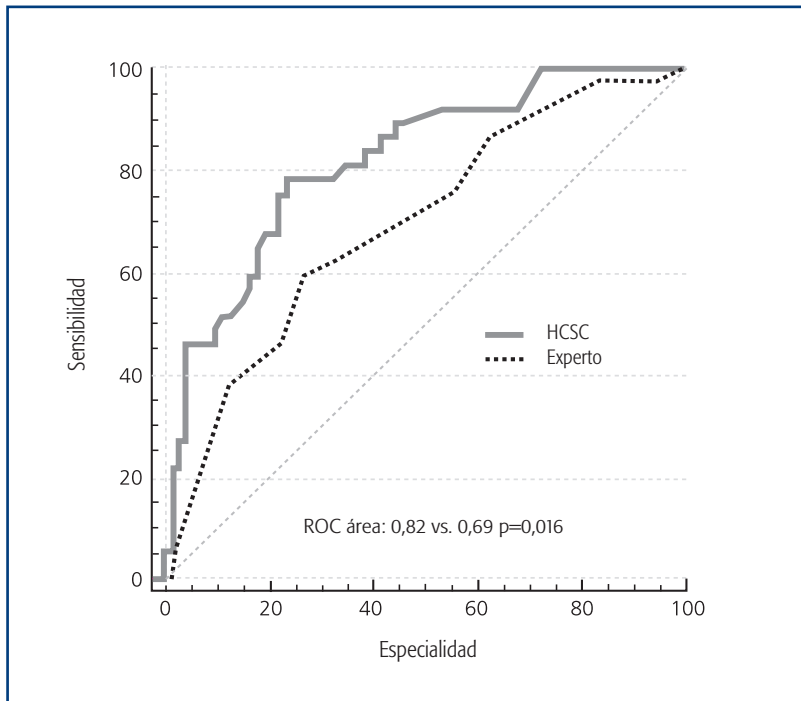
**Figura 1. Probabilidad pre-test de identificar una mutación.** La figura muestra un modelo empírico desarrollado en población española (modelo HCSC). Las variables que predicen la presencia de mutación son: el número de cánceres de ovario en el pedigrí (CO), la edad media de diagnóstico de cáncer de mama y la presencia en el pedigrí de cáncer de mama bilateral, cáncer de mama y ovario en una misma mujer o cáncer de mama en varón. Si en el pedigrí existe un caso de cualquiera de estas manifestaciones V1 adopta el valor de 1 y V2 adopta el valor de 0, si por el contrario hay dos o más caso de estas manifestaciones clínicas (en cualquier combinación posible), la variable V1 adopta el valor 0 y la variable V2 adopta el valor 1. El modelo predice la probabilidad de que la familia sea portadora, sin distinguir entre los genes BRCA1 y BRCA2. Se muestra un ejemplo de aplicación del modelo a una familia real. En este caso la variable CO adopta el valor 1, la variable V1 adopta el valor 0, la variable V2 el valor 1 (pues en la familia existe un caso de cáncer de mama en varón y un caso de cáncer de mama bilateral) y dxCM adopta el valor 53,8 (para calcular la edad media de diagnóstico en cáncer de mama se prescinde del caso de cáncer de mama en varón y del segundo tumor en el caso de cáncer de mama bilateral). De acuerdo al modelo, esta familia tiene una probabilidad del 65% de ser portadora de mutación en uno de los dos genes



media de diagnóstico de CM (excluyendo la edad de diagnóstico de los posibles cáncer de mama en varón) y el número de cánceres de ovario aparecen como factores 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.



**Figura 2. 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%



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 CM bi, el CMO y el CMO en el

**Tabla 4.** Aspectos fenotípicos característico de 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 Turner y col.<sup>9</sup>

modelo es equivalente, cuando en la realidad (y los estudios monovariantes así lo confirman) el peso es distinto (ver Tabla 2). El modelo multivariable, denominado HCSC, y un ejemplo de su utilización se muestran en la Figura 1. En la Figura 2 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. Éstas 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.

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. En este sentido, es importante señalar que estudios recientes sugieren que los tumores asociados a mutación en BRCA1 tienen efectivamente características anatomopatológicas que los diferencian claramente de los tumores de mama esporádicos o BRCA2<sup>8,9</sup>. La Tabla 4 resume las características más relevantes.

Se recomienda leer el artículo original para una descripción más precisa de los criterios de selección de familias

## 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. Los modelos genéticos intentan explicar la agregación familiar de cáncer suponiendo la existencia de un determinado número de genes de susceptibilidad (con una determinada frecuencia y penetrancia) que siguen un determinado patrón de herencia mendeliana. Una vez establecido un modelo de susceptibilidad, se puede emplear una aproximación estadística (normalmente basada en el teorema de Bayes) para determinar la probabilidad de que un individuo con una historia personal y/o familiar de cáncer determinada sea portador de una mutación en uno de los genes de susceptibilidad. El primer modelo genético de susceptibilidad a cáncer de mama fue desarrollado por Claus y colaboradores<sup>10,11</sup>. 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 col<sup>12</sup> modificaron el modelo de Claus para poder incorporar el efecto simultáneo en la población de dos genes de susceptibilidad. El modelo de Parmigiani y col, denominado BRCAPRO, está incluido en el paquete informático CaGene y se utiliza hoy en día en numerosas consultas de consejo genético de todo el mundo para predecir la probabilidad de que una persona sea portadora de mutación en uno de estos genes. Los valores numéricos de la prevalencia y penetrancia pueden ser modificados. Esta flexibilidad permite adaptar el modelo a distintas poblaciones<sup>13</sup>. El modelo IC es una modificación reciente del modelo BRCAPRO desarrollada por un consorcio italiano de investigación en cáncer familiar<sup>14</sup>. La principal diferencia respecto al modelo original es la forma de tratar los casos de concurrencia de dos cánceres en una misma mujer, ya sean casos de cáncer de mama bilateral, casos de cáncer de ovario bilateral o una combinación de cáncer de mama y ovario. El modelo BRCAPRO considera estos sucesos como independientes y por lo tanto con una probabilidad que es igual al producto de las probabilidades de cada suceso individual. Por el contrario, el modelo IC considera estas manifestaciones clínicas como entidades individuales con una probabilidad de suceder específica que no es igual al producto de las probabilidades de los sucesos individuales.

Independientemente de la utilidad que puedan tener en una consulta de consejo genético para identificar portadores, hoy en día no podemos considerarlos modelos adecuados de susceptibilidad, pues dos únicos genes de susceptibilidad no explican todo el exceso de riesgo observado en familiares de enfermos. Antoniou y col han desarrollado un modelo genético que pretende reflejar

más fielmente este hecho<sup>15</sup>. 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 los modelos BRCAPRO e IC), pero asume explícitamente que estos genes no pueden explicar por completo la agregación familiar. Para explicar el exceso de riesgo no atribuible a BRCA1 y BRCA2, propone la existencia de varios genes de baja penetrancia con un efecto en el riesgo multiplicativo. Además, el modelo permite incorporar el efecto de genes modificadores que alteran el riesgo en portadores de mutación en BRCA1 y BRCA2. El modelo BOADICEA es superior al modelo BRCAPRO explicando los rasgos epidemiológicos de incidencia de cáncer en familiares de afectados<sup>16</sup>, pero hasta la fecha no se han publicado estudios que demuestren su utilidad para seleccionar familias en una consulta de consejo genético.

### DATOS DE PREVALENCIA

Una tercera alternativa para calcular la probabilidad de ser portador de mutación, consiste simplemente en clasificar la familias en categorías definidas según la historia de cáncer de mama y ovario que presenten, clasificar 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<sup>17</sup>. 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 pueden considerar 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?

Hemos visto que existen distintas aproximaciones estadísticas para estimar la probabilidad de pre-test de ser portador. Todas ellas son de uso común hoy en día y en general, cada especialista en cáncer familiar elige alguno de los métodos de forma un tanto arbitraria en función de sus preferencias personales. Para poder establecer criterios más objetivos, en los últimos años se han publicado diversos estudios de validación que comparan distintos modelos<sup>14,18,19</sup>. La Tabla 5 muestra los datos más relevantes de algunos de estos estudios junto a los valores del área bajo la curva ROC, que como ya hemos comentado es una medida de la capacidad discriminadora de cada

**Tabla 5.** Estimación de la probabilidad pre-test. Comparación de la capacidad discriminadora (ROC) de los distintos modelos existentes

Familias a estudio Historia familiar mínima	Modelos empíricos						Modelos genéticos				Prevalencia		Ref.
	N	HCSC	Finlandés	Holandés	U Penn	Myriad I	Myriad II	Manchester	Claus	BRCAPRO	IC	2002	
3CM/CO	109	0,78	0,73	0,77	0,72	-	-	-	-	-	-	0,74	18
2CM (1<50); 1CO+1CM	258	-	-	-	-	-	0,71	0,77	0,59	0,59	-	-	19
Sin definir	458	0,65	0,72	-	0,78	0,77	-	-	0,75	0,75	0,76	0,71	14

modelo. 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.

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 lo 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. 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 los modelos empíricos publicados hasta la fecha no se ha tenido en cuenta la presencia de grandes reordenamientos genéticos, que hoy sabemos que representan alrededor del 10% de todas las mutaciones en BRCA1 en la mayoría de poblaciones<sup>20</sup>. 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.

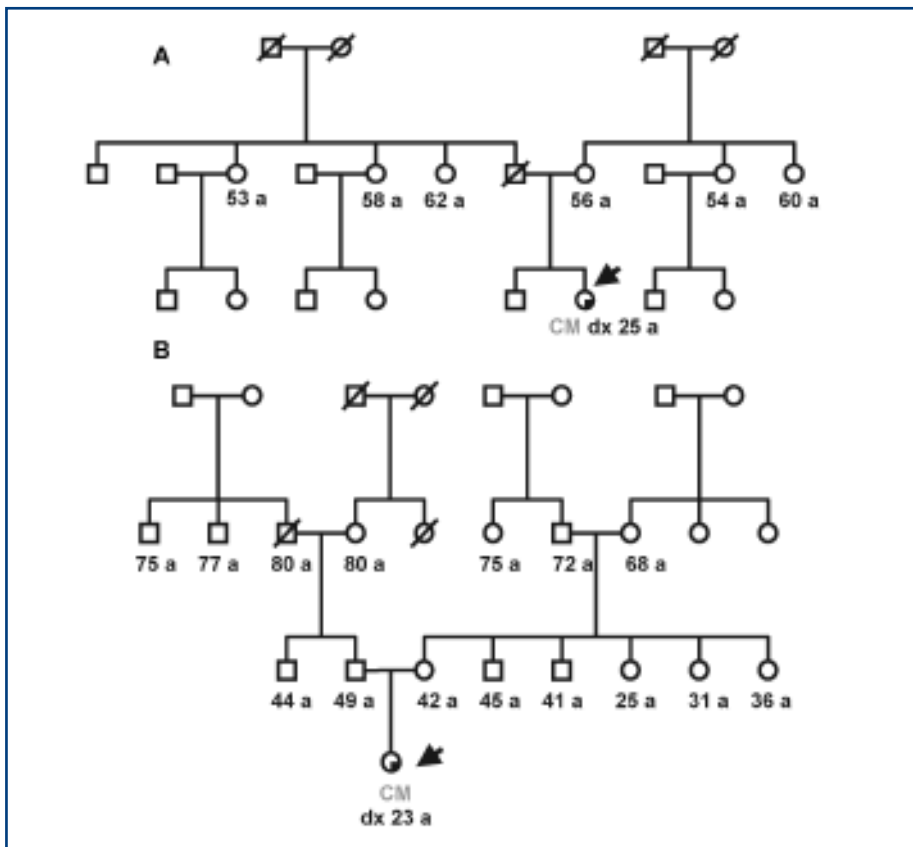
Independientemente de estas consideraciones, lo cierto es que tanto los modelos empíricos como los genéticos tienden a subestimar la frecuencia de mutaciones en familias de bajo riesgo y a sobrestimarlo en familias de riesgo elevado<sup>14</sup>.

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 cumplieran las familias utilizadas para derivar el modelo, si no 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.

Los modelos empíricos (así como la utilización de datos reales de prevalencia), adolecen de un mismo problema, que es la dificultad para clasificar sin ambigüedades el fenotipo de las familias que nos podemos encontrar en la consulta. Por ejemplo, es muy común en la literatura leer expresiones del tipo “familias con al menos tres miembros afectados de cáncer de mama”. ¿Qué se quiere decir con esta expresión? Pensemos en dos familias distintas que acuden a una consulta de consejo genético, cada una con tres casos de cáncer de mama en dos generaciones. En una de las familias las tres únicas mujeres existentes en dos generaciones están diagnosticadas de cáncer de mama, mientras en la otra familia hay tres mujeres afectas y ocho sanas. Los modelos considerarán las dos familias en la misma categoría de riesgo, sin embargo, intuitivamente sospechamos que no se trata de dos familias equivalentes. Este tipo de ambigüedades a la hora de definir una historia familiar es probablemente la mayor fuente de error.

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<sup>19</sup>. Por otro lado, para que los modelos genéticos proporcionen estimaciones de riesgo realistas, 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

**Figura 3. 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 lo tanto poco informativas. Por otro lado, por la rama paterna sólo hay hombres. Por lo tanto, el caso índice no tiene antecedentes pero tampoco tenía posibilidad de tenerlos. El pedigrí B es poco informativo. No se detectó mutación patogénica en el caso A, y sin embargo sí 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



sofisticados, como el modelo BODICEA, requeriría de datos epidemiológicos referidos a genes que ni siquiera están bien caracterizados.

Existen por supuesto problemas comunes a la utilización de cualquier método de estimación de riesgo en cáncer de mama/ovario. Quizás el más importante sea el que se refiere al 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 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. En la Figura 3 se ilustra con un ejemplo este problema.

Los modelos genéticos actuales asumen explícitamente (y los modelos empíricos de forma implícita) que todas las posibles mutaciones localizadas en cada gen de susceptibilidad tienen la misma penetrancia, una suposición que no parece muy realista. De hecho, cada vez hay más evidencias que apuntan en la dirección contraria, como se comentará posteriormente. Este hecho puede comprometer seriamente la utilidad de los modelos actuales en poblaciones donde exista un importante efecto fundador.

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.

## **PENETRANCIA ASOCIADA A BRCA1 Y BRCA2**

Las primeras estimaciones de penetrancia se realizaron en familias que se habían empleado para identificar los genes BRCA1 y BRCA2 por análisis de ligamiento<sup>21</sup>. Lógicamente, estas familias presentaban una carga de cáncer de mama y ovario muy elevado y daban unas estimaciones de penetrancia muy elevadas (Tablas 6 y 7). Estos estudios siguen considerándose de referencia a la hora de estimar el riesgo y sin embargo numerosos estudios posteriores, realizados bien en familias que acudían a una consulta de cáncer familiar o en la población general, han demostrado que estas primeras estimaciones, probablemente debido al sesgo en la selección de familias, sobrestimaban la penetrancia.



**Tabla 6.** Penetrancia (riesgo acumulado) asociada a mutaciones germinales en *BRCA1*, según diversos estudios

Selección de familias	Penetrancia CM %(95%IC)		Penetrancia CO %(95%IC)		Referencia
	50 años	70 años	50 años	70 años	
Familias de alto riesgo	73(49-87)	87(72-95)	29(16-40)	44(28-56)	21
Estudio poblacional	32(2-62)	47(5-82)	11(1-74)	36(4-99)	30
Estudio poblacional	13	30	5	15	26
Estudio poblacional	39	71	21	46	31
Consulta cáncer familiar	34(17-60)	50 (26-82)	21(8-47)	68(36-94)	32
Consulta cáncer familiar	27(20-34)	39(27-52)	14(7-22)	43(21-66)	13
Consulta cáncer familiar	30	58	17	.58	33
Metanálisis	38(30-43)	65 (51-75)	12(6-18)	39(22-51)	34

Algunos de los estudios más relevantes se resumen en las Tablas 6 y 7.

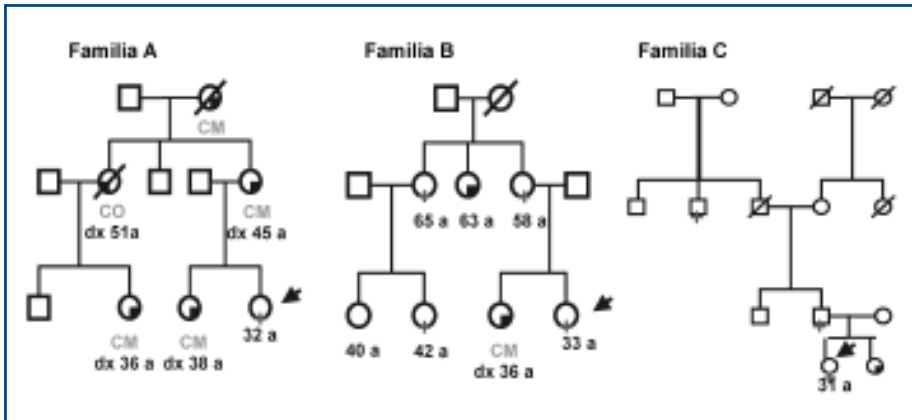
En general, los estudios realizados a partir de familias de múltiples casos darán estimaciones de penetrancia más elevadas que los realizados en familias menos seleccionadas (que son precisamente las familias más frecuentes en una consulta de consejo genético). Lógicamente, las estimaciones de penetrancia más bajas se dan en estudios poblacionales, aunque es importante tener en cuenta que, por razones metodológicas, estos estudios se restringen al análisis de mutaciones recurrentes en la población de estudio, y por lo tanto pueden estar reflejando un riesgo asociado exclusivamente a esas mutaciones.

**Tabla 7.** Penetrancia (riesgo acumulado) asociada a mutaciones germinales en *BRCA2*, según diversos estudios

Selección de familias	Penetrancia CM %(95%IC)		Penetrancia CO %(95%IC)		Referencia
	50 años	70 años	50 años	70 años	
Familias de alto riesgo	28(9-44)	84(43-95)	4(0-10)	27(0-47)	21
Estudio poblacional	18(2-32)	56(5-80)	3(0-19)	10(1-55)	30
Estudio poblacional	4	9	2	5	26
Estudio poblacional	34	74	2	12	31
Consulta cáncer familiar	19	71	1	31	32
Consulta cáncer familiar	26(18-34)	44(29-58)	3(0-7)	15(4-26)	13
Metanálisis	15(10-21)	43(32-52)	2(0-5)	10(4-16)	34

**Figura 4. 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 patogénica 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



Está claro que las distintas aproximaciones estadísticas empleadas para estimar la penetrancia introducen distintos sesgos con importantes consecuencias en el resultado del análisis<sup>22</sup>. Sin embargo, es posible que las diferencias en las estimaciones penetrancia entre estudios, más allá de los problemas metodológicos, respondan en parte a una realidad biológica. En este sentido, es oportuno señalar que, por un lado, se ha demostrado que distintas mutaciones patogénicas en BRCA1 pueden conferir riesgos distintos<sup>23</sup>. Por otro lado, se han descrito variantes génicas<sup>24</sup> y factores ambientales<sup>25</sup> que modifican el riesgo asociado a las mutaciones patogénicas en BRCA1 y BRCA2.

En resumen, debemos tener muy claro que la identificación de una mutación no es sinónimo de una buena estimación de riesgo. La incertidumbre en la estimación de riesgo es lo suficientemente amplia como para tener implicaciones prácticas en el manejo de la personas en cuestión. Pensemos cuan distintas pueden ser las medidas de seguimiento (o profilaxis) que vamos a proponer a una mujer portadora de mutación en función de que estimemos un riesgo de desarrollar cáncer a los 50 años del 73%<sup>21</sup> o del 4%<sup>26</sup>.

Probablemente, para estimar la probabilidad de desarrollar la enfermedad en nuestro portador problema, lo más correcto sea valorar cuidadosamente qué 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 de Ford y col a una familia de bajo riesgo como aplicar estimaciones derivadas de estudios poblacionales a un familia con múltiples casos. La Figura 4 muestra ejemplos de la importancia que la historia familiar tiene en la estimación de riesgo en portadores.

## RESUMEN

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, debemos tener en cuenta que no todos los árboles familiares son igualmente informativos. 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.

## 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. *Sem. Oncol* 2001;28(4):419-33
4. 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(20):1409-15
5. Shattuck-Eidens D, Oliphant A, McClure M, McBride C, Gupte J, Rubano T et al. BRCA1 Sequence analysis in Women at High Risk for Susceptibility Mutations. *JAMA* 1997; 278(15):1242-50
6. 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(7):2417-25
7. 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; 97:466-71
8. Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrío D, Barroso A et al. Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90(1):5-14
9. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of BRCAness in Sporadic Cancers. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:814-19
10. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet* 1991; 48:232-42
11. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* 1994; 73:643-51
12. Parmigiani G, Berry DA and Aguilar O. Determining Carrier Probabilities for Breast Cancer-Susceptibility Genes BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1998; 62:148-58
13. 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(11):899-906
14. Marroni F, Aretini P, D'Andrea E, Caligo MA, Cortesi L, Viel A et al. Evaluation of widely used models for predicting BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Med Genet* 2004; 41:278-85
15. Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Stratton MR, Peto J et al. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer* 2002; 86(1):76-83
16. Antoniou AC, Pharoah PPD, Smith P and Easton DF. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 2004; 91:1580-90
17. 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(6):1480-90
18. de la Hoya M, Díez O, Pérez-Segura P, Godino J, Fernández 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; 40:503-10
19. 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; 41:474-80
20. Mazoyer S. Genomic Rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Human Mutation* 2005; 25:415-22
21. 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(3):676-89

22. Begg CB. On the use of familial aggregation in population-based case probands for calculating penetrance. *J Natl Cancer Inst* 2002; 21;94(16):1221-6
23. Gorski B, Menkiszak J, Gronwald J A protein truncating BRCA1 allele with a low penetrance of breast cancer. *J Med Genet* 2004;41(12):e130
24. Wang WW, Spurdle AB, Kolachana P, Bove B, Modan B, Ebbers SM et al. A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 and risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(9):955-60
25. Narod SA. Modifiers of risk of hereditary breast and ovarian cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(2):113-23
26. 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
27. 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(5):704-08
28. Peelen T. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Leiden. Año 2000
29. 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 Ashenazi woman (LAMBDA). *Breast Cancer Res.* 2003; 5:R206-R216
30. 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(10):1301-8
31. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302(5645):643-6
32. Antoniou AC, Gayther SA, Stratton JF. Risk models for familial ovarian and breast cancer. *Genet Epidemiol* 2000; 18(2):173-90
33. Heimdal K, Maehle L, Apold J, Pedersen JC, Moller P. The Norwegian founder mutations in BRCA1: high penetrance confirmed in an incident cancer series and differences observed in the risk of ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2003; 39(15):2205-13
34. 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(5):1117-30





# ONCOGENES Y GENES SUPRESORES

■  
Raquel Salazar Sáez<sup>1,2</sup>, Eva María Sánchez Tapia<sup>2</sup>  
y Rogelio González Sarmiento<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Oncología Médica. Hospital Clínico Universitario. Salamanca

<sup>2</sup>Centro de Investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca-CSIC. Salamanca

<sup>3</sup>Unidad de Medicina Molecular-Departamento de Medicina. Universidad de 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 cambios 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. Los cambios en la secuencia del ADN se denominan mutaciones. 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 éstas 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 ADN secundarios a alteraciones en los genes encargados de controlar este proceso o que haya un defecto en la capacidad de reconocer y responder al daño genético<sup>1</sup>.

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 ADN y se favorece la acumulación de mutaciones, como es el caso del cáncer de colon hereditario no polipósico.

## **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 ADN producen tumores tras un periodo largo de latencia, mientras que los virus RNA lo hacen tras un periodo 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.

Estudios de hibridación mostraron que las secuencias oncogénicas de los retrovirus se encontraban en las células somáticas normales, de donde 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, principalmente por estar implicados en traslocaciones cromosómicas.

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, traslocación 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<sup>2</sup>.

Estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado que algunos virus ADN 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 carcinoma de orofaringe, etc. Experimentos realizados en cultivos celulares con estos virus han puesto de manifiesto que, tras la infección, los virus ADN estimulan la síntesis del ADN de la célula hospedadora con el fin de activarla y favorecer su propia replicación. Para ello, los virus ADN 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.

El descubrimiento de los oncogenes y protooncogenes supuso un importante avance en el conocimiento de las bases moleculares del cáncer; sin embargo, no todos los tumores presentan alteraciones en estos genes y, en general, los tumores hereditarios no tienen alteraciones en los protooncogenes.

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. Activación transitoria y limitada del receptor del factor de crecimiento, que a su vez activa a varias proteínas transductoras de señales existente en la capa interna de la membrana plasmática.
3. Transmisión por el citosol de la señal traducida hasta que llega al núcleo, por el segundo mensajero.
4. Inducción y activación de los factores reguladores, los sistemas de transducción anteriores trasladan la información al núcleo donde la expresión de los genes es regulada a nivel de la transcripción, y cuyo papel es esencial para controlar el crecimiento celular<sup>3</sup>.

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 *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<sup>4</sup>.

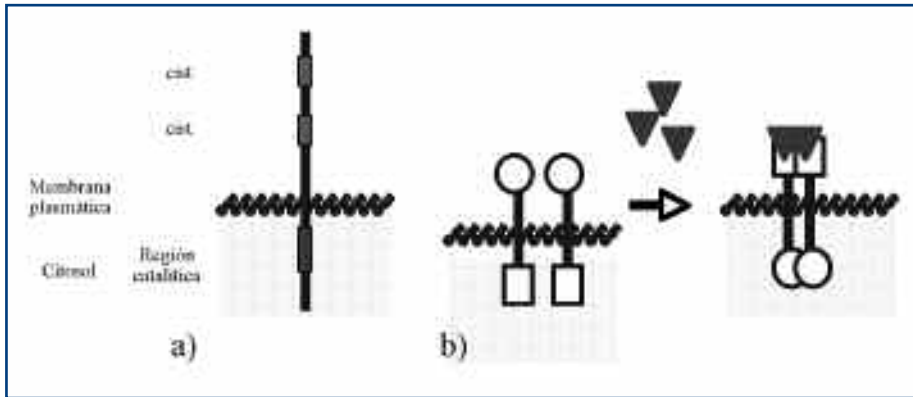
### RECEPTORES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Son proteínas transmembranales, con un ligando de unión situado fuera de la célula y un dominio intracitoplasmático formado por 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 varios sustratos que forman parte de la cascada de señalización. En su función anormal las versiones oncogénicas de estos receptores sufren dimerización y activación persistente sin necesidad de unirse al factor de crecimiento correspondiente; de esta forma el receptor alterado libera hacia la célula continuas señales que estimulan la mitosis. Dentro de este grupo se encuentran los receptores *erb B* y *ret*, de los que comentaremos brevemente sus características dada su importancia en Oncología.

### **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

**Figura 1.** a) Representación del receptor *erbB2*; posee dos regiones ricas en cisteína en el dominio extracelular. b) Modelo de dimerización y activación del receptor; activación del receptor por unión del ligando monomérico y originando un cambio conformacional tanto en la región extracelular como en la intracelular. El receptor se dimeriza por autofosforilación produciendo una cascada de señales



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 sustratos y que se encuentran unidos a la forma inactiva del dominio catalítico, citoplasmático<sup>5,6</sup> (Figura 1).

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 ellos se encuentran la inmunohistoquímica, la hibridación *in situ* con fluorescencia, la hibridación genómica comparada, la hibridación por Southern y la hibridación por dot-blot.

Como en otros receptores de superficie celular, la forma soluble del dominio extracelular de p185<sup>HER2/neu</sup>, 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.

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 o tratamiento hormonal.

### **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 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* 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 Neurothrophic 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 algunas neuronas motoras del periférico<sup>7,8,9</sup>.

## PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS TRANSMISORAS 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<sup>10</sup>.

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 lo 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<sup>11</sup>.

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<sup>12</sup>.

## ONCOPROTEÍNAS DE UNIÓN AL ADN

La replicación del ADN está regulada por una familia de 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 se han localizado oncoproteínas, productos de los oncogenes *myc*, *myb*, *jun* y *fos*, los cuales son genes de respuesta temprana a una estimulación por factores de transcripción. De ellos el gen *myc* es el que con mayor frecuencia está implicado en tumores humanos<sup>13</sup>.

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.

Se conoce que *myc* no sólo controla el crecimiento celular, también puede dirigir la muerte celular mediante la apoptosis. Por lo tanto, cuando la activación del gen se produce en ausencia de señales de supervivencia (factores de crecimiento) las células sufren apoptosis<sup>14</sup>.

El progreso llevado a cabo en los últimos 10 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 cáncer<sup>15</sup>. Los diferentes oncogenes distribuidos en los 4 subgrupos están recogidos en la Tabla 1.

## 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

**Tabla 1.** Clasificación de Oncogenes por localización nuclear y función

<b>GRUPO 1</b>	<b>FACTORES DE CRECIMIENTO</b>
<i>sis</i>	FCdP (factor de crecimiento derivado de las plaquetas)
<i>int-2</i>	FCF (factor de crecimiento de fibroblastos)
<i>hst</i>	FCF
<i>fgf-5</i>	FCF
<i>int-1</i>	Factor de crecimiento embrionario
<b>GRUPO 2</b>	<b>RECEPTORES</b>
<i>erb B</i>	rFCE (receptor del factor de crecimiento epidérmico con actividad quinasa de tirosinas)
<i>neu</i>	Proteína afín a receptor con actividad quinasa de tirosinas
<i>sea</i>	Proteína afín a receptor con actividad quinasa de tirosinas
<i>ret</i>	Proteína afín a receptor con actividad quinasa de tirosinas
<i>trk</i>	Receptor con actividad quinasa de tirosinas
<i>met</i>	Afín al rFCE con actividad quinasa de tirosinas
<i>ros</i>	Proteína afín a receptor, asociado a membrana y con actividad quinasa de tirosinas
<i>kit</i>	Receptor de células troncales con actividad quinasa de tirosinas
<i>mas</i>	Receptor en forma de serpentín de la angiotensina
<i>5HT1c</i>	Receptor en serpentín de la serotonina
<i>erb A</i>	Receptor nuclear de la hormona tiroidea
<b>GRUPO 3</b>	<b>PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS TRANSMISORAS DE SEÑALES</b>
<i>src</i>	Quinasa de tirosinas en el citoplasma
<i>yes</i>	Quinasa de tirosinas en el citoplasma
<i>fgr</i>	Quinasa de tirosinas en el citoplasma, asociado a membrana
<i>lck</i>	Quinasa de tirosinas en el citoplasma, asociado a membrana
<i>fyn</i>	Quinasa de tirosinas en células T
<i>abl</i>	Quinasa de tirosinas en el citoplasma
<i>fes</i>	Quinasa de tirosinas en el citoplasma
<i>N-ras, H-ras, K-ras</i>	Proteína G, con actividad GTPásica
<i>Raf</i>	Quinasa de serina/treonina en el citoplasma
<i>Quinasa C</i>	Quinasa de serina/treonina en el citoplasma
<i>Mos</i>	Quinasa de serina/treonina en el citoplasma
<i>pim</i>	Quinasa de serina/treonina en el citoplasma
<b>GRUPO 4</b>	<b>ONCOPROTEÍNAS DE UNIÓN AL ADN</b>
<i>erb A</i>	Receptor de la hormona tiroidea
<i>fos y jun</i>	Forman el factor AP1
<i>myc, L-myc, N-myc</i>	Unión a secuencias específicas del ADN
<i>ets-1</i>	Unión a secuencias específicas del ADN
<i>myb</i>	Unión a secuencias específicas del ADN
<i>rel</i>	Factor relacionado con NK-kB

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, más recientemente, 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 se presentaban con deleciones 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 ADN favorecen el desarrollo de tumores al secuestrar la proteína *p53* y evitar que ejerza su acción inhibidora del desarrollo tumoral. La proteína *p53* es una proteína nuclear que interviene en el control del ciclo celular, en la replicación del ADN 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 dé lugar a una proteína que inactive la del alelo normal, por lo que las alteraciones de estos genes son consideradas recesivas<sup>16</sup>.



Dentro de los genes supresores se encuentran el gen del retinoblastoma (*RB*), *p53*, genes reguladores de los complejos ciclinas-quinasas dependientes de ciclina (*p16* y familias relacionadas), el gen de la poliposis adenomatosa familiar (*APC*), el gen del síndrome de Von Hippel-Lindau (*VHL*), los genes de la neurofibromatosis tipo 1 y 2 (*NF1*, *NF2*) y el gen del tumor de Wilms (*WT-1*). Comentaremos brevemente las características del gen *Rb* y *p53*.

## EL GEN RB1

El gen RB1 está localizado en el cromosoma 13q14.2. Contiene 27 exones que ocupan 180 Kb<sup>17</sup>. Se transcribe en un RNA mensajero de 4,7 Kb. El gen contiene un total de 46 secuencias Alu<sup>18</sup>, así como varias secuencias repetitivas L1<sup>19</sup>. 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"<sup>20</sup>.

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<sup>21</sup>. 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 quinasa activa en fases G2/M y el factor que autoriza la replicación MCM7<sup>22</sup>. 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<sup>23</sup>.

## FUNCIONES DE RB

El gen *RB1* fue el primer gen supresor de tumores identificado y aislado por clonaje posicional a partir de retinoblastomas familiares<sup>24</sup>. 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<sup>25</sup>.

### **Regulación del ciclo celular**

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 acomplejadas con sus ciclinas correspondientes (CDKs)<sup>26</sup>.

### **Represión de la transcripción**

*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 ADN. La interacción de Rb con E2F bloquea la transcripción mediada por E2F y, de esta forma, la progresión del ciclo celular<sup>27</sup>.

Además, Rb es capaz de reprimir la transcripción por contacto directo con la maquinaria de transcripción basal, así como por su interacción con otros correpresores 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<sup>28</sup>. Las HDACs comprenden una familia de siete proteínas, de las cuales, 1, 2 y 3 interactúan con Rb. El complejo Rb – HDAC puede reprimir activamente la transcripción y regular la acetilación de histonas en el promotor de los genes diana<sup>29</sup>.

Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de la función de E2F por Rb no se produce sólo por la unión directa de las dos proteínas, sino que requiere el reclutamiento de HDACs por parte de Rb.

### **Apoptosis**

Las células deficientes en Rb muestran una sensibilidad incrementada a la apoptosis inducida por los agentes que dañan el ADN. Estos fármacos inducen apoptosis en células *Rb*<sup>-</sup> y parada del crecimiento en las células *Rb*<sup>+</sup>, de forma que se eliminan las células cancerosas, mientras se protegen las normales.

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 proapoptóticas<sup>30</sup>. 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 codificante<sup>31</sup>.

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 ADN, 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<sup>52</sup>:

### ***I. Región de transactivación 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  $\alpha$ -hélice anfipático de 15 aminoácidos de esta región de p53. Este dominio posee también una secuencia de exportación nuclear<sup>33</sup>.

### ***II. Región rica en poliprolina (residuos 61 a 94)***

Esta zona posee cinco repeticiones PXXP. Es importante para la actividad supresora de tumores de p53. En esta región se localiza un polimorfismo en el codón 72 que tiene importancia funcional.

### ***III. Núcleo central (residuos 97 a 300)***

Contiene un dominio específico de unión al ADN. 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.

### ***IV. Región de tetramerización (residuos 324 a 355)***

Esta zona está incluida en la región C-terminal. Interviene en la formación de la estructura tetramérica de p53, imprescindible para el correcto funcionamiento de la proteína.

### ***V. Región C-terminal (residuos 311 a 393)***

Contiene una secuencia de localización nuclear, así como de exportación nuclear, regulando la situación subcelular de p53. También posee una secuencia de unión inespecífica a RNA y ADN y actividades de anillamiento al ADN de hebra única. La región C-terminal también funciona como un dominio regulador negativo.

## **FUNCIÓN DE P53**

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 neoplásica<sup>34</sup>.

### **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 virus<sup>35</sup>.

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

- a) Respuesta a estrés genotóxico, como el daño en el ADN 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.
- b) 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 proliferación<sup>36</sup>.

No obstante, además de los residuos de serina y treonina N-terminales, otras zonas de p53 sufren modificaciones postraduccionales, incluyendo fosforilación, acetilación y sumoilación<sup>37</sup>. 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 libres.

### **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 $\alpha$ . 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 p21<sup>38</sup>.

### **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 ADN que contienen DexH<sup>39</sup>.

### **Reparación del ADN**

p53 está relacionada con varias rutas de reparación del ADN. 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 ADN polimerasa  $\beta$ . 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 elevadas<sup>40</sup>.

## RESUMEN

Se denominan protooncogenes todos aquellos genes cuyas formas alteradas o mutadas contribuyen al desarrollo del cáncer. El oncogén es la forma mutada del protooncogén. Los oncogenes se pueden dividir en cuatro grupos atendiendo a su función y localización nuclear:

Grupo 1: factores de crecimiento

Grupo 2: receptores

Grupo 3: proteínas citoplasmáticas transmisoras de señales

Grupo 4: oncoproteínas de unión al ADN

Los genes supresores transmiten continuamente señales de carácter negativo sobre la proliferación celular y su inactivación provoca divisiones descontroladas. Dentro de este grupo se encuentran los genes del retinoblastoma (*RB*), *p53*, genes reguladores de los complejos ciclinas-quinasas dependientes de ciclina (*p16* y familias relacionadas), el gen de la poliposis adenomatosa familiar (*APC*), el gen del síndrome de Von Hippel-Lindau (*VHL*), los genes de la neurofibromatosis tipo 1 y 2 (*NF1*, *NF2*) y el gen del tumor de Wilms (*WT-1*).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Varmus H, Weinberg RA. Genes and Biology of cancer. Scientific American Library (distributed by WH.freeman), New York, 1993
2. CooperGM. Oncogenes. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1995
3. Nicolini C. Molecular basis of human cancer. New York: Plenum Press, 1991
4. Silver BJ. Platelet-derived growth factor in human malignancy. Biofactors. 1992 Apr;3(4):217-27
5. Brennan PJ, Kumagai T, Berezov A, Murali R, Greene MI. HER2/neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. Oncogene. 2000 Dec 11;19(53):6093-101
6. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. Oncogene. 2000 Dec 11;19(53):6102-14
7. Enomoto H. Regulation of neural development by glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands. Anat Sci Int. 2005; 80(1):42-52
8. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. Nat Rev Cancer. 2005; 5(5): 367-75
9. Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M. RET and neuroendocrine tumors. Cancer Lett. 2004; 204(2): 197-211
10. Barbacid M. ras genes. Annu Rev Biochem. 1987; 56:779-827
11. Biol Chem. 2005 Mar;386(3):193-205. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. Giehl K

12. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):459-65
13. Popescu NC, Zimonjic DB. Chromosome-mediated alterations of the MYC gene in human cancer. *J Cell Mol Med*. 2002 Apr-Jun;6(2):151-9
14. Cui H, Li T, Ding HF. Linking of N-Myc to death receptor machinery in neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 2005 Mar 11;280(10):9474-81
15. Zhang Z, Li M, Rayburn ER, Hill DL, Zhang R, Wang H. Oncogenes as novel targets for cancer therapy (part I): growth factors and protein tyrosine kinases. *Am J Pharmacogenomics*. 2005;5(3):173-90
16. Hinds PW, Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*. 1994 Feb;4(1):135-41
17. Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B et al. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1992; 52: 6194-9
18. Britten RJ, Baron WF, Stout DB et al. Sources and evolution of human Alu repeated sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 4770-4
19. Skowronski J, Fanning TG, Singer MF. Unit-length line-1 transcripts in human teratocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 1385-97
20. Hiebert SW, Chellappan SP, Horowitz JM et al. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev* 1992; 6: 177-85
21. Chen PL, Riley DJ, Lee W-H. The retinoblastoma protein as a fundamental mediator of growth and differentiation signals. *Crit Rev Eukaryo Gene Exp* 1995; 5: 79-95
22. Sterner JM, Tao Y, Kennett SB et al. The amino terminus of the retinoblastoma (Rb) protein associates with a cyclin-dependent kinase-like kinase via Rb amino acids required for growth suppression. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 53-64
23. Dahiya A, Gavin MR, Luo RX et al. Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6799-805
24. Friend SH, Bernards R, Rogelj S et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323: 643-6
25. Ludlow JW, DeCaprio JA, Huang CM et al. SV40 large T antigen binds preferentially to an unphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* 1989; 56: 57-65
26. Harbour JW, Luo RX, Dei Sante A et al. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 1999; 98: 859-69
27. Adadne J, Shao Z, Robbins PD. The retinoblastoma susceptibility gene product represses transcription when directly bound to the promoter. *J Biol Chem* 1995; 270: 8837-43
28. Alland L, Muhle R, Hou H Jr et al. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 1997; 387: 49-55
29. Luo RX, Postigo AA, Dean DC. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 1998; 92: 463-73
30. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ et al. The INK4a tumor suppressor gene product, p16ARF, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998; 92: 713-23
31. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV 40- transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-3
32. El-Deiry WS, Kern SK, Pietenpol JA et al. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1992; 1: 45-8
33. Zhang Y, Xiong Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 2001; 292: 1910-5
34. 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

35. McGill G, Fisher DE. P53 and cancer therapy: a doubledged sword [comment]. *J Clin Invest* 1999; 104: 223-5
36. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 731-7
37. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2764-72
38. Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2784-91
39. Peter ME, Krammer PH. The cd95(apo-1/fas) disc and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10: 26-35
40. Zhou J, Ahn J, Wilson SH. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J* 2001; 20: 914-23





# GENES DE BAJA PENETRANCIA Y CÁNCER

■  
Ana Osorio Cabrero  
Grupo de Genética Humana  
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).  
Madrid

## **GENES DE BAJA PENETRANCIA. EL MODELO POLIGÉNICO**

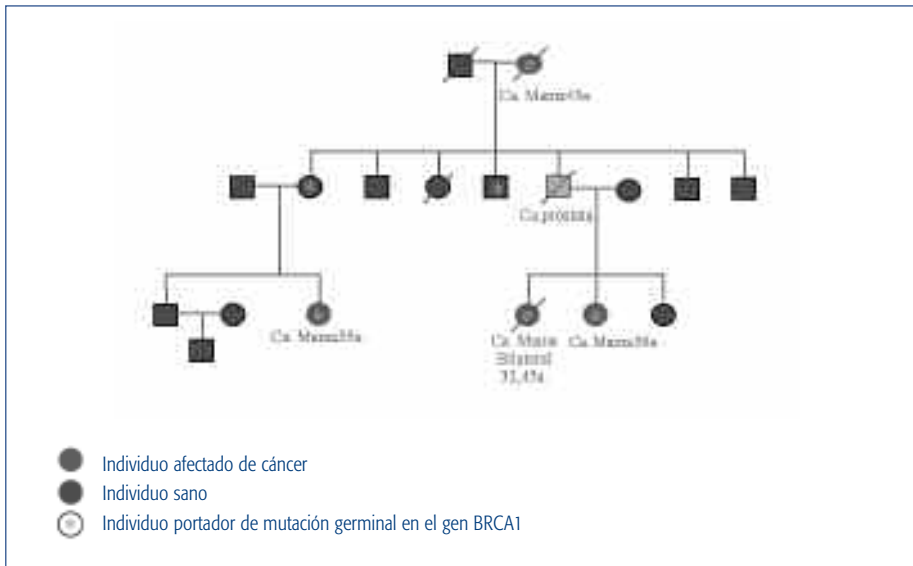
### LOS GENES DE BAJA PENETRANCIA COMO FACTORES DE SUSCEPTIBILIDAD EN EL CÁNCER ESPORÁDICO

Durante las dos últimas décadas, la investigación sobre los factores causantes de la susceptibilidad heredada a padecer cáncer, ha estado 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 de forma autosómica dominante. Ejemplos clásicos de genes de alta penetrancia son BRCA1 y BRCA2, implicados en el síndrome de cáncer de mama y ovario familiar<sup>1,2</sup>, el gen APC<sup>3</sup> implicado en el cáncer de colon polipósico familiar, MLH1 y MSH2<sup>4,5</sup> asociados al cáncer de colon no polipósico y muchos otros, ampliamente revisados en otros capítulos de esta publicación.

La frecuencia de estas mutaciones es muy baja en la población general (0,001 de media), pero cuando aparecen, el riesgo que confieren a padecer cáncer es muy alto, dando lugar a estos patrones de herencia mendeliana (Figura 1).

Sin embargo, estos que podemos considerar como claramente hereditarios, tan sólo representan el 1% de los casos de cáncer, que la mayor parte de las veces aparecen de forma

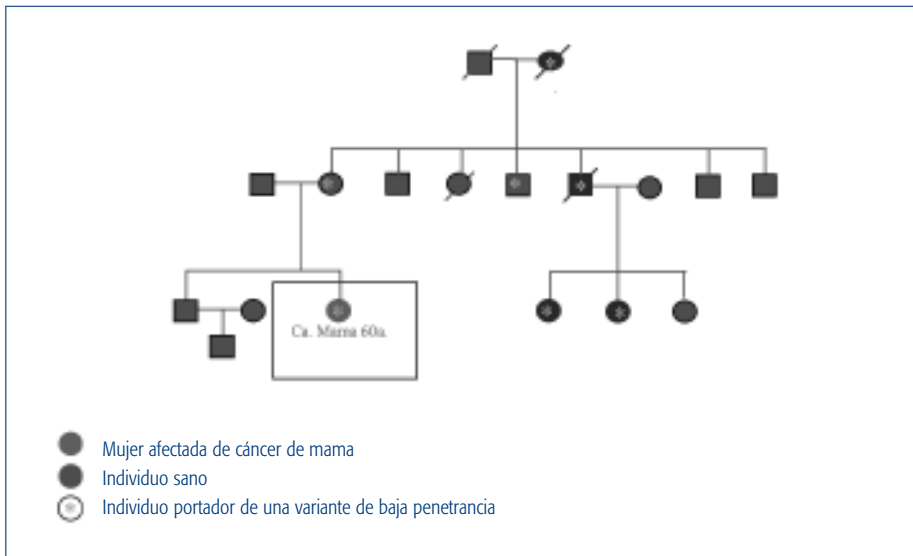
**Figura 1.** Familia portadora de mutación germinal en el gen BRCA1. Aunque la penetrancia de estas mutaciones no es completa, la presencia de las mismas es suficiente para que los individuos portadores presenten una susceptibilidad muy alta a desarrollar cáncer de mama y otros tumores relacionados, como cáncer de ovario o 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 edades tempranas o la presencia de bilateralidad en caso de que el cáncer afecte a órganos pares



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* y el riesgo que confieren a padecer la enfermedad es *bajo o moderado*. 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).

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. No se conoce apenas cuáles son estas variantes, ya que, como veremos más adelante, su identificación entraña numerosas dificultades. Tampoco se sabe si estas variantes, cuando aparecen en un mismo

**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

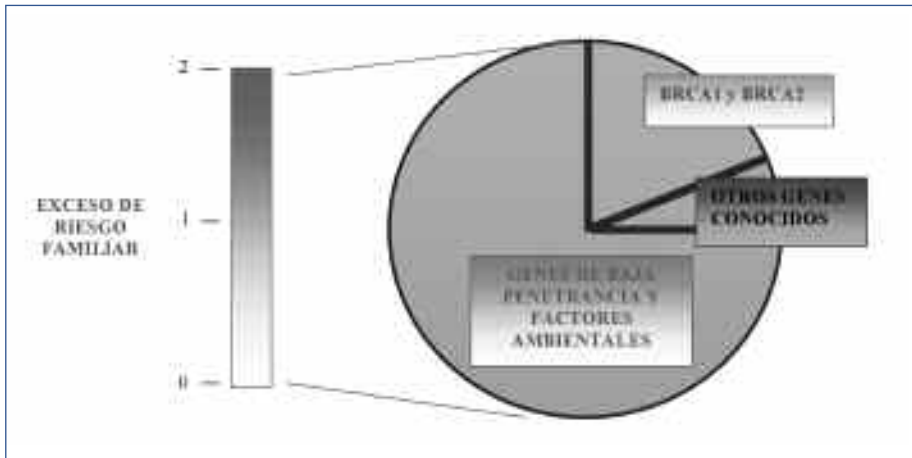


individuo, se combinan de forma aditiva o multiplicativa. Sin embargo, está bastante aceptado que constituyen la base hereditaria del cáncer esporádico. Es lo que se conoce como *modelo poligénico*.

### EL MODELO POLIGÉNICO EN LOS PATRONES DE AGREGACIÓN FAMILIAR

Todos los cánceres comunes muestran cierto grado de agregación familiar. Los parientes de primer grado de un individuo afectado de la enfermedad tienen entre dos y cuatro veces más riesgo de padecer cáncer que el de la población general<sup>6</sup>. Se ha observado que la tasa de cáncer es más alta en gemelos monocigóticos que en dicigóticos, lo cual indica que estas agregaciones son más el resultado de variaciones genéticas que de factores ambientales<sup>7</sup>. El modelo poligénico también daría explicación a estos casos de agregación, que no siguen un patrón de herencia mendeliana y por lo tanto no pueden ser explicados por mutaciones en genes de alta penetrancia.

**Figura 3.** Adaptada de<sup>8</sup>. El círculo representa todos aquellos casos de cáncer de mama que no son puramente esporádicos y presentan cierto grado de agregación familiar. Tan sólo entre un 15-20% del exceso de riesgo familiar que se observa es atribuible a mutaciones en BRCA1 y BRCA2, responsables de los casos claramente hereditarios. Existe también un riesgo incrementado entre los parientes de primer grado de una paciente con cáncer de mama, que es alrededor de dos veces el riesgo poblacional y que podría ser explicado por el modelo poligénico



## 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 hipotética 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 ADN 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 esteroideas 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.

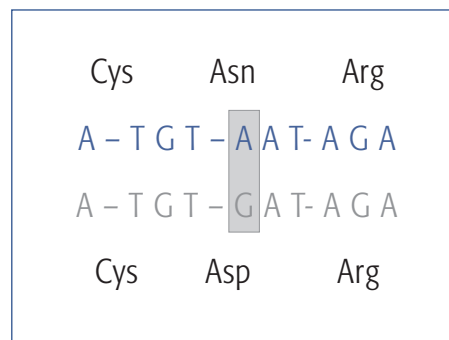
#### VARIANTES GENÉTICAS CANDIDATAS: SNPs

Los *SNPs* representan cambios de un solo nucleótido en la secuencia de ADN (Figura 4). 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 2.000 pares de bases. En los inicios de la secuenciación completa del genoma humano, se identificaron más de 1,4 millones de SNPs<sup>9</sup>. Actualmente están depositados en las bases de datos unos 6 millones de SNPs validados y se estima que este número podría llegar a los 15 millones. 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.

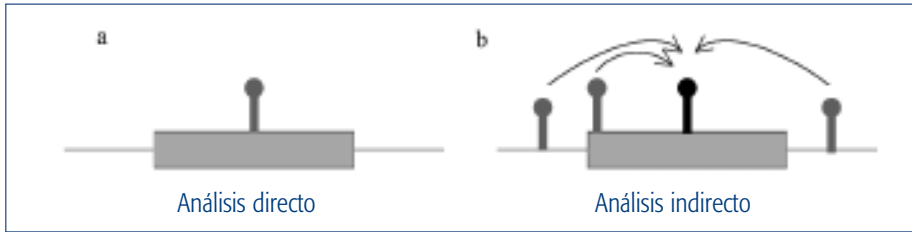
De especial interés son aquellos SNPs que se encuentran en la zona codificante (cSNPs) o reguladora (rSNPs) de los genes, ya que en estos casos, el cambio de nucleótido, pueden traducirse en un cambio de aminoácido en la proteína codificada o en una alteración en el nivel de expresión del gen respectivamente. 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, éstos 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

**Figura 4.** En azul se representa lo que sería una secuencia de nucleótidos que codifica para unos aminoácidos concretos. En gris, debajo, la misma secuencia, pero uno 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



**Figura 5.** Búsqueda de variantes de baja penetrancia por los métodos directo e indirecto. a) Se selecciona un solo SNP para el estudio (en gris), 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 gris), como marcadores genéticos sin repercusión funcional, pero que están cercanos a la variante causal (en negro), y nos darán información sobre la misma



**Tabla 1.** Tipos de SNPs, frecuencia en el genoma y riesgo potencial asociado (modificada de<sup>10</sup>)

Tipo de SNP (cambio de un solo nucleótido)	Localización	Efecto funcional	Frecuencia en el genoma	Riesgo relativo potencial asociado
Provoca cambio de aminoácido no sinónimo, no conservativo	Zona codificante (cSNP)	Cambio de un aminoácido a otro con propiedades diferentes	Baja	Moderado a muy alto
Provoca cambio de aminoácido no sinónimo, conservativo	Zona codificante (cSNP)	Cambio de un aminoácido a otro con iguales propiedades	Baja	Bajo a muy alto
No da lugar a cambio de aminoácido	Zona codificante (cSNP)	Puede alterar el procesamiento del RNA	Media	Bajo a Moderado
En zona promotora o reguladora de un gen (rSNP)	Promotor, 5'UTR, 3'UTR	Puede alterar la expresión del gen	Baja-media	Bajo a Alto
En la zona de unión exón-intrón	En el intrón a menos de 10 nucleótidos del exón	Puede alterar el procesamiento del RNA	Baja	Bajo a Alto
Intrónico	En el intrón	Desconocida pero podría afectar la expresión o estabilidad del RNA	Media	Muy bajo
En zona inter-génica	Zona no codificante entre genes	Desconocida pero podría afectar la expresión	Alta	Muy bajo

<sup>a</sup> secuencia de nucleótidos que no se traduce en aminoácidos

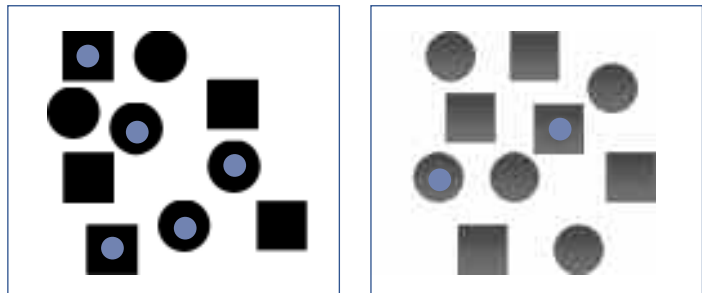
bien dentro, pero sin dar lugar a un cambio de aminoácido. Estos SNPs no tienen repercusión funcional, pero se pueden utilizar como marcadores para identificar la variante causal utilizando lo que llamamos "método indirecto". En la Figura 5 se representa un esquema de ambas estrategias, que se desarrollarán con más detalle en apartados posteriores dentro del capítulo.

## MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DE BAJA PENETRANCIA: LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN

Durante años la principal estrategia utilizada para identificar genes de susceptibilidad al cáncer ha sido el análisis de ligamiento basado en familias. Aunque esta aproximación ha tenido gran éxito en la identificación de genes de alta penetrancia como BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, etc. no es adecuada para la identificación de los genes de baja penetrancia, ya que éstos no dan lugar a un patrón de herencia mendeliano.

La alternativa principal al análisis de ligamiento para la identificación de estos genes es el *estudio de asociación*, en el que se compara la frecuencia de una variante genética en un grupo de 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 <sup>16</sup>. Los círculos y cuadrados negros representan un grupo de casos y los grises un grupo de controles pareados con los casos por sexo y edad. El círculo azul 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

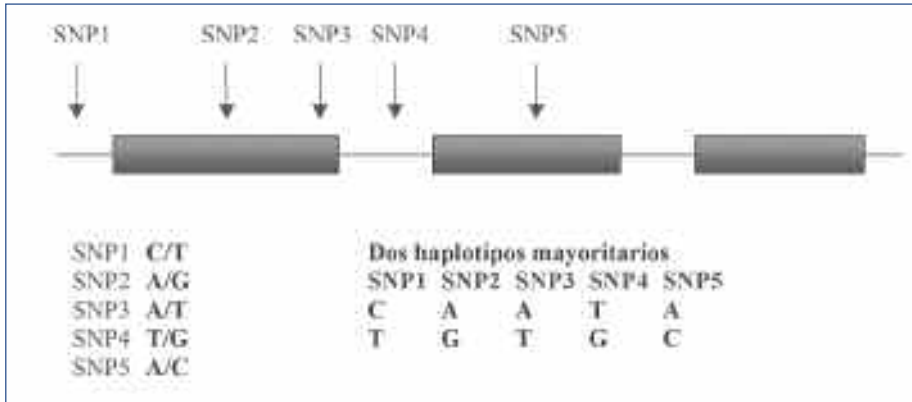
La mayoría de los estudios de asociación que se han realizado hasta el momento están basados en el análisis de *genes candidatos*, *potencialmente implicados en los procesos de carcinogénesis*. Esta aproximación es la ideal, ya que maximizando la verosimilitud biológica, las posibilidades de éxito son mayores. Sin embargo, este tipo de análisis depende del conocimiento que se tenga en el momento del estudio de la funcionalidad de los genes y este conocimiento es limitado.

Además de elegir el gen candidato, hay también que determinar 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, o b) analizar una serie de polimorfismos marcadores que cubran toda la secuencia del gen candidato (Figura 3).

- a) Esta 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. Por otra parte, si se analizaba solamente un polimorfismo, éste ya debía tener una repercusión funcional potencial, ya que se estaba apostando por él como variante causal dentro del gen.
- b) 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 la adecuada para el estudio de 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* 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. Esto significa que de todas las combinaciones posibles (haplotipos), siempre se presentan en dos combinaciones mayoritarias. Una vez establecidos estos haplotipos mayoritarios, 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.

#### ¿CUÁNTOS ALELOS DE RIESGO HAN SIDO IDENTIFICADOS?

Independientemente de la estrategia utilizada, es un hecho que de todos los estudios de asociación realizados hasta el momento, son muy pocos los que han dado resultados concluyentes, como se puede ver en algunas revisiones publicadas sobre identificación de genes de baja penetrancia en cáncer de mama<sup>11</sup> o cáncer de colon<sup>6</sup>. Pondremos el ejemplo del cáncer de mama: en el meta análisis realizado por Dunning, de 46 estudios de asociación analizando 18 genes candidatos, tan solo 12 asociaciones dieron un resultado estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) y ninguno de estos resultados pudo ser replicado en un estudio independiente posterior<sup>11</sup>.

#### LIMITACIONES PRINCIPALES DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN

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 <sup>12</sup>:

- a) 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 <sup>10</sup>, 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.
- b) 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 cuanto a sexo y edad y, por supuesto, pertenecer a la misma población.

#### UN EJEMPLO DE DISEÑO DE ESTUDIO DE ASOCIACIÓN: EL GEN CYP19

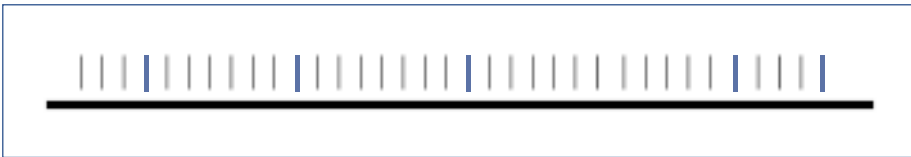
Como ya hemos desarrollado en los puntos anteriores, existen pocos ejemplos en la literatura de un diseño de estudio de asociación que se pueda considerar “ideal”. Uno de ellos sería el análisis de gen CYP19 como gen candidato de susceptibilidad al cáncer de mama, publicado por Haiman y colaboradores <sup>13</sup>. En este trabajo podemos ver cómo se han ido siguiendo los pasos que hemos definido como “correctos” a la hora de realizar un estudio de asociación.

En primer lugar, el gen CYP19, codifica para la enzima P450 aromatasas, que cataliza el paso final de la síntesis de estrógenos. Es de sobra conocido que en mujeres post-menopáusicas, el aumento del nivel de estrógenos se asocia con un incremento en el riesgo para cáncer de mama <sup>14</sup>. Existen múltiples evidencias de la relación entre la aromatasas y la patogénesis del cáncer de mama, entre ellas los altos niveles de expresión de la enzima observados en tumores de mama y tejido adyacente en comparación con el tejido mamario normal <sup>15</sup>. Estudios recientes sugieren que los inhibidores de la aromatasas, como el letrozol y el anastrozol, pueden ser iguales o más efectivos que los moduladores del receptor de estrógenos como el tamoxifeno a la hora de retardar la

progresión tumoral y como tratamiento de primera línea en mujeres con tumores de mama positivos para receptores hormonales<sup>16;17</sup>. Por lo tanto, hay evidencias más que suficientes para considerar al *gen CYP19* en un buen candidato como gen de susceptibilidad.

En segundo lugar, una vez elegido el gen candidato, se identificaron todos los SNPs presentes en el mismo, secuenciando la región de ADN donde se encuentra CYP19 (cromosoma 15q21.1), en 70 individuos de distintos grupos étnicos. De los 74 SNPs encontrados, se analizó cuáles de ellos se encontraban en desequilibrio de ligamiento, reduciendo el número a 25 que permitían definir las combinaciones de SNPs (haplotipos) más comunes en todas las poblaciones (Figura 8).

**Figura 8.** Ejemplo de un gen (línea negra horizontal) en el que se han identificado todos los SNPs más comunes en la población general (líneas verticales). Muchos de estos se encuentran en desequilibrio de ligamiento, de manera que con unos cuantos (líneas azules), obtenemos información sobre todos los demás. En este caso genérico, las distintas combinaciones de estos 5 SNPs (haplotipos), observadas en cada individuo analizado nos darían información sobre la totalidad del gen



El tercer paso sería la selección de la población de estudio que en este caso consistió en 1.355 casos de cáncer de mama y 2.580 controles. Se trata de una población moderadamente grande pero suficiente para diseñar un estudio de asociación de este tipo. En cada uno de estos individuos se analizaron los 25 SNPs comparándose la distribución de los mismos entre el grupo de casos y el grupo de controles. En este caso, la técnica elegida para genotipar los SNPs fue Taqman. Para revisar los distintos métodos de genotipaje de SNPs ver la publicación de Hirschhorn y Daly<sup>16</sup>.

Finalmente, tras el análisis estadístico, se encontraron evidencias de que alguna de estas combinaciones de SNPs o haplotipos era más frecuente en los casos que en los controles, siendo la diferencia estadísticamente significativa. En concreto uno de los haplotipos se asoció con un incremento de OR: 1,3 en el riesgo, lo que supone un ligero aumento con respecto al riesgo poblacional para las mujeres que porten esa combinación de SNPs. La lectura de este resultado, sería que el gen CYP19 puede ser un gen de baja susceptibilidad al cáncer de mama, aunque no se haya identificado exactamente cuál es la variante causal concreta de la susceptibilidad.

En cualquier caso, a pesar de estar ante un ejemplo de lo que puede ser un estudio de asociación idealmente diseñado, el resultado nunca se considera válido hasta que no es confirmado en un análisis independiente. El último paso sería determinar la variante causal dentro del gen de susceptibilidad mediante estudios funcionales y considerarla definitivamente como la variante de baja penetrancia.

### CÓMO FACILITAR LA BÚSQUEDA DE GENES DE BAJA PENETRANCIA

A la vista de todo lo expuesto en este capítulo, la búsqueda de genes de baja penetrancia implicados en cáncer puede parecer una tarea prácticamente imposible. Sin embargo, de todo lo aprendido en los últimos años, recientemente se han propuesto algunas ideas que pueden facilitar mucho este tipo de estudios y, sobre todo, hacer que sean más efectivos:

*Mejorar la elección del gen candidato:* utilizando modelos animales o ensayos funcionales, que confirmen, antes de comenzar el estudio de asociación, que el gen elegido es realmente relevante para el tipo de cáncer estudiado.

*Hacer uso de las bases de datos de SNPs disponibles:* para evitar el paso de tener que “re-secuenciar” un gen en busca de los polimorfismos que lo definan. Muchos SNPs, han sido ya identificados, validados y depositados en bases de datos públicas como las del NCBI o ENSEMBL. De gran utilidad es el proyecto Hap Map Internacional, en el que se pretende identificar la variabilidad genética, así como los bloques de desequilibrio de ligamiento existentes, en varias poblaciones procedentes de Europa, Asia y África. Aún no está claro hasta qué punto se puede perder información, extrapolando lo descrito en las bases de datos a un gen concreto en una población concreta, pero la posibilidad de utilizarlas parece bastante esperanzadora.

*Utilizar una muestra de casos en los que la susceptibilidad genética sea mayor:* se puede reducir el número de casos necesarios para llegar a obtener resultados estadísticamente significativos si se seleccionan aquellos que no son totalmente esporádicos, si no que presentan algún tipo de agregación<sup>18</sup>. Este método se basa en la idea de que utilizando pacientes que al menos tengan un pariente de primer grado afectado de la misma enfermedad, de alguna forma se está “enriqueciendo” la muestra en factores genéticos que provoquen susceptibilidad a padecer la misma. De este modo, se reduciría el número de casos necesarios para identificar dichos factores. Para más detalles, consultar el trabajo publicado por Antoniou y colaboradores<sup>18</sup>.

Otra forma de facilitar la identificación es seleccionar poblaciones más homogéneas, como por ejemplo, en el caso de cáncer de mama, pacientes afectadas antes de los 40 años o con un tipo histológico concreto del tumor.

## ¿BÚSQUEDA GLOBAL EN TODO EL GENOMA?

En principio, existiría la posibilidad futura de evitar las limitaciones de los estudios de asociación basados en el gen candidato, usando un método empírico, en el que se realizarían búsquedas de SNPs a gran escala en todo el genoma sin necesidad de conocer *a priori* la función de ningún gen<sup>19</sup>.

Esto, que se considera una aproximación prometedora, está aún lejos de ser posible a corto plazo, ya que no existe todavía un mapa de SNPs de alta densidad que cubra todo el genoma. Otra limitación sería el excesivo coste de estos análisis a gran escala.

## INTERACCIONES ENTRE GENES Y MEDIO AMBIENTE

Aunque este capítulo está enfocado a revisar la base genética del cáncer esporádico o de agregación familiar, no podemos dejar de mencionar la importancia de los factores ambientales en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad<sup>20</sup>. De hecho, como ya apuntamos al principio del capítulo, muchos de estos genes de baja susceptibilidad, solamente manifiestan su efecto en combinación con otros factores genéticos o ambientales.

Un ejemplo de interacción genes-medio ambiente sería la variante C677T en el gen MTHFR (metilentetrafolato-reductasa). El metabolismo del folato está implicado en los procesos de metilación del ADN y síntesis de nucleótidos y, por lo tanto, se piensa que puede tener un papel importante en los procesos de carcinogénesis. En un trabajo reciente<sup>21</sup>, se describe cómo la variante C677T, se asocia con una disminución del nivel de metilación global, que daría lugar a inestabilidad genética y aumento del riesgo de cáncer, pero solamente en aquellos individuos con niveles bajos de folato circulante y alta ingesta de alcohol.

La necesidad de establecer cómo los distintos genes de baja penetrancia se combinan entre sí y con factores ambientales para definir “perfiles de riesgo” en la población, complica aún más el panorama, pero es la meta a la que hay que tender para conseguir que estos estudios sean realmente útiles.

El objetivo final de estos estudios sería poder definir subgrupos de la población general, que por su perfil genético se consideraran más susceptibles a padecer cáncer y ofrecerles campañas de cribado o medidas preventivas específicas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, et al. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250, 1684-9
2. Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., et al. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265, 2088-90
3. Bodmer, W. F., Bailey, C. J., Bodmer, J., Bussey, H. J., Ellis, A., Gorman, P., et al. (1987). Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328, 614-6
4. 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
5. Peltomaki, P., Aaltonen, L. A., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., et al. (1993). Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260, 810-2
6. Houlston, R. S. & Tomlinson, A. P. M. (2001). Polymorphisms and colorectal tumor risk. *Gastroenterology* 121, 282-301
7. Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., et al. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 343, 78-85
8. Ponder, B. A. (2001). Cancer genetics. *Nature* 411, 336-41
9. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921
10. Tabor, H. K., Risch, N. J. & Myers, R. M. (2002). Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics* 3, 391-A396
11. Dunning, A. M., Healey, C. S., Pharoah, P. D. P., Teare, M. D., Ponder, B. A. J. & Easton, D. F. (1999). A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 8, 843-54
12. 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, 850-60
13. Haiman, C. A., Stram, D. O., Pike, M. C., Kolonel, L. N., Burt, N. P., Altshuler, et al. (2003). A comprehensive haplotype analysis of CYP19 and breast cancer risk: the Multiethnic Cohort. *Human Molecular Genetics* 12, 2679-92
14. Thomas, H. V., Reeves, G. K. & Key, T. J. A. (1997). Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer a quantitative review. *Cancer Causes & Control* 8, 922-8
15. Utsumi, T., Harada, N., Maruta, M. & Takagi, Y. (1996). Presence of alternatively spliced transcripts of aromatase gene in human breast cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81, 2344-9
16. Nabholz, J. M., Buzdar, A., Pollak, M., Harwin, W., Burton, G., Mangalik, A., et al. (2000). Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: Results of a North American multicenter randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* 18, 3758-67
17. Bonnetterre, J., Thurlimann, B., Robertson, J. F. R., Krzakowski, M., Mauriac, L., Koralewski, P., et al. (2000). Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: Results of the tamoxifen or arimidex randomized group efficacy and tolerability study. *Journal of Clinical Oncology* 18, 3748-57
18. Antoniou, A. C. & Easton, D. F. (2003). Polygenic inheritance of breast cancer: Implications for design of association studies. *Genet Epidemiol* 25, 190-202
19. Hirschhorn, J. N. & Daly, M. J. (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6, 95-108
20. Hunter, D. J. (2005). Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 6, 287-98

21. Heijmans, B. T., Boer, J. M., Suchiman, H. E., Cornelisse, C. J., Westendorp, R. G., Kromhout, D., et al. (2003). A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Res* 63, 1249-53

## BASES DE DATOS

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://www.hapmap.org>







# DETECCIÓN DE SÍNDROMES HEREDITARIOS

## ¿ANTE QUÉ SÍNDROME NOS ENCONTRAMOS?



Miguel Urioste Azcorra  
Unidad de Cáncer Familiar  
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 o 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 cáncer 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 patológicamente 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<sup>1</sup>.

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<sup>2</sup>. 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<sup>3</sup>. 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<sup>4</sup>.

## 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<sup>5</sup>). 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 lo 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<sup>5</sup>.

## HERENCIA AUTOSÓMICA DOMINANTE

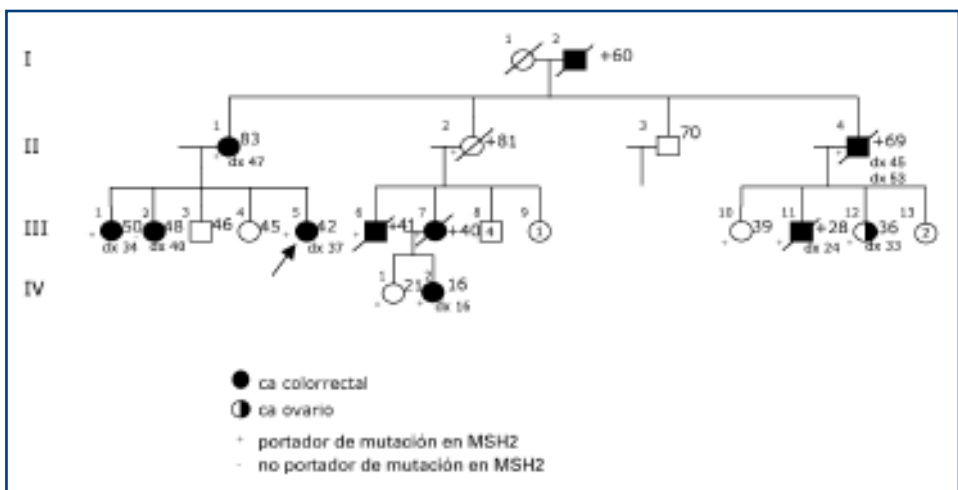
El gen responsable del rasgo o enfermedad se localiza en un autosoma, los cromosomas numerados del 1 al 22, y el fenotipo que se asocia a ese gen se manifiesta independientemente del estado del otro alelo, se manifiesta tanto en heterocigosis como en homocigosis (se dice que

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.

En la Figura 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

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



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 la Figura 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 lo tanto, no va a transmitir la enfermedad.

En la Figura 1 podemos también observar cómo 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 sólo 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. 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 la Figura 1, la mujer II-2 que falleció con 81 años, era portadora asintomática

**Tabla 1.** Síndromes más comunes de predisposición al cáncer

NOMBRE DEL SÍNDROME	GENES RESPONSABLES	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	NÚMERO OMIM	MODELO DE HERENCIA			OTRAS DENOMINACIONES ABREVIATURAS	RIESGO CÁNCER
				DE	PENETRANCIA	INCIDENCIA		
Anemia de Fanconi <sup>25 *</sup>	FANCA FANCB FANCC FANCD1 FANCD2 FANCE FANCF FANCG FANCL	16q24.3 Xp22.31 9q22.3 13q12.3 3p25.3 6p22-p21 11p15 9p13 2p16.1	227650	AR	100% en hh	1/360000	Panцитopenia de Fanconi. FAN	50%
Ataxia-telangiectasia <sup>9</sup>	ATM	11q22.3	208900	AR	100% en hh	1/30000-1/100000	Síndrome de Louis-Barr. AT	30-40%
Beckwith-Wiedemann, síndrome de <sup>20</sup>	KIP2	11p15.5	130650	AD	Incompleta	1/14000	Síndrome EMG. SBW	8-20%
Birt-Hogg-Dubé, síndrome de <sup>26</sup>	BHD	17p11.2	135150	AD	Desconocida, reducida	Raro	BHD	Desc.
Bloom, síndrome de <sup>27</sup>	RECQL3	15q26.1	210900	AR	100%	Raro	BLM	20%
Cáncer de mama y ovario hereditarios <sup>17</sup>	BRCA1 BRCA2	17q21 13q12.3	114480	AD	80%	1/500-1/2500	CMOH	80%
Carcinoma gástrico difuso hereditario <sup>28</sup>	CDH1	16q22.1	137215	AD	90%	Raro	CGD	-
Carcinoma renal papilar hereditario <sup>29</sup>	MET	7q31	164860	AD	Desconocida, reducida	Raro	CRPH	-
Complejo de Carney <sup>30</sup>	PRKRA1A	17q23-q24	160980	AD	Desconocida, reducida	Raro	Síndrome NAME; síndrome LAMB; Enfermedad adrenocortical nodular; Mixoma-Displasia adrenocortical CC	Desc.
Esclerosis Tuberosa <sup>31</sup>	TSC1 TSC2	9q34 16p13.3	191100	AD	95-100%	1/30.000	Enfermedad de Bourneville; Epiloya. ET	Desc.
Gorlin, síndrome de <sup>32 ***</sup>	PTCH	9q22.3	109400	AD	90-97%	1/57000	Síndrome de nevus basocelular; Síndrome de Gorlin; Síndrome de Gorlin-Goltz; Quinta facomatosis. SG	90%

**Tabla 1 (cont.).** Síndromes más comunes de predisposición al cáncer

NOMBRE DEL SÍNDROME	GENES RESPONSABLES	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	NÚMERO OMIM	MODELO DE HERENCIA			OTRAS DENOMINACIONES ABREVIATURAS	RIESGO CÁNCER
				HERENCIA	PENETRANCIA	INCIDENCIA		
Hiperparatiroidismo <sup>33</sup>	HRPT2	1q25-q31	145001	AD	90%	Raro	Hiperparatiroidismo y tumores de mandíbula. HPT	-
Leiomiomatosis uterina y cáncer renal hereditarios <sup>34</sup>	FH	1q42.1	605839	AD	Desconocida	Raro	LCR	-
Li-Fraumeni, síndrome de <sup>35</sup>	TP53	17p13.1	151623	AD	90-95%	Raro	SLF	90%
Lynch, síndrome de <sup>8</sup>	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	75%
Melanoma maligno familiar <sup>36,37</sup>	CDKN2A CDK4	9p21 12q14	155601	AD	30% a los 50 años	1/10000	Síndrome del nevus displásico. MMF	90%
Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1 <sup>38,39</sup>	MEN1	11q13	131100	AD	100% a los 60 años	2-10/100000	Síndrome de Wermer; Síndrome de Zollinger-Ellison. MEN1	10-30%
Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 <sup>39</sup>	RET	10q11.2	171400	AD	70-100%	1/25000	Carcinoma medular de tiroides familiar; Síndrome de Simple. MEN2	70% a los 70 años
Neurofibromatosis tipo 1 <sup>40,41</sup>	NF1	17q11.2	162200	AD	100%	1/3500	Enfermedad de von Recklinghausen. NF1	2-5%
Neurofibromatosis tipo 2 <sup>42</sup>	NF2	22q12.2	101000	AD	100% a los 60 años	1/40000	NF2	Desc.
Nijmegen, síndrome de <sup>19</sup>	NBS1	8q21	251260	AR	100%	Raro	Síndrome de roturas de Nijmegen; Síndrome de Seemanova; Variante 1 de Ataxia Telangiectasia; Síndrome de roturas de Berlín. SN	-
Paraganglioma familiar <sup>43</sup>	SDHB SDHC SDHD	1p36.1-p35 1q21 11q23	168000	AD	Desconocida	Raro	PF	-



**Tabla 1 (cont.).** Síndromes más comunes de predisposición al cáncer

NOMBRE DEL SÍNDROME	GENES RESPONSABLES	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	NÚMERO OMIM	MODELO DE HERENCIA	PENETRANCIA	INCIDENCIA	OTRAS DENOMINACIONES ABREVIATURAS	RIESGO CÁNCER
Peutz-Jeghers, síndrome de <sup>44</sup>	STK11	19p13.3	175200	AD	95-100%	1/120000	Síndrome de pólipos y manchas. SPJ	50%
PTEN-hamartomas, síndrome de <sup>6,45</sup>	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-craneo-cutánea; Síndrome de Proteus (SP)	SC 50%
Poliposis Adenomatosa Familiar ** <sup>46</sup>	APC	5q21-q22	175100	AD	100%	1/6000- 1/13000	Síndrome de Gardner. PAF	100%
Poliposis asociada a MYH <sup>47</sup>	MYH	1p34.3-p32.1	604933	AR	Desconocida	Raro	MYH	-
Poliposis juvenil <sup>48</sup>	SMAD4 BMPR1A	18q21.1 10q22.3	174900	AD	90-100%	1/100000	PJ	30%
Retinoblastoma hereditario <sup>49</sup>	RB1	13q14.1	180200	AD	90%	1/13500- 1/25000	RB	90%
Rothmund-Thomson, síndrome de <sup>49</sup>	RECQL4	8q24.3	268400	AR	100%	Raro	SRT	Desc.
Simpson-Colabi-Behmel, síndrome de <sup>50</sup>	GPC3 SGBS2	Xq26 Xp22	312870	LX-R	Desconocida	Raro	Síndrome del « bulldog ». SGB	-
Síndrome linfoproliferativo autoinmune <sup>51</sup>	FAS FASL CASP10 CASP8	10q24.1 1q25 2q33-q34 2q33-q34	601859	AD	100%	Raro	Síndrome de Canale-Smith. ALPS	Desc.
Síndrome linfoproliferativo ligado al X <sup>52</sup>	SH2	Xq25	308240	LX-R	Desconocida	Raro	Enfermedad de Duncan; Síndrome de Purtilo; Susceptibilidad familiar a la infección por virus Epstein-Barr. SLPLX	-

**Tabla 1 (cont.).** Síndromes más comunes de predisposición al cáncer

NOMBRE DEL SÍNDROME	GENES RESPONSABLES	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	NÚMERO OMIM	MODELO DE HERENCIA			OTRAS DENOMINACIONES ABREVIATURAS	RIESGO CÁNCER
				MODELO DE HERENCIA	PENETRANCIA	INCIDENCIA		
Sotos, síndrome de <sup>53</sup>	NSD1	5q35	117550	esporádico	100%	Raro	Gigantismo cerebral. SS	-
Tumor estromal gastrointestinal familiar <sup>54</sup>	KIT	4p12	606764	AD	Desconocida	Raro	GIST	-
Tumor de Wilms familiar**** <sup>55, 56</sup>	WT1	11p13	194070	AD	100%	1/10000	Nefroblastoma familiar. TWF	100%
Turcot, síndrome de <sup>57</sup>	APC MSH2 MLH1	5q21-q22 2p22-p21 3p21.3	276300	AD	80-100%	Raro	ST	80-100%
von Hippel-Lindau, síndrome de <sup>58</sup>	VHL	3p26-p25	193300	AD	90-95%	1/36000- 1/45500	VHL	45%
Werner, síndrome de <sup>19</sup>	RECQL2	8p12-p11.2	277700	AR	100%	1/50000- 1/1000000	Progeria del adulto. SW	10%
Xeroderma pigmentosum <sup>59</sup>	XPA XPC ERCC2 ERCC3 ERCC4 ERCC5 DDB2	9q22.3 3p25 19q13.2-q13.3 2q21 16p13.3-p13.13 13q33 11p12-p11	278700 278720 126340 133510 133520 133530 278740	AR AR AD AD AD AD AR	100%	1/250000- 1/1000000	XP	90%

AD: autosómico dominante. AR: autosómico recesivo. LX-R: ligado al X recesivo. hh: homocigotos. Desc.: desconocido

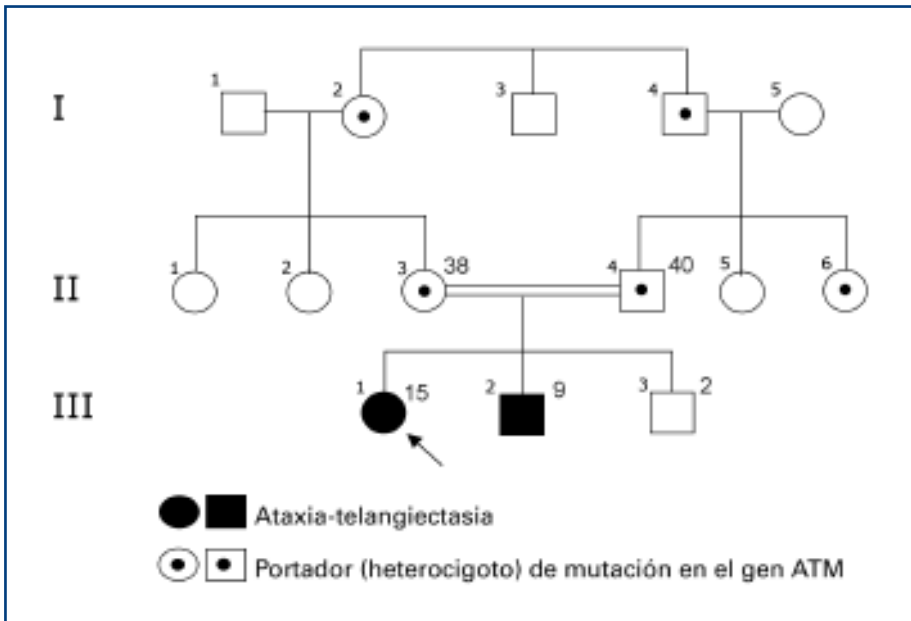
\* Mutaciones bialélicas en BRCA2 producen el fenotipo clásico de la Anemia de Fanconi<sup>60</sup>. \*\*Otras formas de susceptibilidad a cáncer colorrectal se han asociado a mutaciones en el gen AXIN2 (OMIM#604025)<sup>61</sup>. \*\*\* Mutaciones germinales que predisponen a la aparición de meduloblastoma se han descrito en el gen SUFU (OMIM#607035)<sup>62</sup>. \*\*\*\* Mutaciones bialélicas en BRCA2 se han descrito en tumor de Wilms familiar<sup>63</sup>

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 la Figura 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 de la Figura 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<sup>7</sup>, 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*:

**Figura 2.** Familia con Ataxia-telangiectasia (OMIM#208900), ejemplo de herencia autosómica recesiva



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<sup>8</sup>.

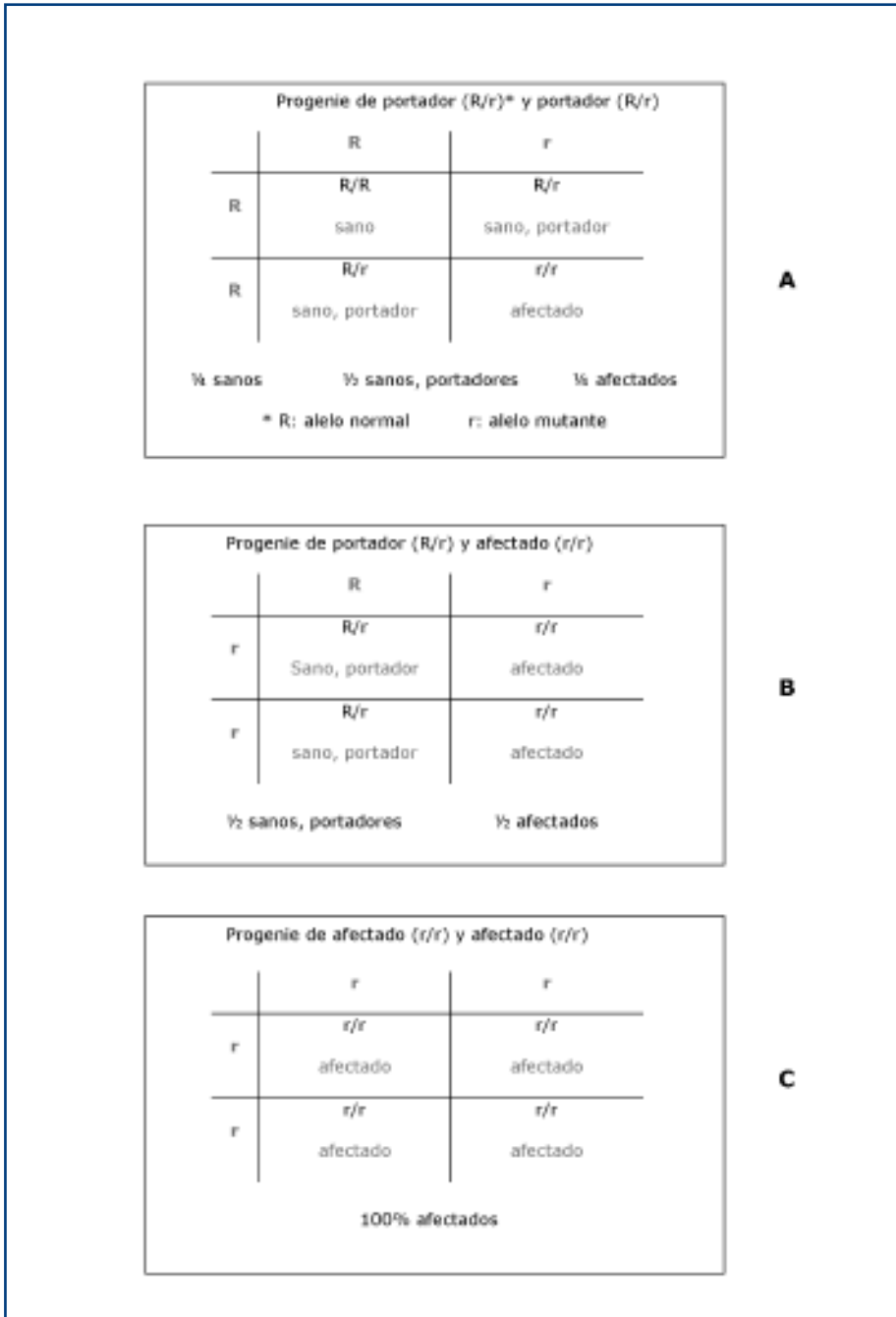
En resumen, es conveniente que la persona que deba valorar familias con posible cáncer hereditario esté familiarizada con conceptos como penetrancia, expresividad variable, fenocopias, o heterogeneidad genética, ya que son factores que si no se tienen presente pueden conducir a graves errores. Además, 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 la Figura 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 la Figura 3. La situación más común es cuando ambos padres son portadores de un alelo recesivo (situación A en la Figura 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 uno de los padres es afectado (homocigoto) y el otro

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



portador (heterocigoto), o la C en la que ambos padres son afectados. En las dos situaciones los riesgos son claramente diferentes.

Por definición, los trastornos recesivos sólo se manifiestan en situación de homocigosis, cuando las dos copias del gen son anómalas. En la Figura 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 la Figura 2 observamos cómo 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%<sup>9</sup>, por lo 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<sup>9</sup>. 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 de ATM podrían mostrar una especial sensibilidad<sup>10</sup>.

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.

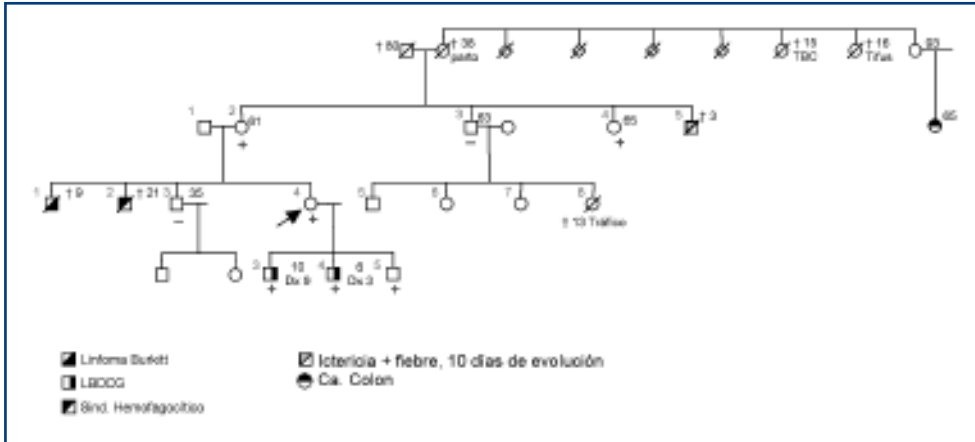
## HERENCIA LIGADA AL SEXO

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<sup>11</sup>. En el catálogo OMIM de Victor McKusick<sup>12</sup>, 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.

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 la Figura 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.

La distribución de los casos en el árbol en la Figura 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 X<sup>5</sup>. Sin embargo, por lo general, las heterocigotas para una patología ligada al X recesiva no manifiestan signos de la enfermedad.

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



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 hemicigotos 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



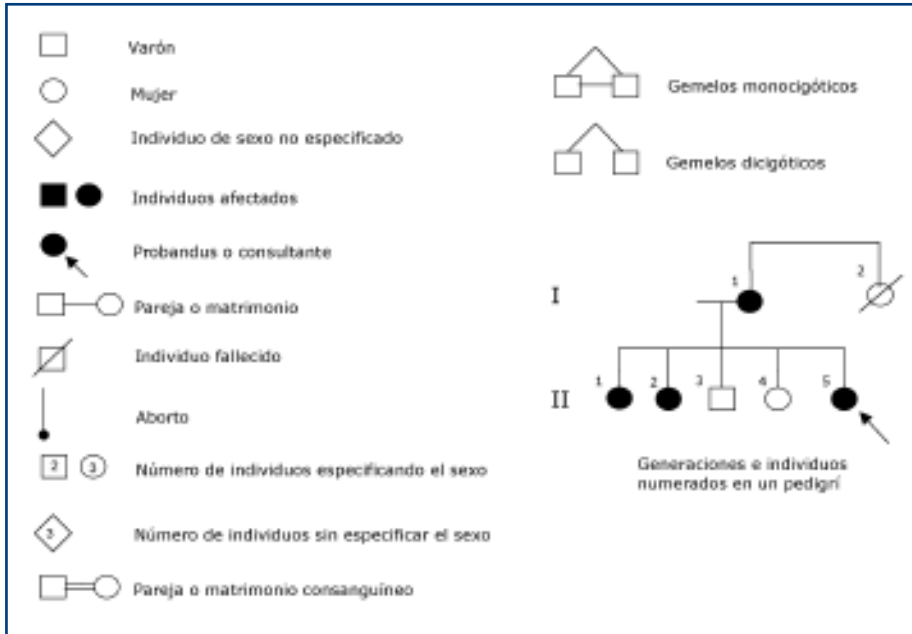
herencia es muy útil el dibujo del árbol familiar o pedigrí de la familia. Éste consiste en la representación gráfica de las relaciones y de las características que nos interesan de los distintos miembros de la familia. Para la elaboración del árbol familiar se utilizan una serie de símbolos estandarizados; algunos de los más habituales se recogen en la Figura 5. Una relación más detallada de la simbología utilizada en la construcción de pedigrís humanos puede encontrarse en Bennett y cols<sup>13</sup>.

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 pedigrí 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 pedigrí 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

**Figura 5.** Algunos de los símbolos más frecuentemente utilizados en la construcción del árbol familiar



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.

## 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<sup>7</sup>. 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 del libro de K. Schneider<sup>14</sup>).

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<sup>15</sup>. También en nuestro país, la media de aparición del cáncer de mama es de 57-58 años<sup>16</sup>. 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<sup>17</sup>.
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<sup>18</sup>.
  
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<sup>19</sup>. Por su parte, el síndrome de Beckwith-Wiedemann se caracteriza por sobrecrecimiento, occipucio prominente, macroglosia, cardiomegalia, hiperplasia pancreática, nefromegalia, edad ósea acelerada, onfalocelo, 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<sup>20</sup>. 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

**Tabla 2.** Otros síndromes de predisposición hereditaria al cáncer

NOMBRE DEL SÍNDROME	GENES RESPONSABLES	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	NÚMERO OMIM	MODELO DE HERENCIA	OTRAS DENOMINACIONES ABREVIATURAS
Bazex, síndrome de <sup>64</sup>	-	-	301845	LX-D	Síndrome de Bazex-Dupre Christol. BDC
Cáncer no medular de tiroides familiar <sup>65</sup>	-	-	188550	AD	Carcinoma papilar de tiroides familiar. CNMTF
Cáncer de próstata familiar <sup>66</sup>	-	-	176807	AD	CPF
Cáncer de testículo familiar <sup>67</sup>	-	-	273300	AR	CTF
Carcinoma de células escamosas esofágico <sup>68</sup>	-	-	133239	AD	CCEE
Carcinoma renal de células claras familiar <sup>29</sup>	*	-	144700	AD	Hipernefroma. CRCCF
Chediak-Higashi, síndrome de <sup>69</sup>	LYST	1q42.2-q42.2	214500	AR	SCH
Currarino, síndrome de <sup>70</sup>	HLXB9	7q36	176450	AD	Triada de Currarino. TC
Denys-Drash, síndrome de <sup>71</sup>	WT1	11p13	194080	AD	Pseudohermafroditismo y tumor de Wilms. SDD
Diamond-Blackfan, síndrome de <sup>72</sup>	RPS19	19q13.2	105650	AD	Anemia de Diamond-Blackfan; Síndrome de Aase-Smith. SDB
Disqueratosis congénita <sup>73</sup>	DKC1	Xq28	305000	LX-R	Síndrome de Zinsser-Cole-Engman. DQC
Esófago de Barret <sup>74</sup>	-	-	109350	AD	Metaplasia de Barret; Reflujo gastroesofágico. EB
Ferguson-Smith, síndrome de <sup>75</sup>	-	-	132800	AD	SFS
Glioma cerebral familiar <sup>76</sup>	-	-	137800	AD? AR?	GCF
Hemihipertrofia <sup>77</sup>	-	-	235000	AR? Multifactorial?	Hemihiperplasia. HH
Insensibilidad a los andrógenos, síndrome de <sup>78</sup>	AR (DHTR)	Xq11-q12	300068	LX-R	Feminización testicular. SIA
Linfoma de Hodgkin familiar <sup>79</sup>	-	-	236000	AR	LHF
Melanoma-astrocitoma, síndrome de <sup>80</sup>	CDKN2A	9p21	155755	AD	SMA

NOMBRE DEL SÍNDROME	GENES RESPONSABLES	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	NÚMERO OMIM	MODELO DE HERENCIA	OTRAS DENOMINACIONES ABREVIATURAS
Melanosis neurocutánea <sup>81</sup>	-	-	249400	esporádico	MN
Neutropenia congénita severa <sup>82</sup>	-	-	202700	AR	Enfermedad de Kostmann. NCS
Ollier, síndrome de <sup>83</sup>	PTHRI	3p22-p21.1	166000	AD?	Encondromatosis múltiple; Síndrome de Maffucci. SO
Pancreatitis hereditaria <sup>84</sup>	-	-	167800	AD	PH
Poliposis mixta hereditaria <sup>85</sup>	-	-	601228	AD	PMH
Reifenstein, síndrome de <sup>86</sup>	AR (DHTR)	Xq11-q12	312300	LX-R	Síndrome de insensibilidad parcial a los andrógenos. SR
Shwachman-Diamond, síndrome de <sup>87</sup>	SBDS	7q11	260400	AR	Lipomatosis congénita del páncreas; Síndrome de Shwachman-Bodian. SSD
Síndrome de predisposición a tumores rabdoideas <sup>88</sup>	SMARCB1	22q11	609322	AD?	SPTR
Tilosis palmoplantar con cáncer esofágico <sup>89</sup>	-	-	148500	AD	TCE
Trombocitopenia amegacariocítica congénita <sup>90</sup>	MPL	1p34	604498	AR	TAC
Trombocitopenia familiar con predisposición a la leucemia mielóide aguda <sup>91</sup>	CBFA2	21q22.3	601399	AD	Trastorno familiar de las plaquetas asociado a leucemia mielóide aguda. TF
WAGR, síndrome de <sup>92</sup>	Síndrome de genes contiguos (AN2, WT1)	11p13	194072	AD	Síndrome de tumor de Wilms-aniridia-anomalías genitourinarias- retraso mental. WAGR
Wiskott-Aldrich, síndrome de <sup>93</sup>	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 en<sup>94</sup>)

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 Vogelstein<sup>2</sup>, Frank<sup>4</sup>, Schneider<sup>14</sup>, Offit<sup>21</sup>, Nagy y cols.<sup>22</sup>, Lindor y Greene<sup>23</sup> y Marsh y Zori<sup>24</sup> y con la información obtenida en Mekusick<sup>12</sup>. 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<sup>12</sup>. 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.

**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 <sup>95</sup>	Trisomía 21	1/650 RNV	Trisomía 21. SDo
Síndrome de Klinefelter y variantes <sup>96</sup>	Varones con 2 o más cromosomas X	47, XXY: 1/2000 RNV X extras en varones 48, XXXY: 1/50.000 RNV 48, XYY: 49, XXXYY; y mosaicos: 1/20.000 RNV	SKI
Síndrome de Turner <sup>97</sup>	Monosomía X	1/4000-1/8000 RNV	Síndrome de Ullrich-Turner. STu
Trisomía 8 en mosaico <sup>98</sup>	Cromosoma 8 extra en algunas células, órganos o sistemas	Desconocida	T8

RNV: Recién nacidos vivos

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 4. Cabeza y cuello**

<b>Boca</b>	Carcinoma	BLM
	Carcinoma de células escamosas	XP, DQC
	Neuromas cutaneomucosos	MEN2
	Tumor osificante mandibular	HPT
<b>Nariz</b>	Carcinoma de células escamosas	FAN, BLM, XP, DQC
	Hamartomas	ET
	Melanoma de la mucosa nasal	SW
<b>Oído</b>	Schwanoma vestibular	NF2
	Tumor de sacos endolímfáticos	VHL
<b>Ojo</b>	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
	Fibrofoliculoma	BHD
	Hamartomas	SC
	Melanoma	MMF, XP, SW, RB, SMA, AT, SC, SLF, MN
	Mixoma cutáneo	CC
	Nevi displásicos	MMF, CC
	Quistes epidermoides	PAF
	Quistes sebáceos	PAF
	Tricolemoma/tricodiscoma/foliculoma	SC, BHD
	Tumor glándulas sebáceas	SL(*)
Teratoma	Teratoma presacro	TC

(\*) En síndrome de Muir Torre

**Tabla 7. Endocrino**

Suprarrenales	Adenoma Hemangioma Carcinoma adrenocortical Feocromocitoma	MEN1 VHL SBW, SLF, CC, HH MEN2, NF1, VHL, PF
Paratiroides	Adenoma/hiperplasia Carcinoma	BHD, MEN1, MEN2, HPT MEN1
Hipófisis	Adenoma	MEN1, CC
Tiroides	Carcinoma inespecífico Adenoma Carcinoma folicular Carcinoma medular Carcinoma papilar	CC, SW CC, ET SC, PAF, SW MEN2 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 Hamartoma Teratoma gástrico congénito Tumor carcinoide Tumor desmoide Tumor estromal	SL, CGD, PAF, CMOH, AT, BLM, PJ, SLF, SW, XP PJ, SG, SPJ SBW MEN1, NF1 PAF GIST
Hígado	Carcinoma hepatocelular Hepatoblastoma	ALPS, SBW, FAN PAF, SBW, SW, HH
Intestino delgado	Adenocarcinoma Hamartoma Tumor estromal	PAF, SL, PJ, SPJ PJ GIST
Páncreas	Adenoma Carcinoma Gastrinoma Quistes	VHL CMOH, SL, AT, BLM, MMF, SMA, PJ, CC, SPJ, VHL, PH, PAF, DQC MEN1, VHL VHL
Pólipos colónicos	Adenomas Hamartomas Hamartomas juveniles Juveniles atípicos Poliposis adenomatosa	PAF, SL, PMH, MYH SC, SPJ, PMH, ET PJ PMH PAF
Vesícula	Carcinoma	CMOH

**Tabla 9. Hematológico y linfático**

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

**Tabla 10. Mama y aparato reproductor de ambos sexos**

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

**Tabla 11. Nervioso Central**

<b>Cerebro</b>	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	
<b>Sistema nervioso</b>	Hemangioma medular	VHL
	Neuroblastoma	SBW, SLF
	Neurofibroma (medular)	NF1, NF2
	Paraganglioma	VHL, PF
	Schwanoma	NF2, NF1

**Tabla 12. Urinario**

<b>Pelvis renal</b>	Células transicionales	SL
<b>Riñón</b>	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
<b>Uréter</b>	Carcinoma	SL
<b>Vejiga</b>	Carcinoma	SL, SW

**Tabla 13. Abreviaturas utilizadas en las Tablas 4-12**

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

## 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. Rosenberg PS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood* 2003;101(3):822-6
26. 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
27. Wu L, Hickson ID. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 2003;426(6968):870-4
28. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. *N Engl J Med* 2001;344(25):1904-9
29. 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
30. 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
31. Mak BC, Yeung RS. The tuberous sclerosis complex genes in tumor development. *Cancer Invest* 2004;22(4):588-603
32. High A, Zedan W. Basal cell nevus syndrome. *Curr Opin Oncol* 2005;17(2):160-6
33. 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
34. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet* 2002;30(4):406-10
35. 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
36. Bataille V. Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer* 2003;39(10):1341-7
37. 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
38. 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
39. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer* 2005;5(5):367-75
40. Arun D, Gutmann DH. Recent advances in neurofibromatosis type 1. *Curr Opin Neurol* 2004;17(2):101-5
41. 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
42. 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
43. Pawlu C, Bausch B, Neumann HP. Mutations of the SDHB and SDHD genes. *Fam Cancer* 2005;4(1):49-54
44. 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
45. 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
46. Jo WS, Chung DC. Genetics of hereditary colorectal cancer. *Semin Oncol* 2005;32(1):11-23
47. 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
48. Howe JR, Sayed MG, Ahmed AF, et al. The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations. *J Med Genet* 2004;41(7):484-91
49. 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
50. 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

51. 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
52. 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
53. 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)
54. 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
55. 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
56. Ruteshouser EC, Huff V. Familial Wilms tumor. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004;129(1):29-34
57. 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
58. Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(24):4991-5004
59. Norgauer J, Idzko M, Panther E, et al. Xeroderma pigmentosum. *Eur J Dermatol* 2003;13(1):4-9
60. Wagner JE, Tolar J, Levran O, et al. Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood* 2004;103(8):3226-9
61. 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
62. Taylor MD, Liu L, Raffel C, et al. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 2002;31(3):306-10
63. 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
64. Stone SP, Buescher LS. Life-threatening paraneoplastic cutaneous syndromes. *Clin Dermatol* 2005;23(3):301-6
65. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;361(9356):501-11
66. Deutsch E, Maggiorella L, Eschwege P, et al. Environmental, genetic, and molecular features of prostate cancer. *Lancet Oncol* 2004;5(5):303-13
67. 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
68. 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
69. 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
70. Urioste M, Garcia-Andrade M del C, Valle L, et al. Malignant degeneration of presacral teratoma in the Currarino anomaly. *Am J Med Genet A* 2004;128(3):299-304
71. 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
72. Perkins SL. Pediatric red cell disorders and pure red cell aplasia. *Am J Clin Pathol* 2004;122 Suppl:S70-86
73. Marrone A, Walne A, Dokal I. Dyskeratosis congenita: telomerase, telomeres and anticipation. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15(3):249-57
74. Shaheen NJ. Advances in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2005;128(6):1554-66
75. 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



76. 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
77. 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
78. Alvarez NR, Lee TM, Solorzano CC. Complete androgen insensitivity syndrome: the role of the endocrine surgeon. *Am Surg* 2005;71(3):241-3
79. 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
80. 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
81. 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
82. Berliner N, Horwitz M, Loughran TP, Jr. Congenital and acquired neutropenia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004:63-79
83. 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
84. 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
85. 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
86. 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
87. Ancliff PJ. Congenital neutropenia. *Blood Rev* 2003;17(4):209-16
88. 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
89. 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
90. Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, et al. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 2001;97(1):139-46
91. 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
92. Dome JS, Coppes MJ. Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr* 2002;14(1):5-11
93. Ochs HD, Notarangelo LD. X-linked immunodeficiencies. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004;4(5):339-48
94. 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
95. Hitzler JK, Zipursky A. Origins of leukaemia in children with Down syndrome. *Nat Rev Cancer* 2005;5(1):11-20
96. Weiss JR, Moysich KB, Swede H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(1):20-6
97. 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
98. Schinzel A. *Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man*, second edition ed. Berlin: Walter de Gruyter, 2001





# CRITERIOS DIAGNÓSTICOS EN LOS SÍNDROMES DE CÁNCER HEREDITARIO

■  
Ángel Miguel Alonso Sánchez<sup>1</sup>, Sira Moreno Laguna<sup>1</sup>, José Ignacio Mayordomo Cámara<sup>2</sup>,  
Ignacio Blanco Guillermo<sup>3</sup>, Pedro Pérez Segura<sup>4</sup> y Carlos San Román Cos-Gayón<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Genética. Hospital Virgen del Camino. Pamplona, <sup>2</sup>Servicio de Oncología Médica. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza, <sup>3</sup>Unidad de Consejo Genético. Servicio de Prevención y Control del Cáncer. Instituto Catalán de Oncología. Hospital Durán i Reynals (ICO). Barcelona, <sup>4</sup>Servicio de Oncología Médica. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid, <sup>5</sup>Servicio de Genética. Servicio de Genética. Hospital 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<sup>1</sup>. 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 enunciadoras (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 recomendándose su lectura en profundidad.

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:

- |   |  |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Anemia de Fanconi.</li> <li>2. Ataxia-Teleangiectasia.</li> <li>3. Beckwith-Wiedeman, Síndrome de.</li> <li>4. Birt-Hogg-Dubé, Síndrome de.</li> <li>5. Bloom, Síndrome de.</li> <li>6. Colon Hereditario No Asociado A Poliposis, Cáncer de.</li> <li>7. Cowden, Síndrome de.</li> <li>8. Esclerosis Tuberosa.</li> <li>9. Feocromocitoma / Paranglioma Familiar.</li> <li>10. Gástrico, Cáncer.</li> <li>11. Gorlin, Síndrome de.</li> <li>12. Leiomiomatosis Hereditaria y Carcinoma Renal.</li> <li>13. Li-Fraumeni, Síndrome de.</li> <li>14. Mama y Ovario Hereditario, Cáncer de.</li> <li>15. Medular de Tiroides Familiar, Carcinoma.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>16. Melanoma Familiar.</li> <li>17. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 1.</li> <li>18. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2A.</li> <li>19. Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2B.</li> <li>20. Neurofibromatosis 1.</li> <li>21. Neurofibromatosis 2.</li> <li>22. Nijmegen, Síndrome de.</li> <li>23. Páncreas Hereditario, Cáncer de.</li> <li>24. Peutz-Jeghers, Síndrome de.</li> <li>25. Poliposis Adenomatosa.</li> <li>26. Próstata Hereditario, Cáncer de.</li> <li>27. Renal Papilar Hereditario, Carcinoma.</li> <li>28. Simpson-Golabi-Behmel, Síndrome de.</li> <li>29. Sotos, Síndrome de.</li> <li>30. von Hippel-Lindau, Síndrome de.</li> <li>31. Werner, Síndrome de.</li> <li>32. Wilms Familiar, Tumor de.</li> <li>33. Wiskott-Aldrich, Síndrome de.</li> <li>34. Xeroderma Pigmentoso.</li> </ol> |
|---|--|

## ANEMIA DE FANCONI<sup>2</sup>

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 anomalías 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.*

## **ATAXIA-TELEANGIECTASIA <sup>3</sup>**

### CRITERIOS NIH

#### **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.

### **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.

## **SÍNDROME DE BECKWITH-WIEDEMAN<sup>4</sup>**

### **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. Onfalocelo/ 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 dos criterios mayores y uno menor.*

## **SÍNDROME DE BIRT-HOGG-DUBÉ<sup>5,6</sup>**

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 cromófbos.
3. Neumotórax espontáneo familiar.
  - *Criterio 1 de confirmación. Criterios 2 y 3 de sospecha.*

## **SÍNDROME DE BLOOM<sup>7</sup>**

### CRITERIOS DEL REGISTRO DE SÍNDROME DE BLOOM

#### ***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.

#### ***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.

### **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.
  - *El intercambio de cromátidas hermanas es único criterio diagnóstico objetivo.*

## **CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO ASOCIADO A POLIPOSIS**

### **Crterios de Ámsterdam<sup>8</sup>**

1. Al menos tres familiares con cáncer colorrectal.
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 familiares 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.*

### **Crterios de Ámsterdam II<sup>9,10</sup>**

1. Al menos tres familiares con cáncer asociado a CCHNP\* 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.*

### **Crterios de Bethesda<sup>11</sup>**

1. Cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años de edad.
2. Presencia de tumores colorrectales sincrónicos, metacrónicos, u otros tumores asociados a CCHNP\*, 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 CCHNP\* 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 CCHNP\* diagnosticado a cualquier edad.
  - *Si se cumple al menos un criterio debe realizarse estudio de inestabilidad o inmunohistoquímica.*

## SÍNDROME DE COWDEN

### INTERNATIONAL COWDEN CONSORTIUM OPERATIONAL CRITERIA <sup>12</sup>

#### **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 <sup>13</sup>.

#### **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.

\*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.

- *Deben cumplirse: lesiones cutáneas patognomónicas solas (si 6 o más pápulas faciales, al menos tres de las cuales deben ser tricolemomas, o pápulas faciales y papilomatosis mucosa oral, o papilomatosis oral y queratosis acral, o 6 o más queratosis palmoplantares), o 2 o más criterios mayores, o 1 criterio mayor y tres menores, o 4 criterios menores.*

## ESCLEROSIS TUBEROSA

CRITERIOS NIH<sup>14</sup> Y REVISADOS<sup>15</sup>

### **Crterios 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 sebependimal de células gigantes.
9. Rabdomioma cardíaco único o múltiple.
10. Linfangiomatosis.
11. Angiomiolipoma renal.

### **Crterios 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. Parcheado retinal acromático.
8. Lesiones cutáneas en 'confeti'.
9. Quistes renales múltiples.
  - *Diagnóstico definitivo: dos criterios mayores o uno mayor y dos menores.*
  - *Diagnóstico probable: un criterio mayor y un criterio menor.*
  - *Diagnóstico posible: un criterio mayor o más de un criterio menor.*

## FEOCROMOCITOMA / PARAGANGLIOMA FAMILIAR<sup>16,17</sup>

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

## CÁNCER GÁSTRICO

### **Cáncer Gástrico difuso hereditario (IGCLC\*)<sup>18</sup>**

1. Dos o más casos de cáncer gástrico difuso documentados en familiares de primer o segundo 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 primer o segundo grado, independientemente de la edad.
  - *Debe cumplirse al menos un criterio.*

### **Cáncer Gástrico difuso hereditario (Criterio 1A)<sup>19</sup>**

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

### **Cáncer Gástrico intestinal familiar (IGCLC\*)<sup>18</sup>**

En poblaciones de alta incidencia:

1. Al menos tres familiares con cáncer gástrico intestinal, siendo uno de ellos familiar de primer 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 primer o segundo grado con cáncer gástrico intestinal, siendo al menos 1 de ellos diagnosticado antes de los 50 años.
2. Tres o más familiares de primer o segundo grado con cáncer gástrico intestinal, independientemente de la edad.
  - *Debe cumplirse al menos un criterio.*

---

\*IGCLC= International Gastric Cancer Linkage Consortium

## **SÍNDROME DE GORLIN (SÍNDROME DE CARCINOMA BASOCELULAR NEVOIDE, NBCC) <sup>20,21</sup>**

### ***Crterios Mayores***

1. Más de dos carcinomas basocelulares o uno en un menor de 20 años.
2. Queratoquistes de los maxilares demostrados con estudio histopatológico.
3. Tres o mas 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.

### ***Crterios Menores***

1. Macrocefalia.
2. Malformaciones congénitas: fisura labial o palatina, prominencia frontal, facies ancha, hipertelorismo moderado a severo.
3. Otras alteraciones esqueléticas: deformación de Sprengel, deformación pectoral, sindactilia de los dedos.
4. Anomalías radiográficas: puente en silla turca, anomalías vertebrales tales como hemivértebras, fusión o elongación de los cuerpos vertebrales, defectos en manos y pies.
5. Fibroma de ovario.
6. Meduloblastoma.  
– *Deben cumplirse dos criterios mayores o uno mayor y dos menores.*

## **LEIOMIOMATOSIS HEREDITARIA Y CARCINOMA RENAL <sup>22,23</sup>**

1. Más de 10 lesiones cutáneas compatibles con leiomiomas (al menos uno de ellos verificado histológicamente).
2. Leiomiomas uterinos.
3. Carcinoma papilar renal (histológicamente tipo II)  
– *Criterio 1 de confirmación. Criterios 2 y 3 de sospecha.*

## **SÍNDROME DE LI-FRAUMENI**

### ***Síndrome de Li-Fraumeni clásico <sup>24</sup>***

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<sup>25</sup>**

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.*

## **CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO**

### **Grupo de trabajo de Cáncer Hereditario de la SEOM<sup>26</sup>**

1. Un caso de cáncer de mama menor o igual a 40 años.
2. Diagnóstico de cáncer de mama y ovario en el mismo individuo.
3. Dos o más casos de cáncer de mama, uno de los cuales en menor de 50 años o bilateral.
4. Un caso de cáncer de mama a edad menor o igual a 50 años o bilateral y un caso de cáncer de ovario en familiares de primer o segundo grado.
5. Tres casos de cáncer de mama y ovario (al menos un caso de ovario) en familiares de primer o segundo grado.
6. Dos casos de cáncer de ovario en familiares de primer o segundo grado.
7. Un caso de cáncer de mama en un varón y familiar de primer o segundo grado con cáncer de mama u ovario.
  - *Debe cumplirse al menos un criterio.*

### **“Cancer Family Study Group” de Gran Bretaña (UKCFSG)<sup>27,28</sup>**

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 primer grado de los otros dos.
  - *Debe cumplirse al menos un criterio.*

## **CARCINOMA MEDULAR DE TIROIDES FAMILIAR**<sup>29</sup>

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

## **MELANOMA FAMILIAR**

### ***Melanoma Genetics Consortium***<sup>30</sup>

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

## **NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO 1**<sup>29</sup>

### ***Caso***

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

### ***Familia***

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

## **NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO 2A**<sup>29</sup>

1. Carcinoma medular de tiroides.
2. Feocromocitoma uni o bilateral.
3. Tumores paratiroideos.  
– *Deben cumplirse todos.*

## **NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO 2B**<sup>29</sup>

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

## NEUROFIBROMATOSIS 1

### CRITERIOS NIH<sup>31</sup>

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 primer grado con neurofibromatosis diagnosticada  
– *Deben cumplirse al menos dos criterios.*

## NEUROFIBROMATOSIS 2

### CRITERIOS NIH MODIFICADOS<sup>9,27</sup>

1. Schwannomas vestibulares bilaterales.
2. Un familiar de primer 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.  
– *Debe cumplirse al menos un criterio.*

## SÍNDROME DE NIJMEGEN<sup>32</sup>

### ***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 rhabdomioma perianal.

### ***Manifestaciones clínicas presentes en <50% de los pacientes***

1. Defectos en la pigmentación cutánea (manchas café con leche y áreas de vitiligo).
2. Pelo de la cabeza fino en la primera infancia. Encanecimiento en la adolescencia.
3. Anomalías leves en las extremidades (p.e. clinodactilia del 5.º 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.

### ***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.

*– Las alteraciones cromosómicas constituyen los únicos criterios diagnósticos objetivos.*

## **CÁNCER DE PÁNCREAS HEREDITARIO<sup>33</sup>**

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

## **SÍNDROME DE PEUTZ-JEGHERS**

1. Presencia de al menos un pólipo hamartomatoso gastrointestinal histológicamente verificado, más historia familia positiva o presencia de máculas hiperpigmentadas mucosas perianales o periorales<sup>34</sup>.

2. Presencia de al menos dos pólipos hamartomatosos gastrointestinales histológicamente verificados<sup>35</sup>.  
– *Debe cumplirse al menos un criterio.*

## **POLIPOSIS ADENOMATOSA**

### ***Poliposis Adenomatosa Familiar***<sup>36</sup>

1. Más de 100 pólipos adenomatosos colorrectales.
2. En menores de 20 años, más de 20 pólipos adenomatosos y un progenitor afecto.  
– *Debe cumplirse al menos un criterio.*

### ***Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada***<sup>9,37</sup>

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.  
– *Debe cumplirse al menos un criterio.*

## **CÁNCER DE PRÓSTATA HEREDITARIO**<sup>38</sup>

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

## **CARCINOMA RENAL PAPILAR HEREDITARIO**<sup>39,40</sup>

1. Múltiples tumores renales papilares (histología tipo 1), bilaterales.
2. Historia familiar de cáncer renal.  
– *Deben cumplirse todos.*

## **SÍNDROME DE SIMPSON-GOLABI-BEHMEL**<sup>6,41</sup>

### ***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 marróncea, manchas pigmentadas en la zona perioral y palatina y policitemia.
6. Riesgo de padecer tumores embrionarios: sobre todo tumor de Wilms y neuroblastoma.

## SÍNDROME DE SOTOS

CRITERIOS INICIALES <sup>42</sup> Y MODIFICADOS <sup>43</sup>

### ***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 tres criterios mayores y un menor.*

## ENFERMEDAD DE VON HIPPEL LINDAU <sup>44,45</sup>

### ***En presencia de historia familiar de von Hippel-Lindau (VHL)***

1. Hemangioblastoma único de retina.
2. Hemangioblastoma único de cerebelo.
3. Carcinoma renal de células claras.
4. Feocromocitoma.
5. Cistoadenoma seroso microquístico en el páncreas.  
– *Debe cumplirse al menos un criterio.*

### ***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 un criterio.*

### ***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.

## SÍNDROME DE WERNER

REGISTRO INTERNACIONAL DE SÍNDROME DE WERNER <sup>46</sup>

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

1. Cataratas (bilaterales).
2. Patología dermatológica característica (piel tersa, 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 no cardinales.
  - 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.

**TUMOR DE WILMS FAMILIAR<sup>47</sup>**

1. Patrón de 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) o el síndrome de Denys-Drash, deben estar descartados.
  - *Deben cumplirse todos.*

**SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH<sup>48</sup>**

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 de la enfermedad en la rama materna.
3. Aumento de la incidencia de neoplasias, especialmente linfomas.
4. Eczema.
5. En ocasiones, signos de trastornos de la 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.*

## **XERODERMA PIGMENTOSO**<sup>49</sup>

### ***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 tres sistemas.*

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. 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
2. Alter BP LJ. Fanconi Anemia. Vol. 2006, 2005
3. Perlman S, Becker-Catania S, Gatti RA. Ataxia-telangiectasia: diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Neurol* 2003; 10:173-82
4. Weksberg R, Shuman C, Smith AC. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005; 137:12-23
5. 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
6. 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
7. Amor-Guéret M. Bloom's syndrome: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Bloomsyndrome.pdf>, 2004
8. 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

9. Evans DG, Huson SM, Donnai D, et al. A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med* 1992; 84:603-18
10. 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
11. 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
12. Eng C. Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *J Med Genet* 2000; 37:828-30
13. 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
14. Hyman MH, Whittemore VH. National Institutes of Health consensus conference: tuberous sclerosis complex. *Arch Neurol* 2000; 57:662-5
15. Roach ES, Sparagana SP. Diagnosis of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 2004; 19:643-9
16. Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med* 2002; 346:1459-66
17. 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
18. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, et al. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet* 1999; 36:873-80
19. 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
20. 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
21. Gorlin RJ. Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome. *Genet Med* 2004; 6:530-9
22. Kiuru M, Launonen V. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC). *Curr Mol Med* 2004; 4:869-75
23. 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
24. Li FP, Fraumeni JF, Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969; 71:747-52
25. 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
26. Hoya MDI. Documento de consenso sobre cáncer de mama hereditario. Documentos de Consenso en Cáncer Hereditario. Madrid: Dispublic, 2004:13-5
27. 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
28. 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
29. 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
30. 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

31. 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
32. Chrzanowska KH JC. Nijmegen breakage syndrome: <http://www.emedicine.com/DERM/topic725.htm>, 2006
33. Hruban RH, Petersen GM, Goggins M, et al. Familial pancreatic cancer. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 4:69-73
34. 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
35. Tomlinson IP, Houlston RS. Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* 1997; 34:1007-11
36. Bussey H. Familial Polyposis Coli. Family studies, histopathology, differential diagnosis and results of treatment. Baltimore: The John Hopkins University Press, 1975
37. Knudsen AL, Bisgaard ML, Bulow S. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* 2003; 2:43-55
38. Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 2002; 168:906-13
39. Dharmawardana PG, Giubellino A, Bottaro DP. Hereditary papillary renal carcinoma type I. *Curr Mol Med* 2004; 4:855-68
40. Schmidt L, Lubensky I, Linehan WM, Zbar B. Hereditary papillary renal carcinoma: pathology and pathogenesis. *Contrib Nephrol* 1999; 128:11-27
41. 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
42. Cole TR, Hughes HE. Sotos syndrome: a study of the diagnostic criteria and natural history. *J Med Genet* 1994; 31:20-32
43. Tatton-Brown K, Rahman N. Clinical features of NSD1-positive Sotos syndrome. *Clin Dysmorphol* 2004; 13:199-204
44. Maher ER, Kaelin WG, Jr. von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76:381-91
45. Lonser RR, Glenn GM, Walther M, et al. von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003; 361:2059-67
46. Carol C. Diagnostic criteria of Werner syndrome: <http://www.wernersyndrome.org/registry/diagnostic.html>, 2005
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](http://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